



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

**MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN PROTECCIÓN VEGETAL**

**ANTAGONISMO *in vitro* DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS
EN *Phytophthora cinnamomi* Rands Y *Alternaria alternata*
(Fr.:Fr.).**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCION VEGETAL**

PRESENTA:

MARINA ESCOBEDO SALAS

Bajo la supervisión de: DR. SAMUEL RAMÍREZ ALARCÓN

CHAPINGO ESTADO DE MÉXICO, DICIEMBRE DE 2016



REGISTRACIÓN GENERAL ACADEMICA
SERVICIOS ESCOLARES
FICHA DE EXAMENES PROFESIONALES



La presente tesis titulada **ANTAGONISMO *in vitro* DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EN *Phytophthora cinnamomi* Rands y *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.)**, fue realizada por **Marina Escobedo Salas**, bajo la dirección y asesoría del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCION VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR: _____



Dr. Samuel Ramírez Alarcón

CO-DIRECTOR: _____



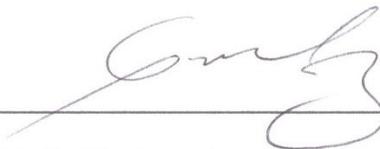
Dra. María Guadalupe Carrillo Benítez

ASESOR: _____



M. C. Martín Gaona Ponce

ASESOR: _____



M.C. Raúl Velasco Azorsa

Chapingo, Estado de México, Diciembre 2016

DEDICATORIA

A mi familia, por su gran apoyo y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, por su formación académica y por permitirme cumplir una meta más en mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por financiar mis estudios de posgrado.

A la Dra. María Guadalupe Carrillo Benítez por la confianza de permitirme trabajar con ella y brindarme su amistad, sus conocimientos y apoyo durante la realización de esta investigación.

A mi director de tesis, Dr. Samuel Ramírez Alarcón por facilitarme las instalaciones y el material para desarrollar esta investigación.

Al M.C. Martín Gaona Ponce por su amistad y orientación en el desarrollo de este proyecto.

Al M.C. Raúl Velasco Azorsa por sus aportaciones durante el desarrollo de esta investigación.

ÍNDICE

I	ANTECEDENTES	
1.1	Importancia del cultivo del aguacate	4
1.2	Tristeza del aguacate	4
1.2..1	Importancia económica	5
1.2.2	Hospedantes	5
1.2.3	Distribución	5
1.2.4	Clasificación taxonómica de <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands	6
1.2.5	Morfología	6
1.2.6	Ciclo biológico y Epidemiología	7
1.2.7	Síntomas y Daños	7
1.2.8	Manejo	8
1.3	Características de <i>Alternaria alternata</i> (Fr.:Fr.)	8
1.3.1	Importancia	9
1.3.2	Clasificación taxonómica	9
1.3.3	Morfología	9
1.3.4	Ciclo biológico y Epidemiología	9
1.3.5	Síntomas y daños	10
1.3.6	Manejo	10
1.4	Hongos entomopatógenos para el control de enfermedades en plantas	10
1.4.1	Clasificación sistemática	11
1.4.2	Características Generales de Hongos entomopatógenos	12
1.4.2.1	Ciclo de vida	12
1.4.2.2	Ecología	13
1.4.3	Principales géneros y especies de hongos entomopatógenos	13
1.4.3.1	Características de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuillemin	13
1.4.3.2	Características de <i>Metarhizium robertsii</i> Bisch, Rehner y Humber	14
1.4.3.3	Características de <i>Purpureocillium lilacinum</i> (Thom) Luangsa-ard	15
1.4.4	Mecanismos de acción de los microorganismos	15
1.4.5	Microorganismos en el control de enfermedades en plantas	16
II	HIPOTESIS	17

III	OBJETIVOS	
3.1	OBJETIVO GENERAL	17
3.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS	107
IV	METODOLOGIA	18
4.1	OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO	18
4.1.1	Zona de colecta	18
4.1.2	Colecta de muestras de suelo	18
4.2	Obtención de aislamientos de Hongos Entomopatógenos	18
4.2.1	Aislamiento directo	18
4.2.2	Aislamiento por dilución de suelo	19
4.2.3	Obtención de cultivos monospóricos	19
4.2.4	Obtención de aislamientos de Hongos fitopatógenos	20
4.3	Identificación morfológica	20
4.4	Identificación molecular	21
4.4.1	Extracción del ADN genómico	21
4.4.2	Amplificación del ADN	21
4.5	Análisis filogenético	21
4.6	Pruebas de germinación	21
4.7	Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i>	22
4.7.1	Pruebas de confrontación dual	22
4.8	Diseño Experimental y análisis estadístico	24
V	RESULTADOS	24
5.1	Aislamientos obtenidos	24
5.2	Identificación morfológica	25
5.3	Identificación molecular	27
5.3.1	Análisis filogenético	27
5.4	Pruebas de germinación	30
5.5	Evaluación antagónica <i>in vitro</i>	30

VI	DISCUSIONES	35
VII	CONCLUSIONES	37
VIII	LITERATURA CITADA	38

ÍNDICE DE CUADROS

V	RESULTADOS	
	Salida del análisis de varianza para los datos de áreas transformadas LOG (y).	31
Cuadro 1.	Resultado de la Prueba de comparaciones de Medias Tukey para $\alpha=0.05$	31

INDICE DE FIGURAS

I	ANTECEDENTES	
	Modo de acción general de hongo entomopatógeno en insectos (Samuels et al, 2016)	13
IV	METODOLOGIA	
	A) Larvas de <i>Tenebrio molitor</i> , B) Recipiente con muestra de suelo, C) Larva micosada, D) Aislamiento	19
Figura 2	Fotografía de conidios a 40 X	20
	Confrontación dual entre hongos entomopatógenos y fitopatógenos	23
Figura 4.	Bioensayo de antagonismo de hongos entomopatógenos contra <i>Phytophthora cinnamomi</i> y <i>Alternaria alternata</i>	23
Figura 5.	RESULTADOS	
	Aislamiento de <i>Beauveria bassiana</i> (A), de <i>Metarhizium</i> (B) y de <i>Purpureocillium lilacinum</i> (C) crecidos en medio de cultivo ADS	25
Fig. 6.	Fotografía a 40 x de <i>B. bassiana</i> , (A) se aprecia el raquis en forma de zigzag de donde emergen las esporas globosas (B), características que distinguen a este género.	26
Figura 7.	Conidios de <i>Metarhizium</i> mostrando masas de conidios paralelas, formando columnas prismáticas.	26
Figura 8.	Estructuras de <i>Purpureocillium lilacinum</i> se observan los conidios elípticos, organizados en cadenas en el ápice de las fiálides	27
Figura 9.	Filogenia del aislamiento JALBB1 inferido desde Máxima	28

	verosimilitud (ML) y 1000 réplicas de Boostrap, basado en el modelo Kimura 2-parámetros.	
	Filogenia del aislamiento JALMR2 inferido desde Máxima verosimilitud (ML) y 1000 réplicas de Boostrap, y la matriz de distancia indicó que entre más cercano a cero las secuencias	
Figura 11.	son iguales, basado en el modelo Kimura 2-parámetros.	29
	Filogenia del aislamiento JALPL3 inferido desde Máxima verosimilitud (ML) y 1000 réplicas de Boostrap, basado en el	
Figura 12.	modelo Kimura 2-parámetros.	30
	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los hongos entomopatógenos <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Metarhizium robertsii</i> y	
Figura 13.	<i>Purpureocillium lilacinum</i> en confrontación con <i>P. cinnamomi</i> .	32
	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los hongos entomopatógenos <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Metarhizium</i> y	
Figura 14.	<i>Purpureocillium lilacinum</i> en confrontación con <i>A. alternata</i> .	32
	Efecto antagónico entre hongos entomopatógenos y hongos fitopatógenos. A) <i>B. bassiana</i> - <i>P. cinnamomi</i> , B) <i>M. robertsii</i> - <i>P.</i>	
Figura 15.	<i>cinnamomi</i> C) <i>P. lilacinum</i> - <i>P. cinnamomi</i>	33
	Efecto antagónico entre hongos entomopatógenos y hongos fitopatógenos. A) <i>B. bassiana</i> - <i>A. alternata</i> , B) <i>M. robertsii</i> - <i>A.</i>	
Figura 16.	<i>alternata</i> C) <i>P. lilacinum</i> - <i>A. alternata</i>	34

Antagonismo *in vitro* de hongos entomopatógenos en *Phytophthora cinnamomi* Rands y *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.).

***In vitro* antagonism of entomopathogenic fungi in *Phytophthora cinnamomi* Rands and *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.)**

Marina Escobedo Salas¹, Samuel Ramírez Alarcón²

RESUMEN

Se aislaron tres hongos entomopatógenos (HE) y dos hongos fitopatógenos (HF) de muestras de suelo de una huerta de aguacate, los HE se obtuvieron por la técnica de trampa de insecto cebo y los HF por la técnica de plantas trampa (*Rhododendron indicum*). Se realizó la identificación morfológica usando claves taxonómicas y la identificación molecular con los primers ITS5 e ITS4, las secuencias fueron comparadas en el Gen Bank. Los aislamientos fueron: *Beauveria bassiana* (Bals) Vuillemin, *Metarhizium robertsii* JF Bisch, Rehner, *Purpureocillium lilacinum* (Thom), *Phytophthora cinnamomi* Rands y *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.). Se realizó el árbol filogenético para cada aislamiento de HE. Se realizaron arboles filogenéticos con el modelo de Máxima similitud (Kimura-2parametros) para corroborar la identificación morfológica de los HE. Se realizaron pruebas de germinación de los aislamientos en cajas Petri con medio de cultivo ADS, en 48 h para los tres aislamientos *in vitro*, los porcentajes de germinación fueron de un 100% para los tres casos. Se realizaron pruebas de antagonismo usando a los HE contra los hongos fitopatógenos *Phytophthora cinnamomi* y *Alternaria alternata* mediante la técnica de cultivo dual en cajas Petri con medio de cultivo ADS, evaluados por Porcentaje de Inhibición de Crecimiento radial (PIC): *Metarhizium robertsii* inhibió a *Phytophthora cinnamomi* en un 38.1% y a *Alternaria alternata* en un 31.7 % en su crecimiento micelial. El efecto antagónico (DCA/Tukey) mostraron que los hongos entomopatógenos sobre los hongos fitopatógenos fueron significativos ($p < 0.05$).

Palabras clave: Antagonismo, competencia, control biológico, caracterización, tristeza del aguacate.

1 Tesista 2 Director

ABSTRACT

Three entomopathogenic fungi (EF) and two phytopathogenic fungi (PF) from soil samples of an avocado orchard were isolated; EF were obtained by the bait insect trap technique and PF by the trap plant technique (*Rhododendron indicum*). Morphological identification was performed using taxonomic keys and molecular identification with primers ITS5 and ITS4; the sequences were compared in Gen Bank. The isolates were: *Beauveria bassiana* (Bals) Vuillemin, *Metarhizium robertsii* JF Bisch, Rehner, *Purpureocillium lilacinum* (Thom), *Phytophthora cinnamomi* Rands and *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.). The phylogenetic tree was performed for each EF isolate. Phylogenetic trees were made using the Maximum Likelihood Method based on the Kimura-2 parameter model to corroborate the morphological identification of EF. Germination tests were carried out in Petri dishes with ADS culture medium, in 48 h for the three *in vitro* isolates; the percentages of germination were 100% for all three cases. Antagonism tests were performed using the EF against the phytopathogenic fungi *Phytophthora cinnamomi* and *Alternaria alternata* by the dual plate culture technique in Petri dishes with ADS culture medium, evaluated by radial Percent Growth Inhibition (PGI): *Metarhizium robertsii* inhibited *Phytophthora Cinnamomi* in 38.1% and *Alternaria alternata* in 31.7% in mycelial growth. The antagonistic effect (DCA/Tukey) showed that the entomopathogenic fungi on the phytopathogenic fungi were significant ($p < 0.05$).

Keywords: Antagonism, competition, biological control, characterization, avocado sadness.

INTRODUCCION

El aguacate es un producto de gran importancia en la agricultura y en la dieta mexicana. Cuenta con más de 175 mil hectáreas plantadas (SIAP, 2015), menos del 1% de la superficie cultivable nacional, pero aporta cerca del 3.4% del valor de la producción agrícola total. Las entidades con mayor producción son: Michoacán, Jalisco, Estado de México, Nayarit, Morelos y Guerrero. Entre las enfermedades que afectan a este cultivo, destaca la tristeza del aguacate cuyo agente causal es *Phytophthora cinnamomi* Rands, este patógeno provoca una disminución en la productividad y rentabilidad de este cultivo. Por otro lado, *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) es un género que afecta una gran variedad de cultivos como los cereales, hortalizas y frutales; ocupa el décimo lugar como patógeno de plantas en términos del número total de especies vegetales sobre las que se ha citado (Farr *et al.*, 1989). Para el manejo de estas enfermedades se aplican principalmente productos de origen químico, los que ejercen una fuerte presión de selección de las poblaciones, generando en algunos casos resistencia o disminución de la sensibilidad a las moléculas químicas utilizadas (Dobrowolski *et al.*, 2008), además de ocasionar serios daños al ambiente y a los alimentos al ser aplicados recurrentemente en pre y postcosecha sin dejar de mencionar la merma económica de los productores. El resultado de estas tácticas de manejo obligan a buscar alternativas al uso de plaguicidas, por lo que investigadores han recurrido al uso de microorganismos inocuos al ambiente pero efectivos para el manejo de las plagas.

En el mundo se conoce un grupo importante de hongos que presentan efecto antagónico sobre otros microorganismos, contribuyen a la atenuación de los daños que causan las enfermedades en los agroecosistemas donde existan condiciones para su desarrollo y conservación (Fernández, 2001). Entre los hongos que han demostrado su efecto de competencia, micoparasitismo y antibiosis, se encuentra *Beauveria bassiana* y *Lecanicillium* sp. (Ownley *et al.*, 2010).

Castillo y colaboradores (2014) presentaron el establecimiento exitoso de *Beauveria bassiana* y *Purpureocillium lilacinum* (anteriormente *Paecilomyces lilacinus*) como

endófitos en algodón a través de la inoculación de las semillas; también se confirmó el efecto antagonista de *Metarhizium anisopliae* contra *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani* (Kang *et al.*, 1996). Estas y otras investigaciones sobre diferentes géneros de hongos entomopatógenos han reportado los diversos roles que estos pueden desempeñar y abre un nuevo paradigma de cómo utilizar con éxito estos microorganismos en programas de control biológico (Vega *et al.*, 2009). Una manera de conocer las relaciones que ocurren entre diferentes organismos presentes en un mismo sitio son las pruebas de confrontación dual o pruebas antagónicas (*in vitro*) las cuales son precisas para determinar el tipo de relación que surge entre hongos entomopatógenos y hongos fitopatógenos. El propósito de la investigación fue obtener aislamientos de hongos entomopatógenos nativos de muestras de suelo recolectadas en una huerta de cultivo de aguacate y evaluar su capacidad antagónica contra *P. cinnamomi* y *Alternaria alternata*.

I. ANTECEDENTES

1.1. Importancia del cultivo del aguacate

El cultivo del aguacate en el año 2014 registró una producción de 3, 239, 056 t a nivel mundial. México, Indonesia, Estados Unidos, Colombia y República Dominicana, fueron los principales productores en el año 2013. Nuestro país ocupa el primer lugar con una producción de 1,006 ,817.62 t y representa el 31% de la producción mundial. (FAOSTAT, 2013).

El aguacate mexicano es comercializado principalmente en Estados Unidos, Canadá, Japón, y Francia. Es un producto del que se obtienen importantes divisas para el desarrollo del campo debido a que las exportaciones alcanzan alrededor de 600 mil toneladas con un valor de más de mil mdd, principalmente dirigidas a EEUU (80%), Japón (9%) y Canadá (5%) (FND, 2014). El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2015) señaló que anualmente se producen alrededor de un millón 467 mil toneladas en 27 estados del país. Sin duda los beneficios económicos son innumerables para un amplio sector de la población rural y urbana en los estados donde se practica su cultivo, considerando todo el proceso de producción, cosecha, transporte, empaque y comercialización.

De las entidades con mayor producción en México, Michoacán es el principal productor al aportar 8 de cada 10 t; los estados que lo siguen en mayor producción son: Estado de México, Jalisco, Nayarit y Morelos, en conjunto generan el 95% de la producción nacional (SAGARPA, 2014).

Es importante mencionar que el aguacate posee valiosas propiedades alimenticias por su alto contenido de aceite (de 12 a 30% y proteína 3-4 %); además de su contenido de carbohidratos, vitaminas y minerales. Esas características le confieren grandes posibilidades en el aumento de su consumo en la dieta humana.

1.2. Tristeza del aguacate.

La tristeza del aguacate, cuyo agente causal es *Phytophthora cinnamomi* Rands tiene una gran capacidad destructiva y un amplio rango de hospedantes, provocando serios daños en bosques naturales, plantas ornamentales y árboles frutales

(Domsch, 1980). La enfermedad fue descrita por Rand en 1922 en árboles de canela, y detectada en el aguacate por primera vez en Estados Unidos, por Tucker en 1929. El hongo presenta un rango de hospedantes sumamente amplio, ya que es capaz de afectar a más de 900 especies de plantas, lo que se considera como un peligro potencial no sólo para el aguacate sino para múltiples cultivos de importancia económica Zentmyer (1980).

1.2.1. Importancia económica

En México, una de las principales limitantes en la producción de aguacate es la pudrición de raíces producida por este patógeno; en 1994, esta enfermedad causó la muerte de 100 000 árboles de aguacate *Persea americana* variedad Hass en Uruapan Michoacán, disminuyendo la producción con pérdidas económicas para los productores por más de 32 millones de pesos (Vidales *et al*, 1999).

1.2.2. Hospedantes

Este hongo, es uno de los patógenos de suelo más problemáticos, no solo en aguacate, sino también en otras especies de árboles incluyendo especies de eucalipto, pino melocotón, piña, pera, macadamia, ornamentales leñosas (como azaleas, camelias y rododendros), y otras especies. Se le atribuye un rango de hospederos de más de 950 plantas (Broadley, 1992).

1.2.3. Distribución

Esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en zonas productoras del mundo, como Suráfrica, Israel, Nueva Zelanda, California, Australia, Centro América y el Caribe, siendo un factor limitante para la producción. En California para 1989 se estimó que causó pérdidas por valor de 44 millones de dólares.

1.2.4. Clasificación taxonómica de *Phytophthora cinnamomi* Rands

Reino: Protista

Phylum: Oomicota

Clase: Oomycetes

Orden: Pythiales

Familia: Phytiaceae

Género: *Phytophthora*

Especie: *Phytophthora cinnamomi* Rands

1.2.5. Morfología

Las estructuras reproductivas asexuales de *P. cinnamomi* Rands son los esporangios, que se producen en hifas especializadas llamadas esporangióforos. Los esporangios siempre aparecen en posición terminal. La forma de los esporangios puede ser ovoide o elipsoide. Sus dimensiones varían notablemente según los aislados, oscilando entre 11-103 x 11-53 μm . Los esporangióforos son simples o con ramificación simpodial y frecuentemente presentan proliferación interna. Otra característica de *P. cinnamomi* Rands es la persistencia del esporangio en el esporangióforo y la ausencia de papila en su parte apical. Los esporangios tienen la capacidad de poder germinar y emitir zoosporas móviles. Son esporas asexuales reniformes y biflageladas. Cuando las zoosporas entran en contacto con las raíces de la planta susceptible engrosan su pared celular y se redondean. En este estado se denominan quistes. En el estado sexual se producen los gametangios femeninos u oogonios (saco en el que se forma la oospora) y los gametangios masculinos o anteridios. Ambos se forman en el extremo de las hifas. El oogonio crece a través del anteridio, atravesándolo, de forma que el anteridio queda como un cuerpo que rodea el pedúnculo del oogonio, denominándose anteridio anfígino. Los anteridios pueden ser unicelulares o bicelulares, de dimensiones 19 x 17 μm . La oospora resultante de la unión de los gametangios ocupa todo el oogonio, denominándose plerótica. La oospora posee una pared gruesa; en el centro de la oospora está el ooplasto (también llamado cuerpo refringente) y en la parte superior se encuentra un cuerpo transparente que contiene el núcleo. Las oosporas de *P. cinnamomi* son esféricas,

hialinas y de 19-54 μm de diámetro. Las oosporas sobreviven largos períodos de tiempo: son estructuras de resistencia a las cuales les resulta difícil germinar. La reproducción sexual aporta además la posibilidad de variación genética debida a la recombinación.

1.2.6. Ciclo biológico y Epidemiología

El oomycete sobrevive en el suelo por varios años en forma abundante como clamidosporas u oosporas en raíces o residuos de aguacate y de otras plantas cultivadas. Las clamidosporas actúan como semillas de propagación y son resistentes a condiciones adversas del medio ambiente como sequía, temperaturas bajas y falta de alimentos, entre otras. Cuando la temperatura aumenta y hay presencia de humedad por efecto de los riegos pesados, lluvia abundante o por inundación combinado con un mal drenaje, las clamidosporas germinan y dan origen al micelio. El micelio dará origen a los esporangios donde posteriormente se formaran las zoosporas, estas tienen movimiento propio y se desplazan con agilidad hacia las raíces atraídas por sustancias que secretan las raíces que atraen las esporas, donde se concentran gran número de ellas para dar inicio a nuevas infecciones (Agrios, 2005).

1.2.7. Síntomas y Daños

Phytophthora cinnamomi Rands es el hongo que produce la principal enfermedad de las plantaciones de aguacate en el mundo. Se denomina Muerte Descendente por la sintomatología que presenta la planta en su parte superior y Pudrición Radicular por los daños que ocasiona al sistema radicular. La agresividad de este hongo está ligada a condiciones de altas temperaturas con abundancia de agua y mal drenaje, condiciones que facilitan la reproducción y diseminación del hongo. Puede atacar las plantas de aguacates en todas sus etapas, incluyendo plantas certificadas como tolerantes y moderadamente resistentes a la enfermedad. Los ataques son más severos en suelos arcillosos, o en suelos arenosos con un subsuelo rocoso o con capa de arcilla que interfieran con el drenaje del agua. Condiciones de alta humedad y de sequía pueden acelerar los síntomas. El síntoma más obvio es la muerte de la planta desde la parte superior de la copa y de los extremos de las ramas hacia abajo.

A esto se debe el nombre de muerte descendente. Las hojas se presentan pequeñas, descoloridas y generalmente con apariencia marchita. Eventualmente el árbol pierde las hojas y muere. El hongo ocasiona la destrucción de las puntas de las raíces, las cuales desempeñan la importante función de absorción de agua y de nutrientes del suelo. Las raíces infectadas se necrosan y se desprenden fácilmente; ocasionalmente el hongo coloniza raíces gruesas, necesitando una herida para causar infección. Raras veces causa chancros o cáncer en la base del tronco. Los síntomas en el follaje son originados por la reducción de la absorción de nutrientes, agua y su transporte ascendente. Además, el árbol pierde más agua por transpiración que la absorbida por un sistema radicular podrido por el hongo. La falta de agua también reduce la capacidad de las hojas para producir clorofila, que les da el color verde a las hojas y esto es causa de clorosis o amarillamiento de las hojas (Téliz, 2000).

1.2.8. Manejo.

En el cultivo del aguacate se han implementado estrategias de manejo de la enfermedad basadas en la aplicación aislada de métodos de control que han resultado inefectivas. La erradicación de este patógeno a través de control químico es irracional por lo difícil, costoso, inefectivo pero sobre todo, dañino al medio ambiente. El combate de un patógeno de este tipo requiere una combinación de varios procedimientos prácticos de manejo, diseñados de modo de reducir la actividad del patógeno y aumentar la resistencia del hospedero durante períodos críticos de infección. Las prácticas de manejo complementarias debieran incluir la prevención (cuarentena, higiene en el vivero), el control cultural (drenaje, riego, adición de fertilizantes como calcio), el control biológico (uso de suelos supresivos, enmiendas y antagonistas), el control químico y la resistencia del portainjerto (Coffey, 1987; Erwin y Ribeiro, 1996).

1.3. Características de *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.).

Alternaria alternata (Fr.:Fr.) es un hongo extremadamente común en abonos, plantas (fresas, crisantemos, tomates, zanahorias y espárragos, cítricos), pulpa de madera y

madera podrida, pero también se encuentra en alimentos y tejidos, así como en diferentes tipos de suelo.

1.3.1. Importancia

Su distribución es universal y se considera que es un hongo de espacios abiertos. Este patógeno es responsable de considerables pérdidas económicas, debido a que reduce el rendimiento de las cosechas y produce alteraciones en los vegetales durante su almacenamiento.

1.3.2. Clasificación taxonómica

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Pleosporales

Familia: Pleosporaceae

Género: *Alternaria*

Especie: *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.)

1.3.3. Morfología

El micelio es de color oscuro gris verdoso con reverso negro, tienen un micelio algodonoso y el reverso de la colonia es obscuro en el centro rodeado de un anillo anaranjado pálido (Andrews, 1992).

Los conidios son grandes, alargados y oscuros, o bien multicelulares y en forma de pera y presentan septos tanto transversales como longitudinales (Agris, 2005).

1.3.4. Ciclo biológico y Epidemiología

El patógeno se disemina por la lluvia y el viento, y sobrevive en tejidos enfermos. En casi todos los casos, se comporta como un parásito de heridas. No obstante la penetración estomatal puede ocurrir o puede invadir un hospedero que está fisiológicamente debilitado causando una destrucción relativamente lenta de los tejidos del huésped. A medida que avanza la invasión de las hifas, éstos destruyen las células vegetales de donde obtienen sus nutrientes, y reduciendo con ello el

potencial fotosintético. El proceso de infección conduce a la formación de lesiones necróticas de forma redonda ubicadas sobre el haz foliar y su color se intensifica debido a la esporulación del hongo (Thomma, 2003). La esporulación de *Alternaria* es óptima en 27 °C por lo que es inhibida en menos de 15 °C o más de 33 °C, aunque el rango de crecimiento está entre 0 y 35 °C (Rotem, 1994; Carrillo 2003).

1.3.5. Síntomas y daños

Los síntomas causados por *Alternaria* se caracterizan por la presencia de necrosis en hojas, brotes y la corteza de los frutos. Las lesiones son redondas, secas, de color café oscuro o negro, de bordes irregulares, con marcados anillos concéntricos rodeados de un halo clorótico (Agrios, 2005).

1.3.6. Manejo

El método para controlar las enfermedades fúngicas se basa en la utilización de productos químicos sintéticos. Para el manejo cultural de esta enfermedad, se recomienda una amplia y adecuada distancia de siembra; realizar podas para favorecer la aireación; tener un adecuado control de malezas; recolección y destrucción de los frutos o partes de la planta afectados para disminuir la fuente de inóculo de la enfermedad y rotación de cultivos (Agrios, 2005).

1.4. Hongos entomopatógenos para el control de enfermedades en plantas

El control biológico de enfermedades en plantas o insectos con agentes microbianos se convierte en una alternativa viable, tomando en cuenta la reducción de costos al compararlo con otras prácticas habituales de control y sobre todo de la eficiencia y estabilidad del microorganismo en el ambiente (Papavizas, 1985).

Los hongos entomopatógenos (HE) son importantes agentes de control biológico en todo el mundo y han sido objeto de una intensa investigación por más de 100 años (Vega *et al.*, 2012). Se estima que existen aproximadamente 1,5 millones de especies en el Reino de los Hongos, de las cuales tan sólo 110.000 han sido descritas, y dentro de éstas, 700 especies de 90 géneros son patógenas de insectos

(Mueller y Schmit, 2007; Kirk *et al.*, 2008). Son de los primeros organismos en utilizarse para el biocontrol de plagas, por el hecho encontrarse en todo el cosmos y tener una gran diversidad representan una solución sostenible hacia el MIP (Sinha *et al.*, 2016).

Estos hongos están presentes de forma natural en el suelo, en el filoplano de las plantas e incluso en el aire (Meyling y Eilenberg, 2006; Quesada-Moraga *et al.*, 2007; Quesada-Moraga y Santiago Álvarez, 2008), están unidos de manera intrínseca a sus hospedantes, en un proceso de continua co-evolución que hace que estén adaptados a vivir a expensas de estos de los que se obtienen la energía necesaria para el desarrollo (Roy *et al.*, 2010). De esta forma, en función de la asociación trófica de los HE con sus hospedantes, se pueden distinguir tres grupos, biótrofos que se alimentan únicamente de células vivas y tal proceso cesa con la muerte de las mismas, necrótrofos que matan al hospedante y después crecen a expensas de los tejidos muertos y hemibiótrofos que son inicialmente biotrófos y una vez que el hospedante muere se vuelven necrótrofos (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008; Vega *et al.*, 2009). Así en la actualidad existen numerosas preparaciones comerciales de HE que están basadas en un número restringido de especies como *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin, *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch., *Isaria fumosorosea* (Wize) y *Lecanicillium longisporum* (Petch) Zare & W. Gams, entre otros (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008; Roy *et al.*, 2010).

1.4.1. Clasificación sistemática

Los hongos entomopatógenos tienen una gran capacidad de adaptarse e infectar ya sean patógenos obligados o facultativos. Estos se encuentran en las divisiones Zygomycota, Ascomycota, y Deuteromycota (Samson *et al.*, 1988; Humber, 1998). Son hongos que se caracterizan por formar micelio del que se originan las esporas asexuales o conidios a partir de células conidiógenas especializadas formadas en hifas simples o ramificadas denominadas conidióforos. Esta clasificación reúne a la mayoría de especies utilizadas en el control microbiano

Dentro del Phylum Ascomycota y Deuteromycota los géneros más comunes son *Aspergillus*, *Metarhizium*, *Hirsutella*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Culicinomyces*, *Lecanicillium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, etc. estos hongos presentan un micelio septado, haploide, y las ascosporas forman cuerpos fructíferos llamados ascas.

1.4.2. Características Generales de Hongos entomopatógenos

1.4.2.1. Ciclo de vida

Los hongos entomopatógenos se encuentran en el medio ambiente, como esporas o clamidosporas; en la superficie de las plantas, en el suelo, en el aire o en el cuerpo de insectos muertos. El ciclo de vida de los hongos entomopatógenos inicia con la germinación de la espora sobre la cutícula del hospedero. Las esporas infectan a los insectos a través de la penetración de la cutícula, a menudo de las partes más delgadas del insecto, como las articulaciones o pliegues de la cubierta protectora. El acceso de esporas en la epicutícula del huésped, y la posterior germinación y crecimiento, son las fases críticas del proceso de infección (Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013). Una vez dentro, el hongo crece en el hemocele de los insectos (Figura 1). Muchos hongos también producen toxinas que aumentan la velocidad de muerte del insecto. Después de la muerte del hospedero, el hongo crece a través del exoesqueleto donde comenzará a producir más esporas. Las esporas se extienden pasivamente a través de la acción del viento, la lluvia o el contacto con otros insectos. Las esporas que no encuentran un hospedero mueren o persisten en el suelo, la mayoría de ellas son viables durante una temporada de cultivo. Sin embargo, algunas especies de hongos producen esporas de descanso (clamidosporas) que al tener condiciones ambientales adecuadas son capaces de infectar.

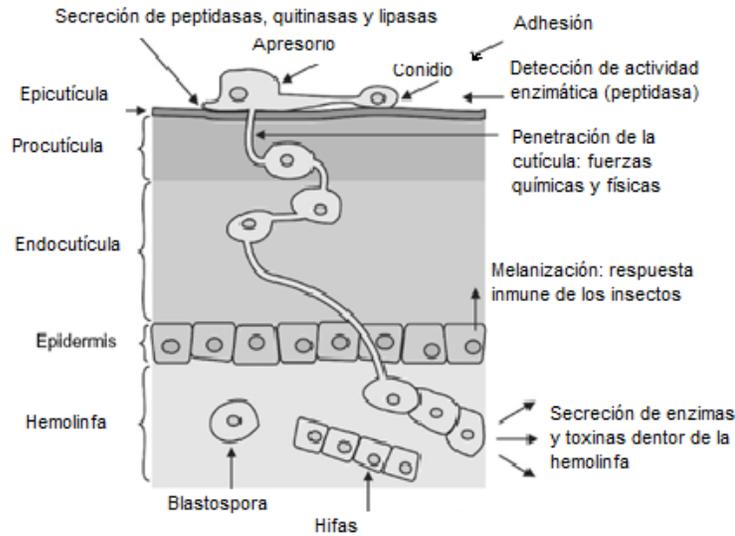


Figura 1. Modo de acción general de hongo entomopatógeno en insectos (Samuels et al, 2016).

1.4.2.2. Ecología

Para desarrollarse, los hongos entomopatógenos, requieren una humedad relativa del 93 % en el sitio de infección (Andersen *et al.*, 2006), una temperatura que oscile entre 20 y 30 °C. Además la humedad, la materia orgánica y el pH son factores importantes en el proceso de infección. El viento y la luz son factores abióticos que influyen de igual manera; el primer factor ayuda a dispersar las esporas, sin embargo, la luz solar y los rayos ultravioleta pueden reducir el proceso de infección (Sinha *et al.*, 2016). Por lo que el suelo los protege de la radiación solar y actúa como un amortiguador frente a condiciones extremas de temperatura y disponibilidad de agua. De la misma manera es el hábitat de muchos insectos huéspedes potenciales, algunos de los cuales se producen en altas densidades (Humber, 2008).

1.4.3. Principales géneros y especies de hongos entomopatógenos

1.4.3.1. Características de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuillemin.

Beauveria bassiana es un hongo que crece naturalmente en el suelo a lo largo del mundo y actúa como un agente patógeno en varias especies de insectos, causa la enfermedad muscardina blanca (Sinha *et al.*, 2016). Esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1834 por Agostino Bassi.

Beauveria bassiana es un hongo entomopatógeno perteneciente al orden de los Hypocreales, forma una cubierta densa y blanca sobre el exoesqueleto de sus hospederos, ocasionalmente forma sinemas; las células conidiógenas usualmente agrupadas (verticiladas o solitarias), incoloras, con base globosa o parecido a un frasco y la extensión apical denticulada (raquis) sobre los cuales se desarrollan los conidios; los conidios son aseptados, incoloros o amarillentos, globosos o elipsoidales (Humber, 2012).

1.4.3.2. Características de *Metarhizium robertsii* Bisch, Rehner y Humber

Metarhizium robertsii JF Bisch, Rehner y Humber (Clavicipitaceae) es un hongo que tiene la característica de presentar un estilo de vida bifuncional (Sasan *et al.*, 2012). No sólo es un hongo entomopatógeno ya que también coloniza fácilmente la rizósfera de las plantas (Hu y St. Leger, 2002). La utilidad de los hongos entomopatógenos para el control de plagas es una alternativa viable a los insecticidas químicos. Se ha demostrado que es un hongo competente en la rizósfera (Hu y St. Leger, 2002), pero esta asociación aún no ha sido completamente aclarada.

En los inicios de su descripción en 1883 las especies del genero *Metarhizium* han sido ampliamente estudiadas (Rocha *et al.* 2013), las investigaciones más recientes del complejo *Metarhizium anisopliae* s.l. (Metschnikoff) reconocen diez especies: *M. anisopliae* s.s. y *M. pingshaense* y las nuevas especies *M. frigidum*, *M. globosum* y *M. robertsii*, y se recupera a *M. Brunneum*; lo que eleva al nivel de especies a tres variedades: *M. acridum*, *M. lepidiotae* y *M. majus* y finalmente reconoce a *M. taii* como una sinonimia de *M. guizhouense*. (Bischoff *et al.* 2006; Bischoff *et al.* 2009; Rocha *et al.* 2013).

Metarhizium robertsii es indistinguible de *Metarhizium anisopliae*, por la forma y el tamaño de los conidios que son similares: *M. anisopliae* (5.0–7.0 x 2.0– 3.5 µm) y *M. robertsii* (5.0– 7.5 x 2.0–3.5 µm); por lo que solo es posible diferenciarlos molecularmente.

1.4.3.3. Características de *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard

El género presenta hifas hialinas a amarillentas, septadas de paredes delgadas. La mayoría presenta ramificaciones verticiladas o irregularmente ramificadas, llevan en su parte terminal en cada rama grupos de fiálides, las cuales pueden ser también solitarias. Las fiálides constan de una porción basal cilíndrica o hinchada, adelgazándose abruptamente a menudo para formar un cuello muy notorio. Los conidióforos son ramificados, agrupados o irregulares. Los conidios se encuentran agrupados en forma de cadena. Presentan un rápido crecimiento de sus hifas. El conidióforo presenta grupos de ramificaciones laterales, cada una de las cuales presenta de 2 a 4 divisiones ovaladas antes de los conidios. Estos últimos tienen una longitud de 2,5-3,0 μm de largo y de 2,0-2,2 μm de ancho y presentan coloración lila (Samson, 1975). Las colonias crecen muy rápidamente, alcanzando un diámetro de 5 a 7 cm en 14 días a 25 ° C, forma un micelio aéreo floculante; inicialmente es de color blanco, pero cuando la esporulación inicia, se muestra un tono liláceo. El crecimiento óptimo para el desarrollo del microorganismo ocurre en un rango de 26-30 °C, con un pH de 2-10 (Domsch *et al.*, 1980).

1.4.4. Mecanismos de acción de los microorganismos

En la naturaleza existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas (bacterias, levaduras y hongos), de forma que estos últimos contribuyen a que en la mayoría de los casos, la enfermedad no se desarrolle. Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos. Algunos de éstos son antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia. La antibiosis ocurre cuando un microorganismo produce moléculas que afectan negativamente a otros organismos por toxicidad o inhibición del crecimiento. Dentro de este grupo se incluyen los productos metabólicos como antibióticos, enzimas líticas y enzimas detoxificadoras. La definición de competencia utilizada para los microorganismos, y los hongos, son los efectos negativos de un organismo en otro como resultado del consumo de un recurso de disponibilidad limitada, o de controlar el acceso a un recurso. Los

Macroecólogos consideran dos tipos de competencia: competencia de interferencia y competencia de explotación; La competencia por interferencia se refiere a la situación en la que un organismo inhibe a otro por ejemplo, producir sustancias químicas alelopáticas o sombrear plantas de crecimiento más lento o más pequeñas, mientras que la competencia por explotación, es la situación cuando un organismo utiliza un recurso y por tanto reduce su disponibilidad a otro organismo (Boddy, 2016). El parasitismo puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. Sin embargo, la acción antagónica entre dos hongos, es que uno (hiperparásito) parasita al otro (micoparásito) a través de una síntesis de exoenzimas hidrolíticas para facilitar la degradación de la pared celular del hospedante. Un antagonista puede utilizar a un hongo como fuente de alimento. El micoparasitismo se divide en dos grupos: biotrópicos, tienen un rango restringido de hospedantes y necrotrópicos, matan a la célula antes o después de la invasión, excretan sustancias tóxicas y utilizan sus nutrientes (Pérez, 2004). Otro mecanismo importante de los microorganismos de biocontrol es la capacidad de inducir cambios metabólicos en las plantas que aumentan su resistencia a una amplia gama de microorganismos patógenos (hongos y bacterias). La Resistencia Sistémica Inducida (ISR, por sus siglas en inglés), mejora la respuesta de las plantas al ataque de patógenos estimulando la producción de compuestos de defensa en las plantas. La ISR generalmente es de carácter sistémico, ya que la resistencia a enfermedades se produce en los sitios de distancia, desde la ubicación de los microorganismos de biocontrol; la inducción de resistencia incluye la producción de lipopolisacáridos, sideróforos y ácido salicílico entre otros (Pieterse *et al*, 2014). Otra forma en la que estos organismos benéficos actúan, es a través de la promoción del crecimiento de las plantas mediante la síntesis de fitohormonas, producción de sideróforos, solubilización de minerales y fijación del nitrógeno atmosférico entre otros.

1.4.5. Microorganismos en el control de enfermedades en plantas

Existe un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos contra microorganismos patógenos de plantas. Los microorganismos más usados en control biológico pertenecen a los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*,

Trichoderma, *Streptomyces* etc. También se ha reportado el uso de levaduras y recientemente el uso de entomopatógenos para manejo de las enfermedades en plantas (Vega *et al.*, 2009). Desde hace varias décadas se viene documentando el uso de microorganismos antagonistas para el manejo de enfermedades.

En cuanto al control biológico contra *Phytophthora* spp., hay referencias en las cuáles cepas de *Streptomyces* han sido eficientes en la disminución de la severidad de *P. megasperma* en alfalfa y soja (Xiao *et al.*, 2002), también se han citado a las especies de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lignorum* (Tode) Harz, *Trichoderma polysporum* (Link: Persoon) Rifai, *Trichoderma viride* (Pers.), *Gliocladium roseum*, y *Bacillus subtilis*, como antagonistas de varias especies de *Phytophthora* (González Benavente *et al.*, 2002).

II. HIPOTESIS

“Los hongos entomopatógenos tienen capacidad antagonista contra *Phytophthora cinnamomi* y *Alternaria alternata*”.

III. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Obtener aislamientos de hongos entomopatógenos y evaluar su capacidad antagonista contra hongos fitopatógenos.

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtener aislamientos de hongos entomopatógenos nativos de muestras de suelo por la Técnica de insecto trampa usando larvas de *Tenebrio molitor* L.
- Obtener aislamientos de hongos entomopatógenos nativos de muestras de suelo por la Técnica de diluciones.
- Realizar bioensayos *in vitro* de cultivos duales de los aislamientos obtenidos contra *Phytophthora cinnamomi* y *Alternaria alternata*.

IV. METODOLOGIA

4.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

4.1.1. Zona de colecta.

Tepatitlán de Morelos es una Ciudad y Municipio localizado en la Región Altos Sur en el estado de Jalisco. Su ubicación regional respecto al estado es al centro y con respecto a la región al sureste, en las coordenadas 20° 54' 50" y los 21° 01' 30" de latitud norte y los 102° 33' 10" a los 1021 56' 15" de longitud oeste a una altura de 1,800 metros sobre el nivel del mar.

4.1.2. Colecta de muestras de suelo

Las muestras fueron recolectadas en 4 parcelas de aguacate cuya edad de los árboles oscilaba entre los 3 y 6 años, siendo parcelas relativamente jóvenes; los puntos de recolección fueron en la zona de goteo de los árboles, a una profundidad de 20 cm de la rizósfera del árbol, se tomaron 5 muestras por árbol, de aproximadamente 1 kg cada una, posteriormente se mezclaron y homogeneizaron para tomar 1 kg como muestra del sitio. Cada muestra se colocó en bolsas de polipapel, etiquetadas y trasladadas en una hielera para su análisis en laboratorio de Control Biológico del programa de Protección Vegetal de la Universidad Autónoma Chapingo.

4.2. Obtención de aislamientos de Hongos Entomopatógenos

4.2.1. Aislamiento directo

Los hongos entomopatógenos fueron aislados de muestras de suelo utilizando la técnica de insecto trampa (Zimmermann, 1986) (Figura 2). En esta etapa se utilizaron larvas de *Tenebrio molitor* L. de 2.5 a 3 cm de longitud. Las muestras de suelo se tamizaron por separado en el laboratorio de Control Biológico de la Universidad Autónoma Chapingo, las muestras se dividieron en 10 sub-muestras, que fueron depositadas en recipientes nuevos de plástico con tapa, previamente desinfectados con alcohol, las muestras de suelo fueron humedecidas con agua destilada estéril; en cada sub-muestra se colocaron 5 larvas de *Tenebrio molitor* y se incubaron a 25 °C

en un cuarto oscuro durante 20 días. Cuando las larvas presentaron síntomas de infección, se retiraron del vaso y se colocaron de manera individual en cámaras húmedas que contenían papel filtro estéril, se incubaron a 28 °C hasta producir esporulación. Posteriormente se tomó una pequeña cantidad de conidios con una aguja y se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo ADS (Agar Dextrosa Sabouraud), se incubaron a 28 °C, por un período de 10 días.

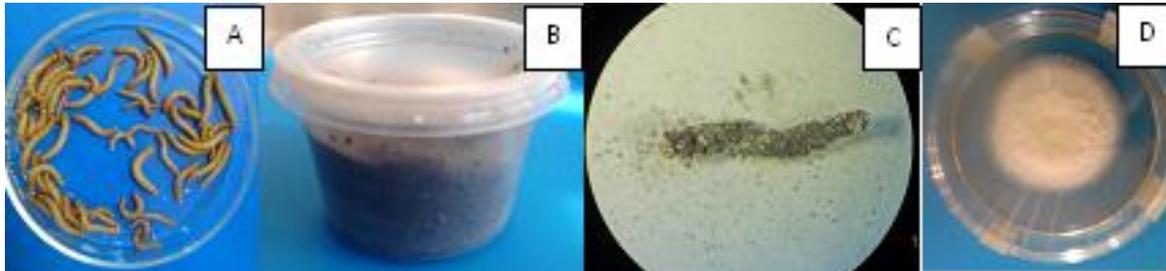


Figura 2. A) Larvas de *Tenebrio molitor*, B) Recipiente con muestra de suelo, C) Larva micosada, D) Aislamiento.

4.2.2. Aislamiento por dilución de suelo

Se utilizó la técnica de diluciones seriadas para la obtención de hongos entomopatógenos, la cual consistió en diluir 0.10 gr de suelo en 900 μ l de agua destilada estéril y se agitó mecánicamente durante 10 minutos para posteriormente hacer diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , para realizar las siembras se utilizaron 100 μ l de las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} en cajas Petri con medio ADS y con ayuda de un triángulo de vidrio se homogenizó la dilución. Las cajas Petri se incubaron a 28°C durante dos días para posteriormente realizar aislamientos, hasta obtener cultivos puros.

4.2.3. Obtención de cultivos monospóricos

Para la obtención de los cultivos monospóricos se utilizaron los aislamientos puros, con ayuda de una asa bacteriológica se tocó una colonia de cada hongo aislado con la finalidad de que conidios y micelio quedaran adheridos, estos se suspendieron en 1 ml de Tween80 estéril al 0.03 % contenido en tubos Eppendorf de 1.5 ml. De esa suspensión se tomaron 100 μ l con ayuda de una micropipeta se vaciaron a una caja Petri que contenía medio de cultivo ADS. Se esparció con ayuda de un triángulo de

vidrio y se incubó a 28 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo, se observó en el microscopio los conidios germinados y se transfirieron individualmente a una nueva caja Petri con medio de cultivo ADS.

4.2.4. Obtención de aislamientos de Hongos fitopatógenos

Los aislamientos de *Phytophthora cinnamomi* y *Alternaria alternata* se obtuvieron por trampeo de suelo, metodología usada por Almaraz *et al.*, 2013.

4.3. Identificación morfológica.

De los aislamientos monospóricos se realizaron preparaciones en seco, que consistió en colocar una muestra de conidios en un portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos; la toma de fotografías se realizó en un microscopio con cámara lúcida (Leica DM750), con el programa Leica Application Suite, LAS EZ versión 3.0.0. Se empleó el aumento de 40x para obtener una mejor visualización de los conidios (Figura 3). Para la digitalización de las fotografías se usó el editor de imágenes GIMP2.8.2, con el fin de depurar y modificar las ilustraciones, para dar pie a la imagen final. El programa ImageJ versión 1.51c se utilizó para medir el largo y ancho de los conidios. Para su identificación se utilizaron las claves taxonómicas de Humber 2012.



Figura 3. Fotografía de conidios a 40 X

4.4. Identificación molecular

4.4.1. Extracción del ADN genómico.

Para la extracción del ADN genómico se utilizaron aislamientos con 7 días de crecimiento en medio de cultivo ADS. Se siguió el protocolo modificado de Manicom B.Q. (1987).

4.4.2. Amplificación del ADN

Se amplificaron las regiones espaciadoras de transcripción interna (ITS) utilizando los oligonucleótidos ITS5 e ITS4. El volumen de reacción de la PCR fue de 20 µl, contenía 8.9 µl de agua, 0.5X de buffer de PCR, 1 mM de dNTP's, 0.5 mM de cada primer, 0.25 U/µl de *Taq* polimerasa y 3 µl de ADN, las condiciones de amplificación para la mezcla de reacción fue: desnaturalización inicial a 94°C por 3 min; 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30s, hibridación a 42 °C por 1 minuto y extensión a 72°C por 2 min; y una extensión final a 72°C por 5 minutos. El producto amplificado fue enviado a secuenciar a Macrogen (Seoul, Korea). Las secuencias obtenidas se editaron en el programa BioEdit 7.2.5, el alineamiento se realizó con el programa Clustal W y se compararon en el programa BLAST del NCBI (Centro Internacional para la Información Biotecnológica).

4.5. Análisis filogenético

Las secuencias fueron alineadas con el programa Clustal W, la divergencia entre individuos fue cuantificada usando el modelo de distancia Kimura dos parámetros. Se crearon árboles por el Método de Máxima Verosimilitud. El análisis fue realizado con el programa MEGA7 7.0.14.

4.6. Pruebas de germinación

Para evaluar la viabilidad de los conidios de los aislamientos monospóricos, se colocaron 50 µl de una dilución 1×10^{-3} en 5 puntos de una caja Petri con medio de cultivo ADS y se incubaron a 28°C por un lapso de 48 horas. Pasado este tiempo, se colocó una gota de azul de lactofenol para detener la germinación, un conidio se consideró germinado cuando el tubo germinativo superó el diámetro del conidio. Por

cada lectura en un campo del microscopio de luz con el objetivo de 40X, (contando cinco campos macroscópicos por alícuota) se contó el total de conidios germinados y no germinados para determinar luego el porcentaje de germinación usando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de germinación} = \frac{\text{Total de conidios germinados}}{\text{Total de conidios germinados y no germinados}} \times 100$$

4.7. Pruebas de antagonismo *in vitro*

Para realizar los bioensayos, los hongos entomopatógenos se sembraron cinco días previos al bioensayo en cajas Petri (100 x 15 mm) con 15 ml de medio de cultivo ADS; En el caso de los hongos fitopatógenos (HF), se sembraron 10 días de anticipación para el caso de *Phytophthora cinnamomi* y siete días para *Alternaria alternata*.

Para determinar la concentración de inóculo, los hongos entomopatógenos y *Alternaria alternata* crecieron en cajas Petri con medio de cultivo ADS e incubadas en 28 °C durante 15 días; una vez crecidos y con suficiente esporulación se rasparon con una espátula estéril para posteriormente vaciarlos a un tubo Falcon que contenía 30 ml de Tween 80 al 0.03% , se agitó mecánicamente durante 5 minutos, se filtró a través de una gasa estéril para separar conidios de micelio y medio de cultivo; se procedió a medir la concentración de esporas por medio de diluciones seriadas, el conteo se realizó en una cámara de Neubauer y un microscopio compuesto. La concentración usada para inocular las cajas Petri con medio de cultivo ADS para las pruebas de confrontación dual fue de 1×10^7 , se tomaron 100 μ l de cada suspensión y se dispersó con ayuda de un triángulo de vidrio estéril. De *Phytophthora cinnamomi* se tomó un círculo de medio inoculado y se colocó en el centro de la caja Petri, todas las cajas se incubaron a 28°C en los tiempos señalados para cada hongo.

4.7.1. Pruebas de confrontación dual

La evaluación se hizo por el método de bioensayo dual, metodología usada por Bell *et al.*, 1982 la cual fue modificada y consistió en colocar a 1 cm del centro de la caja Petri un disco de 7 mm de diámetro del medio de cultivo con el hongo

entomopatógeno (HE) y en dirección opuesta, se colocó a 1 cm del centro de la caja Petri un disco del agente fitopatógeno (HF) (Figura 4). Se evaluaron los 3 hongos entomopatógenos (HE) aislados de suelo de aguacate contra los hongos fitopatógenos *Phytophthora cinnamomi* y *Alternaria alternata*.

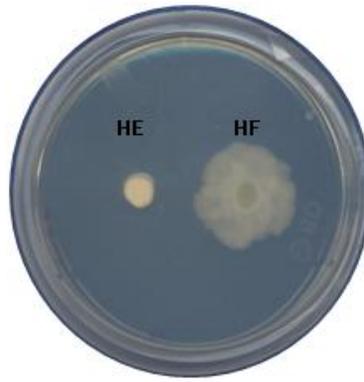


Figura. 4. Confrontación dual entre hongos entomopatógenos y fitopatógenos

Se tuvo un total de 3 tratamientos para cada hongo fitopatógeno con cinco replicas. Las cajas Petri se incubaron a 28 °C durante 15 días (Figura 5), durante este tiempo, se escanearon utilizando un escáner HP Scanjet 5590 cada tercer día para observar el crecimiento radial y con ayuda del programa GIMP 2.8.2 se procesaron las imágenes. Para calcular el área de crecimiento de cada hongo se utilizó el programa ImageJ versión 1.51c.

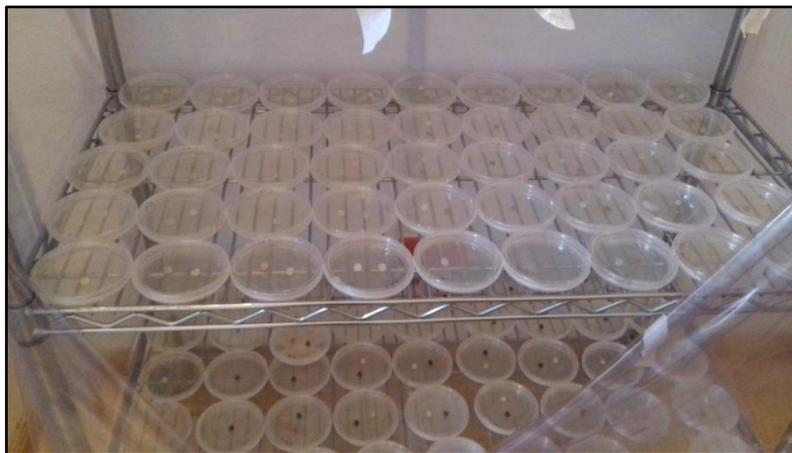


Figura 5. Bioensayo de antagonismo de hongos entomopatógenos contra *Phytophthora cinnamomi* y *Alternaria alternata*.

Con los datos obtenidos, se calculó el Porcentaje de Inhibición del crecimiento radial (PICR), que mide el antagonismo de los microorganismos confrontados junto con sus respectivos testigos, empleando la fórmula utilizada por Royse (1978).

$$\text{PICR} = \frac{R1 - R2}{R1} \cdot 100$$

Donde R1 es el radio mayor (radio patógeno-testigo) y R2 es el radio menor (radio del patógeno en cultivo dual).

4.8. Diseño Experimental y análisis estadístico

Con el objetivo de seleccionar el mejor tratamiento de inhibición de crecimiento de *Phytophthora cinnamomi* y *Alternaria alternata*, se utilizó un Diseño Completamente al Azar, se utilizaron las áreas totales en cm² de los hongos entomopatógenos; los datos se evaluaron con una prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y se transformaron por LOG (y). Posteriormente se realizó un Análisis de Varianza y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey (p<0.05). Los datos se analizaron en el Programa SAS v.9.0 para Windows.

V. RESULTADOS

5.1. Aislamientos obtenidos

Se aislaron 2 hongos entomopatógenos en el trampeo de muestras de suelo (Figura 6), los cuales correspondieron a los géneros de *Beauveria* y *Metarhizium*. Mientras que por el método de dilución de suelo se obtuvo a *Purpureocillium lilacinum*. Estos aislamientos se encuentran conservados en el cepario del Laboratorio de Control Biológico del Programa de Posgrado en Protección Vegetal de la Universidad Autónoma Chapingo.

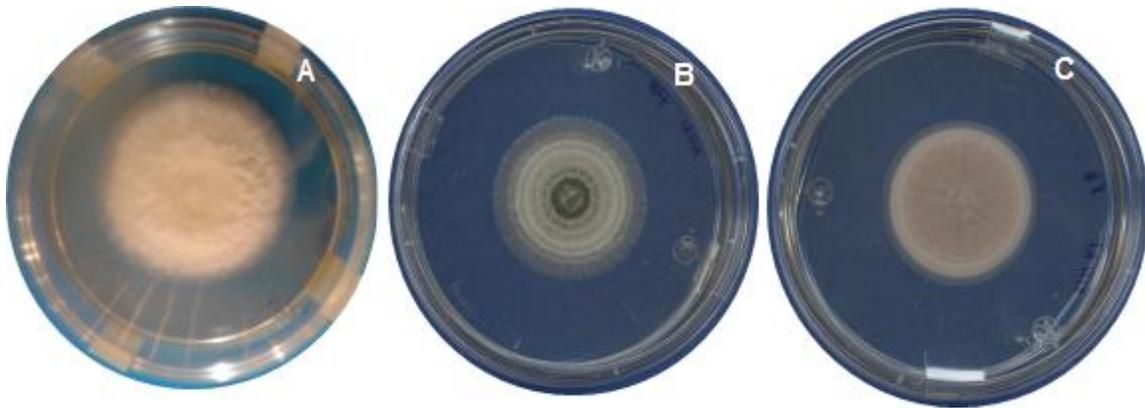


Figura 6. Aislamiento de *Beauveria bassiana* (A), de *Metarhizium* (B) y de *Purpureocillium lilacinum* (C) crecidos en medio de cultivo ADS.

5.2. Identificación morfológica

La identificación de los hongos aislados se realizó mediante las claves de Humber (2012) tomando como base sus estructuras de reproducción, que en este caso fueron los conidios para la identificación de *Beauveria bassiana* (Figura 7), *Metarhizium robertsii* (Figura 8) y *Purpureocillium lilacinum* (Figura 9).

Del género *Beauveria bassiana* (Figura 7) se observó que presenta conidios en forma globosa a subglobosa y una coloración blanca cremosa, con un tamaño promedio de $1.9 \times 1.4 \mu\text{m}$, coincidiendo con Humber (2012) donde refiere que el tamaño de los conidios oscila entre $1.5 - 3.5 \mu\text{m}$, estas estructuras se presentan dispuestas en un raquis en forma de zigzag.

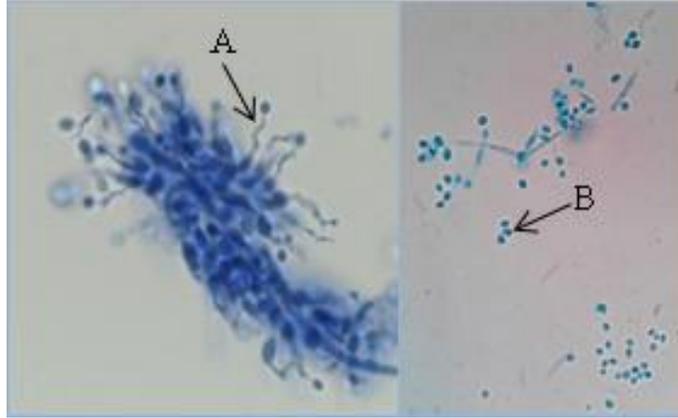


Figura 7. Fotografía a 40 x de *B. bassiana*, (A) se aprecia el raquis en forma de zigzag de donde emergen las esporas globosas (B), características que distinguen a este género.

En lo que refiere al género *Metarhizium* (Figura 8), los conidios son cilíndricos u ovoides, dispuestos en largas cadenas y miden en promedio $3.9 \times 2 \mu\text{m}$, resultados similares a los señalados por Bischoff *et al* (2009) donde menciona que los conidios miden $5.0-7.5 \times 2.0 - 3.5 \mu\text{m}$.

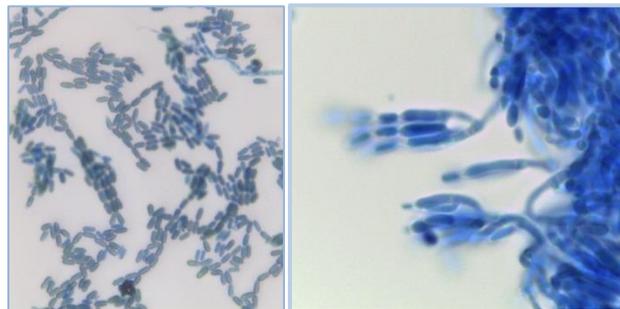


Figura 8. Conidios de *Metarhizium* mostrando masas de conidios paralelas, formando columnas prismáticas.

Purpureocillium lilacinum (Figura 9) presenta conidios en cadenas basipétalas, unicelulares, ovoides a fusoides, hialinos (Barnet y Hunter, 1998), en éste caso midieron en promedio $1.7 \times 1-2 \mu\text{m}$.

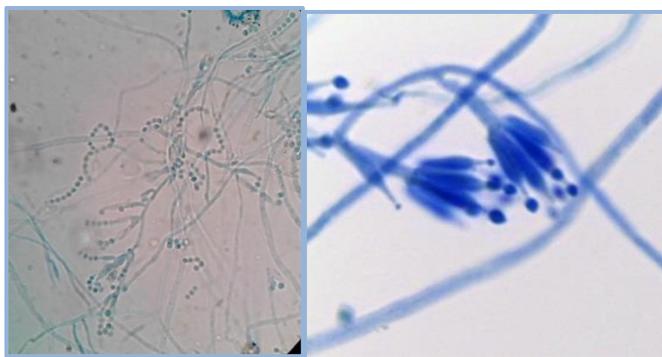


Figura 9. Estructuras de *Purpureocillium lilacinum* se observan los conidios elípticos, organizados en cadenas en el ápice de las fiálides.

5.3. Identificación molecular

Por los resultados obtenidos se confirmó la identidad de los hongos entomopatógenos coincidiendo con la identificación morfológica.

5.3.1. Análisis filogenético

La amplificación fue de 585 pares de bases para el caso de *Beauveria* (JALBB1), el porcentaje de similitud fue de 99% (E-value=0.0) con la especie ***bassiana***, mientras que para el aislamiento de *Metarhizium* (JALMR2) se generaron 561 pares de bases y su porcentaje de similitud 97% (E-value=0.0) con la especie ***robertsii***; se obtuvieron 590 pares de bases; en el caso de *Purpureocillium* (JALPL3) el porcentaje de similitud 99% (E-value=0.0) en comparación con la especie ***lilacinum***. La comparación de todos los aislamientos se realizó en el programa BLAST del NCBI.

La secuencia parcial de ITS fue obtenida para el aislamiento JALBB-1 de *B. bassiana* con un producto de 560 pb, el análisis mostró que el aislamiento se agrupó, con las secuencias seleccionadas del GenBank de la especie *bassiana* (Análisis de Máxima Verosimilitud; apoyado en 76% de soporte de rama y 1000 réplicas de bootstrap), sin embargo, la matriz de distancias indicó que al comparar entre secuencias existen variaciones; mientras que al comparar con la especie *B. brongniartii* la separación fue de 100% (Figura 10).

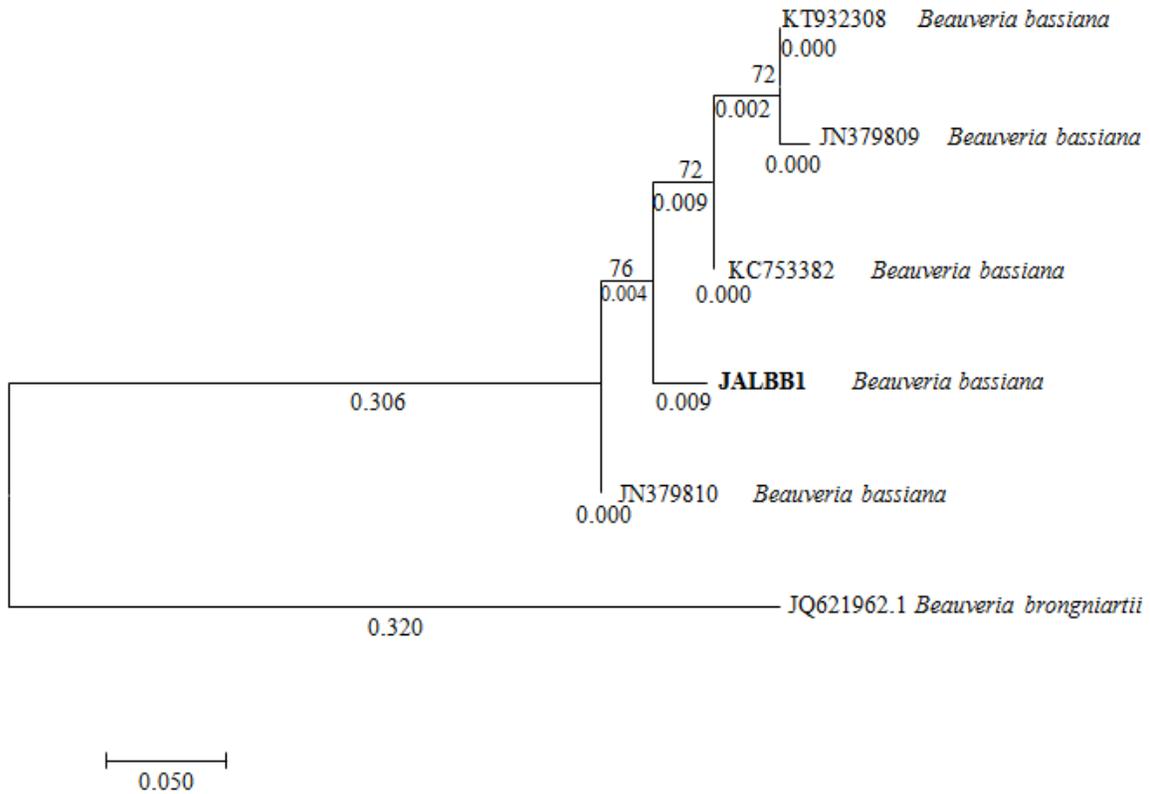


Figura 10. Filogenia del aislamiento JALBB1 inferido desde Máxima verosimilitud (ML) y 1000 réplicas de Bootstrap, basado en el modelo Kimura 2-parámetros.

En el caso del aislamiento JALMR2 se obtuvieron 561 pares de bases, el análisis mostró que el aislamiento se agrupó con las secuencias seleccionadas del GenBank en la especie *M. robertsii* (Análisis de Máxima Verosimilitud; apoyado en 79% de soporte de rama y 1000 réplicas de bootstrap); la matriz de distancia indicó que al comparar entre secuencias existen pequeñas variaciones con respecto a la especie de *M. robertsii* (Figura 11).

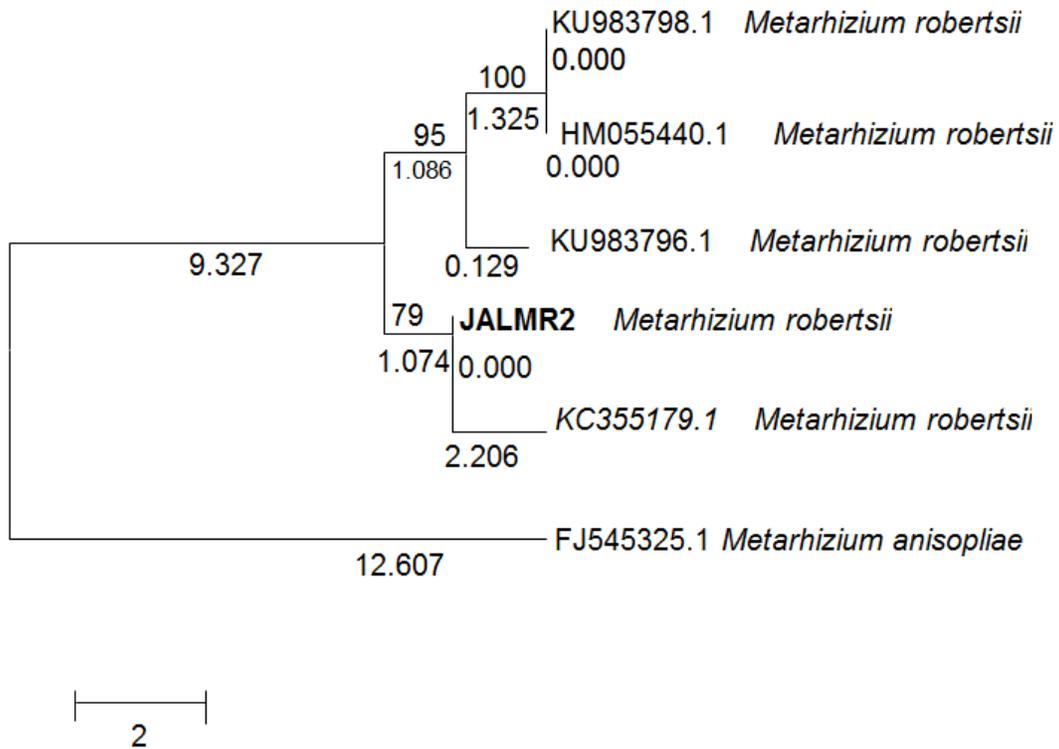


Figura 11. Filogenia del aislamiento JALMR2 inferido desde Máxima verosimilitud (ML) y 1000 réplicas de Bootstrap, y la matriz de distancia indicó que entre más cercano a cero las secuencias son iguales, basado en el modelo Kimura 2-parámetros.

Para el caso del aislamiento JALPL3 se obtuvieron 590 pb, el análisis filogenético del aislamiento *P. lilacinum* lo agrupó en la especie *lilacinum* (Análisis de Máxima Verosimilitud; apoyado en 99% de soporte de rama y 1000 réplicas de bootstrap); la matriz de distancia fue de 0.00 con respecto a *lilacinum*, esto indicó que existe similitud entre las secuencias y el aislamiento en estudio (Figura 12).

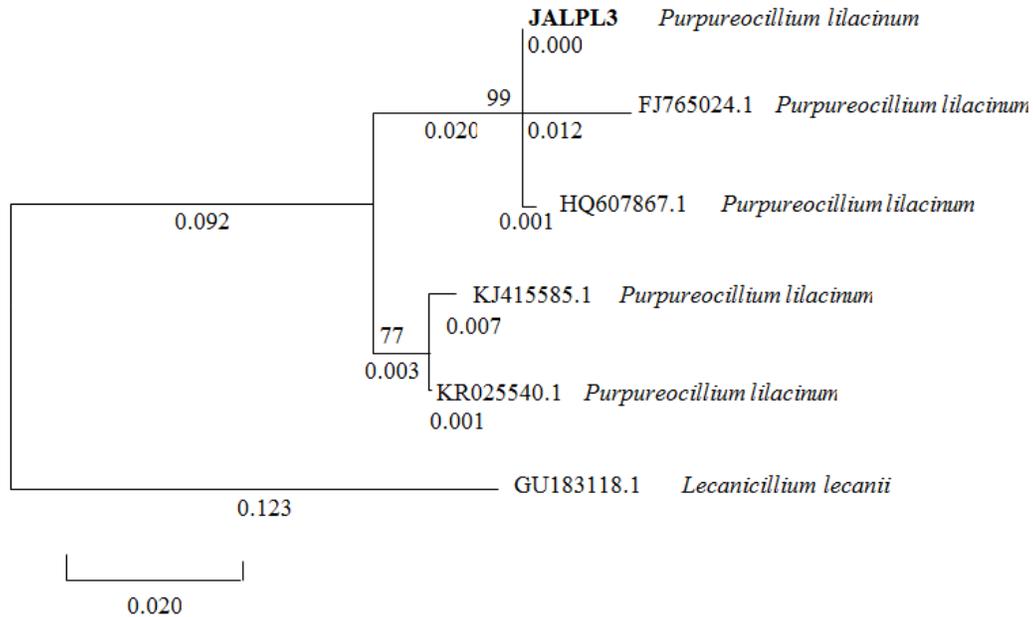


Figura 12. Filogenia del aislamiento JALPL3 inferido desde Máxima verosimilitud (ML) y 1000 réplicas de Bootstrap, basado en el modelo Kimura 2-parámetros.

5.4. Pruebas de Germinación

El porcentaje de germinación de los aislamientos evaluados correspondió a 100 % a las 48 horas de evaluación.

5.5. Evaluación antagonica *in vitro*

Al realizar las confrontaciones para evaluar la inhibición de los aislamientos de hongos entomopatógenos contra hongos fitopatógenos se observó competencia por espacio. Los resultados del análisis de varianza (Cuadro 1) $Pr > F (<.0001)$, indicaron que el efecto de los hongos entomopatógenos en el crecimiento de *Phytophthora* y *Alternaria*, produce diferencias significativas ($P < 0.01$, $\alpha = .0001$), es decir, existe competencia entre los hongos entomopatógenos y los hongos fitopatógenos.

Cuadro 1. Salida del análisis de varianza para los datos de áreas transformadas LOG (y).

Fuente	df	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	f-valor	pr>f
Modelo	7	9.9977009	1.42824299	23.70	<.0001
Error	32	1.92843650	0.06026364		
Total	39	11.92613745			
correcto					

Debido a que se detectaron diferencias en los tratamientos se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey (Cuadro 2), observándose que el tratamiento 1 (Testigo *P. cinnamomi*) es diferente a los demás tratamientos ($p < 0.05$), sin embargo el Testigo 2 (*A. alternata*) es ligeramente más pequeño que el testigo 1, mientras que los tratamientos 5 *P. cinnamomi* – *P. lilacinum* (Pc-PI), 8 *A. alternata*- *P. lilacinum* (AI-PI) y 6 *A. alternata*-*B. bassiana* (AI-Bb) tuvieron un crecimiento ligeramente similar ($p > 0.05$), pero significativamente diferentes de los tratamientos 7 (AI-Mr) y tratamiento 3 *P. cinnamomi*-*B. bassiana* (Pc-Bb).

Cuadro 2. Resultado de la Prueba de comparaciones de Medias Tukey para $\alpha = 0.05$

Agrupamiento	Medias	n	TRATAMIENTO
A	3.8970	5	1 (Testigo <i>P. cinnamomi</i>)
BA	3.5372	5	2 (Testigo <i>A. alternata</i>)
BAC	3.4241	5	5 (Pc-PI)
BDC	3.3129	5	8 (AI-PI)
BDC	3.0850	5	6 (AI-Bb)
DC	2.9763	5	4 (Pc-Mr)
D	2.9081	5	7 (AI-Mr)
E	2.1025	5	3 (Pc-Bb)

Error: 0.0.60264 gl: 32

Los aislados de hongos entomopatógenos presentaron porcentajes de inhibición entre 16.24 % y 38.10 % (Figura 13) contra *P. cinnamomi*. *M. robertsii* se destacó por presentar halos de inhibición que impidieron el desarrollo normal de *P. cinnamomi*

En confrontación con *A. alternata*, *M. robertsii* inhibió 31.37 %, *B. bassiana* 29.87 % y *P. lilacinum* con 27.14 % (Figura 14).

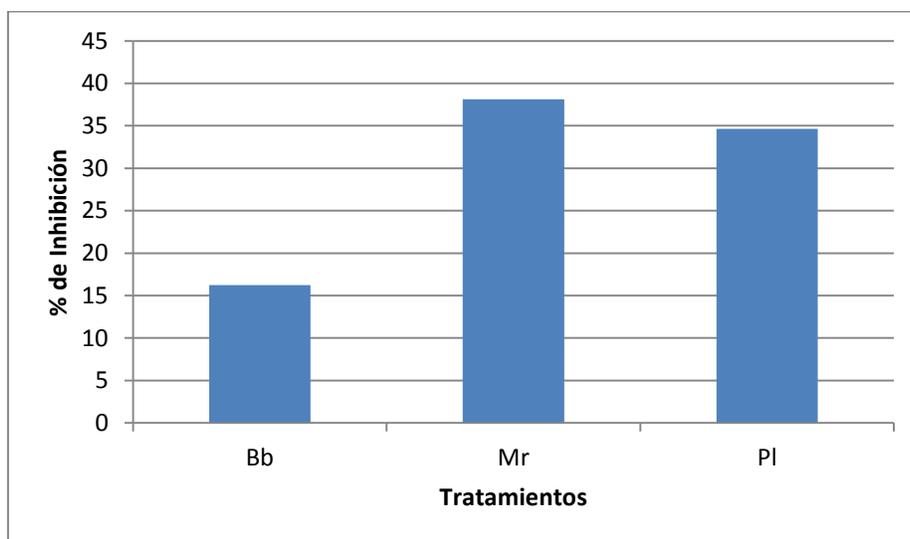


Figura 13. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium robertsii* y *Purpureocillium lilacinum* en confrontación con *P. cinnamomi*.

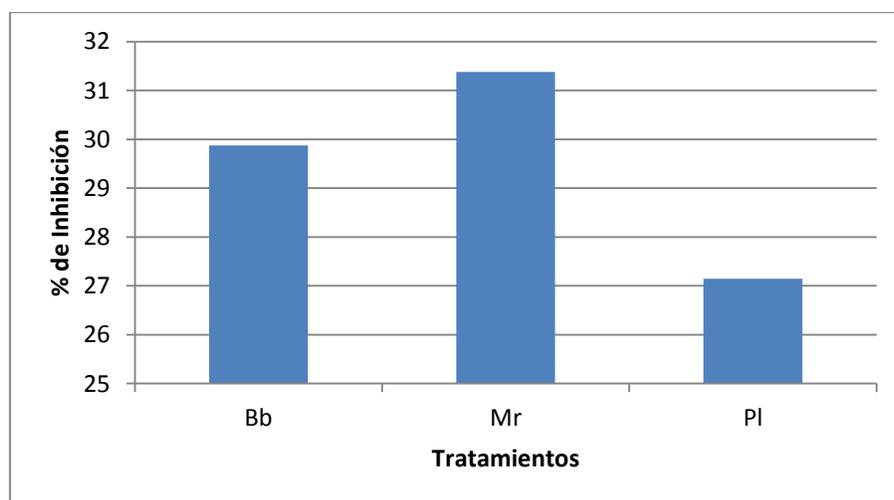


Figura 14. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium robertsii* y *Purpureocillium lilacinum* en confrontación con *A. alternata*.

En las Figuras 15 y 16 se aprecia el crecimiento de los hongos confrontados, se observa que los aislamientos de *Metarhizium*, *Beauveria* y *Purpureocillium* tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos.

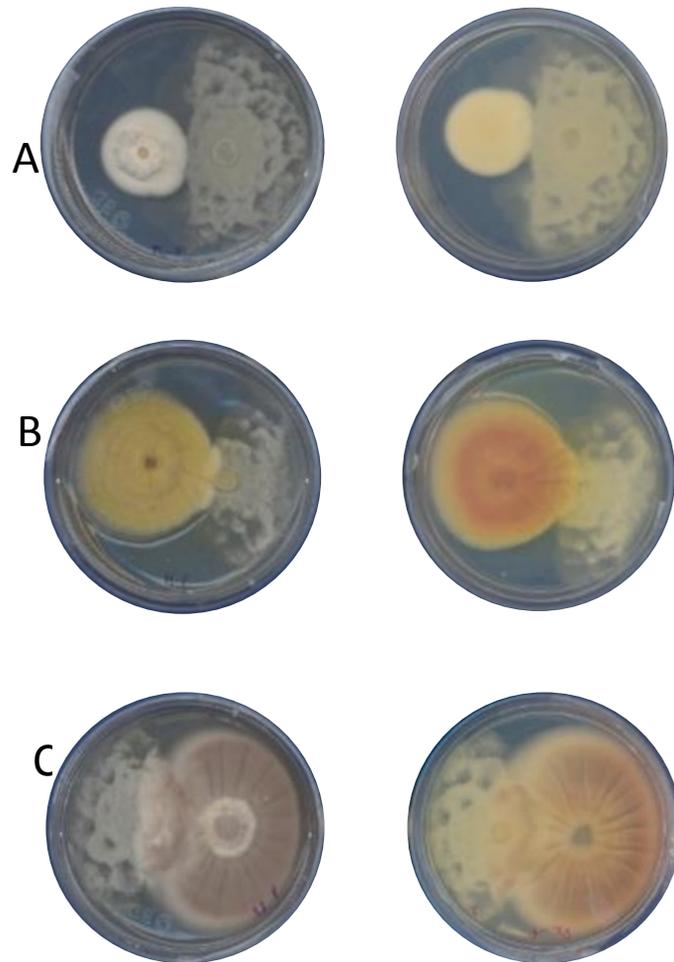


Figura 15. Efecto antagónico entre hongos entomopatógenos y hongos fitopatógenos. A) *B. bassiana*-*P. cinnamomi*, B) *M. robertsii*-*P. cinnamomi* C) *P. lilacinum*-*P. cinnamomi*

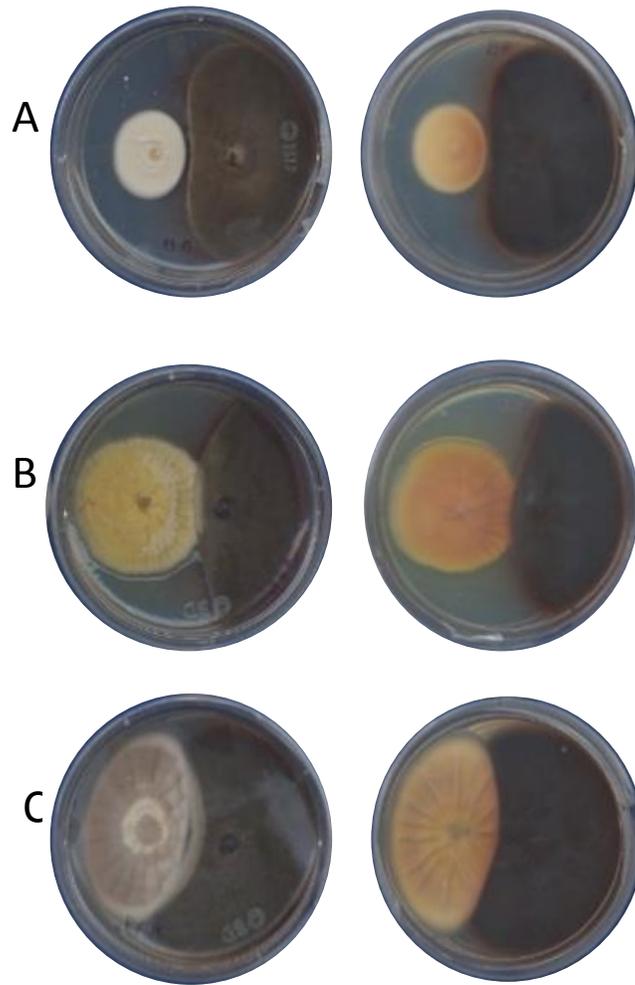


Figura 16. Efecto antagónico entre hongos entomopatógenos y hongos fitopatógenos. A) *B. bassiana*-*A. alternata*; B) *M. robertsii*-*A. alternata*; C) *P. lilacinum*-*A. alternata*

Los resultados encontrados indican que los aislamientos nativos de hongos entomopatógenos pueden ser utilizados en el control biológico de *P. cinnamomi* y *A. alternata*, la inhibición que se dio pudo ser por nutrientes o la liberación de metabolitos que se liberan al medio de cultivo; con esto, los hongos entomopatógenos se pueden considerar como herramientas en el control biológico de hongos fitopatógenos.

VI. DISCUSIONES

Los hongos entomopatógenos son agentes reguladores de poblaciones de insectos plaga y recientemente se ha encontrado que muchos de ellos juegan roles adicionales en la naturaleza (Vega *et al*, 2009). La inquietud de conocer el comportamiento entre hongos entomopatógenos y hongos fitopatógenos motivó llevar a cabo esta investigación.

En la evaluación de las muestras de suelo de huertas de aguacate en busca de hongos entomopatógenos, el resultado fue satisfactorio; se logró aislar a *Beauveria bassiana*, *Metarhizium robertsii* y *Purpureocillium lilacinum*, agentes de biocontrol en insectos que tienen una amplia distribución en suelos de todo el mundo, (Keller and Zimmermann 1989; Bidochka *et al*, 1998; Klingel *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2008); Pérez-González *et al.* 2014).

Al estudiar cualquier microorganismo, es necesario conocer los métodos que nos permitan identificar específicamente la especie a trabajar, para ello se realiza la identificación morfológica usando claves taxonómicas, sin embargo, en las últimas décadas se han desarrollado técnicas moleculares de detección e identificación de microorganismos en cuestión. La identificación morfológica de *Beauveria bassiana* y *Purpureocillium lilacinum*, tomando en cuenta el tamaño de los conidios, coincidió con Humber (2012), a *Metarhizium robertsii* se le comparó y coincidió con resultados obtenidos por Bischoff (2009) quien evaluó las relaciones filogenéticas del complejo *M. anisopliae* identificando linajes monofiléticos y aclarando la taxonomía de especies. Para la identificación molecular de los aislamientos obtenidos se usaron los primers ITS5 e ITS4 obteniendo fragmentos de 585, 561 y 590 pares de bases en *B. Bassiana*, *M. robertsii* y *P. lilacinum* respectivamente, Galán (2012) obtuvo resultados similares con *B. bassiana* y *M. anisopliae* con los ITS5 e ITS2; con el fin de caracterizar mediante ITS al hongo *Paecilomyces* identificado macroscópica y microscópicamente, Suárez-Contreras y colaboradores (2015) realizaron la comparación de cepas usando los ITS 4 y 5, concluyeron que molecularmente algunas de ellas pertenecen a *Purpureocillium lilacinum*, por lo que se requieren estudios más específicos para determinar especies. Al evaluar la germinación de los

hongos entomopatógenos a las 48 horas, los resultados demuestran 100 % de germinación in vitro. Ruiz Sánchez *et al.* (2011) obtuvo resultados similares al evaluar cepas nativas de *Metarhizium*. Elósegui Claro y Elizondo Silva (2010) realizaron pruebas de germinación en cocultivo de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Lecanicillium lecanii* y observaron que el porcentaje de germinación fue superior al 95 %. Otros investigadores han estudiado enzimas asociadas a la germinación de los conidios encontrando que las proteasas incrementan la virulencia del hongo debido a la aceleración de la germinación (Bidochka y Khachatourians, 1990; Zhanga, 2008). Por otro lado, Tiscornia (2012) determinó que las proteasas producidas por *M. anisopliae* se producen rápidamente a las 48 horas, quedando confirmada esta información al comparar el alto porcentaje de germinación obtenida en este estudio.

La utilización de microorganismos antagonistas plenamente identificados, es una alternativa viable y amigable con el ambiente, sin dejar de mencionar el beneficio económico respecto a los plaguicidas convencionales. Trabajos previos con estos agentes de biocontrol mencionan que *B. bassiana* aislado en tomate se confrontó con el patógeno *Pythium myriotylum* observándose parasitismo al enrollar sus hifas sobre el micelio del patógeno (Ownley *et al.*, 2008); a *P. lilacinum* junto con *B. bassiana* se les ha encontrado satisfactoriamente como endófitos al inocular semillas de algodón, cumpliendo además su papel como entomopatógeno; Lozano-Tovar (2013) usó cepas de *M. brunneum* y *B. bassiana* y reporta una inhibición del 42 al 62 % respectivamente contra *Phytophthora* spp concluyendo que se da un mecanismo de antibiosis, en comparación con los resultados obtenidos, existe una gran diferencia en porcentaje, debido a que en este experimento el género *Metarhizium* logró 38.10 % de inhibición contra *P. cinnamomi* y *B. bassiana* logró 16.24 %, esto probablemente se debe al distinto medio de cultivo usado en los experimentos. En este experimento, el aislamiento de *P. lilacinum* dio los mejores resultados al tener el porcentaje de inhibición del crecimiento radial más alto y observarse una competencia por nutrientes y espacio contra los dos hongos fitopatógenos usados. *M. robertsii* presentó un halo de inhibición contra *P. cinnamomi* y *A. alternata* inhibiendo su crecimiento, esto se debe a las proteasas que este hongo puede

generar de acuerdo con Tiscornia (2012). En el caso de *B. bassiana*, mostró una inhibición de 16.24 y 29.87 % contra *P. cinnamomi* y *A. alternata*. Los mecanismos de antagonismo observados se deben, de acuerdo con Franco-Chávez y colaboradores (2011), a que los hongos entomopatógenos producen metabolitos que son usados para inhibir y degradar el crecimiento y la pared celular de los hongos fitopatógenos.

VII. CONCLUSIONES

Se obtuvieron dos aislamientos por la técnica de insecto trampa, que correspondieron a los géneros *Beauveria* y *Metarhizium*, mientras que por el método de diluciones seriadas de suelo se obtuvo a *Purpureocillium lilacinum*.

El aislamiento nativo de *M. robertsii* es el antagonista que presentó el porcentaje más alto de inhibición contra *P. cinnamomi* y *A. alternata* presentando habilidades de micoparasitismo, competencia por espacio e inhibición del crecimiento de acuerdo con las pruebas *in vitro*.

Los hongos entomopatógenos tuvieron una inhibición del 16.24 % al 38.10 % contra hongos fitopatógenos en condiciones de laboratorio.

M. robertsii, *B. bassiana* y *P. lilacinum* se pueden incluir en el manejo de *P. cinnamomi* y *A. alternata*.

VIII. LITERATURA CITADA

- Agrios G. N., 2005. Fitopatología, Editorial: N/A, Pág.: 819
- Almaraz-Sánchez, A.; Alvarado-Rosales, D; Saavedra-Romero, .L L. 2013. Trampeo de *Phytophthora cinnamomi* en bosque de encino con dos especies ornamentales e inducción de su esporulación. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, vol. 19, núm. 1, enero-abril, 2013, pp. 5-12
- Andersen M., Magan N., Mead A., Chandler D., 2006. Development of a population-based threshold model of conidial germination for analyzing the effects of physiological manipulation on the stress tolerance and infectivity of insect pathogenic fungi. Environ. Microbiol. 8, 1625–1634.
- Andrews S. 1992. Differentiation of *Alternaria* species isolated from cereals on dichloran malt extract agar. pp. 351-355 en: Samson RA et al., editores. Modern Methods in Food Mycology. Elsevier, Amsterdam.
- Barnet H. L., Hunter B.B., 1998. Illustrate genera of imperfect fungi. 4th Ed APS Press, St Paul, Minnesota, 218 p
- Bell, D. K.; H. D. Well; C. R. Markham. 1982 «In vitro Antagonism of *Trichoderma* Species Against Six Fungal Plant Pathogens», Phytopathology 72:379-382, EE. UU.
- Bidochka M., J., Kasperski & G. Wild. 1998. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. Canadian Journal of Botany, 76: 1198-1204
- Bidochka, M.J.; Khachatourians, G.G. 1990. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factors in pathogenicity towards the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. Journal of Invertebrate Pathology. 56: p. 362-370.
- Bischoff JF, Rehner SA, Humber RA. 2006. *Metarhizium frigidum* sp. nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and a member of the *M. flavoviride* complex. Mycologia 98: 737–745.
- Bischoff J.F., Rehner A.S., and Humber R.A., 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. Mycologia 101: 508–528.

- Boddy L. 2016. Interactions Between Fungi and Other Microbes. Chapter 10. The Fungi. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00010-4>
- Carrillo, L. 2003. Los Hongos de los Alimentos y Forrajes. Universidad Nacional de Salta. 4ta edición. 130 p.
- Castillo López D, Zhu-Salzman K, Ek-Ramos MJ, Sword GA. 2014. The Entomopathogenic Fungal Endophytes *Purpureocillium lilacinum* (Formerly *Paecilomyces lilacinus*) and *Beauveria bassiana* Negatively Affect Cotton Aphid Reproduction under Both Greenhouse and Field Conditions. PLOS ONE 9(8): e103891. doi: 10.1371/journal.pone.0103891
- Coffey M.D. 1987. *Phytophthora* root rot of avocado: an integrated approach to control in California. Plant Dis. 71:1046-1052.
- Dobrowolski, M.; Shearer, B.; Colquhoun, I.; O'Brien, P. y Hardy, G. 2008. Selection for decreased sensitivity to phosphite in *Phytophthora cinnamomi* with prolonged use of fungicide. Plant Pathology, vol. 57, pp. 928-936. ISSN 1983-2052.
- Domsch H., Gams W. 1980. Compendium of soil fungi. Academic Press Ltd. New York, U.S.A. 859 pp.
- Elosegui Claro, O., Elizondo Silva A. I. 2010. Evaluación microbiológica in vitro de mezclas de especies de hongos entomopatógenos ingredientes activos de bioplaguicidas cubanos. Fitosanidad, Ciudad de la Habana, v. 14, n. 2, p. 103-109, jun.
- Erwin D. and Ribeiro O. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathol. Soc., MN. 270-271 pp.
- Farr, D.F., Bills, G.F., Chamuris, G.P., and Rossman, A.Y. 1989. Fungi on plants and plant products in the United States. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, U.S.A. 1252 p.
- Fernández L. O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas.; 62:96-100
- FAOSTAT. 2013. (Food and Agriculture Organization of The United Nations Statistics Division. Consultado el 04 de noviembre del 2016 en <http://faostat3.fao.org>
- FND. 2014. Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica, Análisis Sectorial y Tecnologías de la Información.
- Franco-Chávez, K., Rodríguez, S., Cervantes, J., Barranco, J., 2011. Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas. Sociedades rurales producción y medio ambiente. vol.11. Núm. 22
- Galán-Franco L.A. 2012. Aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos de las diferentes zonas Citricolas de México. (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma de Nuevo León

- González-Benavente, A., Fernández- González, J., Rodríguez, R., Beltran, C., Lacasa, A. López J. 2002. Control biológico in vitro de *Phytophthora capsici* mediante cepas de PGPR. *Phytoma* 143: 24-33.
- Hu G, St. Leger RJ, 2002. Field studies using recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 6383–6387.
- Humber, R.A., 1998. ARS collection of entomopathogenic fungal cultures. In: Lichtenfels, J.R., Kirkbride Jr., J.H., Chitwood, D.J. (Eds.), *Systematic Collections of the Agricultural Research Service. USDA-ARS Misc. Publ. 1343*, pp. 8–12. Humber R.A. 2012. Identification of entomopathogenic fungi. *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Academic Press. Second Edition. Chapter VI. Pages 151-187
- Humber, R.A., 2008. Evolution of entomopathogenicity in fungi. *Journal of Invertebrate Pathology* 98, 262–266.
- Humber R., 2012. *Manual of techniques in invertebrate pathology*. Chapter VI. Pages 151 - 187
- Kang S. C., Bark Y. G., Lee D. G., & Kim, Y. H. 1996. Antifungal activities of *Metarhizium anisopliae* against *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, and *Alternaria solani*. *Korean J. Mycol.*, 24, 49 e 55
- Klingel I., Eilemberg J. Meadow R. 2002. Effects of farming system, field margins and bait insect on the occurrence of insect pathogenic fungi in soils. *Agr. Ecosyst. Environ.* 91: 191-198.
- Keller S and Zimmermann G. 1989. Mycopathogens of soil insects. In: Wilding N, Collins NM, Hammond PM, Webber JF, editors. *Insect-Fungus Interactions*. Academic Press. pp. 239–270.
- Kirk, P., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A. 2008. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 10th edn. CAB International, Wallingford, UK.
- Lozano-Tovar M.D. Ortiz-Urquiza A., Garrido-Jurado I., Trapero-Casas A., Quesada-Moraga E. 2013. Assessment of entomopathogenic fungi and their extracts against a soil-dwelling pest and soil-borne pathogens of olive. *Biological Control* 67 (2013) 409–420
- Manicom, B.Q., Bar-Joseph, M., Rosner, A., Vigodsky-Haas, H. and Kotze, J.M. 1987. Potential applications of random DNA probes and restriction fragment length polymorphisms in the taxonomy of the fusaria. *Phytopathology* 77, 669-672
- Meyling, N.V., Pell, J.K., Eilenberg, J. 2006. Dispersal of *Beauveria bassiana* by the activity of nettle insects. *Journal Invertebrate Pathology*. 93: 121-126. Molnár et al., 2010

- Ortiz-Urquiza, A., Keyhani, O., 2013. Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects* 4, 357–374.
- Ownley B.H., Griffin M.R., Klingeman W.E., Gwinn K.D., Moulton J.K., Pereira R.M. 2008. *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. *Journal Invertebrate Pathology*. 98:267-270.
- Ownley B.H., Gwinn K.D., Vega F.E. 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl* (2010) 55:113–128
- Papavizas, G.C. 1985. Trichoderma and Gliocladium: biology, ecology and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 23: 23-54
- Pérez Consuegra N. 2004: Manejo Ecológico de Plagas. La Habana, Cuba. Editorial Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural. 127 – 284 pp.
- Pérez-González V.H., Guzmán-Franco A.W., Alatorre-Rosas R., Hernández-López J., Hernández-López A., Carrillo-Benítez M.G., Baverstock J. 2014. Specific diversity of the entomopathogenic fungi *Beauveria* and *Metarhizium* in Mexican agricultural soils, *Journal of Invertebrate Pathology*, Volume 119
- Pieterse, C., Zamioudis, Ch., Berendsen, R., Weller, D., Van, S., Bakker, P. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*. 52: 347-375.
- Quesada-Moraga, E., Navas-Cortés, J., Marahao, E., Ortiz-Urquiza, A., Santiago-Álvarez, C. 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycological Research*. 111: 947-966.
- Quesada-Moraga, E., Álvarez- Santiago, C. 2008. Hongos entomopatógenos. En: Control biológico de plagas agrícolas. Jacas, J.A., Urbaneja, A. (Eds). Phytoma España. p. 98-120.
- Rocha L.F., Inglis P.W., Humber R.A., Kipnis A., and Luz C. 2013. Occurrence of *Metarhizium* spp. in Central Brazilian soils. *Journal Basic Microbiol*. 53(3): 251-259.
- Roy, H.E., Brodie, E.L., Chandler, D. 2010. Deep space and hidden depths: understanding the evolution and ecology of fungal entomopathogens. *BioControl*. 55: 1–6.
- Royse J.J. and Ries S.M. 1978. The influence of fungi isolated from peach Twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Phytopathology* 68: 603-607.
- Rotem, Y. 1994. The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity. APS Press, American Phytopathological Society. 326 p.

- Ruiz-Sánchez E., Chan-Cupul W., Pérez Gutiérrez A., Cristóbal-Alejo J., Uch-Vazquez B., Tun-Suárez J.M., Munguía-Rosales R. 2011. Crecimiento, esporulación y germinación in vitro de cinco cepas de *Metarhizium* y su virulencia en huevos y ninfas de *Bemisia tabaci*. *Revista Mexicana de Micología*.33: 9-15
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2014. Boletín N° 034.
- Samson, R.A., Evans, H.C., Latg, J.P., 1988. *Atlas of Entomopathogenic Fungi*. Springer, Berlin Heidelberg, New York.
- Samuels R. I. Paula A.R., Carolino A.T., Gomes S.A. Morais C.O.P, Cypriano M.B.C., Silva L.E., Ribeiro A. Santos J.W.A.B., Silva C.P. 2016. entomopathogenic organisms: conceptual advances and real-world applications for mosquito biological control. *Open Access Insect Physiology* 6
- Sasan, R., Bidochka, M. 2012. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American Journal of Botany*. 99: 101-107.
- SIAP (Servicio de Información agroalimentaria y pesquera). 2015. En línea: www.siap.gob.mx. Consultado el 20 de marzo 2016.
- Sinha K. K., Choudhary A. K., Kumar P. 2016. Ecofriendly Pest Management for Food Security. Chapter 15 – Entomopathogenic Fungi. Pages 475–50
- Suárez-Contreras L.Y., Peña-Barrera W.L. 2015. Caracterización molecular mediante ITS del biocontrolador *Paecilomyces sp.* del banco de cepas de la Universidad Francisco de Paula Santander, sede Campos Eliseos – Los Patios. II Semana Internacional. X semana de Ciencia, tecnología e Innovación. Universidad Francisco de Paula Santander.
- Sun B-D, Y H-Y, Chen A. J. Liu X-Z. 2008. Insect-associated fungi in soils of field crops and orchards. *Crop Protection*. Volume 27, Issue 11, Pages 1421–1426
- Téliz O.D. 2000. *El aguacate y su manejo integrado*. Editorial Mundi Prensa 18 Edición. México. 219 pág.
- Thoma B. P. H. J. 2003. *Alternaria sp.* From general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology* 4(4):225-226.
- Tiscornia, S. 2012. Comunidades de hongos endófitos de Myrtaceae neotropicales: evaluación de la producción de enzimas y metabolitos bioactivos. (Tesis de doctorado). Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA).
- Vega F. E., Meyling N. V., Luangsa-ard J.J., Blackwell M. 2012. *Insect Pathology*. Chapter 6. Pages 171-220

- Vega, F., Goettel, M., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M., Keller, S., Koike, M. 2009. Fungal entomopathogens: New insights on their ecology. *Fungal Ecology* 2: 149-159
- Vidales- Fernandez J.A., Alcantar-Rocillo J.J. 1999. Acción de la solarización y de la materia orgánica en el control de la tristeza *Phytophthora cinnamomi* Rands, del aguacate (*Persea americana* Mill. Cv Hass) *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5: 255-259.
- Xiao, K., Kindel, L., Saman, D. 2002. Biological control of *Phytophthora* Root Rots on alfalfa and Soybean with *Streptomyces*. *Biological Control* 23: 285-295.
- Zhanga YJ, Fengb MG, Fana YH, Luoa ZB, Yanga XY, Wua D. 2008. A cuticle-degrading protease (CDEP-1) of *Beauveria bassiana* enhances virulence. *Biocontrol Science and Technology*. 18(6):543-555.
- Zentmyer, G.A. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and diseases it causes *Phytopathological Monograph*. Phytopathol. Soc.ST. Paul M.N., USA. 96 p.
- Zimmermann G. 1986. The "Galleria bait method" for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of Applied Entomology* 102: 213-215.