



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES
ORIENTACIÓN PROFESIONALIZANTE

**PRODUCCIÓN Y FORMULACIÓN DE *Trichoderma*
asperellum PARA EL MANEJO DE PATÓGENOS DE
LA RAÍZ DE CAÑA DE AZÚCAR**

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 A L E S

P R E S E N T A

ING. YANETH MARGARITA LÓPEZ ALCÁNTARA

DIRECTOR

DR. EDGAR MARTÍNEZ FERNÁNDEZ

CODIRECTOR

DR. VÍCTOR MANUEL HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ



CUERNAVACA MORELOS, DICIEMBRE DEL 2018

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría y el financiamiento de este proyecto.

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por permitir realizar mis estudios de maestría en el Centro de Investigaciones Biológicas.

Al Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) por la oportunidad brindada para realizar mis estudios en la Maestría en Manejo de Recursos Naturales.

A mi asesor de tesis Dr. Edgar Martínez Fernández por su acertada orientación, por compartir sus conocimientos invaluable que me brindo para llevar a cabo esta investigación y sobretodo por la paciencia y apoyo brindado durante la realización de mis estudios de maestría. Además de ayudarme a mejorar como alumna.

Al Dr. Victor Manuel Hernández Velázquez por fungir como codirector de esta investigación y por sus aportes fundamentales durante la realización de este trabajo; a la Dra. Karla Murillo Alonso por compartir sus conocimientos, sus sugerencias y consideraciones durante el desarrollo de esta investigación.

Al comité evaluador: M. en C. Ma. De Lourdes Acosta Urdapilleta y Dr. Guadalupe Peña Chora por su dedicación y valiosos aportes para enriquecer esta investigación; así como al comité revisor Dra. Maura Telléz Telléz y Dra. Verónica Obregón Barboza por las valiosas contribuciones y tiempo dedicado para corregir el manuscrito final.

A la M. en C. Patricia Martínez Jaimes por su apoyo y disposición brindada para realizar esta investigación.

A mis compañeros de maestría Lizbeth, Marlem, Yakin, Rodolfo, Marco Polo y Ricardo por compartir sus conocimientos y por su valiosa amistad.

A mi familia, a mis papás, hermanos y sobrinos por su apoyo en cada meta que me propongo.

DEDICATORIA

Este trabajo de tesis es dedicado a mi mamá Margarita Alcántara Valeriano por ser una madre excepcional, por educarnos de la mejor manera posible, también, por motivarme en situaciones difíciles para las dos. A mi papá Gerardo López Mendoza, quien es y será siendo siempre un ejemplo a seguir, enseñándonos a esforzarnos al máximo y dar lo mejor de nosotros en cada meta que nos propongamos, por estar pendiente de nosotros, por brindarnos su apoyo incondicional y su amor a pesar de la distancia, los amo papás. A mis hermanos Sergio, Oscar, Adolfo y Gerardo, por ayudarme, por sus ánimos y siempre estar pendiente de nosotros. A mis sobrinos Aleidi, Yohali, Karla, Eury, Kevin y Joshua por brindarme su cariño y esos momentos de felicidad en los que alegran cada uno de mis días, espero que estos sean un ejemplo a seguir, los quiero mucho.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	5
CAPÍTULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA	7
2.1. IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR	7
2.2. MARCHITEZ DE LA CAÑA DE AZÚCAR	9
2.3. TAXONOMÍA DEL GÉNERO <i>Fusarium</i>	10
2.4. PRINCIPIOS DE CONTROL DE LAS ENFERMEDADES DE PLANTAS	11
2.5. MANEJO DE <i>Fusarium</i> SPP. EN CAÑA DE AZÚCAR	12
2.6. CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES	14
2.7. <i>Trichoderma</i> SPP.	15
2.8. REQUERIMIENTOS PARA EL CRECIMIENTO DE <i>Trichoderma</i> SPP.	16
2.9. MECANISMOS DE ACCIÓN DE <i>Trichoderma</i> SPP.	17
2.9.1. COMPETENCIA	17
2.9.2. ANTIBIOSIS	18
2.9.3. MICOPARASITISMO	19
2.9.4. PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO	20
2.10. PRODUCCIÓN DE HONGOS ANTAGONISTAS	21
2.10.1. FERMENTACIÓN	21
2.10.1.1. FERMENTACIÓN LÍQUIDA	22
2.10.1.2. FERMENTACIÓN SÓLIDA	22
2.10.1.3. FERMENTACIÓN DIFÁSICA	24
2.11. FORMULACIONES DE HONGOS ANTAGONISTAS	24
2.12. TIPOS DE FORMULACIONES	27
2.12.1. FORMULACIONES LÍQUIDAS	31
2.12.2. FORMULACIONES SÓLIDAS	31
2.13. ESTABILIDAD DE LOS FORMULADOS	33
2.14. APLICACIÓN DE FORMULADOS	33
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN	35

CAPÍTULO 4. OBJETIVOS	35
4.1. OBJETIVO GENERAL	35
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4.3. HIPÓTESIS	35
CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS	36
5.1. ACTIVACIÓN DE LA CEPA DE <i>T. asperellum</i>	36
5.2. SELECCIÓN DE SUSTRATOS PARA LA PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE <i>T. asperellum</i>	36
5.2.1. MANEJO DE SUSTRATOS PARA DETERMINAR LA HUMEDAD ÓPTIMA PARA LA PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE <i>T. asperellum</i>	36
5.2.2. PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE <i>T. asperellum</i> EN GRANOS DE ARROZ Y SORGO CON DIFERENTE CONTENIDO DE HUMEDAD	37
5.2.3. INOCULACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS CON <i>T. asperellum</i>	39
5.3. CANTIDAD ÓPTIMA DE INÓCULO DE <i>T. asperellum</i> PARA LA PRODUCCIÓN MASIVA DE CONIDIOS EN SUSTRATO DE ARROZ	42
5.4. PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE <i>T. asperellum</i> EN SUSTRATO DE ARROZ	42
5.5. CALIDAD DE LA BIOMASA DE <i>T. asperellum</i>	44
5.6. FORMULACIONES DE <i>T. asperellum</i>	47
5.6.1. EVALUACIÓN DE LAS FORMULACIONES DE <i>T. asperellum</i>	48
CAPÍTULO 6. RESULTADOS	50
6.1. PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE <i>T. asperellum</i> EN SUSTRATO DE ARROZ CON DIFERENTE CONTENIDO DE HUMEDAD Y TIEMPO DE ESTERILIZACIÓN	50
6.2. PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE <i>T. asperellum</i> EN SUSTRATO DE SORGO CON DIFERENTE CONTENIDO DE HUMEDAD Y TIEMPO DE ESTERILIZACIÓN	54
6.3. PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE <i>T. asperellum</i> EN SUSTRATO DE ARROZ CON DIFERENTE CANTIDAD DE INÓCULO	57
6.4. PRODUCCIÓN Y CALIDAD DE CONIDIOS DE <i>T. asperellum</i>	59
6.5. COMPOSICIÓN DE FORMULACIONES DE <i>T. asperellum</i> Y EVALUACIÓN	60
CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN	64
CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES	72
CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA	73

ÍNDICE DE CUADROS

CONTENIDO	PÁGINA
CUADRO 1. CONSIDERACIONES DE FORMULACIONES DE ACUERDO CON EL TIPO DE PATÓGENO	26
CUADRO 2. DISTRIBUCIÓN DE BIOPRODUCTOS BASADOS EN <i>Trichoderma</i> SPP. DISPONIBLES EN EL MERCADO MUNDIAL	29
CUADRO 3. LISTA DE AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO BASADOS EN ESPECIES DE <i>Trichoderma</i> (Verma <i>et al.</i> , 2007)	30
CUADRO 4. TRATAMIENTOS PARA DETERMINAR HUMEDAD EN SUSTRATOS DE ARROZ Y SORGO PARA LA PRODUCCIÓN DE <i>T. asperellum</i>	37
CUADRO 5. PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE <i>T. asperellum</i> EN SUSTRATO DE ARROZ CON DIFERENTE CONTENIDO DE HUMEDAD	51
CUADRO 6. PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE <i>T. asperellum</i> EN SUSTRATO DE SORGO CON DIFERENTE CONTENIDO DE HUMEDAD	55
CUADRO 7. COMPOSICIÓN DE LAS FORMULACIONES A BASE DE CONIDIOS DE <i>T. asperellum</i>	60
CUADRO 8. UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS Y PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE CONIDIOS DE <i>T. asperellum</i> EN TRES FORMULADOS ALMACENADOS TRES MESES.	61

ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINA
FIGURA 1. PROCESO DE PRODUCCIÓN DE <i>Trichoderma</i> SPP. MEDIANTE SISTEMA DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO.	24
FIGURA 2. ESTADÍSTICAS DEL MERCADO DE BIOFUNGICIDAS DE <i>Trichoderma</i> SPP. Y OTROS BIOFUNGICIDAS, QUE TIENEN COMO PRINCIPIO ACTIVO BACTERIAS, NEMATODOS Y VIRUS.	28
FIGURA 3. SUSTRATO DE ARROZ EN ESTUFA A 110 °C.	38
FIGURA 4. PRODUCCIÓN DE CONIDIOS EN SUSTRATO DE ARROZ. a) COLONIAS DE <i>T. asperellum</i> . b) SUSPENSIONES CONIDIALES. c) SUSTRATO DE ARROZ INOCULADO CON <i>T. asperellum</i> E INCUBADO A 24 ± 2°C.	39
FIGURA 5. SUSTRATO DE ARROZ INOCULADO CON <i>T. asperellum</i> INCUBADO DURANTE 15 DÍAS. a) GRANO DE ARROZ ESPORULADO DE <i>T. asperellum</i> . b) SUSPENSIÓN CONIDIAL DE <i>T. asperellum</i> .	40
FIGURA 6. EXTRACCIÓN DE BIOMASA DE <i>T. asperellum</i> . a) DESHIDRATACIÓN DEL SUSTRATO ESPORULADO. b) TAMIZADO DE LOS GRANOS DE ARROZ CON <i>T. asperellum</i> .	41
FIGURA 7. INTEGRACIÓN DE LAS FORMULACIONES DE <i>T. asperellum</i> . a) EXCIPIENTES Y BIOMASA DEL FORMULADO TRES. b) COMPOSICIÓN DE FORMULADOS EN CONDICIONES ASÉPTICAS.	48
FIGURA 8. EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN DE CONIDIOS DE <i>T. asperellum</i> . a) CORTES DE MEDIO DE CULTIVO EMA CON CONIDIOS DE <i>T. asperellum</i> . b) CONIDIOS DE <i>T. asperellum</i> GERMINADOS Y NO GERMINADOS.	49
FIGURA 9. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LOS TRATAMIENTOS (PORCENTAJE DE HUMEDAD Y TIEMPO DE ESTERILIZACIÓN) Y LA PRODUCCIÓN DE CONIDIOS/g DE SUSTRATO DE ARROZ DE ACUERDO CON LA PRUEBA TUKEY (P≤0.05).	52
FIGURA 10. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE CANTIDAD DE BIOMASA DE <i>T. asperellum</i> PRODUCIDA SOBRE SUSTRATO DE ARROZ CON DIFERENTE CONTENIDO DE HUMEDAD Y TIEMPO DE ESTERILIZACIÓN DE ACUERDO CON LA PRUEBA TUKEY (P≤0.005).	54
FIGURA 11. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LOS TRATAMIENTOS (PORCENTAJE DE HUMEDAD Y TIEMPO DE ESTERILIZACIÓN) Y LA PRODUCCIÓN DE CONIDIOS/g DE SUSTRATO DE SORGO DE ACUERDO CON LA PRUEBA TUKEY (P≤0.05).	56

FIGURA 12.	COMPARACIÓN DE MEDIAS DE CANTIDAD DE BIOMASA DE <i>T. asperellum</i> PRODUCIDA SOBRE SUSTRATO DE SORGO CON DIFERENTE CONTENIDO DE HUMEDAD Y TIEMPO DE ESTERILIZACIÓN DE ACUERDO CON LA PRUEBA TUKEY ($P \leq 0.05$).	57
FIGURA 13.	COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LOS TRATAMIENTOS (CANTIDAD DE INOCULO DE <i>T. asperellum</i> Y PRODUCCIÓN DE CONIDIOS/g DE SUSTRATO DE ARROZ).	58
FIGURA 14.	EVALUACIÓN DE GERMINACIÓN Y PUREZA DE CONIDIOS DE <i>T. asperellum</i> PRODUCIDOS EN FERMENTACIÓN SÓLIDA EN SUSTRATO DE ARROZ. a) CONIDIO GERMINADO DE <i>T. asperellum</i> INCUBADO DURANTE 16 HORAS EN MEDIO DE CULTIVO EMA. b) COLONIAS DE <i>T. asperellum</i> INCUBADAS 48 HORAS EN MEDIO DE CULTIVO EMA CON Y SIN CLORANFENICOL.	59
FIGURA 15.	FORMULACIONES Y TESTIGO (CONIDIOS SIN FORMULAR) DE <i>T. asperellum</i> .	60
FIGURA 16.	PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE LOS CONIDIOS DE <i>T. asperellum</i> EN TRES FORMULADOS. a) PORCENTAJES INICIALES DE GERMINACIÓN DE CONIDIOS EN FORMULADOS. b) PORCENTAJES DE GERMINACIÓN DESPUÉS DE 30 DÍAS DE ALMACENAMIENTO DE LOS FORMULADOS. c) PORCENTAJES DE GERMINACIÓN DESPUÉS DE 60 DÍAS DE ALMACENAMIENTO DE LOS FORMULADOS. d) PORCENTAJES DE GERMINACIÓN DESPUÉS DE 90 DÍAS DE ALMACENAMIENTO DE LOS FORMULADOS.	63

RESUMEN

La caña de azúcar es uno de los cultivos más representativos del estado de Morelos abarcando una superficie de 22 128 has con un rendimiento promedio de 111 ton/ha. La producción es afectada por varios factores, uno de mayor importancia son los hongos del género *Fusarium* spp. que infectan las raíces lo cual ocasiona la marchitez de las plantas. Habitualmente para el control de esta enfermedad se recomienda la aplicación de diferentes fungicidas cuya efectividad es limitada y ocasionan daños al ambiente, por lo que es necesario buscar alternativas viables para el manejo de esta enfermedad. Como resultado de investigaciones anteriores en el Centro de Investigaciones Biológicas de la UAEM se ha integrado un cepario que cuenta con aislamientos de *Trichoderma* spp., obtenidos de campos de cultivo de caña de azúcar de varios municipios del estado de Morelos. Mediante pruebas *in vitro* se ha demostrado que la cepa de *T. asperellum* es altamente antagonista a *Fusarium* spp. Este trabajo tuvo como objetivo general evaluar la producción de conidios de *T. asperellum* en dos sustratos naturales y proponer una formulación para su aplicación en campo. Se evaluarón los sustratos de granos de arroz y sorgo con diferente contenido de humedad con tiempos variados de esterilización, bajo un diseño completamente al azar con 16 tratamientos, un testigo y cuatro repeticiones para cada sustrato. Las variables respuesta fueron: la producción de conidios y la cantidad de biomasa (mezcla de residuos del sustrato y conidios). Asimismo, se determinó la cantidad óptima de inóculo de *T. asperellum* para la producción masiva de conidios en sustrato de arroz. La mayor producción de conidios (9.34×10^8 conidios/g) se presentó en el sustrato de arroz con un contenido de humedad de 28.58% esterilizado durante 15 minutos y la mayor cantidad de biomasa se obtuvo con el sustrato con un contenido de humedad del 29.44% y fue esterilizado durante 15 minutos ($P \leq 0.05$, Tukey). En el sustrato de sorgo se registró la mayor producción de conidios/g (1.49×10^8) cuando presentó una humedad de 20.87% y fue esterilizado por 15 minutos ($P < 0.05$); sin embargo, el análisis de varianza para la cantidad de biomasa no mostró diferencias significativas entre los tratamientos, presentando menos de 0.56 g. Para la producción masiva de conidios de *T. asperellum* sobre sustrato de arroz la cantidad óptima

de inóculo fue de 3 mL. Se evaluaron tres formulaciones compuestas con talco, yeso y biomasa de *T. asperellum*, bajo un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos incluido un testigo y cuatro repeticiones. La viabilidad de las formulaciones se determinó mediante la evaluación de la germinación de los conidios en cada una de las formulaciones y en el testigo, al establecer las formulaciones y a intervalos de 30 días por 3 meses almacenados en oscuridad y a temperatura ambiente; también, se determinó la cantidad de UFC/g de cada formulado. En las formulaciones no se observó una disminución progresiva de la viabilidad de los conidios y la cantidad de UFC en los tres meses de almacén. En la evaluación inicial de las formulaciones 1, 2, 3 y el testigo presentaron 92.83, 90.57, 89.20 y 88.94% de viabilidad, respectivamente. Esta viabilidad se redujo gradualmente después de 3 meses de almacén a 92.31, 88.22, 89.09 y 87.50% respectivamente. La cantidad de UFC/g de los formulados y el testigo se redujo en un 0.53, 2.63, 0.13 y 1.6% durante los tres meses de almacén.

ABSTRACT

Sugarcane is one of the most representative crops in the state of Morelos covering an area of 22 128 ha with an average yield of 111 ton/ha. The production is affected by several factors, one of major importance are the fungi of the genus *Fusarium* spp. that infect the roots causing a wilting of the plants. Usually for the control of this disease is recommended the application of different fungicides whose effectiveness is limited and cause damage to the environment, so it is necessary to look for viable alternatives for the management of this disease. As a result of previous investigations in the Center of Biological Research of the UAEM has been integrated a strains collection that counts with isolates of *Trichoderma* spp., obtained from fields of sugarcane of several municipalities of the state Morelos. *In vitro* tests have shown that the *T. asperellum* strain is highly antagonistic to *Fusarium* spp. The general objective of this work was evaluate the production of conidia of *T. asperellum* in two natural substrates and to propose a formulation for its application in field. Substrates of grains of rice and sorghum with different moisture content and with varying sterilization times were evaluated, under a completely random design with 16 treatments, one control and four repetitions for each substrate. The response variables were: the production of conidia and the amount of biomass (mixture of substrate residues and conidia). The optimal amount of *T. asperellum* inoculum was also determined for the massive production of conidia in rice substrate. The highest production of conidia (9.34×10^8 conidia/g) was present in rice substrate with a moisture content of 28.58% sterilized for 15 minutes and the highest amount of biomass was obtained with the substrate with a moisture content of 29.44% and sterilized for 15 minutes ($P \leq 0.05$, Tukey). In the sorghum substrate the highest conidia production (1.49×10^8 conidia/g) was registered when it present a humidity of 20.87% and was sterilized during 15 minutes ($P < 0.05$); however, the analisis of variance for the amount of biomass showed no significant difference between treatments, presenting less than 0.56 g. For the massive production of *T. asperellum* conidia on rice substrate the optimal amount of inoculum was 3 mL. Three formulations composed of talc, gypsum and *T. asperellum* biomass were evaluated under a completely randomized desing with four treatments including a control and four repetitions.

The viability of the formulations was determined by evaluating the germination of the conidia in each of the formulations and in the control, when establishing the formulations and at intervals of 30 days for 3 months stored in the dark and at room temperature; the amount of CFU/g of formulated was also determined. In the formulations there was no a progressive decrease in the viability of the conidia and the amount of CFU in the three months of storage. In the initial evaluation of formulations 1, 2, 3 and the control presented 92.83, 90.57, 89.20 and 88.94% viability, respectively. This viability was gradually reduced after 3 months of storage at 92.31, 88.22, 89.09 and 87.50% respectively. The amount of CFU/g of the formulated and the control was reduced by a 0.53, 2.63, 0.13 and 1.6% during the three months of storage.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es uno de los cultivos industriales de mayor importancia a nivel mundial (Hernández, 2014). En México es una importante fuente de divisas y empleo para una gran parte del sector de la población rural (DOF, 2015). En el estado de Morelos su importancia se debe a la cantidad de superficie que se destina a la producción de este cultivo y los rendimientos más altos registrados a nivel nacional (SIAP, 2017).

Un factor que ha limitado el desarrollo y los rendimientos de este cultivo son las plagas y enfermedades (Suárez *et al.*, 2018; Zhang y Govindaraju, 2018). Las enfermedades producidas por microorganismos fitopatógenos constituyen la mayor causa de pérdida en la producción agrícola (Rey *et al.*, 2000), los hongos pueden causar hasta el 50% de pérdidas de la producción nacional (Ibarra *et al.*, 2006). La marchitez es una de las enfermedades fungosas más importantes del cultivo de caña de azúcar, ocasiona una sintomatología de clorosis y flacidez de las plantas, así como reducción de su crecimiento y los efectos de esta enfermedad inciden directamente en el rendimiento del cultivo (Viswanathan y Rao, 2011). Martínez-Jaimes (2014), reporta que la necrosis de la raíz de caña de azúcar en el estado de Morelos es causada por *Fusarium andiyazi*, *F. nygamai*, *F. solani* y *F. sacchari*, induciendo la marchitez de las plantas de caña de azúcar.

El control de esta enfermedad se realiza mediante la aplicación de compuestos químicos (Vishwakarma *et al.*, 2013), los cuales tienen efectividad limitada y causan daños severos al ambiente (Hermosa *et al.*, 2012). Debido a la problemática que presenta el control químico, el control biológico constituye una estrategia viable para el manejo de las enfermedades de las plantas de importancia agrícola (Heredia y Delgadillo, 2000). Diversos agentes de control biológico han sido estudiados, destacando el género *Trichoderma*; su importancia se reconoce por los mecanismos de acción que presenta (Guédez *et al.*, 2012).

La necesidad de reducir el uso de fungicidas en el control fitosanitario hace necesario desarrollar tecnologías que permitan de forma económica y efectiva obtener productos a partir de microorganismos, con viabilidad de conidios para ser aplicados en campo (Michel-Aceves *et al.*, 2008). *Trichoderma* también es ampliamente utilizado debido a su ubicuidad, a

su facilidad para ser aislado y producido, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no afecta a las plantas (Chávez, 2006). Para que este hongo pueda ser utilizado en campo es necesario que se produzcan grandes cantidades de conidios (Martínez, 2010). La producción de conidios de *Trichoderma* se realiza utilizando técnicas de fermentación sólida, líquida o difásica. En la fermentación sólida se utilizan diferentes sustratos como: arroz, avena, soya, trigo, cebada, entre otros. Estos procesos representan una alternativa para la producción de conidios a nivel industrial o artesanal, obteniendo resultados de calidad (Chávez-García *et al.*, 2008).

Para que los conidios de *Trichoderma* spp. obtenidos mediante un proceso de producción intensivo puedan ser aplicados en campo para el control de hongos fitopatógenos es necesario realizar formulaciones adecuadas para reducir la pérdida de viabilidad de los conidios, mejorando las propiedades de almacenamiento, manipulación, aplicación, efectividad y seguridad (Martínez, 2010).

CAPÍTULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) pertenece a la familia Poaceae y tiene la característica única de acumular altos niveles de azúcar en su tallo. Por lo cual, desempeña un papel fundamental en la agricultura mundial como cultivo productor de azúcar. Se cultiva principalmente en regiones tropicales y subtropicales de más de 90 países que prucen más de ciento setenta y dos millones de toneladas de azúcar (Asano *et al.*, 2004; DOF, 2015) destacando como principales países productores Brasil, India y Tailandia (CONADESUCA, 2016).

México se encuentra entre los diez principales países productores de caña de azúcar (Ruiz *et al.*, 2015). Además de satisfacer la demanda nacional y la agroindustria, también ha ampliado su volumen de exportaciones, ubicando a México como el sexto país exportador de azúcar a nivel mundial en el ciclo 2013/14 (Senties-Herrera *et al.*, 2014; CONADESUCA, 2016).

En México la producción de caña de azúcar y sus derivados es una de las principales agroindustrias. Se siembra en regiones distribuidas en la costa del Pacífico, Área Central, Golfo de México y Área Caribeña de la Península de Yucatán, con una extensión de 822,897 hectáreas, que abastecen 57 ingenios, de los cuales se obtienen 56,007,311 ton. Los principales estados productores de caña de azúcar por superficie sembrada son Veracruz, San Luis Potosí, Jalisco, Oaxaca y Tamaulipas, juntos contribuyen con el 70.28% de la producción nacional (SIAP, 2017).

La industria azucarera es una actividad de alto impacto, generando más de 440 mil empleos directos que benefician indirectamente a más de 2.2 millones de personas; sus actividades productivas se desarrollan en 15 entidades federativas y 227 municipios en donde habitan 12 millones de personas (DOF, 2015).

En el estado de Morelos uno de los cultivos más representativos es la caña de azúcar. Se cultiva en 20 municipios, que conjuntamente presentan una superficie sembrada de 22,128

ha y un rendimiento promedio de 111.47 ton/ha, el cual, es uno de los mayores registrado a nivel nacional. Los municipios con mayor superficie sembrada son Tlaltizapán, Ayala, Tlaquiltenango, Yauatepec, Cuautla y Jojutla, juntos contribuyen con el 47.56% de la producción estatal (SIAP, 2017).

Un factor que ha limitado el desarrollo y los rendimientos de este cultivo es la incidencia de plagas y enfermedades. Existen al menos 100 especies de insectos que ocasionan daños al cultivo de caña, los efectos en la caña dependen de los órganos y tejidos que son afectados; se les puede encontrar causando daños en raíces, tallos y hojas durante un periodo específico de desarrollo de la planta, o bien, durante todo el ciclo del cultivo de la caña de azúcar (Salgado *et al.*, 2012).

Los insectos plaga que se presentan comúnmente en el cultivo de caña de azúcar en el estado de Morelos son barrenadores: *Diatraea magnifactella* y *Eoreuma loftini*, picudo del tronco *Cholus morio* Cham; pulgón amarillo *Melanaphis sacchari*; mosca pinta o salivazo *Aeneolamia contigua*; chinche de encaje *Leptodictya tabida*; escama acanalada *Praelongorthezia acapulcoa* (Campos *et al.*, 2012; Fonseca *et al.*, 2013; Muñoz-Vélez *et al.*, 2015). También, el cultivo presenta severos daños por la rata de campo *Sigmodon hispidus* (Villar-González, 2000).

La producción de caña de azúcar en todo el mundo ha sido afectada por diversas enfermedades, constituyendo una amenaza para los lugares donde se siembra (Comstock, 2013). A pesar de los esfuerzos para obtener variedades resistentes a enfermedades, la incidencia de enfermedades en este cultivo continúa y el rendimiento disminuye cada año; los países productores reportan pérdidas entre el 10% y el 15% de la producción de azúcar (Viswanathan y Rao, 2011). En India Rott *et al.* (2000), Rao *et al.* (2002) y Senties-Herrera *et al.* (2014) reportan que existen aproximadamente 55 enfermedades de caña de azúcar causadas por hongos, bacterias, virus, fitoplasmas y nematodos.

Se conoce que las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos constituyen la mayor causa de pérdida en la agricultura, alteran las funciones fisiológicas de las plantas, afectando a su funcionamiento normal, reduciendo generalmente los rendimientos y en casos extremos provocándoles la muerte (Rey *et al.*, 2000; Infante *et al.*, 2009). En México se ha reportado

que las enfermedades fungosas asociadas al cultivo de caña de azúcar son el carbón causado por *Sporisorium scitamineum*, la roya (*Puccinia melanocephala* y *Puccinia Kuehni*), Pokkah boeng (*F. moniliforme*, *F. Proliferatum* y *F. verticilloides*) y la marchitez asociada a especies de *Fusarium* (Salgado *et al.*, 2012; Martínez-Fernández *et al.*, 2014; Rosas-Guevara *et al.*, 2014; Martínez-Fernández *et al.*, 2015). Senties-Herrera *et al.* (2017) reportan que las enfermedades que tienen mayor efecto en el cultivo de caña de azúcar en México fueron causadas por hongos de los géneros *Fusarium* (1194 ha) y *Puccinia* (414 ha). En el estado de Morelos las enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos que afectan al cultivo de caña de azúcar son el carbón causado por *Sporisorium scitamineum*, la roya causada por *Puccinia melanocephala* y la marchitez ocasionada por especies del género *Fusarium*. La incidencia de esta enfermedad ha incrementado en los últimos años, por lo que es preocupante para los productores cañeros (Campos y Lugo, 2012; Martínez-Fernández *et al.*, 2014; Martínez-Fernández *et al.*, 2015).

2.2. MARCHITEZ DE LA CAÑA DE AZÚCAR

La marchitez es una importante enfermedad de tallo y raíz que afecta el rendimiento de caña de azúcar en muchos países donde se cultiva, cuya sintomatología es una clorosis de las bases en hojas jóvenes, seguida por la flacidez y muerte de las plantas (Martínez-Jaimes, 2014); causando pérdidas en la producción debido a la reducción de 15-30% en la extracción del jugo (Viswanathan y Rao, 2011).

El agente causal de esta enfermedad es un tema de debate, ya que se ha documentado la incidencia de diferentes hongos fitopatógenos asociados a síntomas de marchitez en el cultivo de caña de azúcar. Diferentes autores tales como Mohanraj *et al.* (2002), Satyavir y Kushal, (2002), Rosas *et al.* (2013), Silva *et al.* (2013) mencionan la presencia de diferentes especies de *Fusarium* aislados de tejidos de raíces, hojas y tallos. Viswanathan *et al.* (2011), compararon especies de *Fusarium* obtenidas de tallos de caña con marchitez, encontraron que *F. sacchari* fue el que produjo los síntomas de marchitez, y que las cepas como *F. verticillodes*, *F. proliferatum* y *F. napiforme* fueron no patogénicas o menos virulentas. Waraitch,

1981; McFarlane y Rutherford, 2010; Viswanathan *et al.*, 2011 y Mohammadi *et al.*, 2012, reportan que la enfermedad de la marchitez y la malformación de hojas se han asociado con diferentes especies de *Fusarium* como: *F. moniliforme*, *F. sacchari*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. napiforme*, *F. andiyazi*, y *F. moniliforme var. subglutinans*. Rebollar *et al.* (2012) mencionan a *F. sacchari*, *F. subglutinans*, *F. verticillioides*, *F. andiyazi*, *F. kuyyensi* y *F. brachygybbosum*. Martínez-Jaimes (2014), en el estado de Morelos reportó cuatro especies de *Fusarium* causantes de la marchitez de la caña de azúcar *Fusarium andiyazi*, *F. nygamai*, *F. sacchari* y *F. solani*.

2.3. TAXONOMÍA DEL GÉNERO *Fusarium*

El género *Fusarium* es considerado como el grupo más importante de hongos patógenos de plantas de importancia económica que afectan la agricultura y horticultura globalmente (Summerell *et al.*, 2010; Zhang y Jeyakumar, 2018). Aproximadamente el 80% de las plantas cultivadas están asociadas con al menos una enfermedad causada por alguna especie de *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006).

El planteamiento sobre la taxonomía del género *Fusarium* inicio con Wollenweber y Reinking (1935, citado por Leslie y Summerell, 2006). Considerando 135 especies, proponiendo un sistema subgenérico basado en 16 secciones. Este sistema constituyo la base para nuevos esquemas taxonómicos del género *Fusarium*, como el propuesto por Snyder y Hansen (Romero, 1993).

Entre las obras sobresalientes y más reconocidas sobre la taxonomía de *Fusarium* se encuentran las de Booth (1971), Gerlach y Nirenberg (1982) y Nelson *et al.* (1983). En estos sistemas se puso más atención a una evaluación cuidadosa de aspectos morfológicos, tales como las células conidiógenas, macroconidios, microconidios y las clamidosporas (Summerell *et al.*, 2010).

2.4. PRINCIPIOS DE CONTROL DE LAS ENFERMEDADES DE PLANTAS

2.4.1. MEDIDAS PREVENTIVAS

Para reducir pérdidas en la producción se deben tomar en cuenta ciertas medidas, tales como: seleccionar el suelo óptimo para el desarrollo del cultivo, uso de variedades resistentes a plagas y enfermedades, material vegetal certificado, ajustar tasas de siembra, profundidad de la semilla y control de malezas, realizar rotación y asociación de cultivos, preferentemente al utilizar plantas con propiedades antagónicas, desinfectar maquinaria y herramienta de trabajo e incorporar materia orgánica. La incorporación de materia orgánica al suelo favorece la actividad antagónica de la biota habitante del suelo; aplicación de organismos antagonistas y uso de productos químicos que protejan los cultivos de manera preventiva (Zavaleta-Mejía, 2000; Wagner, 2006; Kerruish, 2014). Una problemática actual en México es la existencia de variedades resistentes a *Fusarium* spp. (Rosas-Guevara *et al.*, 2014).

2.4.2. MEDIDAS DE CONTROL

Para obtener rendimientos óptimos en la producción agrícola se deben de efectuar labores de cultivo oportunamente: así como, establecer medidas de sanidad vegetal para el control de los patógenos. Algunas de estas medidas son las siguientes: prácticas de labranza, aplicación de fertilizante, prácticas de saneamiento que incluye todas las actividades destinadas a eliminar o reducir la cantidad de inóculo en la planta o parcela, eliminación de órganos enfermos y destrucción de residuos, así como, la aplicación de agentes de control biológico e incorporación de productos químicos para el control de enfermedades (Sandoval, 2004; Kerruish, 2014).

2.5. MANEJO DE *Fusarium* spp. EN CAÑA DE AZÚCAR

Campos *et al.*, (2012) mencionan que el control de estos patógenos causantes de la enfermedad de la marchitez se puede realizar mediante tres formas:

1. Control cultural

Establecer el cultivo en suelos bien drenados, cuando el cultivo se establezca en suelos pesados, se tendrán que utilizar las curvas de nivel para conducir el agua adecuadamente. Los riegos deben ser espaciados y los cultivos se deben mantener libres de malezas realizando labores culturales en tiempo y forma.

2. Control químico

La forma tradicional para el control de las enfermedades en los cultivos ha sido la aplicación de productos químicos, los cuales se aplican a la semilla, follaje y al suelo, pero debido a su composición resultan tóxicos e inespecíficos, ya que además de eliminar a los patógenos, dañan la flora y la fauna del suelo (Vinale *et al.*, 2008; Malusá y Vassilev, 2014). Además, de no ser completamente exitoso en la prevención de enfermedades en plantas causadas por *Fusarium* y ejercer resistencia por parte de los fitopatógenos del suelo a fungicidas, sin olvidar el detrimento que causa en la salud humana (Michel-Aceves *et al.*, 2008; Askun, 2018). Ibarra *et al.*, (2006) reportan que el uso de plaguicidas también puede generar la presencia de nuevas especies de microorganismos fitopatógenos con un grado de afectación más virulento. El uso de estos productos químicos ha permitido obtener incrementos en la producción; sin embargo, sus efectos adversos están impactando de manera significativa la sostenibilidad de la agricultura (Zavaleta-Mejía, 2000). Por esta razón, es necesaria la búsqueda de alternativas orientadas al manejo de agentes antagonistas que sean eficientes y compatibles con el ambiente (Cupull *et al.*, 2003).

Sin embargo, en plantas de caña de azúcar con síntomas de marchitez o pokkah boeng se ha indicado que es necesario hacer una aplicación de tiofanato metílico en dosis de 1 a 2 kg/ha (Campos *et al.*, 2012). Este fungicida es el más utilizado en el estado de Morelos, sin

embargo, López-Alcántara *et al.* (2016) evaluaron mediante pruebas *in vitro* la efectividad de tres fungicidas sobre *F. sacchari*; informando que los fungicidas carbendazim y benomyl son altamente efectivos en todas las dosis, en contraste con el fungicida tiofanato metílico quien presentó efectividad a partir de la dosis de 10 ppm. Vishwakarma *et al.* (2013) reportan que se deben realizar aplicaciones de carbendazim (1 g/L), oxiclورو de cobre (0.2%) y mancozeb al 0.3%, realizando usualmente dos aplicaciones a intervalos de 15 días, lo que reduce la enfermedad y pérdidas en el rendimiento.

La efectividad de los productos químicos depende de diversos factores, tales como: la variedad del cultivo, tipo de boquilla de la aspersora, volumen de pulverización y velocidad de aplicación; también influyen las condiciones ambientales (Lehoczki-Krsjak *et al.*, 2010).

3. Control biológico

La aplicación de *Trichoderma* spp. para el manejo de enfermedades de raíz causadas por *Fusarium* spp. ha sido reportado en diferentes trabajos. Perdomo *et al.* (2007) evaluarón la aplicación de *T. harzianum* para el control de *Pythium* sp., *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* spp. causantes de la enfermedad “sanchocho” en semilleros de tomate. Sus resultados indican que *T. harzianum* reduce la enfermedad causada por los patógenos en el cultivo de tomate.

García *et al.* (2006b) evaluarón un biofungicida a base de *T. harzianum* contra los patógenos *Sclerotium cepivorum*, *R. solani*, *Fusarium* spp. y *Phytophthora* spp. en plantas de ajo, plátano, café, tabaco, leguminosas y solanáceas. Los resultados obtenidos muestran que en todos los cultivos se redujo la incidencia de las enfermedades ocasionadas por los diferentes patógenos.

Gamboa-Villa, (2017) evaluó la aplicación de *T. asperellum* y *T. koningiopsis* sobre plantas de caña de azúcar inoculadas con *F. andiyazi*, patógeno causante de la marchitez. Sus resultados indican que ambas especies de *Trichoderma* son altamente antagónicas hacia *Fusarium* sp.

Campos *et al.* (2012) indican que para el manejo preventivo de la enfermedad de la marchitez o pokkah boeng en el cultivo de caña de azúcar se deben realizar aplicaciones con el hongo *Trichoderma* spp.

2.6. CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES

Cook y Baker (1983) definen el control biológico de patógenos vegetales como la reducción de la densidad de inóculo de un patógeno o su capacidad para producir la enfermedad, mediante la acción de uno o más organismos, sin la intervención del hombre. Por otra parte, Campbell (1989) lo define ampliamente como: cualquier método de control de enfermedades de las plantas, utilizando organismos para reducir estas enfermedades.

El control biológico mediante organismos antagónicos representa una valiosa herramienta biológica para la protección de los cultivos contra hongos fitopatógenos (Ait-Lahsen *et al.*, 2001).

Dentro de los agentes de control biológico se pueden encontrar hongos, bacterias y virus (Robles, 2012). Babalola (2010) reporta que se pueden encontrar hongos como *Trichoderma* spp., y rizobacterias promotoras de crecimiento de las plantas de los géneros *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, y *Rhodococcus*. Michel-Aceves *et al.* (2008) mencionan que los hongos más utilizados y conocidos en control biológico pertenecen a los Hyphomycetes, entre ellos, los géneros *Trichoderma*, *Penicillium* y *Gliocladium*.

El género *Trichoderma* se considera que es uno de los antagonistas más importantes para el control biológico por poseer diferentes mecanismos de acción contra los patógenos de las plantas (Méndez-Vilas, 2010; Valencia *et al.*, 2011). También son importantes debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a la capacidad de sobrevivir en condiciones desfavorables (Rey *et al.*, 2000; Benítez *et al.*, 2004).

2.7. *Trichoderma* spp.

Trichoderma spp. es un hongo que se encuentra en muchos ecosistemas (Hermosa *et al.*, 2012); un organismo de vida libre y se puede encontrar principalmente en suelos y ecosistemas de raíz, donde se observan interacciones complejas entre la planta huésped, los patógenos y factores ambientales (Harman, 2006; Woo *et al.*, 2006).

El género *Trichoderma* está catalogado entre los agentes de control biológico más eficientes debido al amplio espectro antagonista que presenta (Michel-Aceves *et al.*, 2008); pueden ejercer antagonismo y controlar un amplio rango de patógenos de las plantas económicamente importantes incluyendo hongos, virus y bacterias (Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004). Especies de *Trichoderma* son utilizadas en la agricultura para el manejo de enfermedades causadas por patógenos fúngicos del suelo tales como: *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium*, *Fusarium* (Bernal *et al.*, 2000; Ferre y Santamarina, 2010) y *Verticillium* spp. (González *et al.*, 2005).

La clasificación taxonómica de *Trichoderma* propuesta por Chaverri *et al.* (2011) es la siguiente: Reino: Fungi

División: Ascomycota

Subdivisión: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Hypocreomycetidae

Orden: Hypocreales

Familia: Hypocreaceae

Género: *Trichoderma*

Las colonias de *Trichoderma* generalmente crecen rápidamente, los tonos son típicamente verdes, gris o marrón, las hifas son septadas, generalmente hialinas, de pared lisa, los conidióforos en la mayoría de las especies con un eje principal muy ramificado, las fiálides

típicamente verticiladas, alternas u opuestas, conidios unicelulares, típicamente de color verdes o hialinos, de paredes lisas, ovoides o elipsoidales, clamidosporas abundantes, particularmente en medio de cultivo sumergido, de forma elipsoidal, hialina o color amarillo o verde, de pared lisa. Algunas especies de *Trichoderma* tienen fase sexual la cual es conocida como *Hypocrea* (Kubicek y Harman, 1998; Howell, 2003; García-Núñez *et al.*, 2017; Hyder *et al.*, 2017).

Colonias de *T. asperellum* después de siete días de incubación en medio de cultivo PDA presentan diámetro de 8-9 cm; con la formación de 2-3 anillos concéntricos y producción densa de conidios. En su morfología microscópica presenta conidióforos ramificados de forma regular, con ramas primarias uniformemente espaciadas y apareadas, terminando en dos o más fiálides. Las fiálides se forman en las puntas de las ramas, siendo rectas, ampuliformes, ligeramente anchas en el centro (ancho de la fiálide de 2.33-3.27 μ) y largo (7.33-11.4 μ m). Los conidios son globosos a subglobosos ligeramente ovalados, ancho de 1.84-3.26 μ m) largo (2.44-3.65 μ m) y con pigmentación verde-amarilla (Gamboa-Villa, 2017).

2.8. REQUERIMIENTOS PARA EL CRECIMIENTO DE *Trichoderma* SPP.

Trichoderma spp. requiere ciertos nutrientes y condiciones ambientales para su apropiado crecimiento y reproducción. Principalmente necesitan una fuente de carbono (almidón, pectina, celulosa), una fuente de nitrógeno (urea, nitritos, amoníaco y sulfato de amonio), y otros microelementos como hierro, zinc, cobre, molibdeno y manganeso en muy bajas concentraciones (Osorio-Concepción *et al.*, 2013; Noboa y Quelal, 2015).

Trichoderma se desarrolla en un rango de temperatura de 15-35 °C, siendo la temperatura óptima 25 °C; períodos alternados de luz y oscuridad (fotoperiodo); pH entre 2 y 9 siendo el óptimo entre 4 y 7 y una humedad entre el 70 y 80% (Noboa y Quelal, 2015).

Los hongos descomponen el almidón secretando enzimas hidrolíticas (glucoamilasas, α -amilasas, β -amilasas, pulunasas e isoamilasas) altamente concentradas en las puntas de la

hifa para penetrar en el sustrato y acceder a los nutrientes, promoviendo la actividad metabólica y el rápido crecimiento micelial (Jaronski y Jackson, 2012).

2.9. MECANISMOS DE ACCIÓN DE *Trichoderma* SPP.

Uno de los aspectos más importantes de la ciencia de control biológico es el estudio de los mecanismos empleados por agentes de control biológico para efectuar el control de la enfermedad (Howell, 2003).

Los mecanismos de acción mediante los cuales los aislamientos de *Trichoderma* enfrentan al patógeno se describen a continuación:

2.9.1. COMPETENCIA

Se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de ellos reduzca la cantidad necesaria para los demás (Martínez *et al.*, 2013).

La escasez de nutrientes de fácil acceso para los microorganismos, especialmente los que viven en el suelo y la superficie de las plantas podría dar lugar a una competencia por nutrientes, por ejemplo, *Trichoderma* podría competir por iones de hierro, nutriente que es esencial para los patógenos de las plantas (Verma *et al.*, 2007).

Cepas de *Trichoderma* crecen rápidamente en el suelo, debido a que son resistentes a muchos compuestos tóxicos como herbicidas, fungicidas, plaguicidas, entre otros. La competencia por rizosfera es la causa más común de muerte para los microorganismos fitopatógenos, compitiendo por nutrientes (principalmente por carbono, nitrato y hierro) y espacio (Howell, 2003; Martínez *et al.*, 2013).

Trichoderma tiene la capacidad de movilizar y absorber los nutrientes del suelo, en comparación de otros antagonistas. El uso eficiente de los nutrientes disponibles se basa en

la capacidad de *Trichoderma* para obtener ATP a partir del metabolismo de diferentes azúcares (Mukherjee *et al.*, 2012).

2.9.2. ANTIBIOSIS

Michel-Aceves (2001) y Robles (2012) definen el efecto de antibiosis como un proceso de interacción entre organismos en el cual uno o más metabolitos son excretados (enzimas hidrolíticas, metabolitos secundarios volátiles y pequeñas moléculas tóxicas) por un organismo y tienen efecto dañino sobre uno o más organismos, normalmente actúan en bajas concentraciones. Además, los antibióticos y otros productos tóxicos que son volátiles (como el cianuro de hidrogeno), son capaces de afectar el crecimiento de las células de los microorganismos fitopatógenos.

Benítez *et al.* (2004) reportan que *Trichoderma* spp. produce gran cantidad de compuestos difusibles de bajo peso molecular, también conocidos como “antibióticos”, que mediante las interacciones impiden el crecimiento micelial del patógeno, entre los metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles se han reportado ácido harziánico, alameticina, tricolin, peptaiboles, antibioticos, 6-pentil- α -pirona, massoilactona, viridina, gliovirina, glisoperonas, ácido heptéldico, entre otros.

Shi *et al.* (2012) reportaron que *T. pseudokoningii* produce tres principales peptaiboles, tricokonin VI (TK VI), tricokonin VII y tricokonin VIII, siendo TK VI el peptaibol que obtuvo mayor actividad antifúngica contra *F. oxysporum*, *Ascochyta citrulina*, *Botrytis cinerea* y *Phytophthora parasitica*, por lo tanto, a este peptaibol se le atribuye tener gran actividad antifúngica contra patógenos de plantas. También reportaron que TK VI ejerce actividad antifúngica contra los hongos patógenos de plantas a través de una vía apoptótica.

Ferre y Santamarina (2010) evaluaron la eficacia de *T. harzianum* en la supresión de *F. culmorum*, reportando que las hifas de *F. culmorum* mostraron una severa deformación debido posiblemente a la secreción de metabolitos de *T. harzianum* que inhibieron el crecimiento micelial de patógeno.

2.9.3. MICOPARASITISMO

Es un proceso muy complejo que involucra eventos secuenciales incluyendo el reconocimiento, el ataque y la posterior penetración y muerte del huésped (Benítez *et al.*, 2004). Especies de *Trichoderma* pueden ejercer control biológico parasitando una amplia gama de hongos y la detención de crecimiento de otros; debido en gran parte a la expresión secuencial de enzimas que degradan la pared celular, en su mayor parte quitinasas, glucanasas y proteasas (Harman *et al.*, 2004).

El micoparasitismo implica cambios morfológicos tales como, el enrollamiento y la formación de estructuras similares al apresorio, que tienen la función de penetrar en el huésped. Involucra cuatro pasos secuenciales: quimiotropismo, reconocimiento, adhesión y enrollamiento y penetración de la pared celular y degradación del contenido de la célula huésped. El quimiotropismo de un hongo antagonista es el crecimiento dirigido hacia el huésped, después, procede el reconocimiento mediado por la unión de carbohidrato de lectina entre el huésped y *Trichoderma* spp., posterior al reconocimiento las hifas de *Trichoderma* se unen y se enrollan alrededor de la hifa del huésped y las estructuras semejantes a apresorios penetran en el huésped produciendo enzimas que degradan la pared celular y peptaiboles, lo que facilita la entrada de la hifa de *Trichoderma* al hongo huésped y la asimilación del contenido de la pared celular (Howell, 2003; Steyaert *et al.*, 2003; Benítez *et al.*, 2004).

Kubicek *et al.* (2011) reporta que el micoparasitismo comprende una combinación de eventos que incluyen la lisis de las paredes celulares del patógeno hospedero, abundantes enzimas se encargan de degradar la armadura de carbohidratos de las hifas del hospedero en su mayoría enzimas quitinolíticas, glucósido hidrolasa y β -1,3-glucanasas producidas por *Trichoderma* spp. El grupo de las enzimas glucósido hidrolasas comprende a la familia GH18 la cual, contiene enzimas que degradan la quitina, siendo esta un componente sustancial de las paredes celulares de los hongos, por lo tanto, las quitinasas son fundamentales en el ataque micoparasitario.

2.9.4. PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO

Especies de *Trichoderma* han sido ampliamente evaluadas por la capacidad de sintetizar diversos metabolitos secundarios, los cuales pueden tener muchos efectos biológicos en las plantas (Reino *et al.*, 2008). Algunos de estos metabolitos pueden estimular el crecimiento de gran diversidad de plantas, incluyendo, cultivos de frutales, ornamentales y forestales; el nivel de promoción del crecimiento puede aumentar hasta 200% en la biomasa total en comparación con las plantas que no son inoculadas con *Trichoderma* spp. (Stewart y Hill, 2014). Harman *et al.* (2004) reportan que *Trichoderma* spp. puede colonizar raíces y aumentar el número de raíces siempre y cuando haya abundantes raíces sanas en el ecosistema, también, aumenta el crecimiento de las raíces y por ende aumenta el crecimiento de la planta y mejora la absorción de nutrientes.

Nieto-Jacobo *et al.* (2017) reportan que la promoción del crecimiento de las plantas no es una característica universal de todas las cepas de *Trichoderma*, debido a la diversidad de relaciones simbióticas entre plantas y microorganismos, y a que la interacción entre las plantas y *Trichoderma* involucra el reconocimiento de moléculas producidas por hongos como auxinas y compuestos orgánicos volátiles (VOCs). Sin embargo, esta relación depende del entorno; en este estudio los metabolitos secundarios involucrados en la promoción del crecimiento de las plantas fueron los compuestos orgánicos volátiles sintetizados por *Trichoderma*, sin embargo, no todos los VOCs pueden promover el crecimiento de las plantas, debido a la variabilidad en cuanto a la cepa que los produce, a los compuestos implicados y diversos mecanismos de inducción.

Candelero *et al.* (2015) estimaron el efecto promotor de crecimiento evaluando 14 cepas nativas de *Trichoderma* spp. en plántulas de *Capsicum chinense*, mostrando que 5 de las cepas evaluadas ejercieron un efecto promotor del crecimiento obteniendo plantas de mayor vigor, mayor tamaño y mayor biomasa seca total en comparación con el testigo (plantas sin inocular).

Mastouri *et al.* (2010) atribuyen que el aumento del vigor en plántulas de tomate fue por la aplicación de *T. harzianum*, ya que posee mecanismos que mitigan tensiones abióticas y fisiológicas en las semillas y plántulas.

2.10. PRODUCCIÓN DE HONGOS ANTAGONISTAS

La producción de hongos se fundamenta en la propagación masiva del hongo, principalmente mediante esporas conocidas como conidios. Los métodos de producción desarrollados incluyen la multiplicación artesanal, la producción semi-industrial y la producción industrial, para la cual se requiere de reactivos y equipos especializados (Monzón, 2004).

Trichoderma produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y esporas (conidios); para la producción masiva de este hongo las esporas son más viables, caracterizadas por tener una gruesa pared exterior, constituida por tres capas: endospora, epispora y perispora, que protegen el protoplasto. Esta pared celular gruesa permite a los conidios sobrevivir a condiciones adversas, manteniéndolos en dormancia hasta que haya condiciones óptimas para su germinación (Allori *et al.*, 2017; Vassilev y Mendes, 2018).

2.10.1. FERMENTACIÓN

Fermentación es el término utilizado para describir cualquier proceso para la obtención de un producto por medio del cultivo de un microorganismo; el producto puede ser la célula en sí, referida como producción de biomasa.

La producción de biomasa constituye con frecuencia el objetivo de las fermentaciones; si se desea obtener biomasa es necesario considerar diversos factores para obtener una oxidación completa del sustrato, con el fin de que toda la energía del sustrato sea liberada y utilizada para la absorción y asimilación (Colina *et al.*, 2009).

2.10.1.1. FERMENTACIÓN LÍQUIDA

Es una técnica de crecimiento de microorganismos en un medio líquido, donde todos los nutrientes se encuentran disueltos en el medio de cultivo y el proceso se lleva a cabo bajo condiciones fisicoquímicas controladas (García *et al.*, 2006a). El medio de cultivo líquido básico para la producción de hongos entomopatógenos contiene glucosa o sacarosa (fuente de carbohidratos), extracto de levadura (fuente de nitrógeno), licor de maceración de maíz (utilizado para la producción de blatoesporas) y gentamicina, estreptomomicina o claranfencicol (antibióticos utilizados para inhibir el crecimiento de bacterias) (Jaronski y Jackson, 2012).

2.10.1.2. FERMENTACIÓN SÓLIDA

La fermentación sólida es un proceso que involucra medio sólido en ausencia parcial o total de agua libre; sin embargo, el sustrato debe tener la humedad suficiente para permitir el crecimiento del microorganismo y que lleve a cabo sus procesos metabólicos (Pandey, 2003); además, sirve como fuente de nutrientes y como soporte para que los microorganismos crezcan sobre él (Robinson *et al.*, 2002). El sistema de producción en estado sólido en la producción de hongos entomopatógenos (Hypocreales) es el más utilizado, debido a su eficacia, además de no requerir equipo especializado (Jaronski y Jackson, 2012).

En la fermentación sólida se pueden manipular parámetros fisicoquímicos y bioquímicos como: el tamaño de partícula, humedad inicial, pH, pretratamiento del sustrato, humedad relativa, temperatura de incubación, agitación, aireación, entre otros (Roussos y Perraud-Gaime, 1996; Pandey, 2003). Vassilev y Mendes (2018), informan que el sistema de fermentación en estado sólido es un método efectivo para la producción de biomasa de hongos antagonistas, los conidios sobreviven durante largos periodos de tiempo, son fáciles de almacenar y demuestran una gran actividad en el suelo, además de que los sustratos son económicos y el equipo es simple.

Para un crecimiento óptimo en la producción de conidios de hongos filamentosos se requiere de una adecuada nutrición (fuentes de carbono, fósforo y nitrógeno) (Jaronski y Jackson, 2012), por lo que a elección de un sustrato adecuado es un factor clave en procesos de fermentación sólida. Han sido reportados sustratos empleados para la producción masiva de conidios de *Trichoderma* spp. como: grano de arroz, grano de trigo, grano de sorgo, grano de maíz, grano de alpiste, bagazo de caña, melaza, café, pulpa de remolacha, harina de trigo, cascarilla de arroz, cascara de maní, cáscara de tomate, cáscara de ajo, cáscara de cacao, cáscara de ajonjolí, cáscara de cacahuate, olote de maíz, rastrojo de soya, rastrojo de maíz, vaina de frijol y cáscara de café (Krishna, 2005; Michel-Aceves *et al.*, 2008; Arévalo *et al.*, 2017).

La humedad juega un papel importante en la fermentación sólida, una baja humedad tiende a reducir la difusión de nutrientes, crecimiento del microorganismo, estabilidad enzimática y degradación del sustrato, por lo que es importante mantener un nivel óptimo humedad (Ferrer *et al.*, 2014). Vassilev y Mendes (2018) mencionan que los pasos principales para el proceso de producción de *Trichoderma* spp. en fermentación sólida son: el aislamiento de la cepa, identificación, selección de sustratos, optimización de los sustratos, separación de las esporas, proceso de formulación y evaluación en campo (Figura 1).



Figura 1. Proceso de producción de *Trichoderma* spp. mediante sistema de fermentación en estado sólido.

2.10.1.3. FERMENTACIÓN DIFÁSICA

La fermentación difásica se lleva a cabo secuencialmente en dos fases: una líquida y otra sólida. Generalmente, en la fermentación difásica el hongo inicialmente crece en un medio líquido hasta el final de la fase de crecimiento exponencial, y posteriormente se transfiere esta biomasa a un sustrato sólido (Elósegui, 2006).

2.11. FORMULACIONES DE HONGOS ANTAGONISTAS

En una formulación de hongos antagonistas como ingrediente activo se pueden emplear conidios y clamidosporas. Sin embargo, para la elaboración de formulaciones a base de hongos antagónicos frecuentemente se utilizan los conidios, debido a que son resistentes a

condiciones ambientales no favorables para su germinación (García *et al.*, 2006a; Allori *et al.*, 2017).

Una formulación se define como el proceso mediante el cual el ingrediente activo, se mezcla con materiales portadores inertes; tales como, adherentes, solventes, emulsificantes o gelificantes, entre otros. Estos materiales estabilizan la longevidad del propágulo infeccioso durante el almacenamiento; protegen el propágulo del medio ambiente, aumentando su vida útil y ayudan a su desarrollo una vez que se aplica en el suelo. También, deben cumplir con ciertos requisitos, tales como, no afectar la actividad del hongo antagonista, no deben tener actividad biológica sobre animales, plantas o insectos benéficos, ser inocuos para el medio ambiente, presentar características físico-químicas adecuadas para mezclarse con los conidios (Urtubia y France, 2007).

El objetivo de realizar una formulación es preparar una combinación de ingredientes de tal forma que el propágulo infeccioso o principio activo se mantenga estable y viable durante el mayor tiempo posible en almacenamiento (Martínez, 2010; Ravensberg, 2011).

Existen diferentes tipos de formulaciones y varían en función al ingrediente activo, la producción masiva, el método de aplicación; así como el agente patógeno a controlar. En el Cuadro 1 se muestran las consideraciones para la elaboración de formulaciones de acuerdo con el tipo de patógeno.

Cuadro 1. Consideraciones de formulaciones de acuerdo con el tipo de patógeno (Ravensberg, 2011)

	Bacterias	Hongos	Virus	Nemátodos
1. Estabilidad				
Mantener virulencia	++	++++	++	++++
Normalización de la potencia o contenido	+++	++	++++	+
Mantener estabilidad física	+	++	++	+++
Mantener estabilidad química	---	--	+	+++
Minimizar número y crecimiento de contaminantes	++	---	++	--
Envoltura	++	+++	++	++++
2. Eficacia y factibilidad de uso				
Características de aspersión	+++	++++	+++	---
Método y equipo de aplicación	++	++++	++	++
Eficiente focalización	+++	++++	+++	-
Conveniencia de uso	+	+++	+	++
Mejora de la actividad de propágulos	++	++++	+++	--
3. Persistencia				
Protección	+++	++++	++++	--
Estimulación del crecimiento de los propágulos	---	+++	---	---
4. Registro y seguridad				
Minimizar la exposición	++++	++++	+	---
Reducir al máximo los contaminantes microbianos	+++	+++	+++	---

De + a +++++: Aumento de cantidad de atención necesaria durante la formulación.
 -: No relevante.

Bravo *et al.* (2011) mencionan que para una formulación óptima es necesario obtener la estabilidad física y biológica durante el almacenamiento, evitar la evaporación, incrementar la cobertura y adherencia en el follaje, mejorar la dispersión, aumentar la resistencia a las condiciones ambientales (lluvia, temperatura, radiación, etc.) y facilitar la aplicación. Monzón (2004), reporta que para realizar formulaciones la viabilidad de los conidios del

hongo no debe ser menor a 95%; y el contenido de humedad debe estar entre 4 y 6% (Uturbia y France, 2007). Deben ser considerados también factores muy importantes en el proceso de producción masiva como: medio de cultivo, temperatura, tiempo a la cosecha y régimen de secado, ya que afectan la cantidad y viabilidad de los conidios en almacenamiento (Ravensberg, 2011).

2.12. TIPOS DE FORMULACIONES

Existen diferentes formulaciones, dependiendo del ingrediente activo, procesos de producción, el objetivo y el método de aplicación; cada formulación es específica para un determinado patógeno y está determinada por las características de este patógeno; el modo de acción del propágulo infeccioso es de vital importancia, ya que determina los requisitos para la elaboración de la formulación. También influye para la elección de la formulación, los tipos de propágulos y el modo de aplicación, si será aplicación foliar o del suelo; ya que las formulaciones foliares exigen mayores consideraciones que las formulaciones de aplicación en el suelo, siendo éstas más simples (Ravensberg, 2011).

Las formulaciones básicas pueden ser líquidas y sólidas (Faria y Wraight, 2007) y están compuestas por tres tipos de componentes: el principio activo (microorganismo), el soporte o vehículo (sólido o líquido) y coadyuvantes (inertes que tienen función protectora, dispersante, y adherente, entre otras. Verma *et al.* (2007), documentaron que 60% de los biofungicidas que están en el mercado son elaborados a partir de *Trichoderma* spp. y el 40% restante corresponde a otros biofungicidas que tienen como principio activo bacterias, nematodos y virus (Figura 2).

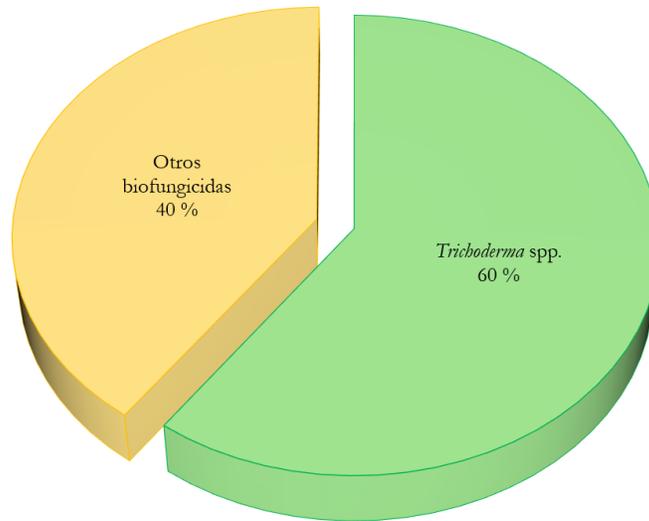


Figura 2. Estadísticas del mercado de biofungicidas de *Trichoderma* spp. y otros biofungicidas, que tienen como principio activo bacterias, nematodos y virus. El mercado se basa en datos dispersos de biofungicidas.

Bettiol *et al.* (2014), reportan que en México actualmente están a la venta alrededor de 31 productos comerciales de control biológico de fitopatógenos, elaborados por empresas mexicanas, de los cuales se desconoce la procedencia de los organismos con los cuales son formulados. Principalmente se comercializa *T. harzianum* (Bioben, Bioderma, Biothork, TRICHO SIN, Natucontrol, Bioinsectum y Miya Fungi TH) y *Bacillus subtilis* (Prosoil, Bioboster, Agrobacilo y Bacifol) utilizados para el control biológico en hortalizas. Hyder *et al.* (2017) indican que en América Central y del Sur se han registrado 22 bioproductos que tienen como principio activo *Trichoderma* spp., y se comercializan 32 biofungicidas (Cuadro 2). La mayoría de los bioformulados de *Trichoderma* spp. utilizan las especies de *T. viride*, *T. virens* y principalmente *T. harzianum* (Benítez *et al.*, 2004). Verma *et al.* (2007) y Bettiol *et al.* (2014) reportan que esta última especie es la más utilizada como agente de control biológico en formulados comerciales (Cuadro 3).

Cuadro 2. Distribución de bioproductos basados en *Trichoderma* spp. disponibles en el mercado mundial

Región	# de productos informados	# de productos registrados	Descripción		Formulaciones			
			Hongos	Estimulador de crecimiento	Polvo	Granular	Líquida	Pellets
África	9	9	7	1	4	-	-	-
Asia	100	8	79	2	51	0	12	0
Europa	57	21	24	2	27	13	5	1
Ámerica del Norte	29	19	16	4	19	15	5	1
Oceanía	22	10	8	1	13	3	-	1
Ámerica Central y del Sur	40	22	32	-	24	3	6	1
TOTAL	257	89	166	10	138	34	28	4

Cuadro 3. Lista de agentes de control biológico basados en especies de *Trichoderma* (Verma *et al.*, 2007).

Organismo benéfico	Nombre comercial	Plagas controladas	Tipo de acción según el fabricante	País de registro
<i>T. harzianum</i>	RootShield™, BioTrek 22G™, Supresivit™, T-22G™, T-22HB™	Patógenos de suelo: <i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Sclerotium</i> y otros.	Micoparasitismo y competidor	U.S. y Europa
<i>T. harzianum</i>	Trichodex™	<i>Botrytis cinerea</i> y otros	Micoparasitismo	Israel
<i>T. harzianum</i> y <i>T. polysporum</i>	Binab™	Patógenos relacionados con árboles	Micoparasitismo	U.K., Suecia
<i>T. harzianum</i> y <i>T. viride</i>	Trichopel™, Trichojet™, Trichodowels™, Trichoseal™	<i>Armillaria</i> , <i>Botryosphaeria</i> y otras enfermedades fúngicas	Antagonismo por enzimas y antibióticos	Nueva Zelanda
<i>Trichoderma</i> spp.	Promot™, Trichoderma 2000, Biofungus	Promotor de crecimiento, <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Pythium</i> spp., <i>Fusarium</i> spp. en cultivo de vivero y campo	-	U.S. y Bélgica
<i>T. viride</i>	Trieco	Para el manejo de <i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Pythium</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., Podredumbre de la raíz, podredumbre de las plántulas, pudrición de cuello, podredumbre roja, caída de hojas, marchitez por <i>Fusarium</i> en una amplia variedad de cultivos.	-	India
<i>T. harzianum</i>	Trichoderma 2000	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Pythium</i>	-	Israel
<i>T. harzianum</i>	TUSAL®	-	-	España

2.12.1. FORMULACIONES LÍQUIDAS

En formulaciones líquidas se utilizan solventes líquidos y un emulsificante; el líquido utilizado tiene la función de mantener suspendidos los conidios en el medio para lograr una mezcla homogénea, también este líquido debe evitar la absorción de agua por los conidios y mantener su viabilidad (Monzón, 2001). Generalmente estas formulaciones son concentraciones en aceite, las cuales surgen de la mezcla de aceite, conidios, inertes, agua y un emulsificador (Martínez, 2010).

Las formulaciones de hongos entomopatógenos realizadas con aceites son mayormente utilizadas debido a que minimizan la evaporación, facilitan la adhesión, dispersión de los conidios en el área blanco, protegen al conidio de condiciones adversas y se utilizan en ultra bajo volumen (Morales, 1993; Hernández, 1996; Cazorla y Morales, 2016). Sin embargo, en la producción orgánica los aceites minerales o derivados del petróleo no son aceptados debido al tipo de aceite que contienen (Monzón, 2001).

2.12.2. FORMULACIONES SÓLIDAS

El proceso de producción masiva es un factor muy importante para la formulación, ya que se presentan variaciones en cuanto a la calidad de los conidios; los conidios que se obtienen a partir de sustratos sólidos son más exitosos, debido a que toleran mayor el estrés abiótico (Elósegui *et al.*, 2009). Santos *et al.*, (2012) mencionan que también, la vida útil de los productos formulados puede depender de las características de la cepa, el tipo de formulación y la temperatura de almacenamiento.

Las formulaciones sólidas incluyen polvo humectable, granulados, gránulo dispersable en agua y polvo de contacto (Faria y Wraight, 2007). Una característica de esta formulación es utilizar un soporte sólido para diluir el principio activo; se emplean sales solubles en agua como cloruros, carbonatos, sulfatos, fosfatos y se utilizan tierras inertes como talco, arcillas, caolín, bentonita, silicato, zeolita, entre otros (Martínez, 2010). En formulaciones de hongos entomopatógenos también se utilizan emulsificantes, tensoactivos y otros adyuvantes, que

son importantes para la protección de la unidad infectiva tales como polímeros (aumentan tamaño de gota y evitan evaporación), protectores de radiación, adherentes, dispersantes, estabilizantes y protectores (Tanzini *et al.*, 2001; Urtubia y France, 2007; Grijalbab *et al.*, 2009).

Las formas de presentación de los productos registrados a nivel mundial de *Trichoderma* spp. comúnmente son polvos humectables, granulados dispersables, concentrados emulsionables y pellets, los cuales tienen una vida útil de 6 meses almacenados a temperaturas inferiores a los 18 °C (Santos *et al.*, 2012).

Kumar *et al.* (2013), evaluaron la vida útil de cuatro formulaciones de una cepa de *T. harzianum* utilizando diferentes concentraciones de biomasa líquida y sólida, así como talco y carbón vegetal como vehículos (material inerte), adicionadas con carboximetilcelulosa, obteniendo una reducción de la viabilidad de 66.78, 69.98, 69.52 y 70.81% en un periodo de 120 días.

Mukherjee *et al.* (2014), desarrollaron un formulado con la cepa de *T. harzianum* CICR-G, empleando como vehículo talco adicionado con carboximetilcelulosa; con el producto se realizó un tratamiento de semillas de algodón y fueron sembradas en suelo inoculado con *Sclerotium delphini*, teniendo como resultado que el tratamiento con suelo infestado presentó en promedio 2.7 plantas sanas y el tratamiento con el formulado 6.6 plantas sanas.

Striram *et al.* (2010), evaluaron el efecto de quitina coloidal en la vida útil de un formulado utilizando como vehículo talco en relación 1:2 (v/w), agregaron diferentes concentraciones de quitina al medio de cultivo para la producción y durante la formulación con talco; evaluaron la viabilidad de los conidios inicial y mensualmente hasta que obtuvieran una concentración de 2×10^6 . La formulación donde se agregó la quitina al medio líquido presentó una vida útil a los 7 meses agregando 0.10 y 0.20% de quitina pura de 2×10^6 UFC/g. La formulación donde se agregó la quitina al momento de formular con talco la vida útil a los 7 meses fue de 1×10^5 UFC/g, en las diferentes concentraciones de quitina y en el testigo.

2.13. ESTABILIDAD DE LOS FORMULADOS

La función principal de una formulación es mantener los propágulos en un estado de baja actividad metabólica, viables y virulentos durante el mayor tiempo posible de almacenamiento en el empaque del producto final (vida útil), la cual, depende de la temperatura de almacenamiento, de los portadores utilizados en la formulación, el proceso de producción, así como, el método utilizado y las características de la cepa (Ravensberg, 2011; Mohd *et al.*, 2013).

Santos *et al.* (2012) mencionan que productos registrados a nivel mundial que tienen como ingrediente activo *Trichoderma* spp. cuyas formas de presentación son polvos mojables, granulados dispersables, concentrados emulsionables y pellets, tienen vidas útiles cercanas a los 6 meses cuando son almacenados al vacío y a temperaturas inferiores a 18 °C.

2.14. APLICACIÓN DE FORMULADOS

La aplicación de la formulación es la manera de introducir el agente de control biológico en el ecosistema de la planta, para permitir su supervivencia o multiplicación cerca o dentro de los sitios de entrada de patógenos específicos de la planta huésped (Bonaterra *et al.*, 2012). Para una aplicación eficiente del formulado es importante conocer la biología del agente de control biológico, así como, las condiciones ambientales a las cuales son susceptibles; también se debe considerar, su modo de acción, la biología del patógeno objetivo, dosis, equipo y la de frecuencia de aplicación. En aplicaciones al suelo una distribución uniforme es de mayor importancia que obtener una eficiente pulverización (Ravensberg, 2011).

Francés *et al.* (2006), reportaron que la eficacia del agente de control biológico en el control de patógenos depende principalmente de la dosis, ya que la dosis debe ser relativa de acuerdo con el patógeno, también, la dosis puede influir de diferentes maneras de acuerdo con el agente de control biológico y las condiciones ambientales.

En formulaciones a base de hongos, Bonaterra *et al.* (2012) recomiendan una dosis de 10^7 UFC/mL⁻¹; sin embargo, para la aplicación del formulado comercial PHC ® T-22® que tiene como ingrediente activo *T. harzianum* cepa T-22 la dosis es variada de acuerdo con el cultivo (90 - 908 g/ha).

CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN

La cepa de *T. asperellum* aislada de la rizosfera del cultivo de caña de azúcar en el estado de Morelos, ha sido seleccionada en laboratorio por pruebas *in vitro* presentando altos niveles de antagonismo hacia especies de *Fusarium*. Sin embargo, es necesario evaluar la producción de conidios en sustratos naturales y obtener un formulado de fácil aplicación en campo, eficiente y de vida útil en almacén mayor a tres meses.

CAPÍTULO 4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar dos sustratos naturales para la producción de conidios de *T. asperellum* y proponer tres formulaciones a base de biomasa de *T. asperellum*.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar las condiciones óptimas para la producción de conidios de *T. asperellum* en sustratos de arroz y sorgo.
2. Desarrollar y evaluar tres formulaciones conteniendo conidios de *T. asperellum*.

4.3. HIPÓTESIS

1. La producción de conidios de *T. asperellum* es variable de acuerdo al sustrato natural donde se desarrolle, siendo mayor en sustrato de arroz.
2. Al menos una formulación de *T. asperellum* mantendrá de un 90 a 95% de viabilidad de los conidios para recomendar su evaluación en campo.

CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del estado de Morelos.

5.1. ACTIVACIÓN DE LA CEPA DE *T. asperellum*

Se activó la cepa 2 correspondiente a *T. asperellum*, del cepario de Hongos Fitopatógenos del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del estado de Morelos, la cual por pruebas *in vitro* se ha demostrado que es altamente antagonista a *Fusarium* spp.

De un vial con sílica gel conteniendo la cepa de *T. asperellum*, se tomaron cristales con esporas con ayuda de una pinza estéril y se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo Agar Extracto de Malta (EMA) Difco y Agar Dextrosa Papa (PDA) Bioxon. Las cajas Petri se sellaron y etiquetaron con los datos correspondientes, incubándose a 24 °C durante un periodo de 12 días.

5.2. SELECCIÓN DE SUSTRATOS PARA LA PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE *T. asperellum*

5.2.1. MANEJO DE SUSTRATOS PARA DETERMINAR LA HUMEDAD ÓPTIMA PARA LA PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE *T. asperellum*

De manera inicial se evaluó el porcentaje de humedad del sustrato de arroz y sorgo para determinar la humedad óptima para el crecimiento de *T. asperellum* sobre sustratos naturales. Para esto se estableció un diseño completamente al azar con 16 tratamientos y cuatro repeticiones de cada sustrato incluido un testigo (Cuadro 4), la unidad experimental fue una bolsa de polipapel que contenía 100 g de sustrato.

Cuadro 4. Tratamientos para determinar la humedad óptima de los sustratos para la producción de *T. asperellum*

Tratamiento	Hidratación (min)	Drenado (min)	Esterilización (min)
1	15	10	15
2	30	20	15
3	45	30	15
4	60	40	15
5	15	10	20
6	30	20	20
7	45	30	20
8	60	40	20
9	15	10	25
10	30	20	25
11	45	30	25
12	60	40	25
13	15	10	30
14	30	20	30
15	45	30	30
16	60	40	30

5.2.2. **PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE *T. asperellum* EN GRANOS DE ARROZ Y SORGO CON DIFERENTE CONTENIDO DE HUMEDAD**

Los sustratos fueron lavados tres veces con agua de la llave, se dejó hidratar durante 15, 30, 45 y 60 minutos, después del periodo de hidratación se eliminó el exceso de agua durante 10, 20, 30 y 40 minutos, las bolsas se cerraron eliminando el aire y realizando un nudo en la parte superior y se esterilizaron en una autoclave AESA CV300 durante 15, 20, 25 y 30 minutos a una presión de 1.5 kg/cm² (121 °C). Una vez concluida la esterilización las bolsas se dejaron enfriar durante 24 h, se tomó una muestra de 100 g de sustrato de cada tratamiento para determinar el porcentaje de humedad por el método de pérdida de peso por secado de cada sustrato, se determinó el peso de cada muestra, posteriormente el sustrato de cada muestra se vertió en un recipiente y se colocaron en un horno a 110 °C

durante 24 horas (Figura 3), después de este tiempo las muestras fueron pesadas. La humedad del sustrato de cada tratamiento se determinó mediante la fórmula de Zhang *et al.* (2012):

$$MC = \frac{WW - DW}{WW} \times 100$$

Donde:

MC: Contenido de humedad %

WW: Peso húmedo de la muestra

DW: Peso seco de la muestra



Figura 3. Sustrato de arroz en estufa a 110 °C

5.2.3. INOCULACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS CON *T. asperellum*

Cada tratamiento de sustrato con diferente contenido de humedad se inoculó con una suspensión de conidios de *T. asperellum*. La suspensión de conidios se preparó adicionando 20 mL de agua destilada estéril con Tween 20 (0.1%) a una caja Petri con *T. asperellum* con 10 días de crecimiento. Con una aguja de disección previamente flameada y fría se desprendieron los conidios de *Trichoderma* de la colonia. Con ayuda de un hematocitómetro esta suspensión se ajustó a una concentración de 1×10^7 conidios/mL. A esta suspensión conidial se adicionó 125 ppm de cloranfenicol. Con una pipeta esterilizada se tomaron 2 mL de la suspensión de conidios de *T. asperellum* y se depositaron en una bolsa que contenía 100 g de sustrato esterilizado, las bolsas sellaron realizando un nudo en la parte superior, se etiquetaron con los datos correspondientes y se incubaron (Figura 4) durante 15 días a temperatura ambiente 24 ± 2 °C; el contenido de las bolsas se homogenizó manualmente cada tercer día para favorecer el desarrollo del micelio y esporulación.

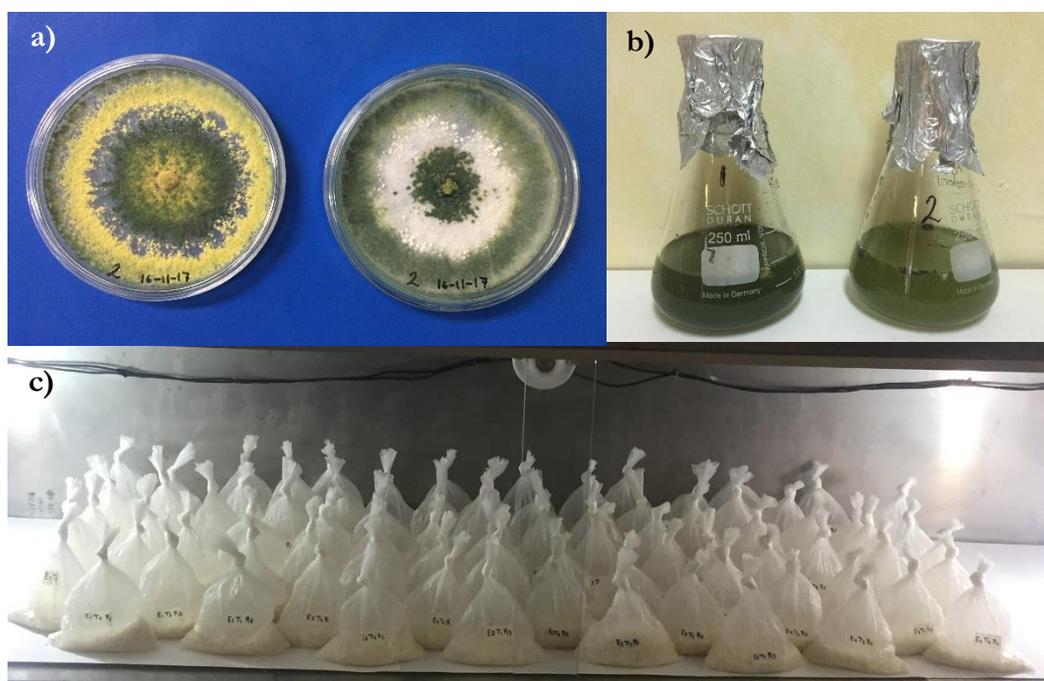


Figura 4. Producción de conidios en sustrato de arroz. a) Colonias de *T. asperellum*. b) Suspensiones conidiales. c) Sustrato de arroz inoculado con *T. asperellum* e incubado a 24 ± 2 °C.

Después del tiempo de incubación se determinó la producción de conidios de *T. asperellum* en cada uno de los tratamientos.

Para el conteo de conidios se pesó 1 g de sustrato esporulado (Figura 5a) del tratamiento correspondiente en una balanza analítica granataria, y se agregó a un matraz que contenía 100 mL de agua destilada con Tween 20 (0.1%) (Figura 5b), el matraz se etiquetó y se agitó con un vórtex para homogenizar la suspensión. El conteo de conidios se realizó utilizando una cámara de Neubauer; con una pipeta Gilson se tomó una alícuota de la suspensión, y se colocó en la cámara de conteo, después de 5 minutos, se realizó el conteo de los conidios en un microscopio Leica DM500; se realizaron 4 conteos por repetición, para obtener un rendimiento promedio de cada tratamiento.

Se determinó la producción de conidios por gramo a través de la fórmula de Cañedo y Ames, (2004):

$$\text{No. Conidios por mL} = \frac{\text{total de conidios contados (factor de cámara)}}{\text{número de cuadros}}$$

Donde:

$$\text{Factor de cámara} = 250,000$$

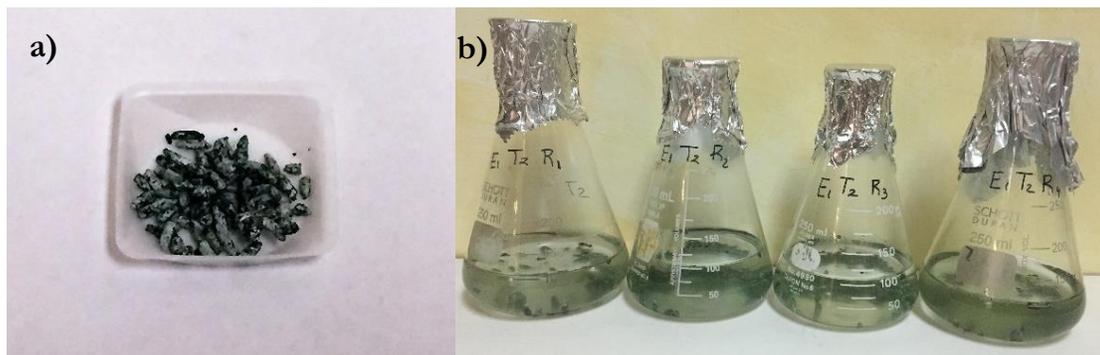


Figura 5. Sustrato de arroz inoculado con *T. asperellum* incubado durante 15 días. a) Grano de arroz esporulado de *T. asperellum*. b) Suspensión conidial de *T. asperellum*.

Posteriormente, se procedió a reducir la humedad del sustrato esporulado de cada tratamiento, para lo cual, las bolsas se abrieron y colocaron en una incubadora durante 3 días; posteriormente, el contenido de cada repetición (bolsa) se vertió en un recipiente (Figura 6a), se colocó una cubierta de papel y se dejaron en incubación durante 10 días a temperatura ambiente, el sustrato de cada repetición se homogenizo manualmente cada tercer día.

Después de reducir la humedad del sustrato se procedió a obtener los conidios de *T. asperellum*, este proceso consistió en separar los conidios del sustrato y se recolectaron en forma de biomasa que consiste en residuos de polvo del sustrato y conidios; esto se realizó depositando cada repetición (sustrato colonizado por *T. asperellum*) en un tamiz de 120 micras y mediante agitación y frotación, se separaron los conidios del sustrato (Figura 6b). El material retenido por el tamiz se desechó y la biomasa se depositó en bolsas de aluminio y se colocaron en refrigeración para mantener su viabilidad por más tiempo (Monzón, 2001). En una balanza analítica Precisa XT 220A se pesó la cantidad de polvo del sustrato con conidios de los diferentes tratamientos evaluados.

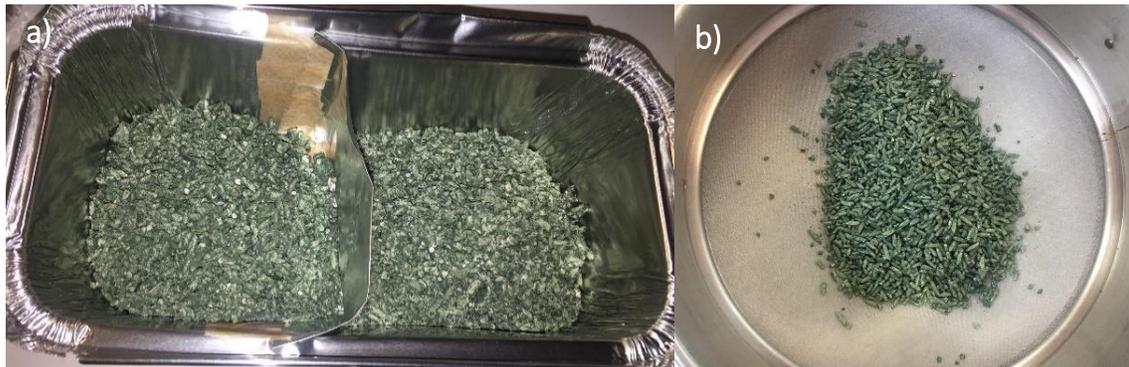


Figura 6. Extracción de biomasa de *T. asperellum*. a) Deshidratación del sustrato esporulado. b) Tamizado de los granos de arroz con *T. asperellum*

5.3. CANTIDAD ÓPTIMA DE INÓCULO DE *T. asperellum* PARA LA PRODUCCIÓN MASIVA DE CONIDIOS EN SUSTRATO DE ARROZ

Tomando como criterio el resultado del experimento anterior se consideró al sustrato de arroz para realizar la producción masiva de conidios de *T. asperellum*. La producción masiva se realizó en bolsas que contenían 300 g de sustrato de arroz, por lo que fue necesario determinar la cantidad óptima de inóculo de *T. asperellum*. Se realizó un diseño completamente al azar con tres tratamientos (cantidad de inóculo 3, 5 y 8 mL) y tres repeticiones. La unidad experimental fue una bolsa de polipapel que contenía 300 g de sustrato de arroz.

El grano de arroz fue lavado tres veces con agua de la llave, se hidrató por 30 minutos, concluido el tiempo de hidratación se eliminó el exceso de agua durante 20 minutos, después, se pesaron 300 g de sustrato de arroz y se coloraron en bolsas de polipapel para posteriormente ser esterilizadas durante 15 minutos. Las bolsas con sustrato esterilizado se dejaron enfriar en una campana de flujo laminar durante 24 horas.

Las repeticiones de cada tratamiento fueron inoculadas con 3, 5 y 8 mL de inóculo de *T. asperellum* con concentración de 1×10^7 conidios/mL, respectivamente; las bolsas se sellaron e incubaron bajo las condiciones descritas anteriormente. Concluido el tiempo de incubación, se determinó la producción de conidios de los tratamientos de acuerdo con la metodología antes descrita.

5.4. PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE *T. asperellum* EN SUSTRATO DE ARROZ

Para realizar la producción de *T. asperellum* se consideraron los resultados de los bioensayos anteriores.

El sustrato de arroz fue lavado 3 veces con agua de la llave, se hidrató durante 20 min, después se eliminó el exceso de agua durante 30 min; posteriormente 300 g de sustrato se depositaron en bolsas de polipapel, se sacó el aire de las bolsas y se realizó un nudo en la parte superior, las bolsas fueron esterilizadas en autoclave durante 15 min a una presión de

1.5 kg/cm² (121° C), concluido el tiempo de esterilización, las bolsas se colocaron sobre la campana de flujo laminar y se dejaron enfriar durante 24 h. 30 bolsas con 300 g de sustrato fueron inoculadas con 3 mL de una suspensión de *T. asperellum* a una concentración de 1×10^7 conidios/mL. La preparación del inóculo se hizo siguiendo la metodología anteriormente descrita. Las bolsas inoculadas se cerraron realizando un nudo en la parte superior, se etiquetaron con los datos correspondientes y se incubaron durante 15 días a temperatura ambiente $24^{\circ} \text{C} \pm 2$, el contenido de las bolsas se homogenizó manualmente cada tercer día para favorecer el desarrollo del micelio y esporulación.

Posteriormente, se procedió a reducir la humedad del sustrato esporulado, para lo cual, las bolsas se quedaron abiertas en la incubadora durante 3 días; después, el contenido de las bolsas se vertió en un recipiente, se colocó una cubierta de papel, se dejaron en incubación durante 10 días a temperatura ambiente y se homogenizó el sustrato esporulado manualmente cada tercer día.

Después de reducir la humedad del sustrato esporulado se procedió a obtener los conidios de *T. asperellum*, este proceso consistió en separar los conidios del sustrato y se recolectaron en forma de biomasa que consiste en una mezcla de residuos del sustrato de arroz y conidios; esto se realizó depositando el sustrato colonizado por *T. asperellum* en un tamiz de 120 micras y mediante agitación y frotación, se separaron los conidios del sustrato. El material retenido por el tamiz se desechó y los residuos del sustrato y conidios se depositó en bolsas de aluminio y se colocaron en refrigeración para mantener su viabilidad por más tiempo (Monzón, 2001). Posteriormente, se determinó el porcentaje de humedad de la biomasa de *T. asperellum*, para lo cual, se registró el peso de un recipiente de aluminio vacío, después se pesó 1 gramo de biomasa y se depositó sobre el recipiente de aluminio y se registró su peso (peso del recipiente de aluminio y más la muestra húmeda), el recipiente con la biomasa se colocó en un horno a 100 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a registrar el peso del recipiente de aluminio más la muestra seca y se determinó el porcentaje de humedad mediante la fórmula de Mar y Lumyong, (2012).

$$\% \text{ de humedad} = \frac{(W-B) - (D-B)}{(W-B)} * 100$$

Donde

W= Peso del recipiente de aluminio con biomasa húmeda

D= Peso del recipiente de aluminio con biomasa seca

B= Peso del recipiente de aluminio

5.5. CALIDAD DE LA BIOMASA DE *T. asperellum*

Después de obtener la biomasa, se procedió a evaluar su calidad, lo cual se refiere a la cantidad de conidios/g, la viabilidad de los conidios y la pureza.

La evaluación se realizó de la manera siguiente

1. Cantidad de conidios por gramo de biomasa.

Para el conteo de conidios de cada tratamiento se pesó 1 g de biomasa en una balanza analítica Precisa XT 220A, y se depositó en tubo de ensayo que contenía 9 mL de agua destilada adicionada con Tween 20 (0.1%) previamente esterilizados, el matraz se etiquetó y se agitó en un vórtex para homogenizar la suspensión (Toledo-Hernández *et al.*, 2017). De esta solución se tomó 1 mL con una pipeta estéril y se vertió en un tubo de ensayo que contenía 9 mL de agua destilada estéril con Tween 20 al 0.1%, el tubo de ensayo se etiquetó y se agitó en un vórtex. El conteo de conidios se realizó utilizando una cámara de Neubauer (Santos *et al.*, 2013); con una pipeta Gilson se tomó una alícuota de la dilución 10⁻¹, y se colocó en la cámara de conteo, después de 5 minutos, se realizó el conteo de los conidios en un microscopio Leica DM500; se realizaron 10 conteos, para obtener un rendimiento promedio.

Se determinó la producción de conidios por gramo de biomasa a través de la fórmula de Cañedo y Ames, (2004):

$$\text{No. Conidios por mL} = \frac{\text{total de conidios contados (factor de cámara)}}{\text{número de cuadros}}$$

Donde:

Factor de cámara= 250,000

2. Viabilidad

La viabilidad se determinó mediante el porcentaje de germinación, para lo cual se realizó una suspensión utilizando 1 g de biomasa, se agregó a un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril adicionada con Tween 20 (0.1%), la suspensión se agitó en un vortex, para posteriormente realizar diluciones seriadas; con una pipeta estéril se tomó 1 mL de la suspensión conidial y se depositó a un tubo de ensayo que contenía 9 mL de agua destilada estéril con Tween 20 al 0.1%, el tubo de ensayo se etiquetó con los datos correspondientes (10^{-1}) y se agitó en un vortex, se realizaron más diluciones seriadas hasta obtener la dilución con una concentración de 1×10^5 conidios/mL.

Se utilizaron 3 cajas Petri con medio de cultivo PDA, las cuales fueron marcadas con 5 puntos en la parte externa inferior, después, con una micropipeta se tomaron 50 μ l de la dilución con concentración de 1×10^5 conidios/mL y fueron depositados en cada punto de las cajas Petri (250 μ l por caja); las cajas se etiquetaron e incubaron a 25 ± 2 °C durante 16 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a cortar cuadros de agar de 1 cm en los puntos donde fueron depositadas las alícuotas de suspensión de conidios; el cuadrado de agar se colocó sobre un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos. Las evaluaciones se realizaron utilizando el microscopio óptico Leica DM500 con el objetivo 40X. Se realizaron 3 muestras, cada una con 5 submuestras y se realizó un conteo de más de 100 conidios por muestra. Las variables que se evaluaron son: número de conidios germinados,

número de conidios no germinados y total de conidios. Un conidio se considera germinado cuando la longitud del tubo germinativo es doble del diámetro de los conidios (Cardona *et al.*, 2014).

El porcentaje de viabilidad se determinó mediante la fórmula de Agus *et al.* (2015):

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{a}{a + b} * 100$$

Donde:

a = número de conidios germinados

b = número de conidios no germinados

3. Pureza

Se preparó una suspensión con 1 g de biomasa y 9 mL de agua destilada estéril con Tween 20 (0.1%), se agitó por 5 min en un vortex; de esta suspensión se hicieron diluciones, tomando 1 mL de suspensión original colocándose en un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril con Tween 20 (0.1%), el tubo de ensayo se etiquetó con los datos correspondientes (10^{-1}) y se realizará el mismo procedimiento hasta conseguir una suspensión con una concentración de 1×10^4 conidios/mL; de esta suspensión con una pipeta estéril se toman 0.3 mL y se dispersaron sobre cajas Petri con medio de cultivo PDA con y sin cloranfenicol (0.016%). La solución de cloranfenicol se preparó agregando 0.25 g de cloranfenicol en 100 mL de agua destilada estéril, de esta solución se tomó con una pipeta estéril 1 mL y se agregó a un matraz con 150 mL de medio de cultivo PDA. Se prepararon seis cajas Petri, se incubaron a temperatura ambiente ($24 \pm 2^\circ \text{C}$) y se revisaron a los 2 y 7 días. Se contabilizó las unidades formadoras de colonia (UFC) de las muestras y se determinó el porcentaje de pureza mediante la fórmula de Cardona *et al.* (2014).

$$\% \text{ de pureza} = \frac{\text{UFC de colonias de interés}}{\text{UFC totales}} \times 100$$

5.6. FORMULACIONES DE *T. asperellum*

Bajo condiciones asépticas fueron integradas tres formulaciones con biomasa de *T. asperellum* y otros excipientes (Figura 7), las cuales se describen a continuación.

Formulación 1

Polvo

Se realizó una mezcla con 0.8% de biomasa de *T. asperellum*, 98% de silicato de magnesio de calidad farmacéutica utilizado como diluyente y 0.005% de colorante rojo (Santos *et al.*, 2012).

Formulación 2

Polvo

La mezcla consistió en biomasa de *T. asperellum* (residuos del sustrato con conidios), yeso industrial en proporción 1:2 y 500 mg de carboximetilcelulosa (CMC) por 100 g de material portador (Karunanithi *et al.*, 2001).

Formulación 3

Polvo

Se realizó una mezcla de 20 g de biomasa de *T. asperellum* con 100 g de talco y se agregaron 500 mg de carboximetilcelulosa/100 g de vehículo (Kumar *et al.*, 2013).

Las formulaciones se almacenaron en bolsas de polipapel a temperatura ambiente 24 ± 2 °C y en oscuridad.

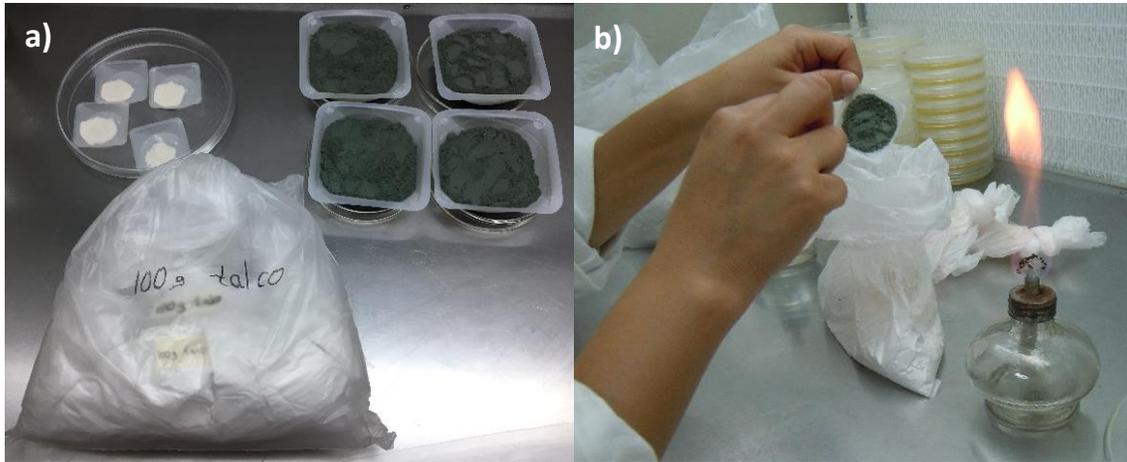


Figura 7. Integración de las formulaciones de *T. asperellum*. a) Excipientes y biomasa del formulado tres. b) Composición de formulados en condiciones asépticas.

5.6.1. EVALUACIÓN DE LAS FORMULACIONES DE *T. asperellum*

Para el estudio de la vida útil de las formulaciones se evaluó la viabilidad expresada como la capacidad de germinación de los conidios formulados. El porcentaje de viabilidad de conidios de *T. asperellum* en las formulaciones se realizó siguiendo la metodología anteriormente descrita (Figura 8), inoculando 1 caja Petri por cada repetición. La viabilidad de los conidios en las diferentes formulaciones se evaluó antes de su almacenamiento, y cada 30 días por un periodo de tres meses de almacenamiento a temperatura ambiente. Con los conteos de conidios realizados durante el proceso para determinar la viabilidad y el porcentaje de viabilidad estimamos la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) mediante la siguiente formula de Goettel y Inglis (1997).

$$\text{UFC} = \text{Conidios totales (porcentaje de viabilidad)}$$

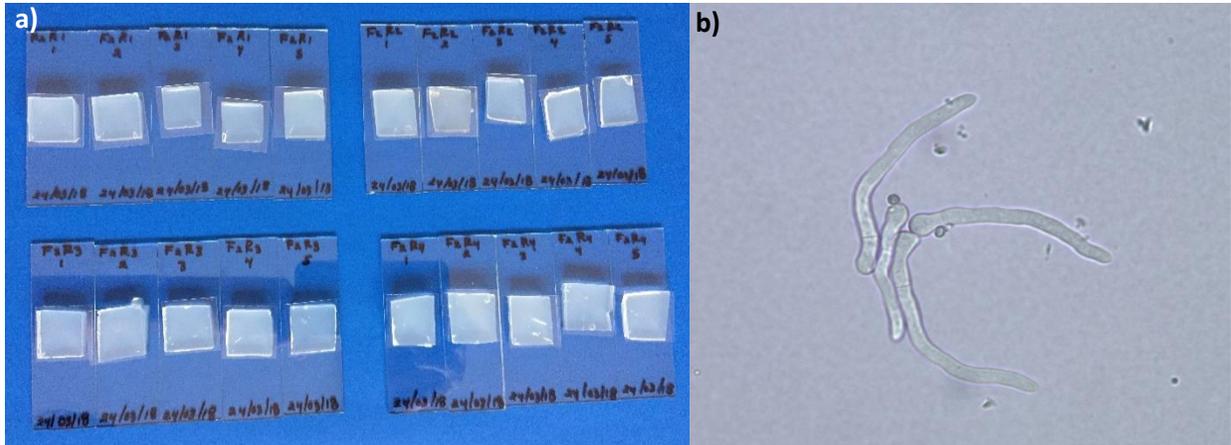


Figura 8. Evaluación de la germinación de conidios de *T. asperellum*. a) Cortes de medio de cultivo EMA con conidios de *T. asperellum*. b) Conidios de *T. asperellum* germinados y no germinados.

Se realizó un experimento con tres tratamientos y un testigo (conidios sin formular) cada uno con 4 repeticiones bajo un diseño completamente al azar; la unidad experimental fue una bolsa con formulado de *T. asperellum*. La variable respuesta fue la viabilidad de conidios de *T. asperellum* que se evaluaron al inicio y cada 30 días por un periodo de 3 meses de su almacenamiento. Los datos se analizaron mediante el paquete estadístico SAS y fueron sometidos a un análisis de varianza y a una prueba de separación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) para obtener la eficacia de los tratamientos.

CAPÍTULO 6. RESULTADOS

La cepa de *T. asperellum* seleccionada para este estudio se desarrolló de manera óptima en el medio de cultivo EMA y PDA.

6.1. PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE *T. asperellum* EN SUSTRATO DE ARROZ CON DIFERENTE CONTENIDO DE HUMEDAD Y TIEMPO DE ESTERILIZACIÓN

La producción de conidios de *T. asperellum* fue variable de acuerdo al contenido de humedad del sustrato de arroz. La mayor producción de conidios por gramo de sustrato se dio en los tratamientos 1, 2, 3 y 4 con porcentajes de humedad de 30.43, 28.58, 29.27 y 29.44 con un tiempo de esterilización de 15 minutos. En contraste, la producción de conidios por gramo de sustrato fue menor en los tratamientos 5-16 sometidos a 20, 25 y 30 minutos de esterilización con porcentajes de humedad que oscilan entre 26.03 a 30.4 (Cuadro 5).

Cuadro 5. Producción de conidios de *T. asperellum* en sustrato de arroz con diferente contenido de humedad

Tratamiento	Tiempo de esterilización	Humedad del sustrato de arroz (%)	Cantidad de conidios/g	Cantidad de biomasa (g)
1	15	30.43	884500000 ab *	8.8 ab
2	15	28.58	934375000 a	8.34 abc
3	15	29.27	927500000 a	6.76 abcd
4	15	29.44	744062500 abc	9.95 a
5	20	28.5	660312500 abc	4.8 cdef
6	20	28.28	585937500 c	5.67 bcde
7	20	28.2	614375000 bc	3.47 def
8	20	28.71	607187500 bc	3.07 def
9	25	30.4	636250000 bc	2.71 ef
10	25	29.07	585937500 c	3.08 def
11	25	29	679062500 abc	3.29 def
12	25	28.84	638750000 bc	4.03 def
13	30	26.03	550937500 c	1.2 f
14	30	27.66	663125000 abc	3.12 def
15	30	27.95	664375000 abc	2.59 ef
16	30	26.84	548437500 c	2 ef

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales con base a la prueba de Tukey (0.05).

El análisis de varianza para la producción de conidios por gramo de sustrato mostró diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (arroz con diferente contenido de humedad esterilizado a diferentes tiempos) ($P < 0.05$).

De acuerdo a la prueba Tukey los tratamientos evaluados para la producción de conidios se pueden dividir en cinco grupos. El primer grupo corresponde al sustrato de arroz con una de humedad que oscilan entre 26.03 a 29.07% y tiempo de esterilización de 20, 25 y 30 minutos con producción de 5.48×10^8 a 5.85×10^8 conidios/g. El segundo grupo con una humedad entre 28.2 a 30.4% y tiempo de esterilización de 20 y 25 minutos con producción de 6.07×10^8 a 6.38×10^8 conidios/g. El tercer grupo corresponde a sustrato con humedad entre 27.66 a 29.44% y con tiempo de esterilización de 15, 20, 25 y 30 minutos con producción de 6.60×10^8 a 7.44×10^8 conidios/g. El cuarto grupo con porcentaje de

humedad del sustrato de 30.43 esterilizado 15 minutos con producción de 8.84×10^8 conidios/g. El quinto grupo con humedad de 28.58 y 29.27% esterilizados 15 minutos con producción de 9.27×10^8 y 9.34×10^8 conidios/g, siendo esta la humedad y el tiempo de esterilización del sustrato óptima para la producción de conidios de *T. asperellum* como se muestra en la Figura 9.

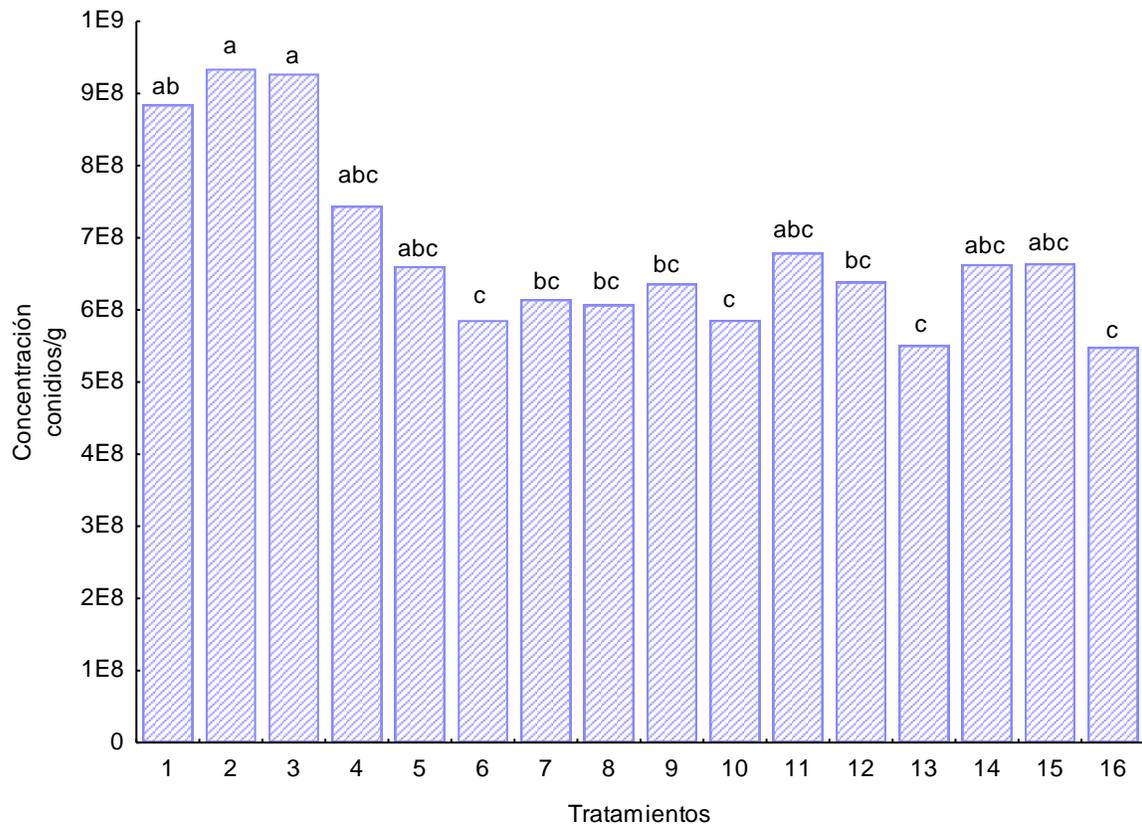


Figura 9. Comparación de medias de los tratamientos (porcentaje de humedad y tiempo de esterilización) y la producción de conidios/g de sustrato de arroz de acuerdo con la prueba Tukey ($P \leq 0.05$).

De los tratamientos 1, 2, 3 y 4 se obtuvo la mayor cantidad de biomasa, la cual fue obtenida del sustrato de arroz esporulado; por otra parte, en los tratamientos 9, 13, 15 y 16 se obtuvo la menor cantidad de biomasa fúngica.

El análisis de varianza de los tratamientos evaluados (arroz con diferente contenido de humedad esterilizados a diferentes tiempos) mostró diferencias significativas en la producción de biomasa fúngica ($P < 0.05$) (Cuadro 5).

De acuerdo a la prueba Tukey los tratamientos pueden dividirse en 9 grupos. El primer grupo corresponde al sustrato de arroz con contenido de humedad de 26.03% esterilizado 30 minutos del cual se obtuvo 1.2 g de biomasa. Los tratamientos del segundo grupo presentaron entre 2 a 2.71 g de biomasa, cuando la humedad del arroz oscila entre 26.84 a 30.4% y tiempo de esterilización de 25 y 30 minutos. El tercer grupo corresponde a los tratamientos cuyo sustrato contenía humedad entre 27.66 a 29.07% y esterilizados por 20, 25 y 30 minutos de los cuales se obtuvo 3.07 a 4.03 g de biomasa. El cuarto grupo con 28.5% de humedad esterilizado 20 minutos presentó 4.8 g. El quinto grupo con 28.28% de humedad esterilizado 20 minutos con cantidad de 5.67 g de biomasa. En el sexto grupo se obtuvieron 6.76 g de biomasa con humedad del sustrato de 29.27% y esterilizado 15 minutos. El séptimo grupo con 8.34 g de biomasa cuando el sustrato presentó 28.58% de humedad esterilizado 15 minutos. Se obtuvo 8.8 g de biomasa en el octavo grupo cuando el sustrato presentó 30.43% de humedad esterilizado 15 minutos. El noveno grupo incluyó al tratamiento que presentó humedad de arroz de 29.44% y esterilizado 15 minutos, del cual obtuvimos 9.95 g de biomasa, siendo este grupo el que mostró la mayor cantidad de biomasa de *T. asperellum* (Figura 10).

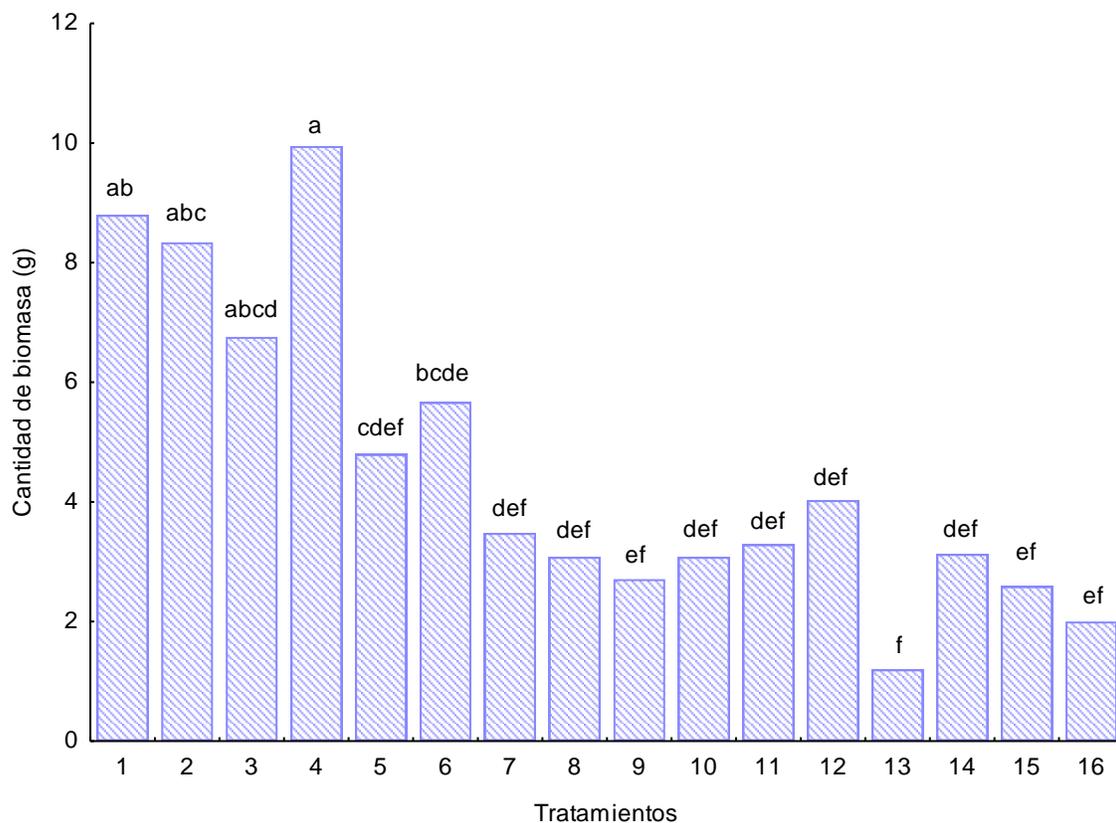


Figura 10. Comparación de medias de cantidad de biomasa de *T. asperellum* producida sobre sustrato de arroz con diferente contenido de humedad y tiempo de esterilización de acuerdo con la prueba Tukey ($P \leq 0.005$).

6.2. PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE *T. asperellum* EN SUSTRATO DE SORGO CON DIFERENTE CONTENIDO DE HUMEDAD Y TIEMPO DE ESTERILIZACIÓN

La producción de conidios de *T. asperellum* fue variable de acuerdo al contenido de humedad del sustrato de sorgo. La mayor producción de conidios por gramo de sustrato se dio en los tratamientos 3, 7 y 4 con porcentajes de humedad de 20.87, 23.29 y 20.97 con tiempos de esterilización de 15 y 20 minutos (Cuadro 6). En contraste, la producción de conidios por gramo de sustrato fue menor en los tratamientos 9, 11 y 10 sometidos a 25 minutos de esterilización con porcentajes de humedad que oscilan entre 19.02 a 20.51.

Cuadro 6. Producción de conidios de *T. asperellum* en sustrato de sorgo con diferente contenido de humedad

Tratamiento	Tiempo de esterilización	Humedad del sustrato de sorgo (%)	Cantidad de conidios/g	Cantidad de biomasa (g)
1	15	18.2	80937500 ab *	0.07 a
2	15	22.53	86562500 ab	0.07 a
3	15	20.87	149062500 a	0.56 a
4	15	20.97	122812500 ab	0.11 a
5	20	19.7	33750000 ab	0.02 a
6	20	20.49	33750000 ab	0.03 a
7	20	23.29	134062500 ab	0.19 a
8	20	21.27	80312500 ab	0.06 a
9	25	19.02	4375000 c	0.005 a
10	25	19.2	14062500 c	0.01 a
11	25	20.51	6875000 c	0.009 a
12	25	20.07	67500000 ab	0.11 a
13	30	19.46	19687500 ab	0.02 a
14	30	18.36	36875000 ab	0.03 a
15	30	20.55	58437500 ab	0.06 a
16	30	19.82	54062500 ab	0.04 a

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales con base a la prueba de Tukey (0.05).

El análisis de varianza para la producción de conidios por gramo de sustrato de sorgo mostró diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (sorgo con diferente contenido de humedad esterilizados a diferentes tiempos) ($P < 0.05$).

De acuerdo a la prueba Tukey los tratamientos evaluados para la producción de conidios se pueden dividir en tres grupos. El primer grupo corresponde al sustrato de sorgo con una humedad que oscila entre 19.02 a 20.51% y tiempo de esterilización de 25 minutos con producción de 4.37×10^6 a 1.40×10^7 conidios/g. El segundo grupo con porcentaje de humedad entre 18.2 a 23.29 y tiempo de esterilización de 15, 20, 25 y 30 minutos con producción de 1.96×10^7 a 1.34×10^8 conidios/g. El tercer grupo con humedad de 20.87%, esterilizado 15 minutos con producción de 1.49×10^8 conidios/g, siendo esta la humedad

y el tiempo de esterilización donde se obtuvo la mayor producción de conidios de *T. asperellum* (Figura 11).

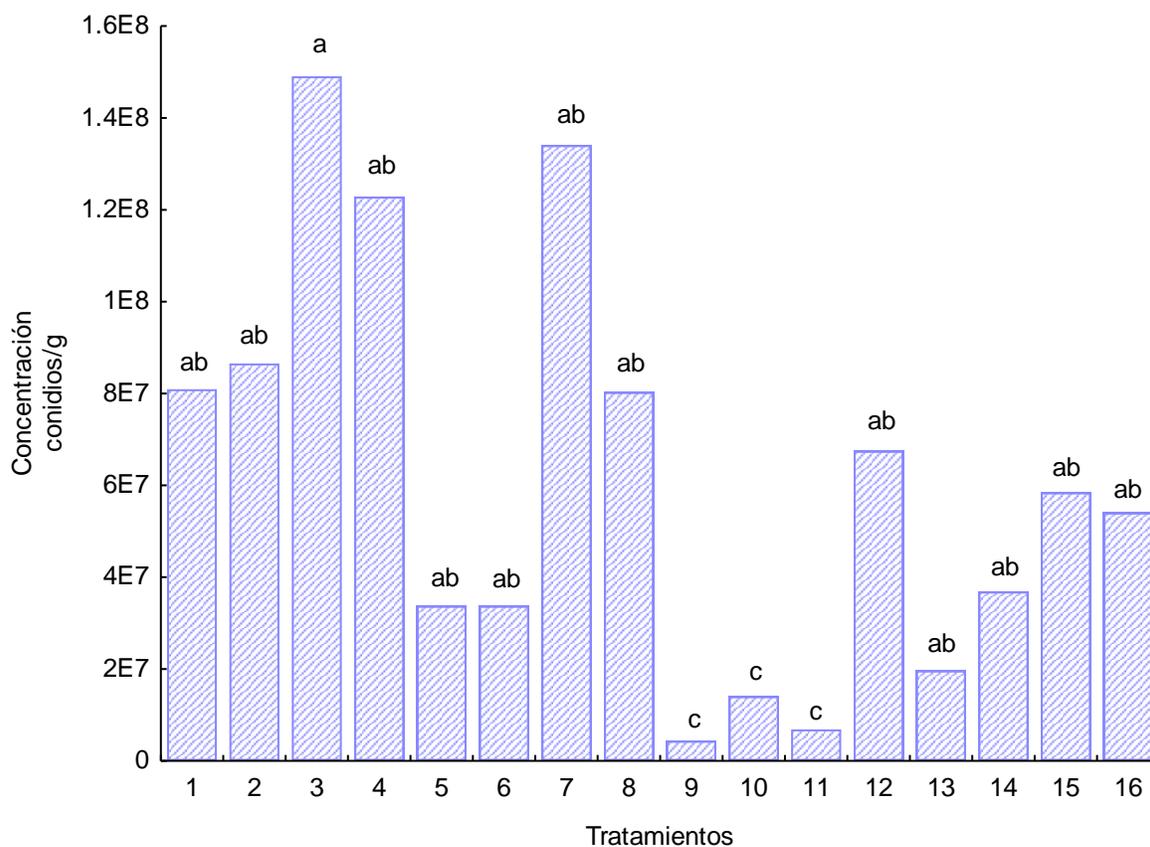


Figura 11. Comparación de medias de los tratamientos (porcentaje de humedad y tiempo de esterilización) y la producción de conidios/g de sustrato de sorgo de acuerdo con la prueba Tukey ($P \leq 0.05$).

De acuerdo a la biomasa obtenida, en el tratamiento 3 se obtuvo la mayor cantidad de biomasa (0.56 g), la cual fue obtenida de sustrato de sorgo esporulado; por otra parte, en los demás tratamientos se obtuvo menor cantidad de biomasa (Cuadro 6). Por lo que, el análisis de varianza de los tratamientos evaluados (sorgo con diferente contenido de humedad esterilizados a diferentes tiempos) mostró que no hay diferencias significativas en la producción de biomasa fúngica (Figura 12).

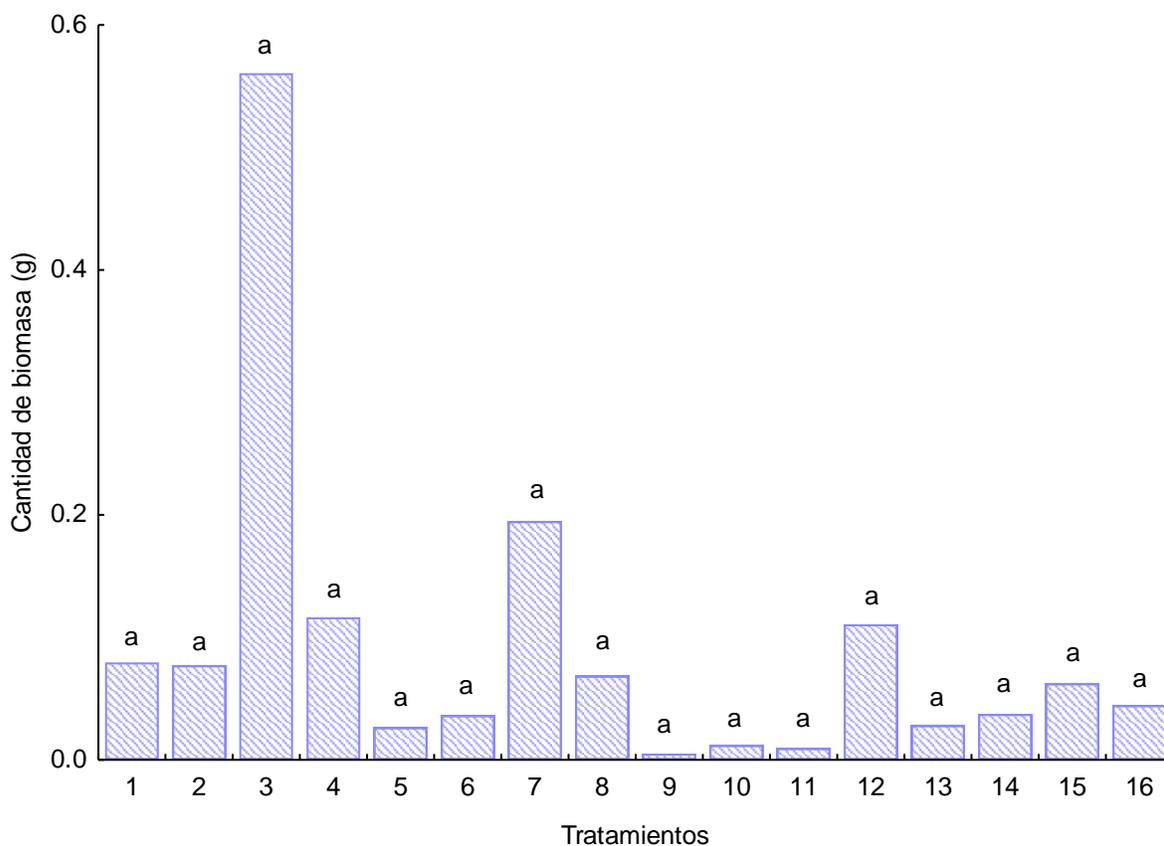


Figura 12. Comparación de medias de cantidad de biomasa de *T. asperellum* producida sobre sustrato de sorgo con diferente contenido de humedad y tiempo de esterilización de acuerdo con la prueba Tukey ($P \leq 0.05$).

6.3. PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE *T. asperellum* EN SUSTRATO DE ARROZ CON DIFERENTE CANTIDAD DE INÓCULO

T. asperellum inoculado en sustrato de arroz esporuló a los 3 días incubado bajo condiciones de laboratorio 24 ± 2 °C. Los tratamientos que fueron inoculados con 3 y 5 mL de suspensión conidial presentaron la mayor producción de conidios/g de sustrato, en contraste, la producción de conidios por gramo de sustrato de arroz fue menor cuando se inocularon 8 mL (tratamiento 3) de suspensión conidial.

El análisis de varianza para la producción de conidios en sustrato de arroz no mostró diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (sustrato de arroz inoculado con diferente cantidad de inóculo de *T. asperellum* con concentración de 1×10^7 conidios/mL).

De acuerdo a la prueba Tukey los tratamientos evaluados para la producción de conidios se agrupan en un solo grupo. El tratamiento 1 inoculado con 3 mL de suspensión conidial de *T. asperellum* presentó la mayor producción de conidios/g de sustrato (108, 750, 000 conidios/g) seguido por el tratamiento 2 inoculado con 5 mL con 104, 166, 667 conidios/g y el tratamiento 3 inoculado con 8 mL en el cual se obtuvieron 63, 750, 000 conidios/g, siendo este último tratamiento el que presentó la menor producción de conidios (Figura 13).

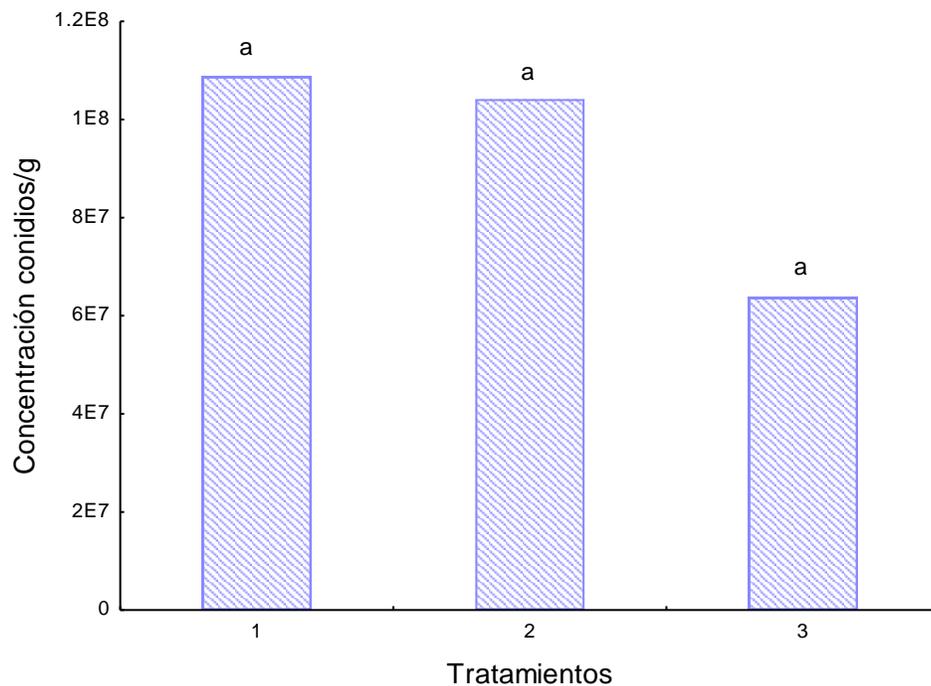


Figura 13. Comparación de medias de los tratamientos (cantidad de inóculo de *T. asperellum* y producción de conidios/g de sustrato de arroz).

6.4. PRODUCCIÓN Y CALIDAD DE CONIDIOS DE *T. asperellum*

La producción masiva de conidios de *T. asperellum* se realizó considerando los resultados de los bioensayos anteriores.

La producción de conidios de *T. asperellum* se realizó en sustrato de arroz inoculado con 3 mL de suspensión conidial incubado bajo condiciones de laboratorio (24 ± 2 °C). *T. asperellum* esporuló rápidamente a partir de los cuatro días y desarrolló una rápida colonización del sustrato presentando los granos una coloración verde oscura.

La biomasa de *T. asperellum* obtenida del tamizado de arroz esporulado tiene un tamaño de partícula no mayor a 0.125 mm, con humedad del 11.56%, la cantidad de conidios por gramo de biomasa fue de 2.74×10^{10} , la viabilidad de los conidios a las 16 horas fue de 86.36% y presentó un porcentaje de pureza de 98.41 (Figura 14).

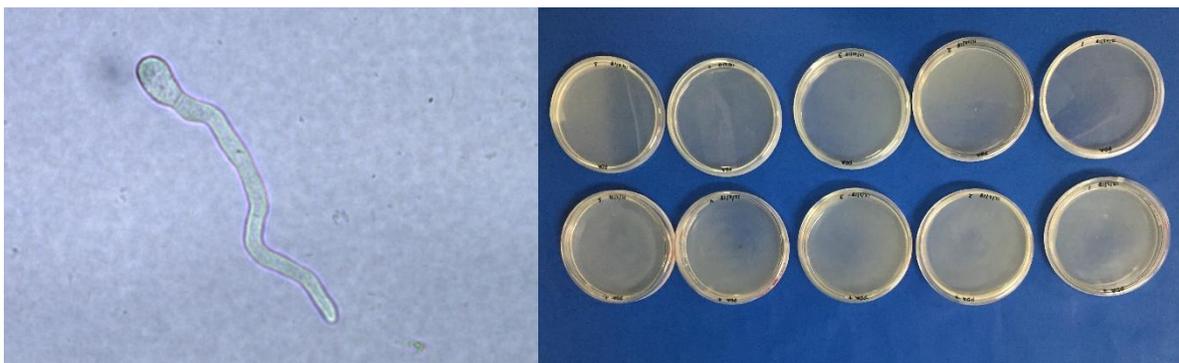


Figura 14. Evaluación de germinación y pureza de conidios de *T. asperellum* producidos en fermentación sólida en sustrato de arroz. a) Conidio germinado de *T. asperellum* incubado durante 16 horas en medio de cultivo EMA. b) Colonias de *T. asperellum* incubadas 48 horas en medio de cultivo EMA con y sin cloranfenicol.

6.5. COMPOSICIÓN DE FORMULACIONES DE *T. asperellum* Y EVALUACIÓN

La biomasa de *T. asperellum* producida bajo un sistema de fermentación sólida sobre sustrato de arroz durante 15 días fue integrada en condiciones asépticas con diferentes protectores y adyuvantes (Figura 15) para establecer las tres formulaciones evaluadas (Cuadro 7).

Cuadro 7. Composición de las formulaciones a base de conidios de *T. asperellum*

Biomasa, portadores y adyuvantes	Formulaciones			Testigo
	Formulación 1 (Santos <i>et al.</i> , 2012)	Formulación 2 (Kumar <i>et al.</i> , 2013)	Formulación 3 (Karunanithi <i>et al.</i> , 2001)	
Biomasa fúngica	0.8 g	20 g	20 g	20 g
Silicato de magnesio	98 g	100 g		
Colorante rojo	0.005 g			
Yeso			40 g	
Carboximetilcelulosa		500 mg	200 mg	



Figura 15. Formulaciones y testigo (conidios sin formular) de *T. asperellum*

La viabilidad de los conidios de *T. asperellum* en las formulaciones y el testigo empaquetadas en bolsas de polipapel y almacenadas a temperatura ambiente y en oscuridad fueron evaluadas inicialmente al establecer las formulaciones y a intervalos de 30 días por tres meses.

La viabilidad de los conidios de *T. asperellum* fue variable de acuerdo con la formulación y el tiempo de almacenamiento. En los tratamientos y el testigo no se evidenció una disminución progresiva de la viabilidad de los conidios durante los 90 días de almacenamiento. En el formulado 1 la evaluación inicial de UFC de *T. asperellum* fue de 1.131×10^8 /g y la viabilidad fue superior al 90% durante los 90 días de estudio.

El formulado 2 presentó en la evaluación cero o inicial 2.284×10^9 UFC/g y 90.57% de viabilidad. En la evaluación 3 realizada después de 90 días de almacenamiento se registró una disminución de la viabilidad y de las UFC de 88.22% y 2.224×10^9 /g, respectivamente.

La viabilidad del formulado 3 fue de 89.2% con 5.231×10^9 UFC/g, sin embargo, los resultados de la evaluación del formulado después de tres meses de almacenamiento fue de 5.224×10^9 UFC/g y 89.09% de viabilidad.

El tratamiento testigo, conidios sin formular, presentaron los porcentajes de viabilidad menores y la cantidad de UFC fue mayor. En la evaluación inicial se registró una viabilidad de 88.94% y 2.437×10^{10} UFC/g. En la evaluación 3 realizada después de tres meses de almacenamiento el porcentaje de viabilidad disminuyó ligeramente a 87.5 y presentó 2.398×10^{10} UFC/g (Cuadro 8).

Cuadro 8. Unidades formadoras de colonias y porcentaje de viabilidad de *T. asperellum* en tres formulados almacenados tres meses

Formulados	UFC de <i>T. asperellum</i> /g de formulado					% de viabilidad de los 3 formulados			
		Tiempo de almacenamiento (días)				Tiempo de almacenamiento (días)			
		0	30	60	90	0	30	60	90
1	$\times 10^8$	1.131 a	1.099 a	1.139 a	1.125 a	92.83 a	90.2 a	93.49 a	92.31 a
2	$\times 10^9$	2.284 ab	2.25 a	2.254 bc	2.224 b	90.57 ab	89.22 a	89.4 bc	88.22 b
3	$\times 10^9$	5.231 b	5.215 a	5.28 ab	5.224 ab	89.2 b	88.94 a	90.04 ab	89.09 ab
Testigo	$\times 10^{10}$	2.437 b	2.406 a	2.357 c	2.398 b	88.94 b	87.82 a	86.03 c	87.5 b

El análisis de varianza de los tratamientos evaluados inicialmente (formulaciones de *T. asperellum*) mostró diferencias significativas en el porcentaje de viabilidad de los conidios en los tres formulados y el testigo ($P < 0.05$).

De acuerdo a la prueba Tukey los tratamientos evaluados para la viabilidad inicial de los conidios de *T. asperellum* en los formulados se pueden dividir en tres grupos (Figura 16a). El primer grupo corresponde al formulado uno, registrando la mayor viabilidad de los conidios con 92.83%; la viabilidad de los conidios del formulado dos con 90.57% pertenecen al segundo grupo. Por el contrario, en el tercer grupo la viabilidad de los conidios del formulado tres y del testigo fue menor (89.2 y 88.94%), siendo estadísticamente iguales entre ellos.

El análisis de varianza para la viabilidad de los conidios de *T. asperellum* en los formulados almacenados durante 30 días no mostró diferencias significativas entre los tratamientos. El porcentaje de viabilidad de los conidios del formulado uno fue de 90.2, seguido por el formulado dos con 89.22%, el formulado tres con 88.94% y por último el testigo con el menor porcentaje de viabilidad (87.82) (Figura 16b).

En cuanto a los porcentajes de viabilidad de los conidios de *T. asperellum* en los formulados almacenados durante 60 días el análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). Al realizar la comparación de medias de porcentaje de viabilidad, como se puede apreciar en la Figura 16c, los tratamientos se dividen en cuatro grupos. La viabilidad del formulado uno es mayor que los demás tratamientos con 93.49%. El segundo grupo corresponde al formulado tres con 90.04% de viabilidad de los conidios de *T. asperellum*. El formulado dos con 89.4% de viabilidad corresponde al tercer grupo siendo diferente respecto al tratamiento cuatro (testigo) con 86.03% de viabilidad.

Los porcentajes de viabilidad de los conidios de *T. asperellum* en los formulados almacenados 90 días muestran diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ($P < 0.05$). La comparación de medias de porcentajes de viabilidad muestra que los tratamientos se dividen en tres grupos (Figura 16d). El porcentaje de viabilidad de los conidios en el formulado uno es mayor que los demás tratamientos con 92.31 siendo

estadísticamente diferentes a los demás; el grupo dos con 89.09% de viabilidad corresponde al formulado tres. Los conidios del formulado dos y el testigo presentan los porcentajes de viabilidad menores con 88.22 y 87.5.

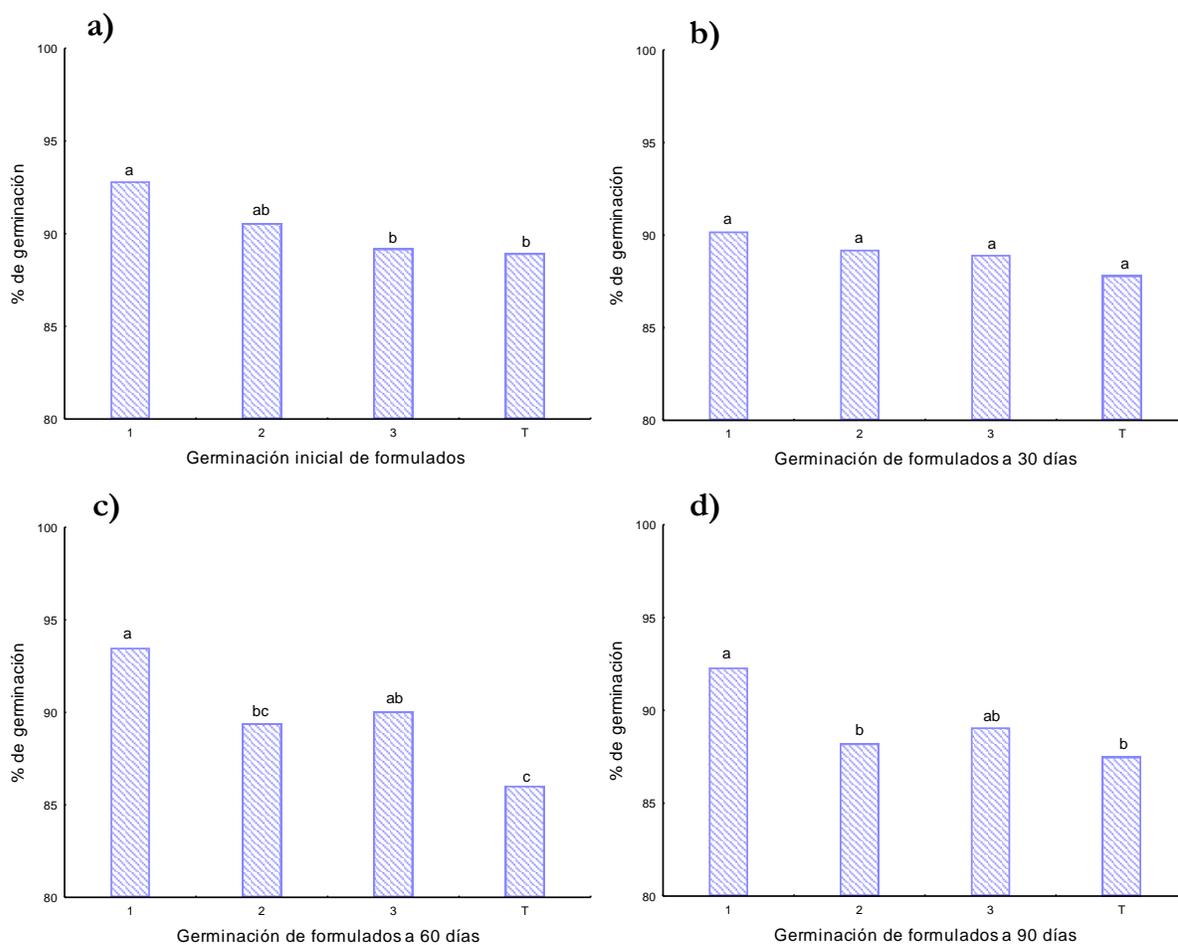


Figura 16. Porcentaje de germinación de los conidios de *T. asperellum* en tres formulados. *letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba Tukey ($P \leq 0.05$). a) Porcentajes iniciales de germinación de conidios en formulados. b) Porcentajes de germinación después de 30 días de almacenamiento de los formulados. c) Porcentajes de germinación después de 60 días de almacenamiento de los formulados. d) Porcentajes de germinación después de 90 días de almacenamiento de los formulados.

CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN

Los hongos del género *Trichoderma* desempeñan un papel muy importante como agentes de control biológico de enfermedades en las plantas. Las especies *T. harzianum*, *T. virens*, *T. viride*, *T. pseudokoningii*, *T. koningiopsis*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, entre otras, han sido evaluadas para inhibir el crecimiento de grupos importantes de hongos patógenos de plantas de importancia agrícola (Shi *et al.*, 2012; Gamboa-Villa, 2017; Mahmoud y Abdalla, 2018; Nawrocka *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2018).

La especie *T. asperellum* ha demostrado ser altamente eficiente para el control de patógenos de raíz, se ha reportado como antagonista notable hacia las especies fitopatógenas *F. oxysporum*, *F. verticilloides*, *F. proliferatum*, *F. sacchari* y *F. andiyazi* (Milanesi *et al.*, 2013; Hernández, 2014; Gamboa-Villa, 2017; Luna, 2017; Patel y Saraf, 2017) estas dos últimas especies son causantes de la necrosis de la raíz de la caña de azúcar en el estado de Morelos (Martínez- Jaimes *et al.*, 2014).

Para utilizar las cepas de *Trichoderma* spp. en el control de hongos patógenos es necesario realizar la producción masiva para disponer de cantidades necesarias. La fermentación en estado sólido es el sistema más utilizado para realizar la producción masiva de conidios de *Trichoderma* spp. considerando que la escala de producción sea moderada, además destacando como ventajas los costos relativamente bajos y la manipulación de factores clave, tales como el tamaño de partícula del sustrato y el contenido de humedad (Pandey, 2003; Chávez-García *et al.*, 2008; Vassilev y Mendes, 2018). Debido a la importancia que tiene el factor humedad en la producción de conidios en fermentación en estado sólido se han realizado investigaciones reportando diferentes metodologías en el manejo de los sustratos para determinar la humedad óptima para la producción de conidios de *Trichoderma* spp. Cavalcante *et al.* (2008) reportaron la producción de conidios de especies de *Trichoderma* en tres sustratos sólidos; el sustrato de arroz fue preparado sumergiendo 40 g en 80 mL de agua por un tiempo de 40 minutos y se esterilizó durante 15 minutos. Romero-Arenas *et al.* (2013) utilizaron granos de arroz previamente cocidos y los esterilizaron por 30 minutos para la producción de cuatro cepas nativas de *Trichoderma* spp. Por otro lado, en la

producción de hongos entomopatógenos Murillo-Alonso (2015), reporta la producción de *Isaria fumosorosea* en sustrato de granos de arroz; realiza tres lavados del sustrato con agua, lo hidrata, drena y esteriliza durante 60, 20 y 20 minutos, respectivamente.

La cepa de *T. asperellum* creció y esporuló en los dos sustratos evaluados, observando diferencias significativas en la producción de conidios y la cantidad de biomasa obtenida en cada uno de ellos. En el presente trabajo la humedad óptima del sustrato de arroz para la producción de conidios de *T. asperellum* se obtuvo en el tratamiento 2, el cual fue hidratado, drenado y esterilizado durante 30, 20 y 15 minutos, respectivamente. Con este tratamiento el porcentaje de humedad del sustrato fue 28.58 y se presentó producción de 9.34×10^8 conidios/g. Esta producción es mayor a la reportada por Cavalcante *et al.* (2008), quienes en sustrato de arroz con una humedad de $34.33 \pm 0.91\%$ obtuvieron una producción de 5.8×10^8 conidios/g de *T. harzianum*. De igual manera, Romero-Arenas *et al.* (2013) obtuvieron una producción de 74.37×10^4 conidios/mL de *Trichoderma* spp., A diferencia de lo anterior se tienen reportes de una mayor producción de *Trichoderma* spp., uno de estos reportes es el de Irimia-Hernández *et al.* (2016) quienes señalan una producción de 4.46×10^9 UFC/g de *T. harzianum* con contenido de humedad de 35%. Es evidente que la producción óptima de *Trichoderma* spp. se obtiene cuando el sustrato de arroz tiene una humedad máxima del 35%. Sin embargo, en otros sustratos el contenido de humedad debe ser más alto. Por ejemplo, Sachdev *et al.* (2018) reportan que en bagazo de caña con humedad del 68.87% se obtiene la mayor producción de conidios 20.05×10^7 conidios/g de *T. lixii*. Como se a notado el contenido de humedad no debe ser mayor al 50% para la producción de hongos filamentosos con fines de control, tal es el caso del hongo entomopatógeno *I. fumosorosea* obtuvo una producción máxima de 5.06×10^9 conidios/g en sustrato de arroz con una humedad de $39.14 \pm 1.8\%$ (Murillo-Alonso, 2015).

Los resultados obtenidos en esta investigación durante la fermentación sólida confirmaron lo señalado por Castillo (2005), Zhang y Yang (2015), Sachdev *et al.* (2018), Vassilev y Mendes (2018), indicando que los factores que influyen en la producción de hongos son la temperatura, pH, sustrato, tamaño de partícula, cantidad de inóculo, aireación y el contenido de humedad. De manera más particular Cavalcante *et al.* (2008), Pang *et al.*

(2006), Ferrer *et al.* (2014) y Ghazanfar *et al.* (2018) han indicado que el contenido de humedad del sustrato bajo un sistema de producción en estado sólido afecta las propiedades físicas del sustrato, ya que la humedad causa el ablandamiento del sustrato que a su vez facilita la absorción de nutrientes y el crecimiento del hongo. También, en esto coincidieron Hajieghrari *et al.* (2008) mencionando que para un crecimiento exitoso de agentes de control biológico durante la producción es necesario conocer un valor específico y óptimo de parámetros fisiológicos y ambientales.

En otros trabajos similares se ha destacado la importancia del arroz en la producción de *Trichoderma* spp. Allori *et al.* (2017), obtuvieron producción de 12.17, 9.17, 13.33 y 10.17 (conidios/g X 10⁸) de cuatro cepas antagónicas de *Trichoderma* (TPT03, TPT02, MRT40 y MRT35) sobre sustrato de arroz. De igual manera, Tewari y Bhanu (2004) reportaron producción de *T. harzianum* en sustrato de arroz de 10.80 X 10⁸ UFC/g. Asimismo, Rini y Sulochana (2007) señalan producción de *T. harzianum* (TR20) y *T. viride* (TR22) en sustrato de arroz de 31.0 y 20.6 X 10⁸ UFC/g respectivamente para cada especie. Rajput *et al.* (2014), demostraron que la producción de *T. harzianum* sobre granos de arroz fue de 27.27 X 10⁸ UFC/g. También, Rajput y Shahzad (2015) obtuvieron producción de *T. polysporum* sobre sustrato de arroz de 29.30 X 10⁸ UFC/g. Por otro lado, en la producción de hongos entomopatógenos Gandarilla-Pacheco *et al.* (2018), reportan la producción de cinco aislados de *I. fumosorosea*; la producción se realizó sobre sustrato de arroz y obtuvieron producción que oscila entre 6.69 X 10⁸ a 1.58 X 10⁹ conidios/g.

Aunque el sorgo ha sido considerado un sustrato adecuado para la producción de *Trichoderma* spp. (Rajput *et al.*, 2014 y Singh *et al.*, 2014). En este trabajo la producción de conidios en este grano fue menor que en sustrato de arroz., la humedad óptima del sustrato de sorgo para la producción de conidios de *T. asperellum* se obtuvo con el tratamiento 3, el cual fue hidratado, drenado y esterilizado durante 45, 30 y 15 minutos, respectivamente. Con este tratamiento el porcentaje de humedad del sustrato fue de 20.87 y presentó producción de 1.49 X 10⁸ conidios/g. Esta producción es mayor a la reportada por Singh *et al.* (2007), quienes en sustrato de sorgo obtuvieron producción de 2.1 X 10⁷ UFC/g de *T. harzianum*. Sin embargo, también se han reportado trabajos de una mayor producción de

Trichoderma spp. en sustrato de sorgo., uno de estos trabajos es el de Michel-Aceves *et al.* (2008) quienes señalaron una producción de 1.72×10^7 conidios/mL de *T. harzianum*. Asimismo, Singh *et al.* (2014) reportan una producción de 64×10^7 UFC/g de *T. harzianum*. De igual manera, Rini y Sulochana (2007) obtuvieron una producción de *T. harzianum* (TR20) y *T. viride* (TR22) de 156.3 y 138.6×10^8 UFC/g, respectivamente para cada especie. También, Rajput y Shahzad (2015) reportan producción de *T. polysporum* en sustrato de sorgo de 53.2×10^8 UFC/g.

La cantidad de biomasa en este trabajo fue variable para cada sustrato, presentando mayor cantidad el sustrato de arroz (9.95 g/100 g de sustrato esporulado), estos resultados se asemejan a lo indicado por Monzon (2004) quien señala que la biomasa de hongos entomopatógenos puede variar entre 20 a 80 g o más gramos de biomasa por cada kilogramo de sustrato esporulado. Por otra parte, debemos mencionar que en este trabajo el sustrato de sorgo se produjo una cantidad de biomasa mucho menor que fue de 0.56 g/100 g de sustrato esporulado.

En este trabajo se observó que el tiempo de esterilización del sustrato influyó en la producción de conidios y en la cantidad de biomasa de *T. asperellum*, resultando el mejor periodo de 15 minutos de esterilización. Estos resultados se asemejan a lo reportado por Cavalcante *et al.* (2008) quienes indican que la accesibilidad y disponibilidad de nutrientes en el sustrato sólido puede verse afectada por la humedad y la esterilización, así mismo mencionan que durante la hidratación del sustrato algunos nutrientes podrían haberse solubilizado y perdido en el agua.

La producción de conidios y la cantidad de biomasa en el presente trabajo fue mayor en el sustrato de arroz. Estos resultados obtenidos podrían explicarse debido a que *Trichoderma* spp. tiene la capacidad de usar gran variedad de fuentes de carbono y nitrógeno para su crecimiento y esporulación y el grano de arroz posee aproximadamente 62% de almidón lo que lo convierte en una fuente rica de carbono para su crecimiento (Rai y Tewari, 2016; Allori *et al.*, 2017). Esto también lo confirmaron Benites y Marroquín (2013), indicando que el desarrollo de *T. harzianum* es mejor en sustratos ricos en almidón y con porcentajes medios

de fibra. Además, el arroz por sus características nutricionales y por su disponibilidad es ampliamente utilizado en América del Norte y Europa para la producción de hongos entomopatógenos y *Trichoderma* (Hypocreales) a partir de procesos de fermentación artesanal e industrial (Agamez *et al.*, 2008; Jaronski y Jackson, 2012).

Se conocen algunas referencias recientes indicando que las especies de *Trichoderma* consideradas para ser utilizadas como agentes de control biológico deben ser evaluadas en formulaciones para su aplicación en campo (Santos *et al.*, 2012 y Vassilev y Mendes, 2018). En las formulaciones que tienen como principio activo agentes de control biológico (microorganismos) es necesario satisfacer los requisitos de eficacia y estabilidad bajo condiciones de almacenamiento (Butt *et al.*, 2001; Wraight *et al.*, 2001). Khan *et al.* (2011) reportan que una formulación con agentes de control biológico puede proporcionar un control eficaz siempre y cuando la dosis sea lo suficiente para soportar la supervivencia.

De acuerdo a datos dispersos de biofungicidas en el mercado 40% tienen como principio activo bacterias y el 60% restante son formulados a partir de *Trichoderma* spp. (Verma *et al.*, 2007). Una de las principales limitaciones para la aceptación y aplicación del control biológico con agentes microbianos es el desarrollo de formulaciones eficientes, con un costo accesible para el usuario final y de larga vida útil de almacén, preferentemente sin necesidad de refrigeración o de algún tratamiento especial (Jenkins y Grzywacz, 2000; Fravel, 2005; Jackson *et al.*, 2010). Por tal motivo han sido evaluadas formulaciones líquidas, encapsulados, pellets, geles, polvos y granulados que tienen como ingrediente activo *Trichoderma* spp. utilizando con frecuencia soportes en polvo o gránulos finos, siendo estos económicamente más rentables y viables (Verma *et al.*, 2007; Ramanujam *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2011).

Diversos factores relacionados con la producción tales como las condiciones nutricionales y ambientales, junto con el método de procesamiento, recolección de conidios, secado, así como el contenido de humedad, formulación y envasado desempeñan un papel importante en el almacenamiento exitoso a largo plazo (Jenkins y Grzywacz, 2000; Jackson *et al.*, 2010; Vassilev y Mendes, 2018).

De estos factores por su importancia destaca el contenido de la humedad de la biomasa de conidios (Jackson *et al.*, 2010). Monzón (2004) reportó que el contenido de humedad de la biomasa de conidios para control biológico debe ser del 4 al 6%; sin embargo, estos datos son inferiores al contenido de humedad de biomasa de *T. asperellum* utilizada en las tres formulaciones realizadas en esta investigación que fue de 11.5%. Resultados similares de humedad utilizaron Prasad *et al.* (2002) al evaluar formulaciones a base de polvo de caolín y talco con humedad del 11% las cuales, presentaron viabilidad de conidios y clamidosporas mayor a tres meses. Sriram *et al.* (2010) reportan formulaciones de *T. harzianum* con contenido de humedad del 10%, la cuales presentaron una vida útil mayor a cuatro meses.

En el desarrollo de biofungicidas con agentes de control biológico su calidad se basa en gran medida de las determinaciones de viabilidad (Wurms y Chee (2018). En la presente investigación la viabilidad inicial de los conidios de *Trichoderma* en las tres formulaciones y de los conidios sin formular (evaluadas a las 16 horas) fue de 92.68, 90.2, 89.2 y 88.95% respectivamente; resultados similares reportaron Espinoza y Vallejos (2016) indicando porcentajes de viabilidad iniciales en formulados con *Beauveria bassiana* y aceite de maní, grano de arroz y aceite de soya de 87.5, 92.1 y 92.8 respectivamente, sin embargo con arcilla blanca, arcilla verde, harina de trigo y sulfato de calcio los porcentajes de viabilidad iniciales fueron mayores a 95.1. Por otro lado, Murillo-Alonso *et al.* (2015) en formulaciones de *I. fumosorosea* con aceite de maíz, aceite de canola, aceite de oliva, aceite de cacahuate, aceite de soya y aceite mineral obtuvieron germinaciones iniciales que oscila entre 83 a 94% indicando que los conidios inmersos en agua (testigo) presentan 98% de viabilidad después de 24 horas de incubación. Los resultados obtenidos en esta investigación son inferiores a los reportados por Santos *et al.* (2012), quienes indicaron porcentajes de viabilidad iniciales mayores a 92.8% en formulados con *T. koningiopsis* y *T. asperellum* después de la incubación durante 24 horas. Posiblemente nuestros resultados fueron menores debido a que las lecturas de germinación de conidios siempre se realizaron a las 16 horas debido a que bajo nuestras condiciones a las 24 horas el crecimiento de hifas es muy desarrollado y no permitió el conteo.

En el presente estudio las tres formulaciones con *T. asperellum* almacenadas a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) y en oscuridad evaluadas a los tres meses no presentaron una disminución notable en su viabilidad manteniendo valores superiores al 85%, que se encuentran dentro de los rangos establecidos por Vélez *et al.* (1997) y Jenkins y Grzywacz (2000), quienes han señalado que una formulación comercial con agentes de control biológico debe tener una viabilidad mayor al 85%. Las formulaciones uno, dos y tres realizadas en esta investigación almacenadas durante tres meses, presentaron porcentajes de viabilidad de 92.31, 88.22 y 91.59 respectivamente; sin embargo, los conidios no formulados (testigo) presentaron los porcentajes de viabilidad más bajos (87.4 después de tres meses de almacen). Esto concuerda con lo señalado por Monzón (2001) y Santos *et al.* (2012) quienes señalaron que los conidios en formulación permanecen viables por más tiempo, debido a que los excipientes ejercen un efecto protector sobre el principio activo, mejorando su estabilidad durante el tiempo de almacenamiento y protegiendo el producto de condiciones adversas. Resultados similares de porcentaje de viabilidad en los formulados a los obtenidos en esta investigación fueron reportados por Santos *et al.* (2012), al evaluar formulados de granulos dispersable con con *T. koningiopsis* y *T. asperellum* almacenados a 28 ± 2 °C por tres meses presentaron viabilidad de 86.8 y 85.1% respectivamente y los formulados de polvo con *T. koningiopsis* y *T. asperellum* almacenados por tres meses presentaron 82 y 85.9% de viabilidad. En el presente trabajo la cantidad de UFC/g de los tres formulados y el testigo almacenados por tres meses se redujo en un 0.53, 2.63, 0.13 y 1.6% respectivamente. Estos resultados son superiores a los reportado por Kumar *et al.* (2013), cuando evaluaron la vida útil de formulaciones con diferentes concentraciones de biomasa de *T. viride* (biomasa obtenida bajo un sistema de fermentación sólido sobre granos de sorgo) utilizando como portador silicato de magnesio (talco) y carbón vegetal, ambas adicionadas con carboximetilcelulosa; registraron que las UFC de las formulaciones que tienen como portador talco y carbón vegetal almacenadas durante tres meses se redujo en promedio 46.65 y 47.61% respectivamente. Por otra parte, en formulaciones realizadas con biomasa de *T. asperellum*, talco y carboximetilcelulosa almacenadas a una temperatura de 28-30 °C registraron UFC/mL en la semana uno de 3.3×10^7 y fueron estables hasta la sexta semana

(1.5×10^7 UFC/mL), después de 16 semanas de almacén observaron una pérdida gradual del 99.63% (1.23×10^5 UFC/mL) (Wijesinghe *et al.*, 2011). Gupta y Dohroo (2014) reportaron la vida útil de formulados a base de *T. harzianum* y *T. hamatum* con aserrín de salvado de trigo y talco (1:2) almacenados a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) durante 80 días, sus resultados indican que las formulaciones presentaron al inicio 2.2×10^8 y 2.1×10^8 UFC/g respectivamente, sin embargo, después de 80 días de almacen la viabilidad se redujo 96.23 y 96.67% (8.3×10^6 y 7×10^6 UFC/g) respectivamente para cada especie. En otra formulacion a base de *T. harzianum* con lignito más ceniza y lignito presentaron UFC iniciales de 155×10^3 y 159×10^3 respectivamente, después de tres meses de almacen la viabilidad se redujo 23.90 y 14.84% (132×10^3 y 121×10^3 UFC/g) respectivamente para cada formulado (Jayaraj *et al.*, 2006). Karunanithi *et al.* (2001) evaluaron formulaciones con *T. viride* utilizando como portador ceniza, turba, caolín, lignito, yeso y talco, reportando que los dos últimos formulados presentaron mayor estabilidad, cuando fueron almacenados durante 90 días, presentando reducción de UFC/g de 54.95 y 49.59% respectivamente. Por otra parte, los resultados en esta investigación son menores a los reportados por Sriram *et al.* (2010) informando que una formulación con biomasa de *T. harzianum* y talco en relación 1:2 presentó 2.23×10^7 UFC/g inicialmente y también después de 3 meses de almacen.

En la esta investigación el formulado uno integrado con 0.8 g de biomasa de *T. asperellum*, 98 g de silicato de magnesio y 0.005 g de colorante rojo presentó los mayores porcentajes de viabilidad durante los tres meses de almacén (viabilidad superior al 90%). Seguido por los formulado tres y dos integrados con 20 g de biomasa y otros excipientes (89.09 y 88.22% de viabilidad después de tres meses de almacén). Por el contrario, los conidios sin formular (testigo) presentaron los porcentajes más bajos de viabilidad. Estos resultados indican que los formulados de *T. asperellum* no requieren de grandes cantidades de biomasa para mantener su viabilidad, así mismo, la etiqueta técnica el producto comercial PHC® T-22® indica un contenido de 1.15% de *T. harzianum* y el 98.85% restante corresponde a diluyentes, dispersantes, humectantes y protectores.

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

- La mayor producción de conidios de *T. asperellum* se alcanzó con el sustrato de granos de arroz con humedad que osciló entre 28.58 a 29.27% y tiempo de esterilización de 15 minutos.
- La mayor cantidad de biomasa de *T. asperellum* fue obtenida en sustrato de granos de arroz con humedad que osciló entre 28.58 a 30.43% con un tiempo de esterilización de 15 minutos.
- El tiempo de esterilización de los sustratos de granos de arroz y sorgo influyó en la producción de conidios de *T. asperellum*, presentando mayor producción cuando los sustratos fueron esterilizados durante 15 minutos.
- La cantidad óptima de inóculo para la producción masiva de conidios de *T. asperellum* sobre sustrato de granos de arroz fue de 3 mL con concentración de 1×10^7 conidios/mL.
- Las tres formulaciones y el testigo (conidios sin formular) almacenados durante tres meses presentaron una viabilidad superior al 85%. El formulado uno integrado con 0.8 g de biomasa de *T. asperellum*, 98 g de silicato de magnesio y 0.005 g de colorante rojo presentó los mejores resultados de viabilidad después de tres meses de almacenamiento (92.31%).

CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA

Agamez, R.E.Y., Zapata, N.R.I., Oviedo, Z.L.E. y Barrera, V.J.L. 2008. Evaluación de sustratos y proceso de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. Revista Colombiana de Biotecnología. 10(2): 23-34.

Agus, N., Saranga, A.P., Rosmana, A. y Sugiarti A. 2015. Viability and conidial production of entomopathogenic fungi *Penicillium* sp. International Journal of Scientific & Technology Research. 4(1): 193-195.

Ait-Lahsen, H., Soler, A., Rey, M.J., De la Cruz, J., Monte, E., y Llobell, A. 2001. An antifungal Exo- α - 1,3-glucanase (AGN 13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology. 67: 5833-5839.

Allori, S.E., Yasem de Romero, M.G. y Ploper, L.D. 2017. Evaluación de sustratos para la producción de esporas de *Trichoderma* y estudio del crecimiento en arroz de las cepas antagónicas TPT03, TPT02, MRT35 y MRT40. Revista Agronómica del Noroeste Argentino. 37(1): 57-66.

Arévalo, E., Cayotopa, J., Olivera, D., Gárate, M., Trigos, E., Costa, do. Bomfim y Leon, B. 2017. Optimización de sustratos para la producción de conidias de *Trichoderma harzianum*. Por fermentación sólida en la región de San Martín. Perú. Journal of High Andean Research. 19 (2): 135-144.

Asano, T., Tsudzuki, T., Takahashi, S., Shimada, H. y Kadowaki, K. 2004. Complete nucleotide sequence of the sugarcane (*Saccharum officinarum*) chloroplast genome: a comparative analysis of four monocot chloroplast genomes. DNA. 11: 93-99.

Askun, T. 2018. Introductory chapter: *Fusarium*-pathogenicity, infections, diseases, mycotoxins and management. In: Askun, T. (ed), Plant diseases, pathogen diversity, genetic diversity, resistance and molecular markers. IntechOpen. 1-12 pp.

Babalola, O. O. 2010. Beneficial bacteria of agricultural importance. Biotechnology Letters. 32: 1559-1570.

Benites, B.C.M. y Marroquín, L.C. 2013. Producción de *Trichoderma harzianum* en diferentes sustratos orgánicos. Revista Portal de la Ciencia. 4:68-74.

Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C. y Codón, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7: 249-260.

Bernal, A., Andréu, C.M., Moya, M.M. y González, O. 2000. Utilización de *Trichoderma* spp. como alternativa ecológica para el control de *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp *cubense* (e.f. Smith) Snyder & Hans. *Fitosanidad*. 12: 16-19.

Bettioli, W., Rivera, M.C., Mondino, P., Montealegre, J.R. y Colmenárez, Y.C. 2014. Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe. Ficha catalográfica. Facultad de Agricultura. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 404 p.

Bonatterra, A., Badosa, E., Cabrefiga, J., Francés, J. y Montesinos, E. 2012. Prospects and limitations of microbial pesticides for control of bacterial and fungal pomefruit tree diseases. *Trees*. 26: 215-226.

Booth, C. 1971. *The Genus Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. United Kingdom. Inglaterra. 237 pp.

Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., y Soberón, M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 41(7): 423-431.

Butt, T.M., Jackson, C. y Magan, N. 2001. Introduction-fungal biological control agents: progress, problems and potential. In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.), *Fungi as biocontrol agents. Progress, problems and potential*. CABI Publishing, Wallingford. 1-8 p.

Cavalcante, R.S., Lima, H.L.S., Pinto, G.A.S., Gava, C.A.T. y Rodrigues, S. 2008. Effect of moisture on *Trichoderma* conidia production on corn and wheat bran by solid state fermentation. *Food and Bioprocess Technology*. 1: 100-104.

Campbell, R. 1989. *Biological control of microbial plants pathogens*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 208 p.

Campos, H.A., Cruz, C.E. y Canul, K.J. 2012. Tecnologías para el manejo y control de plagas y enfermedades en caña de azúcar en el estado de Morelos. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Pacifico Sur. Folleto para productor No.62. Zacatepec, Morelos, México. 28 p.

Campos, H.A. y Lugo, A.A. 2012. Manual de plagas y enfermedades en caña de azúcar para el estado de Morelos. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Centro. Folleto para productor No.60. Zacatepec, Morelos, México. 19 p.

Candelerio, D.J., Cristóbal, A.J., Reyes, R.A., Tun, S.J.M., Gamboa, A.M.M. y Ruíz, S.E. 2015. *Trichoderma* spp. promotoras del crecimiento en plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. Y antagonicas contra *Meloidogyne incognita*. Revista Nacional de Botánica Experimental. 84: 113-119.

Cañedo, V. y Ames, T. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa. Lima. Perú. 62 p.

Cardona, L.N., Borrego, D.A., Fernández, E.P., Sánchez, J., Cardona, V. y Montoya, G. 2014. Microbiological evaluation and pathogenicity of a liquid bioformulation of the fungus *Purpureocillium* sp. (strain UdeA 0109) on *Meloidogyne incognita-javanica* stages. Biotecnología Aplicada. 31(3): 210-215.

Castillo, C. D.M. 2005. Evaluación del crecimiento y desarrollo de *Trichoderma aureoviride* TAT-1 en una fermentación en estado sólido sobre sustrato de arroz. Ciencia y Desarrollo. 27-32.

Chaverri, P., Gazis, R.O. y Samuels, G.J. 2011. *Trichoderma amazonicum*, a new endophytic species on *Hevea brasiliensis* and *H. guianensis* from the Amazon basin. Mycologia. 103 (1): 139-151.

Chávez-García, M., Montaña-Lara, J.S., Martínez-Salgad, M.M., Mercado-Reyes, M., Rodríguez, M.J. y Quevedo-Hidalgo, B. 2008. Efecto del sustrato y la exposición a la luz en la producción de una cepa de *Trichoderma* sp. Universitas Scientiarum. 13 (3): 245-251.

Chávez, G. M.P. 2006. Producción de *Trichoderma* sp. y evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Microbiología Industrial – Microbiología Agrícola y Veterinaria. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 178 p.

Cazorla, P.D. y Morales, M.P. 2016. Efecto de formulaciones acuosas y aceitosas de 13 aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* (Ascomycota) sobre *Rhodnius prolixus* (Triatominae) bajo condiciones experimentales. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 27(4):771-782.

Colina, A., Ferrer, A. y Urribarrí, L. 2009. Cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 from different cellulosic substrates. Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia. 32(2): 152-159.

Comstock, J.C. 2013. Sugarcane diseases: Futuristic management strategies. Sugar Tech 15(1):1-2.

CONADESUCA. 2016. Comisión Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar. Balances Mundiales de Azúcar. En línea. Disponible en http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/176227/Balances_mundiales_3er_Triestre_2016.pdf (Consultado en marzo del 2017).

Cook, R.J. y Baker, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society., St. Paul, MN. 539 pp.

Cupull, S.R., Andréu, R. C.M., Pérez, N.C., Delgado, P.Y. y Cupull, S.M. del C. 2003. Efecto de *Trichoderma viride* como estimulante de la germinación, en el desarrollo de posturas de cafetos y el control de *Rhizoctonia solani* Kuhn. Centro Agrícola. 30(1):21-25.

DOF, 2015. Diario Oficial de la Federación. Programa Nacional de la Agroindustria de la Caña de Azúcar. En línea. Disponible en http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5343244&fecha=02/05/2014 (Consultado en octubre del 2016).

Elósegui, C.O. 2006. Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. La Habana, Cuba. 61 p.

Elósegui, C.O., Fernández-Larrea, V.O., Ponce, G.E., Borges, M.G., Rovesti, L. y Jiménez, R.J. 2009. Colecta de esporas de *Trichoderma harzianum* Rifai cepa A34 por lecho fluidizado y ciclón dual y por tamizaje vibratorio. Fitosanidad. 13(4): 265-269.

Espinoza, R. G.C. y Vallejos, T. F. L. 2016. Desarrollo de formulaciones bioplaguicidas a base de *Beauveria bassiana* (Bals & Vuils) con materiales sólidos y líquidos. Tesis profesional de Ingeniería. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua. 46 pp.

Faria, M.R. y Wraight, S.P. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*. 43: 237-256.

Ferrer, G. J.R., Machado, J.L. y Brieva, J. 2014. Fermentación en estado sólido: Una alternativa biotecnológica para el aprovechamiento de desechos agroindustriales. *Revista Tecnológica URU*. 7: 11-22.

Ferre, F.S. y Santamarina, M.P. 2010. Efficacy of *Trichoderma harzianum* in suppression of *Fusarium culmorum*. *Annals of Microbiology*. 60: 335-340.

Francés, J., Bonaterra, A., Moreno, M.C., Cabrefiga, J., Badosa, E. y Montesinos, E. 2006. Pathogen aggressiveness and postharvest biocontrol efficiency in *Pantoea agglomerans*. *Postharvest Biology and Technology*. 39: 299-307.

Fravel, D.R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*. 43: 337-359.

Fonseca, G.A., Peña, CH.G., Trejo, L.A.G., Lina, G.L.P., Rodríguez, B.L.A. y Hernández, V.V.M. 2013. Patogenicidad y virulencia de cepas de *Bacillus thuringiensis* nativas del estado de Morelos sobre *Diatraea magnifactella* (Lepidoptera: Crambidae). *Acta Zoológica Mexicana*. 29(3): 534-544.

Gamboa-Villa, C.L. 2017. Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. para el control de *Fusarium sacchari* y *Fusarium andiyazi* causantes de la necrosis de las raíces de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas. Universidad Autónoma del estado de Morelos. 106 p.

Gandarilla-Pacheco, F.L., Morales-Ramos, L.H., Pereyra-Alfárez, B., Elías-Santos, M. y Quintero-Zapata, I. 2018. Producción de unidades infectivas de *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) a partir de aislados nativos del noreste de México mediante 3 estrategias de propagación. *Revista Argentina de Microbiología*. 50(1):81-89.

García-Núñez, H.G., Martínez-Campos, A.R., Hermosa-Prieto, M.R., Monte-Vásquez, E., Aguilar-Ortigoza, C.J. y González-Esquivel, C.E. 2017. Morphological and molecular characterization of native isolates of *Trichoderma* and its potential biocontrol against *Phytophthora infestans*. Revista Mexicana de Fitopatología. 35: 58-79.

García, R., Durán, M.A. y Riera, R. 2006a. Producción de biomasa de *Trichoderma harzianum* por fermentación líquida. Fitosanidad. 10(4): 295-298.

García, R., Riera, R., Zambrano C. y Gutiérrez L. 2006b. Desarrollo de un fungicida biológico a base de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de la región andina venezolana. Fitosanidad. 10(2): 115-121.

Gerlach, W. y H.I. Nirenberg. 1982. The genus *Fusarium* – a Pictorial Atlas. Biologische Bundesanstalt für Land – und Forstwirtschaft Institut für Mikrobiologie. Berlin, Alemania. 406 p.

Ghazanfar, M.U., Raza, M. y Raza, W. 2018. Effect of physiological parameters on mass production of *Trichoderma* species. Pakistan Journal of Phytopathology. 30(01):59-65.

Goettel, M. S. y Inglis, G. D. 1997. Fungi: Hyphomycetes. In Lawrence A. Lacey (Ed.), manual of techniques in insect pathology (213-147 pp). San Diego, CA: Academic Press.

González, C. J.C., Maruri, G. J.M. y González, A. A. 2005. Evaluación de diferentes concentraciones de *Trichoderma* contra *Fusarium oxysporum* agente causal de la pudrición de plántulas de papaya (*Carica papaya* L.) en Tuxpan, Veracruz, México. Revista UDO Agrícola. 5(1): 45-47.

Grijalbab, E.P., Villamizar, R.L. y Cortes, P. A.M. 2009. Evaluación de la estabilidad de *Paecilomyces* sp. y *Beauveria bassiana* frente a la radiación ultravioleta. Revista Colombiana de Entomología. 35(1): 1-6.

Guédez, C., Cañizalez, L., Castillo, C. y Olivar, R. 2012. Evaluación *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 32: 44-49.

Gupta, M. y Dohroo, N.P. 2014. Shelf life study of formulations of fungal and bacterial antagonists as bioinoculants. Agricultural Science Digest. 34(4): 281-284.

Hajieghrari, B., Torabi, G. M., Mohammadi, M.R. y Davari, M. 2008. Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. African Journal of Biotechnology. 7(8): 967-972.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. y Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology 2: 43-56.

Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology. 96: 190-194.

Heredia, G.E. y Delgadillo, S.F. 2000. El ajo en México. Origen, mejoramiento genético tecnología de producción. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Instituto Nacional de Investigación Forestales Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Centro Campo Experimental Bajío. Celaya. 101 p.

Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, L. y Monte, E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiology. 158: 17-25.

Hernández, V. S.M. 2014. Aislamiento y evaluación *in vitro* de organismos antagonistas para el control de *Fusarium* spp., agente causal de la marchitez y pokkah boeng en caña de azúcar. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado de México. 71 p.

Hernández, V.M. 1996. Formulaciones y Control de Calidad. Memoria Curso-Taller de Producción Masiva de Agentes de Control Microbiano. P 42-48.

Hyder, S., Inam-ul-Haq, M., Bibi, S., Malik, A.H., Ghuffar, S. y Iqbal, S. 2017. Novel potential of *Trichoderma* spp. as biocontrol agent. Journal of Entomology and Zoology Studies. 5(4): 214-222.

Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease. 87:4-10.

Ibarra, J.E., Del Rincón, C. M.C., Galindo, E., Patiño, M., Serreno, L., García R., Carrillo, J.A., Pereyra, A.B., Alcázar, P.A., Luna, O.H., Galán W.L., Pardo, L., Muñoz, G.C., Gómez, I., Soberón, M. y Bravo, A. 2006. Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. Revista Latinoamericana de Microbiología. 48(2): 113-120.

Infante, D., Martínez, B., González, E. y González, N. 2009. *Puccinia kuehnii* (KRÜGER) BUTLER Y *Puccinia melanocephala* H. SYDOW Y P. SYDOW: en el cultivo de la caña de azúcar. *Protección Vegetal*. 24(1): 22-28.

Irimia-Hernández, M.I., Rodríguez-Hernández, A.L. y Castellanos-Gonzalez, L. 2016. Humidity level, strain and quantity of entire rice grain substrate for reproduction of *Trichoderma* spp. *Revista Agroecosistemas*. 4(1): 39-45.

Jackson, M.A., Dunlap, C.A. y Jaronski, S.T. 2010. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl*. 55: 129-145.

Jaronski, S.T. y Jackson, M.A. 2012. Mass production of entomopathogenic Hypocreales. In: Lacey, L.A. (ed.), *Manual of techniques in invertebrate pathology*. Academic Press, San Diego. 255-284 pp.

Jayaraj, J., Radhakrishnan, N.V. y Velazhahan, R. 2006. Development of formulations of *Trichoderma harzianum* strain M1 for control of damping-off of tomato caused by *Phytophthora aphanidermatum*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 39(1): 1-8.

Jenkins, N.E. y Grzywacz, D. 2000. Quality control of fungal and viral biocontrol agents- assurance of product performance. *Biocontrol Science and Technology*. 10: 753-777.

Karunanithi, K., Muthusamy, M. y Seetharaman, K. 2001. Short Communication Gypsum – A suitable material for the mass multiplication of *Trichoderma viride*. *Tropical Agricultural Research and Extension*. 4(2):115-116.

Kerruish, R.M. 2014. *Plant protection 2 control methods and their management* (4th edition). RootRot Press ACT. Australia. 224 pp.

Khan, M.R., Majid, S., Mohidin, F.A. y Khan, N. 2011. A new bioprocess to low cost poder formulations of biocontrol bacteria and fungi to control fusarial wilt root-knot nematode of pulses. *Biological Control*. 59: 130-140.

Krishna, C. 2005. Solid-State Fermentation Systems – An overview. *Critical Reviews in Biotechnology*. 25 (1-2): 1-30.

Kubicek, C.P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martínez, D.A., Druzhinina, I.S., Thon, M., Zeilinger, S., Casas-Flores, S., Horwitz, B.A., Mukherjee, P.K. y otros autores. 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology*. 12: R40.

Kubicek, C. P. y Harman, G. E. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor and Francis Ltd. 271 p.

Kumar, S., Kumar, R. y Om, H. 2013. Shelf- life of *Trichoderma viride* in talc and charcoal based formulations. *Indian Journal of Agricultural Sciences*. 83(5): 566-569.

Lehoczki-Krsjak, S., Szabó-Hevér, A., Tóth, B., Kótai, C., Bartók, T., Varga, M., Farády, L. y Mesterházi, Á. 2010. Prevention of *Fusarium* mycotoxin contamination by breeding and fungicide application to wheat. *Food Additives and Contaminants*. 27(5): 616-628.

Leslie, J.F. y Summerell, B.A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 274 p.

López-Alcánata, Y.M., Martínez-Fernández, E. y Martínez-Jaimes, P. 2016. Evaluación *in vitro* de fungicidas benzimidazoles hacia *Fusarium sacchari*, patógeno de la caña de azúcar. *Investigación Agropecuaria*. 13(2): 153-159.

Luna, V. A. M. 2017. Actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* contra *Fusarium oxysporum* y *Fusarium verticillioides* de cebolla. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. 58 p.

Mahmoud, A.F. y Abdalla, O.A. 2018. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* spp. against sesame wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. Sesami. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 1-11.

Malusá, E. y Vassilev, N. 2014. A contribution to set a legal framework for biofertilisers. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98: 6599-6607.

Mar, T.T. y Lumyong, S. 2012. Conidial production of entomopathogenic fungi in solid state fermentation. *KKU Research Journal*. 17(5): 762-768.

Martínez-Jaimes, P. 2014. Especies de *Fusarium* causantes de la necrosis de raíces de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en el estado de Morelos. Tesis de Maestría en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos. 60 p.

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

Martínez-Fernández, E., Martínez-Jaimes, P., García-Montalvo, J.C. y Burgos-Solorio, A. 2014. El carbón *Sporisorium scitamineum* de la caña de azúcar en el Estado de Morelos, México. Investigación Agropecuaria. 11(2):114-118.

Martínez, B., Infante, D. y Reyes, Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Revista de Protección Vegetal. 28(1): 1-11.

Martínez, C. L.C. 2010. Desarrollo de un prototipo de formulación con hongos entomopatógenos para el manejo de *Demotispá neivai* Bondar (Coleoptera: Chrysomelidae). Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias con énfasis en Entomología. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Colombia. 121 p.

Mastouri, F., Björkman, T. y Harman G.E. 2010. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. Phytopathology. 100(11):1213-1221.

McFarlane, G.P. y Rutherford, R.S. 2010. *Fusarium* species causing Pokkah boeng and their effect on *Eldana Saccharina* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). South African Sugarcane Research Institute. 83: 267 – 270.

Méndez-Villas, A. 2010. A review on contributions presented at the BioMicroWorld2009 Conference. American Journal of Agricultural and Biological Sciences. 5 (4): 486-487.

Michel-Aceves, A. C. 2001. Cepas nativas de *Trichoderma* spp. Euascomycetes: Hypocreales), su antibiosis y microparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (Hyphomycetes: Hyphales). Tesis de doctorado. Biotecnología. Universidad de Colima, México. 152 pp.

Michel-Aceves, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Martínez-Rojero, R. D., Ariza-Flores, R., Barrios-Ayala, A. y Rebolledo-Martínez, A. 2008. Control biológico *in vitro* de enfermedades fungosas en tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. Avances de Investigación Agropecuaria. 12:43-54.

Milanesi, P.M., Blume, E., Antonioli, Z.I., Muñiz, M.F.B., Santos, R.F., Finger, G. y Durigon, M.R. 2013. Biocontrol de *Fusarium* spp. con *Trichoderma* spp. e promoção de crescimento em plântulas de soja. Revista de Ciências Agrárias. 36(3): 347-356.

Mohanraj, D., P. Padmanaban., y R. Viswanathan. 2002. Biological control of sugarcane diseases. pp. 161-178. *In*: S. S. Gnanamanickam. Biological Control of Crop Disease. Marcel Dekker Inc. New York. USA.

Mohammadi, A., Nejad, R.F., y Mofrad, N.N. 2012. *Fusarium verticillioides* from sugarcane, vegetative compatibility groups and pathogenicity. Plant Protection Science. 48 (2): 80-84.

Mohd, J. J., Ahmad, D.N., Ahmad, B.T., Hussain, B.A. y Ahmad, B.M. 2013. Commercial biocontrol agents and their mechanism of action in the management of plant pathogens. International Journal of Modern Plant y Animal Sciences. 1(2): 39-57.

Morales, L. 1993. Formulación de bioinsecticidas, Biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrada en *Bacillus thuringiensis*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, p.85-89.

Monzón, C.A. 2004. Producción y uso de hongos entomopatógenos. Fundación para el Desarrollo Tecnológico Agropecuario y Forestal de Nicaragua. Universidad Agraria. 63 p.

Monzón, C.A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas. 62: 95-103 p.

Mukherjee, M., Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Zachow, C., Berg, G. y Zeilinger, S. 2012. *Trichoderma*- plant- pathogen interactions: advances in genetics of biological control. Indian Journal Microbiology. 52(4): 522-529.

Mukherjee, A. K., Kumar, A. S., Kranthi. S. y Mukherjee, P. K. 2014. Biocontrol potential of three novel *Trichoderma* strains: isolation, evaluation and formulation. *Biotech Magazine*. 4: 275-281.

Muñiz-Vélez, R., Burgos-Dueñas, A., Burgos-Dueñas, O., López-Martínez, V. y Burgos-Solorio, A. 2015. Nuevas aportaciones a los Curculionoidea del estado de Morelos, México. *Folia Entomológica Mexicana*. 1(1):25-49.

Murillo-Alonso, K.T. 2015. Producción y formulación de conidios de *Isaria fumosorosea* cepa EH-511/3 para el control de *Bemisia tabaci*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 85 p.

Murillo-Alonso, K., Peña-Chora, G., Hernández-Baltazar, E. y Hernández-Velázquez, V.M. 2015. Conidia production by *Isaria fumosorosea* on solid substrates and its pathogenicity towards *Bemisia tabaci*. *Biocontrol Science and Technology*. 25(2): 175-184.

Nawrocka, J., Malolepsza, U., Szymczak, H. y Szczech, M. 2018. Involvement of metabolic components, volatile compounds, PR proteins, and mechanical strengthening in multilayer protection of cucumber plants against *Rhizoctonia solani* activated by *Trichoderma atroviride* TRS25. *Protoplasma*. 255: 359-373.

Nelson, P.E., Toussoun, T.A. y Marasas, O.W. F. 1983. *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press. Pennsylvania. USA. 226 p.

Nieto-Jacobo, M.F., Steyaert, J.M., Salazar-Badillo, F.B., Nguyen, D.V., Rostás, M., Braithwaite, M., De Souza, J.T., Jiménez-Bremont, J.F., Ohkura, M., Stewart, A. y Mendoza-Mendoza, A. 2017. Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects índole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Frontiers in Plant Science*. 8:102.

Noboa, G. G.P. y Quelal, G. A.D. 2015. Diseño e implementación de un protocolo para mejorar la producción y conservación de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum* como aporte a los productores de café orgánico de la asociación “RÍO INTAG”, Cantón, Cotacachi. Tesis de Licenciatura en Biotecnología de los Recursos Naturales. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito. Ecuador. 120 p.

Osirio- Concepción, M., Casas- Flores, S. y Cortés- Penagos, C. 2013. Efecto de la limitación de fosfato sobre la conidiación de *Trichoderma atroviride* y mutantes ciegas a la luz. *Revista Mexicana de Micología*. 37: 41-50.

Pandey, A. 2003. Solid fermentation state. *Biochemical Engineering Journal*. 13: 81-84.

Pang, P.K., Darah, I., Poppe, L., Szakacs, G. y Ibrahim, C.O. 2006. Xylanase production by a local isolate, *Trichoderma* spp. FETL c3-2 via solid state fermentation using agricultural wastes as substrates. *Malaysian Journal of Microbiology*. 2(1): 7-14.

Patel, S. y Saraf, M. 2017. Biocontrol efficacy of *Trichoderma asperellum* MSST against tomato wilting by *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. DOI: 10.1080/03235408.2017.1287236.

Perdomo, M., Peña, J., Guédez, C., Castillo, C. y Cánasales, L. 2007. *Trichoderma harzianum* para el control de la enfermedad “sanchocho” en semilleros de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. Academia. 6(12): 52-61.

Prasad, R.D., Rangeshwaran, R., Anuroop, C.P. y Phanikumar, P.R. 2002. Bioefficacy and shelf life of conidial and chlamyospore formulations of *Trichoderma harzianum* Rifai. *Journal of Biological Control*. 16(2):145-148.

Rai, D. y Tewari, A.K. 2016. Evaluation of different carbon and nitrogen sources for better growth and sporulation of *T. harzianum* (Th14). *Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development*. 8(8): 67-70.

Rajput, A.Q. y Shahzad, S. 2015. Growth and sporulation of *Trichoderma polysporum* on organic substrates by addition of carbon and nitrogen sources. *Pakistan Journal of Botany*. 47(3): 979-986.

Rajput, A.Q., Khanzada, M.A. y Shahzad, S. 2014. Effect of different organic substrates and carbon and nitrogen sources on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 16:731-745.

Ramanujam, B., Prasad, R.D., Sriram, S. y Rangeswaran, R. 2010. Mass production, formulation, quality control and delivery of *Trichoderma* for plant disease management. *The Journal of Plant Protection Sciences*. 2(2): 1-8.

Rao, G.P., Viswanathan, R. y Singh, S.B. 2002. Current situation of sugarcane diseases in India. Sugarcane crop management, ed. S. B. Singh, G. P. Rao, and S. Easwaramoorthy, 734. Houston SCI Tech Publishing LLC. 1-9 p.

Ravensberg, W. J. 2011. A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control of arthropods. Springer. 383 p.

Rebollar, A.A., Sánchez, P.J.R. y Silva, R.H.V. 2012. Manejo integrado de *Fusarium* spp. en variedades cultivadas y prometedoras de caña de azúcar. Colegio de Postgraduados. Folleto Técnico. 19 pp.

Reino, J.L., Guerrero, R.F., Hernández, Galán, R. y Collado, I.G. 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. Phytochemistry Reviews. 7:89-123.

Rey, M., Delgado, J.J., Rincón, A.M., Limón, M.C. y Benítez, T. 2000. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. Revista Iberoamericana de Micología. 17: 31-36.

Rini, C.R. y Sulochana, K.K. 2007. Substrate evaluation for multiplication of *Trichoderma* spp. Journal of Tropical Agriculture. 45(1-2):58-60.

Rodrigues, G.S., Magalhães, D.M.A., Costa, A.M. y Luz, E.D.M.N. 2018. Antagonismo de *Trichoderma* spp. ao agente etiológico da Murcha de *Ceratocystis* em cacauero. Summa Phytopathologica. 44(1): 72-78.

Robinson, T., Singh, D. y Nigam, P. 2002. Fermentación en estado sólido: una tecnología microbiana promisor para la producción de metabolitos secundarios. Vitae. 9(2): 27-36.

Robles, C. A.R. 2012. Uso de microorganismos antagonistas y sustancias naturales como una alternativa ecológica en el control de enfermedades en cultivos. Centro de Biotecnología Universidad Nacional de Loja, 1: 35-43.

Rosas-Guevara, V., Hernández-Arenas, M., Miranda-Marini, R., Bravo-Mosqueda, E. Berriozabal-Onofre, A. 2014. Identificación y variabilidad morfológica de pokkah boeng (*Fusarium* spp.) en caña de azúcar en México. Investigación Agropecuaria. 11(2): 119-126.

Rosas, G.V., Hernández, A.M., Nava, D.C., Morán, B.S. y Leyva, M.S. 2013. Identificación morfológica y molecular de *Fusarium* spp. en caña de azúcar cultivada en México. Revista Mexicana de Fitopatología. 31 (Suplemento) p. 89.

Romero, C. S. 1993. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. México. 347 p.

Romero-Arenas, O., Rivera-Tapia, J.A., Huarto, M.A.D., Villareal, R.O.A., Márquez, S. M. y López, O.F.J. 2013. Massive production of Mexican strains of *Trichoderma* spp. in different agricultural substrates. European Journal of Experimental Biology. 3(6): 73-79.

Rott, P., Bailey, R.A., Comstock, J.C., Croft, B.J. y Saumtally, S. 2000. A guide to sugarcane diseases. Montpellier: CIRAD and ISSCT Publication Services. 340 p.

Roussos, S. y Perraud-Gaime, I. 1996. Fisiología y bioquímica de microorganismos utilizados en procesos de fermentación en medio sólido. Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería. 341-348.

Ruíz, M.C., Illescas, R. C.P., Altamirano, H.U. y Wallace, J.R. 2015. Nuevos registros de picudo (Coleoptera: Curculionidae) afectando caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en Veracruz, México. Southwestern Entomologist. 40(2): 427-432.

Sachdev, S., Singh, A. y Singh, R.P. 2018. Optimization of culture conditions for mass production and bioformulation of *Trichoderma* using response Surface methodology. 3 Biotech. 8:360.

Sandoval, B.C. 2004. Manual de Manejo integrado de enfermedades en cultivos hidropónicos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Universidad de Talca. Facultad de Ciencias Agrarias. Talca, Chile. 53 p.

Santos, A., García, M., Cortes, A.M. y Villamizar, L. 2012. Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034. Revista Iberoamericana de Micología. 29 (3): 150-156.

Santos, A., Grijalba, E., Zuluaga, M.V., Gómez, M. y Villamizar, L. 2013. Compatibilidad *in vitro* de un bioplaguicida a base de *Lecanicillium lecanii* (Hypocreales: Clavicipitaceae) con agroquímicos empleados en los cultivos de algodón y berenjena. Revista Colombiana de Biotecnología. 15(2):132-142.

Salgado, G.S., Lagunes, E.L., Núñez, E.R., Ortiz, G.C., Bucio, A.L. y Aranda, I.E. 2012. Caña de azúcar: producción sustentable. Colegio de Posgraduados. Estado de México. 524 p.

Satyavir, A. K. y Kushal, R. 2002. Fungal Disease of Sugarcane. Cap. 13: 298-300 in: Disease of Field Crops. Gopta, V. P. & Paul, Y. S. Indus Publishing Company. New Delhi, India.

Sentías-Herrera, H.E., Trejo-Téllez, L.I. y Gómez-Merino, F.C. 2017. The mexican sugarcane production system: history, current status and new trends. In R. Murphy. (ed.), Sugarcane production systems, uses and economic importance. Nova Science Pub Inc. 39-71.

Sentías-Herrera, H.E. y Gómez-Merino, C.F., Valdez-Balero, A., Silva-Rojas, H.V. y Trejo-Téllez, L.I. 2014. The agro-industrial sugarcane system in Mexico: current status, challenges and opportunities. Journal of Agricultural Science. 6(4): 26-54.

SIAP. 2017. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. Resumen de la producción nacional y estatal de la caña de azúcar. En línea. Disponible en http://infosiap.siap.gob.mx/agricola_siap_gb/icultivo/index.jsp (Consultado en junio del 2018).

Shi, M., Chen, L., Wang, X.W., Zhang, T., Zhao, P.B., Song, X.Y., Sun, C.Y., Chen, X.L., Zhou, B.C. y Zhang, Y.Z. 2012. Antimicrobial peptaibols from *Trichoderma pseudokoningii* induce programmed cell death in plant fungal pathogens. Microbiology. 158: 166-175.

Silva, R. H.V., Rebollar, A.A., Sánchez, P. J.R., Valdez, B.A., Boyzo, M.J., Flores, G.E., Olivares, M. P.X., Aguirre, R. J.M., y Uribe, C. T.B. 2013. *Fusarium kyuyense*, *F. andiyazi*, and *F. nelsonii*, three new species associated to sugarcane. En línea. Disponible en http://www.apsnet.org/meetings/Documents/2013_Meeting_Abstracts/aps2013abP381.htm. Consultada en Enero del 2018.

Singh, A.S., Panja, B. y Shah, J. 2014. Evaluation of suitable organic substrates based *Trichoderma harzianum* formulation for managing *Rhizoctonia solani* causing collar rot disease of cowpea. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 3(8): 127-134.

Singh, A., Srivastava, S. y Singh, H.B. 2007. Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases. Bioresource Technology. 98:470-473.

Sriram, S., Palanna, K.B. y Ramanujam, B. 2010. Effect of chitin on the shelf-life of *Trichoderma harzianum* in talc formulation. Indian Journal of Agricultural Sciences. 80 (10): 930: 932.

Stewart, A. y Hill, R. 2014. Applications of *Trichoderma* in plant growth promotion. In: Gupta, V.K., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R.S., Druzhinina, I. y Tuohy, M.G. Biotechnology and Biology of *Trichoderma*. Elsevier, London. 415- 428.

Steyaert, J.M., Ridgway, H.J., Elad, Y. y Stewart, A. 2003. Genetic basis of mycoparasitism: a mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. 31: 4: 281-291.

Suárez, H.J., Menéndez, S. A., González, M. A., Delgado, M. I. y Gómez, P. J.R. 2018. Evaluación de genotipos de caña de azúcar en diferentes ambientes en el ingenio ofelina, república de Panamá. Revista Centro Agrícola. 45(1): 24-33.

Summerell, B.A., Laurence, M.H., Liew, E. C.Y., y Leslie, J.F. 2010. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. Fungal Diversity. 44: 3-13.

Tanzini, M.R., Alves, S.B., Setten, A. y Augusto, N.T. 2001. Compatibilidad de agentes tensoactivos con *Beauveria bassiana* y *Matarhizium anisopliae*. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). 59: 15-18.

Tewari, L. y Bhanu, C. 2004. Evaluation of agro-industrial wastes for conidia based inoculum production of bio-control agent: *Trichoderma harzianum*. Journal of Scientific and Industrial Research. 63: 807-812.

Toledo- Hernández, R.A., Ortiz- Girón, J.A. y Sánchez, D. 2017. Preliminary observations on pathogenicity of comercial formulations of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* entomopathogenic fungi for control of *Frankliniella invasor* under Laboratory conditions. Society of Southwestern Entomologists. 42(4):1035-1040.

Urtubia, H.I. y France, A. 2007. Formulaciones de hongos entomopatógenos para control de plagas en agricultura. Revista Tierra Adentro Santiago de Chile. 81: 46-49.

Valencia, G.B., Vargas, V.H., Soto, J. N.U., Jiménez, N.N. y Corral, J.H. 2011. *Trichoderma* sp. native from chili región of Poanas, Durango, México antagonist against phytopathogen fungi. American Journal of Agricultural and Biological Sciences. 6 (2): 185-188.

Vassilev, N. y Mendes, G. de O. 2018. Solid-state fermentation and plant-beneficial microorganisms. In: Pandey, A., Larroche, C. y Soccol, C. (Eds.), Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Copyright. 878 p.

Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y. y Valéro, J. R. 2007. Antagonistic, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. Biochemical Engineering Journal. 37(1): 1-20.

Vélez, A. P.E., Posada, F. F.J., Marín, M. P., González, G. M.T., Osorio, V. E. y Bustillo, P. A. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Boletín Técnico No. 17. CENICAFÉ. 48 pp.

Villar-González, D. 2000. Principales vertebrados plaga en México: situación actual y alternativas para su manejo. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. 6(1):41-54.

Vinale, F., Sivasithamparamb, K., Ghisalbertic, M. L., Marra, R., Woo, S. L. y Lorito, M. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. Soil Biology & Biochemistry. 40: 1-10.

Vishwakarma S. K., Kumar, P., Nigam, A., Singh, A., y Kumar, A. 2013. Pokkah Boeng: an emerging disease of sugarcane. Journal of Plant Pathology and Microbiology. 4 (170): 2.

Viswanathan, R. y Rao, G. P. 2011. Disease scenario and management of major sugarcane diseases in India. Sugar Tech. 13 (4): 336-353.

Viswanathan, R., Poongothai, M. y Malathi, P. 2011. Pathogenic and molecular confirmation of *Fusarium sacchari* causing wilt in sugarcane. Sugar Tech. 13(1): 68-76.

Wagner, B. 2006. Productos alternativos para el manejo de enfermedades en cultivos comerciales. Fitosanidad. 10(2): 85-98.

Waraitch, K. S. 1981. Wilt disease in Co. 1148 in the Punjab and assessment of losses caused by it. Indian Sugar 31: 37-40.

Wijesinghe, C.J., Wijeratnam, W.R.S., Samarasekara, J.K.R.R. y Wijesundera, R.L.C. 2011. Development of a formulation of *Trichoderma asperellum* to control black rot disease on pineapple caused by (*Thielaviopsis paradoxa*). Crop Protection. 30: 300-306.

Wraight, S.P., Jackson, M.A. y De Kock, S.L. 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.), Fungi as biocontrol agents. Progress, problems and potential. CABI Publishing, Wallingford. 253-287 p.

Woo, S. L., Scala, F., Ruocco, M. y Lorito, M. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp, pathogenic fungi, and plants. Phytopathology. 96: 181-185.

Wurms, K. y Chee, A.A. 2018. Product formulation is crucial to the success of lipid-based bio-fungicides. New Zealand Plant Protection. 71: 272-284

Zavaleta-Mejía, E. 2000. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. Terra. 17(3): 201-207.

Zhang, M. y Jeyakumar, J.M.J. 2018. *Fusarium* species complex causing pokkah boeng in China. In *Fusarium*- plant diseases, pathogen diversity, genetic diversity, resistance and molecular markers. IntechOpen. 139-154 pp.

Zhang, Y., Ghaly, A. E. y Li, B. 2012. Physical properties of corn residues. American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 8(2): 44-53.

Zhang, M. y Govindaraju, M. 2018. Sugarcane production in China: In: de Oliveira, A. B. (Eds.), Sugarcane- Technology and Research. InTechOpen. 49-68 pp.

Zhang, J. D. y Yang, Q. 2015. Optimization of solid-state fermentation conditions for *Trichoderma harzianum* using an orthogonal test. Genetics and Molecular Research. 14(1): 1771-1781.



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN DE POSGRADO

Maestría en Manejo de Recursos Naturales



Cuernavaca, Mor., 15 de noviembre de 2018.

DR. RUBÉN CASTRO FRANCO
COORDINADOR DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
PRESENTE

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: **PRODUCCIÓN Y FORMULACIÓN DE *Trichoderma asperellum* PARA EL MANEJO DE PATÓGENOS DE LA RAÍZ DE CAÑA DE AZÚCAR**, que presenta la **ING. YANETH MARGARITA LÓPEZ ALCÁNTARA**, 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 la alumna 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
Catedrático de posgrado del
Centro de Investigaciones Biológicas



Cuernavaca, Mor., 15 de noviembre de 2018.

DR. RUBÉN CASTRO FRANCO
COORDINADOR DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
PRESENTE

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: **PRODUCCIÓN Y FORMULACIÓN DE *Trichoderma asperellum* PARA EL MANEJO DE PATÓGENOS DE LA RAÍZ DE CAÑA DE AZÚCAR**, que presenta la **ING. YANETH MARGARITA LÓPEZ ALCÁNTARA**, 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 la alumna 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. VÍCTOR MANUEL HERNÁNDEZ VELAZQUEZ
Catedrático de la Universidad
Autónoma del Estado de Morelos



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN DE POSGRADO

Maestría en Manejo de Recursos Naturales



Cuernavaca, Mor., 15 de noviembre de 2018.

DR. RUBÉN CASTRO FRANCO
COORDINADOR DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
PRESENTE

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: **PRODUCCIÓN Y FORMULACIÓN DE *Trichoderma asperellum* PARA EL MANEJO DE PATÓGENOS DE LA RAÍZ DE CAÑA DE AZÚCAR**, que presenta la **ING. YANETH MARGARITA LÓPEZ ALCÁNTARA** y que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. EDGAR MARTÍNEZ FERNÁNDEZ** y co-dirección del **DR. VÍCTOR MANUEL HERNÁNDEZ VELAZQUEZ** 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 la alumna 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

M. EN C. MA DE LOURDES ACOSTA URDAPILLET A
Catedrática de posgrado del
Centro de Investigaciones Biológicas



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN DE POSGRADO

Maestría en Manejo de Recursos Naturales



**CENTRO DE
INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS
UAEM**

Cuernavaca, Mor., 15 de noviembre de 2018.

DR. RUBÉN CASTRO FRANCO
COORDINADOR DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
PRESENTE

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: **PRODUCCIÓN Y FORMULACIÓN DE *Trichoderma asperellum* PARA EL MANEJO DE PATÓGENOS DE LA RAÍZ DE CAÑA DE AZÚCAR**, que presenta la ING. **YANETH MARGARITA LÓPEZ ALCÁNTARA** y que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. EDGAR MARTÍNEZ FERNÁNDEZ** y co-dirección del **DR. VÍCTOR MANUEL HERNÁNDEZ VELAZQUEZ** 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 la alumna 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
Catedrático de posgrado del
Centro de Investigaciones Biológicas



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN DE POSGRADO

Maestría en Manejo de Recursos Naturales



**CENTRO DE
INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS
UAEM**

Cuernavaca, Mor., 15 de noviembre de 2018.

DR. RUBÉN CASTRO FRANCO
COORDINADOR DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
PRESENTE

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: **PRODUCCIÓN Y FORMULACIÓN DE *Trichoderma asperellum* PARA EL MANEJO DE PATÓGENOS DE LA RAÍZ DE CAÑA DE AZÚCAR**, que presenta la **ING. YANETH MARGARITA LÓPEZ ALCÁNTARA** y que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. EDGAR MARTÍNEZ FERNÁNDEZ** y co-dirección del **DR. VÍCTOR MANUEL HERNÁNDEZ VELAZQUEZ** 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 la alumna 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. VERÓNICA OBREGÓN BARBOZA
Catedrática de la Universidad
Autónoma del Estado de Morelos



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN DE POSGRADO

Maestría en Manejo de Recursos Naturales



**CENTRO DE
INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS
UAEM**

Cuernavaca, Mor., 15 de noviembre de 2018.

DR. RUBÉN CASTRO FRANCO
COORDINADOR DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
PRESENTE

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: **PRODUCCIÓN Y FORMULACIÓN DE *Trichoderma asperellum* PARA EL MANEJO DE PATÓGENOS DE LA RAÍZ DE CAÑA DE AZÚCAR**, que presenta la **ING. YANETH MARGARITA LÓPEZ ALCÁNTARA** y que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. EDGAR MARTÍNEZ FERNÁNDEZ** y co-dirección del **DR. VÍCTOR MANUEL HERNÁNDEZ VELAZQUEZ** 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 la alumna 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
Catedrática de posgrado del
Centro de Investigaciones Biológicas