



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

**MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN PROTECCIÓN VEGETAL**

**DIAGNÓSTICO Y MANEJO DE LA PUDRICIÓN RADICULAR
DEL FRIJOL EJOTERO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

TESIS

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

PRESENTA:

DIONICIO FUENTES ARAGÓN

CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO, ABRIL DE 2016



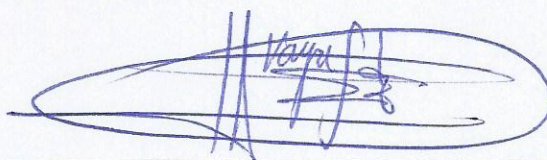
DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



La presente tesis titulada **DIAGNOSTICO Y MANEJO DE LA PUDRICION RADICULAR DEL FRIJOL EJOTERO (*Phaseolus vulgaris* L.)**, fue realizada por **Dionicio Fuentes Aragón**, 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 PROTECCIÓN VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR



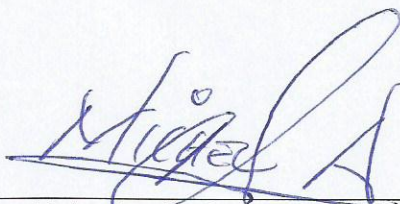
DIRECTOR:

Dr. Mateo Vargas Hernández



ASESOR:

Dr. Marcelo Acosta Ramos



ASESOR:

Dr. Alejandro Casimiro Michel Aceves

Chapingo, Estado de México, Abril de 2016

DIAGNÓSTICO Y MANEJO DE LA PUDRICIÓN RADICULAR DEL FRIJOL EJOTERO (*Phaseolus vulgaris* L.)

DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF SNAP BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) ROOT ROT

Dionicio Fuentes Aragón¹, Mateo Vargas Hernández¹, Marcelo Acosta Ramos¹, Alejandro Casimiro Michel Aceves²

RESUMEN

El diagnóstico preciso de los patógenos causales de las enfermedades de las plantas ayuda a mejorar las estrategias de manejo. El objetivo de la presente investigación fue identificar, con herramientas morfológicas y moleculares, los hongos causantes de la pudrición radicular del frijol ejotero en campo, en el estado de Morelos, México; así como evaluar cepas nativas de *Trichoderma* para el manejo biológico *in vitro* e invernadero, y fungicidas químicos. Los hongos causantes de la enfermedad fueron *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*. En el aislamiento de cepas nativas de *Trichoderma*, se identificaron las especies *T. asperellum*, *T. koningiopsis* y *T. harzianum*, de las cuales las cepas SIN1, SIN2 y COCULA (*T. asperellum*) obtuvieron las mayores inhibiciones en base a los ensayos de micoparasitismo y de metabolitos difusibles y volátiles, siendo los difusibles los mejores inhibiendo a ambos hongos fitopatógenos. Sin embargo, la mayor eficacia en invernadero fue de 25.59 % con SIN1 contra *S. rolfsii*, debido posiblemente a la rápida infección de *R. solani* y *S. rolfsii*, matando a la planta a los 4 y 6 días después de la inoculación, respectivamente; en contraste con los fungicidas químicos, con los cuales se obtuvieron eficacias de más de 80 % para ambos patógenos, debido a su rápida acción, con los ingredientes activos iprodiona (86.90 %), ciprodinil+fludioxonil (84.52 %) y quintozeno+thiram (90.47 %).

Palabras clave: Frijol ejotero, pudrición radicular, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Trichoderma*, fungicidas.

ABSTRACT

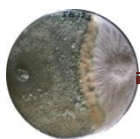
Accurate diagnosis of the causative pathogens of plant diseases helps to improve management strategies. The objective of this research was to identify, with morphological and molecular tools, the causal agent of snap bean root rot in a field in the State of Morelos, Mexico, and to evaluate native strains of *Trichoderma* for *in vitro* and greenhouse biological management, as well as by chemical fungicides. The fungi causing the disease were *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. In the isolation of native *Trichoderma* strains, the species *T. asperellum*, *T. koningiopsis* and *T. harzianum* were identified, of which the SIN1, SIN2, and COCULA (*T. asperellum*) strains obtained the best pathogen inhibition, based on mycoparasitism and non-volatile and volatile assays, with the diffusible metabolites being the best at inhibiting both phytopathogenic fungi. Nevertheless, the best greenhouse efficacy was scarcely 25.59 % with SIN1 against *S. rolfsii*, likely due to the rapid infection by *R. solani* and *S. rolfsii*, killing plants at 4 and 6 days after inoculation, respectively; by contrast, the chemical fungicides obtained efficiencies of over 80 % for both pathogens, due to their rapid action, with the active ingredients iprodione (86.90 %), cyprodinil + fludioxonil (84.52 %) and quintozone + thiram (90.47 %).

Keywords: Snap bean, root rot, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Trichoderma*, fungicides.

DATOS BIOGRÁFICOS



Dionicio Fuentes Aragón es originario de Telixtac, municipio de Axochiapan, Mor., nació el 8 de octubre de 1988 en Axochiapan, Mor. Realizó sus estudios de nivel Primaria en la escuela “El Porvenir Social”, la Secundaria en la Técnica # 29 “Josefa Ortiz de Domínguez”, ambos en Telixtac. Los estudios de nivel medio superior los realizó en la Preparatoria Federal por Cooperación “Manuel Noceda Barrios” en Jonacatepec, Mor., su licenciatura la cursó en el Centro de Estudios Profesionales del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero (CEP-CSAEGRO) (2008-2012). Se desempeñó como Prestador de Servicios Profesionales en Componente de la Cadena Productiva de los Productores de Maíz y Frijol (PROMAF) (2012-2013). Posteriormente realizó los estudios de posgrado en la Maestría en Protección Vegetal en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo (2014-2015).



AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por la beca brindada durante mis estudios de maestría.

A la **Universidad Autónoma Chapingo**, especialmente al **Departamento de Parasitología Agrícola** y al programa de Posgrado en **Protección Vegetal**, por brindarme la oportunidad de continuar con mi preparación académica.

A la **Dirección General de Investigación y Posgrado (DGIP)**, por el apoyo económico del Proyecto que permitió desarrollar el presente trabajo de investigación.

Al **Dr. Mateo Vargas Hernández** por su interminable ayuda en la presente investigación, así como la persistencia para la gestión del proyecto y cumplimiento de las metas propuestas, como profesor y asesor en la parte estadística del análisis de los datos, y dirección de la presente investigación.

Al **Dr. Marcelo Acosta Ramos** por su apoyo en la etapa de laboratorio, así como por la asesoría brindada en el diagnóstico de los hongos fitopatógenos y las sugerencias en la conducción del trabajo de invernadero y campo.

Al **Dr. Omar G. Alvarado Gómez** por su asesoría en la parte del diagnóstico molecular de los hongos fitopatógenos, sus consejos y pronta respuestas a las dudas sobre el trabajo de investigación.

Al **Dr. Alejandro C. Michel Aceves** por su asesoría en la evaluación de los agentes de control biológico de la etapa *in vitro*, así como el apoyo en la revisión y sugerencias de la presente investigación.

A todos los profesores de posgrado que contribuyeron en mi formación académica, por su dedicación y entrega como compartidores del conocimiento.



A todos mis amigos de la maestría, especialmente a los amigos de la generación 54: **Abel Saldivia Tejeda, Eduardo Gutierrez Jimenez, Marco Maidana Ojeda, Canek Mendoza y Aron Gómez López.** Así mismo a **Lucio Delesma Morales, Marco A. Mendoza Montero, Mario Zaragoza, Juan C. Ortiz, Jesus Huerta, Eduardo Elena Santiago, Pedro Plancarte, Arturo Peláez y Sobed Saldivia,** por su amistad y compartir momentos especiales.

A mis primos que me apoyaron en las labores de campo: **Santiago Fuentes, Ruben Fuentes, y Eusebio Fuentes.**

A mi cuñado **José Abraham,** por el apoyo brindado en las actividades agronómicas en la etapa de campo, el cual facilitó el éxito de la realización de esta etapa.



DEDICATORIAS

A mis Padres

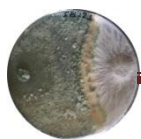
Teresa Aragón Pacheco y **Plácido Fuentes Saavedra**, por darme la vida y el apoyo durante todo el tiempo, la educación e inculcarme los valores morales que hoy poseo. Por su paciencia desde siempre, por su atención y sabiduría que me transmitieron, gracias a la cual, es parte de lo que he logrado hasta ahora académica y personalmente.

A mis hermanos

Margarita y **Rubicel**, por el apoyo moral y consejos que me han permitido superarme personalmente.

A Sandra B. Juárez Vázquez

Por su gran apoyo incondicional y por ser esa persona especial, que complementa mi vida.



ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iii
DATOS BIOGRÁFICOS.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
DEDICATORIAS.....	vii
ÍNDICE GENERAL.....	viii
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....	xiii
 CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA.....	 1
1.1 El cultivo de frijol ejotero.....	1
1.1.1 Importancia.....	1
1.1.2 Producción nacional	1
1.1.3 Panorama mundial	2
1.1.4 Ecología del cultivo	2
1.1.5 Requerimientos climáticos	2
1.1.6 Variedades	3
1.1.7 Siembra.....	3
1.1.8 Suelos	4
1.1.9 Riegos	4
1.1.10 Fertilización	4
1.1.11 Comercialización.....	4
1.2 Enfermedades de la raíz del frijol	5
1.2.1 <i>Rhizoctonia solani</i>	5
1.2.1.1 Importancia	5
1.2.1.2 Taxonomía	6
1.2.1.3 Morfología	6
1.2.1.4 Síntomas.....	7
1.2.1.5 Ciclo de la enfermedad	7
1.2.2 <i>Sclerotium rolfsii</i>	8
1.2.2.1 Importancia	8
1.2.2.2 Taxonomía	8
1.2.2.3 Morfología	9



1.2.2.4	Síntomas.....	10
1.2.2.5	Ciclo de la enfermedad	10
1.3	Identificación molecular de hongos.....	11
1.4	Manejo de enfermedades.....	13
1.4.1	Manejo biológico.....	13
1.4.1.1	<i>Trichoderma</i> spp.	13
1.4.1.2	<i>Bacillus subtilis</i>	16
1.4.2	Fungicidas.....	17
1.4.2.1	Clasificación de los fungicidas	18
 CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS PATÓGENOS CAUSANTES DE LA PUDRICIÓN RADICULAR DEL FRIJOL EJOTERO (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) Y CEPAS NATIVAS DE <i>Trichoderma</i>.....		
1.1	INTRODUCCIÓN	22
1.2	OBJETIVOS.....	23
1.3	MATERIALES Y MÉTODOS	23
1.3.1	Área de muestreo, material vegetal e incidencia	23
1.3.2	Aislamiento de plantas con síntomas	25
1.3.3	Aislamiento a partir de semillas	26
1.3.4	Identificación morfológica	26
1.3.5	Prueba de patogenicidad.....	26
1.3.5.1	Inoculación con los hongos fitopatógenos.....	28
1.3.6	Identificación molecular de los fitopatógenos.....	29
1.3.6.1	Extracción y purificación de DNA	29
1.3.6.2	PCR y secuenciación	30
1.3.7	Obtención de cepas nativas de <i>Trichoderma</i>	30
1.3.7.1	Muestreo de suelo	30
1.3.7.2	Aislamiento e identificación morfológica de <i>Trichoderma</i> spp.	31
1.3.7.3	Identificación molecular	32
1.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
1.4.1	Identificación morfológica de hongos fitopatógenos aislados de plantas	34
1.4.1.1	<i>Rhizoctonia solani</i>	35
1.4.1.2	<i>Sclerotium rolfsii</i>	36
1.4.1.3	<i>Fusarium</i> spp.	37



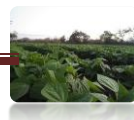
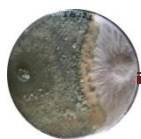
1.4.2	Identificación morfológica de hongos aislados de semilla.....	38
1.4.3	Prueba de patogenicidad.....	40
1.4.4	Identificación molecular de hongos fitopatógenos.....	40
1.4.5	Identificación de cepas de <i>Trichoderma</i>	42
1.4.5.1	Identificación morfológica.....	42
1.4.5.2	Identificación molecular.....	44
1.5	CONCLUSIONES	46

CAPÍTULO III. POTENCIAL ANTAGÓNICO *in vitro* DE CEPAS DE *Trichoderma* CONTRA *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc., CAUSANTES DE LA PUDRICIÓN RADICULAR DEL FRIJOL EJOTERO.....47

1.1	INTRODUCCIÓN	47
1.2	OBJETIVOS E HIPÓTESIS	48
1.2.1	Objetivos.....	48
1.2.2	Hipótesis	48
1.3	MATERIALES Y MÉTODOS	49
1.3.1	Tasa de crecimiento y esporulación	49
1.3.2	Prueba de micoparasitismo	50
1.3.3	Prueba de metabolitos difusibles	51
1.3.4	Prueba de metabolitos volátiles	52
1.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
1.4.1	Tasa de crecimiento	53
1.4.2	Ensayos de antagonismo.....	55
1.5	CONCLUSIONES	62

CAPÍTULO IV. EFECTIVIDAD BIOLÓGICA EN INVERNADERO DE FUNGICIDAS Y CEPAS DE *Trichoderma* CONTRA *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc.....63

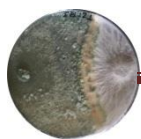
1.1	INTRODUCCIÓN	63
1.2	OBJETIVOS E HIPÓTESIS	64
1.2.1	Objetivos.....	64
1.2.2	Hipótesis	64
1.3	MATERIALES Y MÉTODOS	64
1.3.1	Material vegetal	64



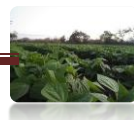
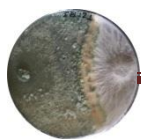
1.3.2	Obtención, preparación y cuantificación de inóculo	65
1.3.3	Inoculación con los hongos fitopatógenos.....	65
1.3.4	Tratamientos	65
1.3.5	Obtención y preparación del inóculo de <i>Trichoderma</i>	65
1.3.6	Aplicación de los tratamientos	67
1.3.7	Diseño experimental	67
1.3.8	Variables medidas.....	67
1.3.9	Análisis estadístico	68
1.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
1.5	CONCLUSIONES	77

CAPÍTULO V. MANEJO DE LA PUDRICIÓN RADICULAR DEL FRIJOL EJOTERO EN CAMPO, EN EL ESTADO DE MORELOS.....79

1.1	INTRODUCCIÓN	79
1.2	OBJETIVOS E HIPÓTESIS	80
1.2.1	Objetivos.....	80
1.2.2	Hipótesis	80
1.3	MATERIALES Y MÉTODOS	80
1.3.1	Área de estudio	81
1.3.2	Material vegetal	81
1.3.3	Tratamientos	81
1.3.4	Aplicación de los tratamientos	81
1.3.5	Manejo agronómico del cultivo.....	82
1.3.6	Diseño experimental	83
1.3.7	Variables estudiadas	85
1.3.8	Análisis estadístico	88
1.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	88
1.4.1	Severidad de la enfermedad y Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE)	88
1.4.2	Rendimiento de ejote	94
1.4.2.1	Calidad primera.....	94
1.4.2.2	Calidad segunda.....	100
1.4.3	Peso de vainas y longitud de vainas	100
1.4.4	Eficacia de los fungicidas	100

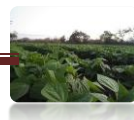
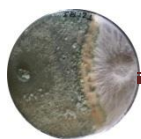


1.4.5	Rentabilidad de los tratamientos	108
1.5	CONCLUSIONES	111
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112
	APÉNDICE.....	146

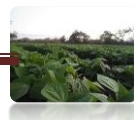
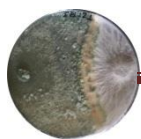


ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Cultivos y localización geográfica de lugares de muestreo.....	31
2	Incidencia y frecuencia de aislamientos de hongos fitopatógenos en los predios muestreados.....	35
3	Frecuencia de asilamiento (FA) y abundancia relativa (AR) de los hongos presentes en las semillas de frijol ejotero variedad “Strike”.....	40
4	Identificación morfológica y molecular por PCR-ITS de los hongos causantes de la pudrición radical del frijol ejotero, basada en la comparación de sus secuencias con la base de datos del NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).....	41
5	Identificación de las cepas de <i>Trichoderma</i> aisladas.....	45
6	Grado de esporulación, clase de antagonismo y TC de las cepas de <i>Trichoderma</i>	54
7	Efecto in vitro del micoparasitismo y compuestos difusibles y volátiles sobre la inhibición de <i>Rhizoctonia solani</i> Kühn y <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc.....	61
8	Tratamientos químicos y biológicos usados en el experimento en invernadero.....	66
9	Escala para la medición de la severidad de la pudrición radicular.....	68
10	Efecto de los fungicidas químicos y biológicos en el control de los agentes causales de la pudrición radicular del frijol ejotero en invernadero.....	69
11	Fungicidas químicos, biofungicidas y dosis, evaluados en campo.....	82

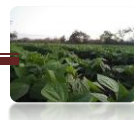
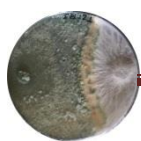


12	Plaguicidas aplicados para el control de plagas del follaje.....	83
13	Escala de evaluación de la pudrición radicular.....	87
14	Análisis de varianza individuales y combinado del ABCPE (% días).....	94
15	Resumen del análisis económico de la variedad Palma.....	109
16	Resumen de análisis económico de la variedad Strike.....	110
17	Resumen del análisis económico combinado para las dos variedades.....	110



ÍNDICE DE FIGURAS

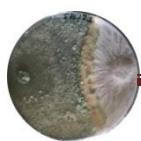
Figura		Pág.
1	Principales estados productores de ejote (miles de toneladas).....	1
2	Hábitos de crecimiento del frijol.....	3
3	Síntomas de pudrición radicular en el estado de Morelos.....	24
4	Localización de los lugares de muestreo.....	25
5	Hongos aislados del hipocotilo y raíz de plantas de frijol con síntomas de pudrición.....	35
6	<i>Rhizoctonia solani</i> . a, micelio en ángulo recto; b, células monilioides; c, cultivo en PDA; d, formación de esclerocio.....	36
7	<i>Sclerotium rolfsii</i> . a, cultivo en PDA; b, formación de esclerocio; c, fíbula; d, esclerocios.....	37
8	Microconidios y macroconidios de <i>Fusarium</i> spp.....	38
9	Prueba de hongos en semillas de frijol ejotero variedad "Strike".....	39
10	Hongos encontrados en semillas de frijol ejotero variedad "Strike". a, b, conidióforo y conidios de <i>Aspergillus</i> sp.; c, ascosporas de <i>Chaetomium</i> sp.	39
11	Síntomas causados por <i>R. solani</i> Kühn en plántulas de frijol.....	41
12	Síntomas causados por <i>S. rolfsii</i> Sacc. en plántulas de frijol.....	42
13	Amplificación por PCR a partir de DNA extraído del micelio de 1. <i>R. solani</i> y 2. <i>S. rolfsii</i> . Los productos de amplificación obtenidos en los carriles 1 y 2 fueron de 649 y 611 pb respectivamente. M es el marcador de peso molecular 100 bp-Ladder de Axygen.....	42



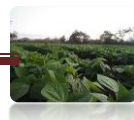
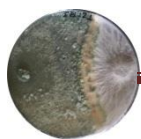
14	Cepas de <i>Trichoderma</i> aisladas de suelo de diferentes lugares y cepa comercial. a-c, f, <i>T. harzianum</i> (MOR2, MOR4, GTO, CHI2); d, e, <i>T. koningiopsis</i> (TB2, CHI1); g, h, <i>T. spp.</i> (ESP, SIN1); i-k, <i>T. asperellum</i> (SIN2, SIN3, COCULA); l, <i>T. virens</i> (cepa comercial).....	43
15	Características morfológicas de las cepas aisladas del suelo. Conidióforos, fiálides y conidios. a, MOR2, b, MOR4; c, GTO; d, TB2; e, CHI1; f, ESP; g, SIN1; h, COCULA; i, SIN2; j, SIN3.....	44
16	Amplificación por PCR del ADN de micelio de <i>Trichoderma</i> . Carril 1, CHI1; carril 2, SIN2; carril 3, GTO. M, marcador de peso molecular 100 bp-Ladder de Axygen. a, Factor de elongación (gen <i>tef1</i>); b, región ITS.....	45
17	Tasa de crecimiento de los fitopatógenos.....	53
18	Inhibición por micoparasitismo a las 72 h. a-d, <i>R. solani</i> ; e-h, <i>S. rolfii</i> ; a, <i>T. asperellum</i> (SIN2); b, e, <i>T. asperellum</i> (SIN3); c, <i>T. koningiopsis</i> (TB2); d, h, cepa comercial (<i>T. virens</i>); f, SIN1; g, ESP, i, Control <i>R. solani</i>	56
19	Inhibición por metabolitos difusibles a las 72 h. a-c, <i>R. solani</i> ; e-h, <i>S. rolfii</i> . a, h, <i>T. asperellum</i> (COCULA); b, <i>T. koningiopsis</i> (TB2); c, g, ESP; d, control <i>R. solani</i> ; e, <i>T. virens</i> (cepa comercial); f, SIN1; i, control <i>S. rolfii</i>	57
20	Antagonismo de las cepas de <i>Trichoderma</i> contra <i>Rhizoctonia solani</i>	58
21	Inhibición por metabolitos volátiles. a-c, <i>R. solani</i> ; e-h, <i>S. rolfii</i> . a, <i>T. koningiopsis</i> (TB2); b, <i>T. asperellum</i> (COCULA); c, e, <i>T. virens</i> (comercial); d, control <i>R. solani</i> ; f, <i>T. koningiopsis</i> (CHI1); g, <i>T. harzianum</i> (MOR2); h, <i>T. asperellum</i> (SIN2).....	59



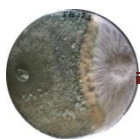
22	Antagonismo de las cepas de <i>Trichoderma</i> contra <i>Sclerotium rolfsii</i>	60
23	Control de <i>Rhizoctonia solani</i> con diferentes fungicidas. a, piraclostrobin; b, quintozeno+thiram; c, iprodiona; d, procloraz; e, ciprodinil+fludioxonil; f, tiabendazol.....	71
24	Control de <i>Sclerotium rolfsii</i> . a, piraclostrobin; b, quintozeno+thiram; c, iprodiona; d, procloraz; e, ciprodinil+fludioxonil; f, tiabendazol.....	73
25	Eficacia de los fungicidas químicos y biológicos contra <i>Rhizoctonia solani</i> .	74
26	Eficacia de los fungicidas químicos y biológicos contra <i>Sclerotium rolfsii</i> ...	74
27	Control de <i>R. solani</i> con agentes de biocontrol. a, <i>Bacillus subtilis</i> ; b, TRICHO-BIO; c, Mezcla; d, <i>T. koningiopsis</i> (TB2); e, f, g, <i>T. asperellum</i> (COCULA, SIN2, SIN3, respectivamente); h, i, Testigo.....	75
28	Control de <i>Sclerotium rolfsii</i> con agentes de biocontrol. a, <i>Bacillus subtilis</i> ; b, TRICHO-BIO; c, mezcla; d, e, f, g, <i>T. asperellum</i> (SIN1, SIN2, SIN3, ESP, respectivamente); h- i, Testigo.....	76
29	Actividades realizadas en el ensayo en campo. a, preparación del terreno; b, siembra directa; c, aplicación de los tratamientos en drench; d, fertilización; e, control de plagas; f, evaluación de la severidad de la enfermedad; g, cosecha y evaluación de las variables de rendimiento.....	84
30	Diseño experimental en campo.....	85
31	Severidades de la variedad Palma. a) Fungicidas solos, b) fungicidas mezclados. Las líneas negras son las aplicaciones de los fungicidas, a los 14 y 21 dds, respectivamente.....	89
32	Severidades de la variedad Strike. a) Fungicidas solos, b) fungicidas	



	mezclados. Las líneas negras son las aplicaciones de los fungicidas, a los 14 y 21 dds, respectivamente.....	90
33	Severidades en el análisis combinado a través de los fungicidas. a) Fungicidas solos, b) fungicidas mezclados. Las líneas negras son las aplicaciones de los fungicidas, a los 14 y 21 dds, respectivamente.....	91
34	Severidades en el análisis combinado a través de las variedades. Las líneas negras son las aplicaciones de los fungicidas, a los 14 y 21 dds, respectivamente.....	92
35	Rendimiento de ejote de primera calidad en el primer corte para el análisis individual de la variedad Palma.....	95
36	Rendimiento de ejote de primera calidad del primer corte del análisis combinado a través de los fungicidas y variedades.....	96
37	Rendimiento de ejote de primera calidad en el segundo corte para la variedad Palma.....	97
38	Rendimiento de ejote de primera calidad en el segundo corte de la variedad Strike.....	98
39	Rendimiento de ejote de primera calidad en el segundo corte en los análisis combinados.....	99
40	Eficacia de los fungicidas en la primera evaluación en los análisis individuales.....	101
41	Eficacia de los fungicidas de los análisis combinados de la primera evaluación.....	102
42	Eficacia de los fungicidas en la segunda evaluación en los análisis	



	individuales.....	103
43	Eficacia de los fungicidas de los análisis combinados de la segunda evaluación.....	103
44	Eficacias de los fungicidas de la tercera evaluación en los análisis individuales.....	104
45	Eficacias de los fungicidas de la tercera evaluación en los análisis combinados.....	105
46	Eficacia de los fungicidas en los análisis combinados de la cuarta evaluación.....	106
47	Eficacias de los fungicidas de los análisis combinados de la cuarta evaluación.....	107



CAPITULO I. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 El cultivo de frijol ejotero

1.1.1 Importancia

El frijol ejotero (*Phaseolus vulgaris* L.) es considerado una hortaliza de importancia mundial por sus características nutraceuticas y nutrimentales, ya que posee carbohidratos, proteínas, calcio, grasas, fibra y cenizas (Salinas, 2010). Es considerado como básico en la alimentación de los pueblos latinoamericanos, este se puede consumir en seco como semilla y en forma de verdura, tal es el caso del ejote (Díaz *et al.*, 2010).

1.1.2 Producción nacional

En México se sembraron aproximadamente 10,409 ha de frijol ejotero. Los principales estados productores fueron Morelos con una producción de 29.8 mil t, seguido de Sinaloa, Hidalgo y Puebla (Figura 1); sumando una producción anual nacional de más de 93 mil t, lo cual representó un valor de producción de \$ 518.96 millones de pesos. El rendimiento y precio t^{-1} medio anual fueron $9.10 t ha^{-1}$ y \$ 5,535 pesos, respectivamente (SAGARPA, 2014).

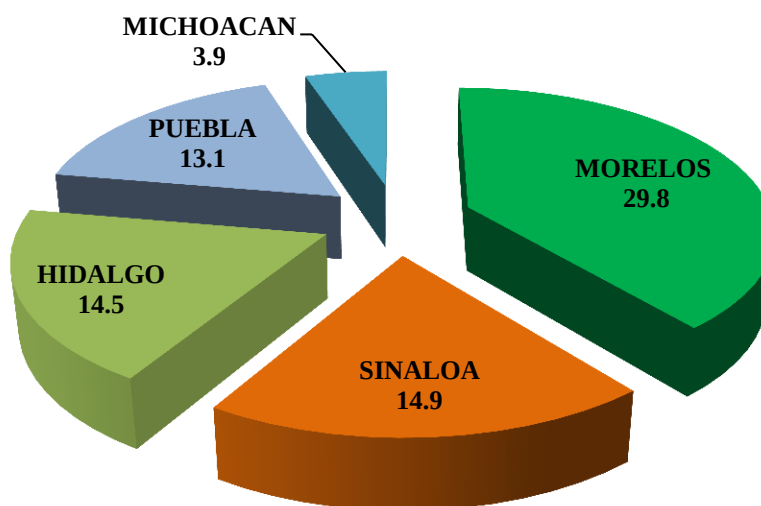
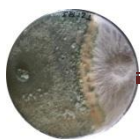


Figura 1. Principales estados productores de ejote (miles de toneladas) (SAGARPA, 2014).



1.1.3 Panorama mundial

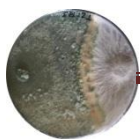
En el 2012, México ocupó el décimo-primer lugar en producción de ejote y el tercero en exportación a nivel mundial, con 93,818 t producidas, de las cuales aproximadamente el 35.7 % fueron para exportación. Los principales países productores fueron China (16.2 millones t), Indonesia (0.87 millones t), India (0.62 millones t) y Turquía (0.61 millones t), los cuales representaron el 91.4% de la producción mundial. Los principales exportadores en el 2011 fueron Francia, Kenia y México, y los importadores España, Estados Unidos y Bélgica (FAO, 2013).

1.1.4 Ecología del cultivo

Es una planta herbácea anual de la familia de las leguminosas, de sistema radicular bien desarrollado y abundante nodulación. Su tallo acanalado, delgado y rugoso, es largo y voluble en las variedades trepadoras, mientras que es corto y erguido en las variedades enanas. Las hojas son alternas, trifoliadas y se vuelven amarillas cuando las vainas maduran. Las flores nacen en racimos de 3 a 8 y son de color variable. El fruto es una vaina colgante, recta o arqueada, que contiene granos o frijoles de forma generalmente arriñonada y tamaño y color variables, según la variedad. La vaina en estado tierno, llamada ejote, se consume como verdura (Santacruz y Santacruz, 2007).

1.1.5 Requerimientos climáticos

La temperatura óptima para la emergencia de la semilla es 25 °C, para el crecimiento de la planta es de 18.3 a 29.4 °C y requiere 1,050 a 1,150 grados día de calor con una base de 10 °C. La mayoría de las variedades maduran a los 50 a 60 días, las cuales se encuentran en



condiciones óptimas de cosecha del ejote. Temperaturas arriba de 32.2 °C causa aborto de flores, así como las lluvias durante la floración (Aguiar *et al.*, 1998).

1.1.6 Variedades

Las vainas de las variedades ejoterías pueden ser planas o redondas transversalmente. Los tipos planos, por ejemplo tipos Kentucky Wonder, incluyen Magnum, Greencrop y Calgreen. Los tipos redondos referidos como tipos Blue Lakes incluye Benchmark, Strike [resistente al virus mosaico del frijol y a la cepa NY15 del mismo (Orzolek *et al.*, 2002)] y Landmark. El hábito de crecimiento de la

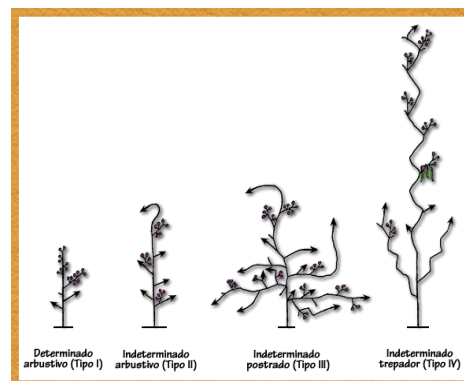
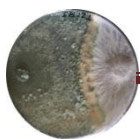


Figura 2. Hábitos de crecimiento del frijol

planta puede ser de arbusto y trepadora. Las primeras son plantas cortas erectas que miden de 0.3 a 0.6 m de altura, estas tienen un conjunto de vainas uniformes, siendo las comúnmente utilizadas para producción comercial (Aguiar *et al.*, 1998). Los hábitos de crecimiento puede dividirse en Tipo I (determinado arbustivo), II (indeterminado arbustivo), III (indeterminado postrado) y IV (indeterminado trepador) (Figura 2) (Debouck y Hidalgo, 1984).

1.1.7 Siembra

En EEUU son depositadas a 19 a 25 mm de profundidad y 5 cm en hilera, con dos hileras por cama de 91 a 102 cm. La sembradora es operada a una velocidad de 3.2 a 4.8 km hr⁻¹ para evitar el daño de la testa de la semilla. El rango de siembra normal es de 84 a 100 kg ha (Aguiar *et al.*, 1998). Mientras que en Morelos, la siembra se realiza manualmente, en el talud de surcos de 0.70 a 0.80 m, depositando 2 semillas por golpe cada 8-12 cm.



1.1.8 Suelos

Crece en muchos tipos de suelo y en un rango de pH de 5.5 a 7.5. El pH óptimo es de 6.0 a 6.5. Suelos con buen drenaje son preferidos. Excesiva humedad en el suelo estimula las enfermedades radiculares y deficiencias nutrimentales. No tolera salinidad, una reducción del 50% del rendimiento podría presentarse con una salinidad del suelo de 3.6 ECe (dS/m a 25 C) (Aguilar *et al.*, 1998).

1.1.9 Riegos

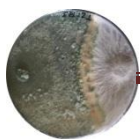
El frijol ejotero tiene un sistema radicular poco profundo, y el cultivo requiere riegos frecuentemente. La saturación excesiva de humedad del suelo, retardará el crecimiento y promoción de raíces, así como la pudrición de raíz y hipocotilo. El estrés hídrico durante la formación de vainas debe de ser evitado.

1.1.10 Fertilización

Aunque es una leguminosa y puede fijar el nitrógeno atmosférico cuando la semilla es inoculada con una cepa bacteriana adecuada, los productores no inoculan sus cultivos, prefiriendo la fertilización química. Requiere menos nitrógeno que otros vegetales. Altos rangos de nitrógeno retrasa la maduración del fruto. Generalmente se aplican 68 a 135 kg de N, 68 a 135 de fósforo, 0 a 110 de potasio, basado en análisis de suelo. Las aplicaciones de nitrógeno deben ser divididas en una al presembrado y dos después, deben ser cuando la planta empiece la etapa leñosa y en floración (Aguilar *et al.*, 1998).

1.1.11 Comercialización

El ejote presenta alta tasa respiratoria y consecuentemente corta vida de anaquel (10 días en promedio). Entre los métodos de conservación que preservan las características de calidad, la



congelación ha tenido amplia aceptación, por las ventajas que ofrece: mínima pérdida del contenido nutricional y conservación del producto hasta por 12 meses. La congelación solidifica el agua contenida en las células y detiene así los procesos biológicos y enzimáticos que degradan los alimentos (Hernández, 1999).

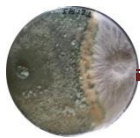
1.2 Enfermedades de la raíz del frijol

1.2.1 *Rhizoctonia solani*

Es un patógeno de distribución cosmopolita nativo del suelo, que afecta a un gran número de hospedantes, principalmente cultivos anuales (Sneh *et al.*, 1991), probablemente cause la mayoría de tipos de enfermedades, sobre gran parte del mundo, y bajo las más diversas condiciones ambientales, que cualquier otra especie fitopatógena. Causa decaimiento de la semilla, damping off de plántulas, pudrición de raíz, canchales en hipocotilo y tallos, podredumbre de corona y brote, tizón aérea y pudrición de partes vegetales que están en contacto con el suelo (Baker, 1970); además de poder encontrarse en semillas de *Brassica* spp., *Capsicum* spp., *Citrus* spp., *Gossypium* spp., *Lycopersicon* esculentum, *Phaseolus* spp., *Spinacea oleracea*, *Vigna unguiculata*, *Zea mays*, *Zinnia elegans* (Neergaard, 1977).

1.2.1.1 Importancia

En México causa enfermedad en diferentes cultivos, se ha reportado en los cultivos de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) (Paredes *et al.*, 2009), jitomate (Fernández *et al.*, 2007), papa (Virgen *et al.*, 2000), calabaza pipiana (*Curcubita argyrosperma* Huber) (Díaz *et al.*, 2015) y en raíces y semillas de chile y frijol (Groenewold *et al.*, 2003; Velásquez *et al.*, 2007). En otros países en el cultivo de frijol, se ha demostrado que causa pérdidas de más de 10% en sistemas de labranza convencional y 20 a 30% en sistemas de mínima o cero labranza en



Estados Unidos. En Brasil, en conjunto con *Fusarium*, se tiene reportado un alcance del 60% (Harveson, 2011). En frijol ejotero (*Phaseolus vulgaris* L.) en EEUU, se ha reportado en Nueva York, Wisconsin, California, Georgia, Florida, Oregon y Carolina del Norte (Averre, 2000; Langston, 2013; Pscheidt y Ocamb, 2015).

1.2.1.2 Taxonomía (González, 2002)

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase: Homobasidiomycetes

Orden: Ceratobasidiales

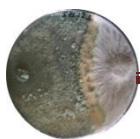
Familia: Ceratobasidiaceae

Género: *Thanatephorus*

Especie: *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*)

1.2.1.3 Morfología

Es una especie compleja que comprende cepas con una apariencia altamente variables en cultivos axénicos, así como en el ancho de hifas, morfología de esclerocios, patogenicidad y susceptibilidad a fungicidas (Anderson, 1982). La clasificación de sus aislamientos se basa en la reacción de anastomosis hifal, la cual es una respuesta de incompatibilidad vegetativa entre las cepas confrontadas (Carling *et al.*, 2002). Esta clasificación es un método conveniente pero no ideal para la clasificación de *R. solani* por la frecuencia de variación de la fusión hifal; por lo tanto, no ofrece información confiable sobre la variación genética (Sharma *et al.*, 2005). Las hifas son café pálido o cafés, ramificadas formando un ángulo recto cerca de las ramificaciones y presente una constricción cerca del septo. Presenta células monilioides



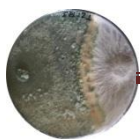
compuestas de células catenuladas desarrolladas acropetalamente. Los esclerocios son cafés a cafés oscuros, variando en forma, de 1 a 3 mm de diámetro. Los cultivos en PDA son cafés, las células hifales son multinucleadas con 4 núcleos por célula (Watanabe, 2010).

1.2.1.4 Síntomas

El damping off es probablemente el síntoma más común causado por *R. solani* en la mayoría de las plantas que infecta (Agrios, 2005). También puede inducir pudrición de semilla, cancro del tallo y pudrición de vaina. El síntoma característico es una lesión hundida café rojiza en el tallo o raíz principal. Al progresar la infección, las lesiones se alargan anillando el tallo, retardando el crecimiento y eventualmente mata la planta. También puede infectar vainas que estén en contacto con el suelo, causando pudrición acuosa, lesiones café rojizas y márgenes distintivos alrededor de las lesiones (Abawi, 1989).

1.2.1.5 Ciclo de la enfermedad

El conocimiento del ciclo de la enfermedad de un patógeno es importante cuando se están desarrollando y utilizando sistemas de pronóstico y umbrales de acción. Entre los aspectos importantes que se deben tomar en cuenta son: si la enfermedad es monocíclica o policíclica, período de latencia, forma de invernación y dispersión (McGrath, 2004). Sobrevive en el suelo como esclerocios o micelio asociados con los residuos de plantas, infectando plantas perennes o material propagativo como tubérculos de papa, y en algunos cultivos puede transportada por semilla. Se dispersa con la lluvia, agua de riego, herramientas, y cualquier cosa que lleve suelo contaminado. La temperatura óptima para el desarrollo del hongo es de 15 a 18 °C (Agrios, 2005).



1.2.2 *Sclerotium rolfsii*

El tizón sureño causado por *Sclerotium rolfsii* es una enfermedad severa de una amplia variedad de plantas hortalizas, frutales, ornamentales y césped. Se presenta en todo el mundo pero principalmente en climas cálidos (Mullen, 2001).

1.2.2.1 Importancia

Tiene un rango de hospedantes de más de 500 especies pertenecientes a dicotiledóneas y pocas especies monocotiledóneas (Prasad y Naik, 2008). En México se ha reportado causando infección en diversos cultivos y malezas (Flores *et al.*, 2006), mientras que en otros países se ha reportado causando tizón sureño en frijol (Garibaldi *et al.*, 2013).

1.2.2.2 Taxonomía

El teleomorfo de *Sclerotium rolfsii* fue descrito previamente como *Corticium centrifugum* (Lév.) Bres. y posteriormente cambió a *C. rolfsii*; subsecuentemente fue transferido al género *Pellicularia*, después a *Botryobasidium* y finalmente a *Athelia*, la cual es aceptada actualmente como la forma sexual de *Sclerotium rolfsii* (Punja, 1988). En los taxones mayores en base a métodos moleculares se ha reclasificado como sigue (Hibbet *et al.*, 2007):

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Subphylum: Agaricomycotina

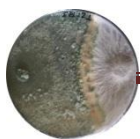
Clase: Agaricomycetes

Subclase: Agaricomycetidae

Orden: Atheliales

Familia: Atheliaceae

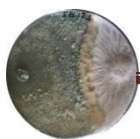
Género: *Athelia* (*Sclerotium*)



Especie: *Athelia rolfsii* (*Sclerotium rolfsii*)

1.2.2.3 Morfología

Presenta micelio hialino y pared delgada con raramente septos y fíbulas. La hifa principal es relativamente larga (5 a 9 μm de diámetro) comparado con otros hongos, mientras que las hifas más pequeñas penetran los tejidos vegetales (Mullen, 2001). Las células apicales contienen 4 a 11 núcleos, con una media de 6 a 8 por célula, y el número es menor en células viejas, promediando de 3 a 4 por célula. El núcleo se divide conjuntamente para asegurar una distribución uniforme de los tipos nucleares en las células hifales, los cuales pueden migrar a través de las fíbulas (Punja, 1988). La fibulación es un mecanismo para mantener la dicariosis del hongo, en el cual los núcleos distintos genéticamente se dividen, uno en la célula hifal y el otro en la hifa en forma de horquilla (fíbula), posteriormente se separan por un septo (Sharma, 2005). Los esclerocios, cuerpos esféricos y difusos comienzan a formarse a partir de áreas estrechamente empaquetadas de hifas o donde dos hebras de hifas se cruzan entre sí. Poco a poco los cuerpos se vuelven suaves y cambian de color blanco a café claro. Los esclerocios maduros normalmente consisten en una corteza exterior más gruesa y resistente (2-4 células de espesor) que rodea una corteza de células de paredes delgadas (6-8 células de espesor). El centro del esclerocio contiene hifas laxas filamentosas. Miden aproximadamente de 0.5 a 2 mm de diámetro, pero algunos pueden ser muy grandes midiendo de 8 a 10 mm de diámetro (Mullen, 2001). La formación de esclerocios está relacionado con la peroxidación lipídica debido el estrés oxidativo por las condiciones de crecimiento (Prasad y Naik, 2008), así como, la influencia de la temperatura, aeración, humedad, luz y factores nutricionales y químicos (Punja, 1985).



Se ha demostrado que aislamientos de *S. rolfii* de diversas áreas geográficas muestran diferencias en morfología, respuesta de crecimiento a diferentes temperaturas y medios de cultivo y la habilidad de producir ácido oxálico y pectinas (Prasad y Naik, 2008), así como la existencia de variabilidad genética dentro de grupos de compatibilidad micelial (Cilliers *et al.*, 2000).

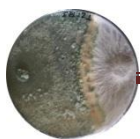
La fase telomórfica *Athelia rolfii* se ha inducido en laboratorio, pero se piensa que no ocurre comúnmente en la naturaleza. Forma basidios en grupos, relativamente cortos, clavados, la mayoría con cuatro esporas, sin fíbula basal. Las esporas son hialinas, con pared delgada, lisas, de 5.5 a 7 μm , subglobosos a elipsoidales y binucleadas. Los basidiocarpos se forman en parches en medio de cultivo, de 1 a 2 cm de diámetro, 50 a 100 μm de grueso (Punja, 1982).

1.2.2.4 Síntomas

Los síntomas iniciales en plantas infectadas son lesiones café oscuro con apariencia acuosa, en la base del tallo. Posteriormente, las lesiones se extienden hacia la raíz principal destruyendo el tejido cortical, causando el damping off. Las vainas que se encuentran en contacto con el suelo también pueden ser infectadas (Abawi, 1989; Garibaldi *et al.*, 2013). Produce abundante micelio blanco en tejidos infectados generalmente a los 3 a 4 días después de la infección cuando las condiciones son cálidas y húmedas. Siete días después de la infección, las hifas empiezan a formar esclerocios (Mullen, 2001).

1.2.2.5 Ciclo de la enfermedad

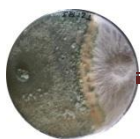
Inverna principalmente como esclerocios, aunque también como micelio en residuos vegetales. Se dispersa por el agua, suelo infestado, herramientas contaminadas, plántulas de trasplante y frutas infectadas, y en algunos casos por esclerocios mezclados con semillas.



Crece muy rápido y produce esclerocios a temperatura de 30 a 35 °C (Agrios, 2005), los cuales pueden permanecer viables por muchos años en el suelo o residuos vegetales con inviernos suaves. En primavera, el crecimiento hifal se reanuda y germina los esclerocios, cuando el micelio entra en contacto con el hospedante susceptible penetra directamente, aunque las heridas facilitan la infección. Ciclos secundarios ocurren y la enfermedad se dispersa cuando las hifas contactan nuevos tejidos en temperaturas cálidas a calientes (Mullen, 2001). Los esclerocios pierden potencial de germinación a profundidades mayores de 7 cm debido a la presión física del suelo y temperaturas menores de 21 °C (Punja y Jenkins, 1984). El hongo produce ácido oxálico, poligalacturonasa y celulosa, los cuales actúan causando separación y muerte de las células del hospedante, por lo tanto la cantidad producida de estos compuestos, está relacionada directamente con la virulencia del hongo (Mullen, 2001; Punja, 1985).

1.3 Identificación molecular de hongos

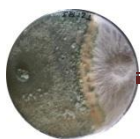
Los avances en el desarrollo de métodos moleculares, especialmente la tecnología de PCR (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés) han proveído laboratorios de diagnóstico con herramientas poderosas para la detección e identificación de hongos fitopatógenos. Estos avances han sido complementados con el desarrollo de nuevos métodos de extracción de ADN, automatización, ensayos de multiplexación e información en línea de diagnósticos moleculares (Capote *et al.*, 2012). El diagnóstico molecular está generando un alto impacto en la investigación en micología, y a la vez, su importancia incrementará en el monitoreo, detección, cuantificación e identificación de hongos, permitiendo un mejor manejo y control de las enfermedades de plantas, animales y humanos e investigación en hongos benéficos (Atkins y Clark, 2004; McCartney *et al.*, 2003).



La Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básico (BLAST, por sus siglas en inglés), es un enfoque para la rápida comparación de secuencias, la cual aproxima directamente alineaciones que optimizan una medida de similitud local, el par de Segmentos de Máxima Puntuación (MSP, por sus siglas en inglés) (Altschul *et al.*, 1990); lo que ha proporcionado una herramienta poderosa y disponible libremente para los biólogos moleculares para funcionar en muchas plataformas computacionales (Mount, 2007).

La región del Espacio Transcrito Interno (ITS, por sus siglas en inglés) en eucariotas, que incluye el gen 5.8S, el ITS1 y ITS2, ha sido propuesto como código de barras para los hongos, debido a que combina un alto poder de resolución para discriminar especies estrechamente relacionadas con una alta tasa de éxito de PCR y secuenciación, en una amplia gama de hongos (Schoch *et al.*, 2012). Para identificar molecularmente, se secuencia la región ITS, utilizando los iniciadores ITS1, ITS1-F, ITS4 para *Rhizoctonia solani* (Fiers *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015); ITS1, ITS2, ITS3, ITS4 para *Sclerotium rolfsii* (Okabe y Matsumoto, 2003; Remesal *et al.*, 2013).

Para el caso de *Trichoderma*, la identificación de especies es muy difícil debido a pocos caracteres morfológicos disponibles, permitiendo la superposición de especies. Alrededor del año 1995, el uso de análisis de secuencias de ADN llega a ser el nuevo paradigma en la sistemática, las cuales se aplicaron en desarrollar la taxonomía de *Trichoderma* y *Hipocrea* (Samuels, 2006). Comúnmente se secuencia la región ITS con los iniciadores ITS1, ITS4 (Castle *et al.*, 1998), SR6R y LR1 (Kullnig *et al.*, 2000; Kubicek *et al.*, 2003), se secuencia el factor de elongación (gen *Tef1*) utilizando los iniciadores EF1 (5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC) y EF2 (5'-GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT) (Anees *et al.*, 2010), EF1-728F (5'-CATCGAGAA



GTTCGAGAAGG-3') y EF1-986R (5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3') (Druzhinina *et al.*, 2005).

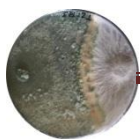
1.4 Manejo de enfermedades

1.4.1 Manejo biológico

El control biológico es definido como el uso deliberado de uno o más organismos (enemigos naturales, competidores, antagonistas) o parte de ellos para reducir o controlar la población de organismos causantes de plagas o enfermedades, o su efecto negativo sobre los cultivos (Olmedo y Casas, 2014). Ofrece un enfoque amigable con el ambiente y puede ser incorporado con el control cultural y físico para un efectivo manejo integrado (Monte, 2001). La antibiosis de algunos hongos está relacionada con la producción de antibióticos, enzimas y metabolitos secundarios resultando en antagonismo (Daguerre *et al.*, 2014). La mayoría de las especies de *Trichoderma* son benéficas por las enzimas que producen, promotor de crecimiento y control de enfermedades de plantas (Samuels, 2006), por ello, de los agentes de control biológico utilizados para el control de hongos fitopatógenos, 90 % de las aplicaciones son cepas de *Trichoderma* (Benítez *et al.*, 2004).

1.4.1.1 *Trichoderma* spp.

Las cepas de *Trichoderma* ejercen varios mecanismos de acción involucrados en el antagonismo de hongos fitopatógenos, además de influir en el metabolismo de las plantas. El antagonismo depende de diversos genes involucrando señalización, antibiosis, transporte o micoparasitismo, de los cuales 44 y 26% de los genes identificados están relacionados con el micoparasitismo y antibiosis, respectivamente. Mientras que la resistencia sistémica inducida,

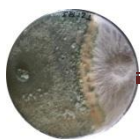


reprogramación genética/señalización y competencia representan solo el 12, 11, y 5% de los genes, respectivamente (Daguerre *et al.*, 2014).

Micoparasitismo. Existen dos clasificaciones de relaciones micoparasíticas, la primera comprende las interacciones biotróficas, donde el hongo se alimenta de otro sin provocarle la muerte; la cual es altamente específica, por lo tanto no puede ser utilizada exitosamente como agente de control biológico. La segunda son las interacciones necrotróficas, son más agresivas y está incluido el género *Trichoderma* (Olmedo y Casas, 2014). Para que haya micoparasitismo, primeramente se debe detectar el hongo hospedante y crecer hacia él, lo cual se lleva a cabo parcialmente por la expresión secuencial de enzimas de degradación de la pared celular, las cuales catalizan la liberación de oligómeros del hongo hospedante, y estas regresan a inducir la expresión de endoquitinasas de *Trichoderma* (Harman *et al.*, 2004). Posteriormente, se debe de penetrar el micelio del hospedante, lo cual es posible por la degradación parcial de su pared celular por la acción de enzimas micolíticas, principalmente quitinasas, glucanasas y proteasas (Viterbo *et al.*, 2002), las cuales están relacionadas con la expresión de diversos genes (Carsolio *et al.*, 1994; Reithner *et al.*, 2011).

Antibiosis. Ocurre durante las interacciones involucrando moléculas de bajo peso molecular o antibióticos producidos por cepas de *Trichoderma* que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. La mayoría producen metabolitos volátiles y no volátiles (Benitez *et al.*, 2004). Como el ácido harzianico, alameticinas, tricolina, peptaboils, antibióticos, 6-pentil- α -pirona y masoilactona (Vey *et al.*, 2001). Aunque se han descrito más de 123 metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma* (Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998).

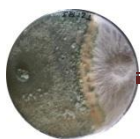
Promotor de crecimiento. Muchas cepas de *Trichoderma* son capaces de estimular el crecimiento de diferentes especies de plantas, incluyendo frutales, hortalizas, pastos y



forestales. Esta relación parece ser específica con muchas cepas teniendo un amplio rango de hospedantes, mientras que otras son más restrictivas, pudiendo inducir un incremento de más del 200% en la biomasa total comparada con plantas control. Sin embargo, no ha sido adoptado en este aspecto debido a la alta variabilidad en diferentes lugares y ciclos de cultivo, probablemente por la fluctuación de factores bióticos y abióticos (Stewart y Hill, 2014).

Cepas de *Trichoderma* pueden colonizar las raíces de las plantas y estimular el crecimiento de las plantas y proteger contra infecciones de patógenos. La colonización implica la habilidad de adherirse y reconocer las raíces de las plantas, penetrar y resistir los metabolitos tóxicos producidos por las plantas en respuesta a la invasión de organismos extraños patogénicos o no (Benítez *et al.*, 2004).

Resistencia Sistémica Inducida. Es capaz de inducir una respuesta benéfica en más de 10 diferentes dicotiledóneas y monocotiledóneas, incluyendo poáceas, solanáceas y curcubitáceas, a infección por hongos, bacterias e incluso virus (Woo *et al.*, 2006). A nivel molecular, la resistencia es resultado del incremento en la concentración de metabolitos y enzimas relacionadas a los mecanismos de defensa, tales como las enzimas fenil-alanina amonio-liasa y calcone sintasa, involucrados en la síntesis de fitoalexinas, quitinasas y glucanasas. Los genes de la planta responden a los patógenos y elicitores, por esta razón, los mecanismos de defensa de la planta no necesariamente requieren la estimulación de organismo vivos, por lo tanto, los metabolitos de *Trichoderma* pueden funcionar como elicitores (Benítez *et al.*, 2004). Se ha demostrado efectividad de diferentes especies de *Trichoderma*, en diversos cultivos y contra diversos hongos, bacterias y hongos fitopatógenos, con eficacias variando del 25 al 100% (Harman *et al.*, 2004).



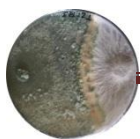
Competencia por nutrientes. Otra ventaja es su habilidad para desplazar otras especies de hongos en la rizósfera, debido a que son excelentes competidores por espacio y nutrientes. En este sentido, las cepas de *Trichoderma* que obtienen nutrientes eficientemente y crecen más rápido que los competidores tendrán una ventaja notable para colonizar y sobrevivir en diferentes nichos. Este sistema comprende la producción de sideróforos y péptidos que funcionan como transportadores de hierro (Olmedo y Casas, 2014).

Colonización de raíces de las plantas. *Trichoderma* crece intercelularmente, la epidermis, corteza y vasos permanecen intactos o mínimamente alterados. Esto provoca el fortalecimiento de las paredes celulares de las células circundantes por la deposición de callosa, celulosa y la producción de compuestos fenólicos los cuales pueden conferir alta rigidez a las paredes celulares del hospedante; por lo tanto, estas modificaciones no le permiten la entrada de los hongos fitopatógenos (Olmedo y Casas, 2014).

Trichoderma posee muchas habilidades probadas que afectan positivamente la productividad y sanidad vegetal, las cuales pueden ser explotadas mucho más eficientemente cuando se tienen un mejor entendimiento de los mecanismos y sistemas que operan en las interacciones entre *Trichoderma* y patógenos de plantas (Harman *et al.*, 2004).

1.4.1.2 *Bacillus subtilis*

El género *Bacillus* (Phylum: Firmicutes, Clase: Bacilli, Orden: Bacillales, Familia, Bacillaceae), son Gram-positivas, presenta células en forma de barra, rectas o ligeramente curvadas, estando solas o en pares, algunas en cadenas. Forma endosporas, no más de una por célula, las cuales son muy resistentes (De Vos *et al.*, 2009). Las especies de *Bacillus* son el tipo de especies de bacterias más comúnmente aisladas del suelo, pudiendo representar hasta el 36% de la población bacteriana (Hallmann *et al.*, 1998). Son comunes en la naturaleza, no

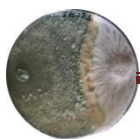


toxicas y dañinas para humanos y animales, y no patogénica a plantas (Aceá *et al.*, 1988); además, de poseer diversas ventajas sobre otras bacterias por la protección de las raíces contra patógenos y la habilidad de formar endosporas, lo cual facilita el almacenamiento y comercialización (Yang *et al.*, 2009). Se ha demostrado ampliamente la efectividad antagónica de *B. subtilis* contra hongos fitopatógenos que afectan la raíz en diversos cultivos, especialmente el potencial inhibitorio contra especies de *Fusarium* (Baysal *et al.*, 2008; Swain y Ray, 2009).

1.4.2 Fungicidas

Las enfermedades de las plantas afectan la mayoría de los cultivos a lo largo del mundo y deben ser controladas para prevenir las pérdidas de la producción (The American Phytopathological Society, 1990). Los fungicidas son un componente vital del manejo de las enfermedades de las plantas ya que controlan satisfactoriamente muchas de éstas, las prácticas culturales a menudo no proporcionan un control adecuado, los cultivares resistentes no están disponibles o no son aceptados en el mercado y, algunos cultivos de gran valor, presentan muy baja tolerancia a la presencia de síntomas de enfermedades (McGrath, 2004).

El aspecto económico frecuentemente influye en la selección y época de aplicación de un fungicida. En cultivos valiosos se utilizan fungicidas costosos y numerosas aplicaciones, debido a que, en la ausencia de estos tratamientos podrían producirse pérdidas económicas sustanciales, tal es el caso de frutales y campos de golf. En el caso de algunas enfermedades donde el rendimiento de los cultivos no se ve impactado porque la severidad es baja, se utiliza un umbral económico para determinar cuándo es necesario un tratamiento con fungicidas (McGrath, 2004).

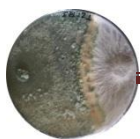


Los fungicidas representaron el tercer lugar en ventas en el mercado mundial en 2007, después de los herbicidas e insecticidas, alcanzando \$ 9,216 millones de dólares (23 % de los plaguicidas vendidos) (Grube *et al.*, 2011), aunque según un nuevo estudio indica que el mercado de los fungicidas alcanzará US\$ 16,200 millones para el 2020, registrando una tasa compuesta de crecimiento anual del 5.4% del 2014 al 2020, siendo las estrobilurinas y triazoles los segmentos de mayor crecimiento (Allied Market Research, 2014). En términos de cultivos, las hortalizas (US\$ 1,720 millones), cereales templados (US\$ 1,200 millones), arroz (US\$ 740 millones), vid (US\$ 700 millones), soya y frutas pomáceas (US\$ 320 millones) dominaron el mercado mundial de fungicidas, representando casi el 85% del valor total de las ventas en el 2005 (Oliver y Hewitt, 2014).

1.4.2.1 Clasificación de los fungicidas

Los fungicidas pueden clasificarse de acuerdo a su modo de acción, sitio bioquímico de acción, grupo, grupo químico y nombre común (FRAC, 2015). Conocer el modo de acción es muy importante para facilitar el manejo de la resistencia de los hongos y el impacto en organismos no objetivos, de este modo se utilizan sabiamente los fungicidas en la agricultura (Yang *et al.*, 2011; Leroux, 1996).

Piraclostrobin. Interfiere en la respiración celular (Código FRAC: C3), actuando en el complejo III sobre la ubiquinol oxidasa a nivel del sitio Q0, inhibiendo el transporte de electrones entre el citocromo b y c1 (FRAC, 2015). Tiene actividad translaminar, el cual puede tomar de uno a varios días para ser completamente efectivo (Vincelli, 2002). Posee efectos fisiológicos, mejorando el crecimiento y la asimilación de nitrógeno, por lo tanto, el rendimiento en la soya (Mahoney *et al.*, 2015), ‘efecto verde’ en soya (Kyveryga *et al.*, 2013),

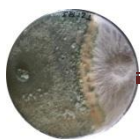


incremento en rendimiento de maíz (Shetley *et al.*, 2015) y mejora la calidad del frijol (Mahoney y Gillard, 2014).

Procloraz. Inhibe la biosíntesis de esterol, imidazol no sistémico, de contacto y translaminar, con actividad protectante y erradicativa, usado principalmente contra Ascomycetes y hongos imperfectos; en uso foliar en cereales para el control de *Pseudocercospora*, *Pyrenophora*, *Rhynchosporium* y *Septoria*. En otros cultivos se utiliza contra *Botrytis*, *Alternaria*, *Sclerotinia*, *Pyricularia* y *Colletotrichum* (FAO, 2009). Se ha demostrado tener efectos negativos en el sistema endocrino (Vinggaard *et al.*, 2006).

Polyoxin-D sal de zinc. Un total de 13 polyoxin (A-M) han sido aislados y caracterizados de la fermentación de caldos de *Streptomyces cacaoi* y todos, a excepción del C y I, tienen actividad antifúngica. Los más importantes desde el punto de vista comercial son el B y D, los cuales difieren estructuralmente solo en el estado de oxidación del componente uracilo. Inhiben la síntesis de quitina, componentes principales de las paredes celulares de los hongos, por lo tanto no son eficientes contra Oomycetes debido a que no poseen quitina. El polyoxin D penetra localmente en la planta y no se transloca fácilmente hacia arriba en la planta. El polyoxin B es usado para el control de una variedad de hongos que afectan frutales y hortalizas, incluyendo *Alternaria* en manzanas y peras y *Botrytis* en viñedos y tomates; mientras que el D es principalmente usado para el control del tizón de la vaina del arroz (Wong, 2010; Godfrey, 1995).

Iprodiona. Dicarboxamida Frecuentemente utilizado para el control de *Botrytis*, *Monilia*, y especies del genero *Sclerotinia*, y especialmente utilizado en frutales, fresa, viñedos, hortalizas y ornamentales (Vanni *et al.*, 2000); y alta efectividad contra *Rhizoctonia cerealis* y *R. solani* (Kataria y Gisi, 1995). También es usado en postcosecha y tratamiento de semilla. Es



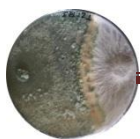
rápidamente degradado en suelos alcalinos y por la acción de bacterias (Paranjape *et al.*, 2015).

Ciprodinil. Anilino pirimida de amplio rango contra *Botryotinia fuckeliana* en viñedos, frutas, hortalizas y ornamentales; *Venturia inaequalis* en manzano y *Alternaria* y *Monilinia* spp. causando mancha de la hoja y pudrición en un amplio rango de hortalizas y frutales, enfermedades en cereales causados por *Tapesia* spp., *Pyrenophora teres* y *Rhynchosporium secalis* en cebada, y en moderado grado también *Leptosphaeria nodorum* y *Blumeria graminis* (Gisi y Müller, 2007), así como *Rhizoctonia solani* (Kataria y Gisi, 1995).

Fludioxonil. Introducido en 1990 como fungicida foliar o tratamiento de semillas. Posee amplio espectro con la mayoría de las clases de hongos excepto oomycetes. Se ha utilizado para el control de *Botrytis cinerea* en frutales, viñedos, hortalizas y ornamentales (Ackerman *et al.* 2007), así como contra *Rhizoctonia solani* causante de costra negra en papa (Bains *et al.*, 2002).

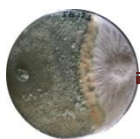
Tiabendazol. Benzimidazol que ha sido aplicado desde los 70s en papas para controlar una variedad de enfermedades causadas por *Helminthosporium solani*, *Polyscytalum pustulans*, *Phoma foveata* y *Fusarium* spp. (Carnegie *et al.*, 2008). Muestra actividad antifúngica fuerte contra *Rhizoctonia solani* (Kataria y Grover, 1978).

Quintozeno. Es un organoclorado usado para el tratamiento de semillas y aplicación al suelo controlando un amplio rango de enfermedades. En las últimas décadas ha sido utilizado ampliamente contra *Rhizoctonia*, teniendo alta efectividad, sin embargo es bastante variable entre aislamientos y regiones geográficas (Kataria y Gisi, 1995). Además, está reconocido como posible sustancia causante de cáncer, clasificado por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, como clase III (Tas y Pavlostathis, 2010).



Thiram. Fungicida no sistémico utilizado para prevenir el daño de cultivos en el campo y los productos cosechados almacenados o transportados. También utilizado para tratamientos de semilla de una amplia gama de cultivos. Es suficientemente móvil y persistente, y en algunos casos puede alcanzar las aguas superficiales en concentraciones suficientemente altas para impactar la vida acuática (Environmental Protection Agency, 2004). Es tóxico para *Rhizobium*, por lo tanto cuando se aplica a la semilla de frijol, reduce la nodulación (Kataria y Gisi, 1995).

Durante los últimos 10 a 15 años, el tratamiento de semillas ha crecido rápidamente, como parte de una tendencia amplia en la agricultura que hace hincapié en el valor de la semilla; por lo tanto, muchos tratamientos de semillas con fungicidas han sido adoptados, debido a nuevos ingredientes muchos más eficaces y el desarrollo y disponibilidad de equipos de aplicación (Munkvold, 2009).

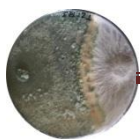


CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS PATÓGENOS CAUSANTES DE LA PUDRICIÓN RADICULAR DEL FRIJOL EJOTERO (*Phaseolus vulgaris* L.) Y CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma*

1.1 INTRODUCCIÓN

El frijol ejotero (*Phaseolus vulgaris* L.) es considerado una hortaliza de importancia mundial por sus características nutraceuticas, debido a que posee carbohidratos, proteínas, calcio, grasas, fibra y cenizas (Salinas, 2010). En México, el consumo *per cápita* es de 0.80 kg., y los principales estados productores en el 2012 fueron Sinaloa, Morelos, Puebla e Hidalgo; con una producción anual nacional de 93,818 t y valor de producción de \$ 555.7 millones de pesos (SAGARPA, 2012); siendo en el estado de Morelos uno de los cultivos más importantes como alternativa de producción en el ciclo otoño invierno, de la cual la mayoría es destinada para la exportación (INIFAP, 2002).

Por otra parte, las enfermedades de las plantas son importantes para el hombre debido a que perjudican las plantas y sus productos (Montesinos *et. al.*, 2007). La detección e identificación precisa es una de las más importantes estrategias para controlar las enfermedades de las plantas con medidas preventivas o curativas (Capote *et al.*, 2012). El diagnóstico es una forma de prueba de hipótesis, donde la hipótesis es simplemente la identificación de la enfermedad, y un buen diagnosticador pasa por múltiples iteraciones del método científico; entonces pueden ser necesarias extensas pruebas para determinar la identificación del patógeno de la planta (Riley *et al.*, 2002). La identificación a nivel especie o cepa es frecuentemente esencial para implementar una estrategia de manejo, debido a que diferentes genotipos/variedades moleculares pueden también existir dentro de especies y pueden tener diferentes perfiles patogénicos y niveles de virulencia hacia el hospedante (Tsui *et al.*, 2011). El diagnóstico



molecular ofrece alternativas más precisas para determinar la enfermedad, con las ventajas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en ingles), secuenciación de ADN económica, y un banco de datos relativamente amplio de secuencias de ADN ribosomal, es ahora posible caracterizar e identificar más objetivamente las especies de hongos (Harrington *et al.*, 2000). La incorporación de estas nuevas herramientas en los sistemas de manejo de las enfermedades de las plantas son un reto, sin embargo, los beneficios a través de un uso eficiente de los fungicidas podrían ser considerables (McCartney *et al.*, 2003).

En las principales regiones productoras del estado de Morelos, uno de los mayores problemas que afecta la producción de frijol ejotero en etapa de plántula, es la pudrición radicular causada por hongos (damping off), trayendo como consecuencia pérdidas económicas considerables. Por las consideraciones anteriores se decidió llevar a cabo el diagnóstico preciso de la enfermedad, para posteriormente implementar estrategias de manejo eficaces.

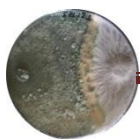
1.2 OBJETIVOS

Debido a que no se ha realizado un diagnóstico y manejo eficiente de la pudrición radicular del frijol ejotero en las principales regiones productoras del estado de Morelos, se llevó a cabo la presente investigación, planteando los siguientes objetivos:

- ❖ Realizar el diagnóstico de los patógenos causantes de la pudrición radicular del frijol ejotero, mediante la identificación morfológica y molecular
- ❖ Aislar e identificar molecularmente cepas nativas de *Trichoderma* de varios cultivos

1.3 MATERIALES Y MÉTODOS

1.3.1 Área de muestreo, material vegetal e incidencia



En febrero de 2014, se realizó un muestreo sistemático en “W” de plantas de frijol ejotero (*Phaseolus vulgaris* L.) con síntomas de pudrición radicular (Figura 3) en dos predios, uno de 14 has bajo condiciones de riego por goteo, ubicado en Telixtac, municipio de Axochiapan, Mor., entre los paralelos geográficos 18° 34' 15.07" N y 98° 46' 28.98" W a 1,100 msnm, y el segundo en un predio de Tepalcingo, Mor., entre los paralelos 18° 36' 41.07" N y 98° 50' 21.65" S a una altitud de 1,189 msnm (Figura 4) (Google Earth, 2015). Ambos lugares de muestreo se caracterizan por tener un clima cálido $Aw_0(w)$, con temperatura media anual entre 22 y 26 °C, temperatura media del mes más caliente mayor de 18 °C, las lluvias son de verano (de mayo a octubre), con invierno seco (menos del 5% de la precipitación total anual) (García, 2004). El tipo de suelo en los terrenos agrícolas en Telixtac es una combinación edáfica de regosol éutrico - vertisol pélico con textura media, mientras que en Tepalcingo es vertisol-pélico, con textura fina y fase pedregosa (Guerrero, 1993). Se calculó la incidencia de la enfermedad muestreando 100 plantas al azar.



Figura 3. Síntomas de pudrición radicular en el estado de Morelos

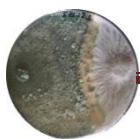
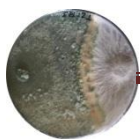


Figura 4. Localización de los lugares de muestreo

1.3.2 Aislamiento de plantas con síntomas

De las plántulas recolectadas en los predios, se hicieron cortes de raíz y cuello del tallo de 1 cm, los cuales presentaban parte sana y enferma, se lavaron con agua de la llave y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2.5% durante 2 minutos; posteriormente se lavaron los trozos con agua destilada esterilizada durante 3 minutos y se secaron en papel esterilizado. A continuación, se sembraron cuatro trozos por caja Petri con papa-dextrosa-agar (PDA), y se incubaron a 24 °C durante 7 días. Se cuantificó la frecuencia de aislamiento con la siguiente ecuación:

$$FA = \left(\frac{\# \text{ muestras conteniendo un hongo en particular}}{\text{Total de muestras}} \right) (100)$$



Por último se procedió a purificar los hongos fitopatógenos reaislando en cajas Petri individuales, y posteriormente por medio de punta de hifa y monoconidial.

1.3.3 Aislamiento a partir de semillas

Se utilizó la técnica en placa Petri con medio de cultivo, de acuerdo con Dhingra y Sinclair (1985) e ISTA (2014). Se desinfestaron 100 semillas con hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min (Mahmoud *et al.*, 2013), y se pusieron 10 semillas por cada placa Petri con medio PDA. Se incubaron durante 7 días a $\pm 24\text{ C}^\circ$ a 12 horas luz y oscuridad.

La frecuencia de aislamiento (FA) y la abundancia relativa (AR) fueron calculados con las siguientes ecuaciones (Pathak y Zaidi, 2013):

$$FA = \left(\frac{\# \text{ semillas conteniendo un hongo en particular}}{\text{Total de semillas utilizadas}} \right) (100)$$

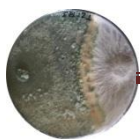
$$AR = \left(\frac{\text{Total de número colonias de un hongo sobre la semilla}}{\text{Total de número de colonias de todos los hongos}} \right) (100)$$

1.3.4 Identificación morfológica

De los cultivos puros obtenidos, se realizaron preparaciones en lactofenol y se observaron al microscopio compuesto; para la identificación de especies se utilizaron las claves taxonómicas de Sneh *et al.* (1996), Watanabe (2002) y Leslie y Summerell (2006).

1.3.5 Prueba de patogenicidad

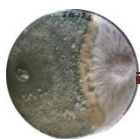
Se llevó a cabo la prueba de patogenicidad en vasos de poliestireno en condiciones de invernadero, utilizando un suelo en una proporción 1:1.5 v/v peat moss-limo, previamente esterilizado en autoclave durante 30 min a 15 lb pulg^{-2} .



De un muestreo previamente realizado en Axochiapan, Mor., en una parcela comercial de frijol ejotero, se obtuvieron dos aislamientos monoconidiales de *Fusarium* spp. (Leslie y Summerell, 2006), y dos cultivos por medio de punta de hifa, de *Rhizoctonia* sp. y *Sclerotium* sp. Los patógenos se sembraron en medio papa-dextrosa-agar (PDA) (Singleton *et al.*, 1992). Todos los patógenos fueron previamente identificados morfológicamente. Los aislamientos antes mencionados se cultivaron y se incrementaron para realizar la inoculación como se menciona a continuación:

***Fusarium* spp.** Se utilizaron granos de avena con glumas y lemmas, en un contenedor de 2 L, se añadió aproximadamente 500 mL de avena y después se agregó agua de la llave aproximadamente a 1 L de capacidad. Se mezcló bien para liberar las burbujas de aire y humedecer totalmente la mezcla. Se puso el contenedor a 5 C° durante 24 h, para lixiviar los compuestos fenólicos. Después de que la lixiviación se completó, se invirtió el contenedor en un escurridor para drenar el agua. Después de 5 a 10 min, se envolvió la avena con gasas y exprimó hasta que no se pudo liberar más agua. La avena ya drenada se distribuyó en matraces Erlenmeyer, los cuales fueron llenados hasta una profundidad de 5 cm. Los recipientes se sellaron con un tapón grande de algodón y se llevaron al autoclave durante 60 min en dos días sucesivos. Los contenedores fueron inoculados con discos de 1 cm de diámetro de PDA con micelio, a razón de 15 discos por 250 mL de avena. El material inoculado se agitó vigorosamente para obtener una buena distribución del inóculo. Se incubó por 14 días (Leslie y Summerell, 2006; Bateman, 2005).

***Rhizoctonia* sp.** En matraces de 500 mL se colocaron 250 cm³ de granos de avena sanos más 150 mL de agua destilada, y se dejó reposar por 24 h a 4 C°. Posteriormente, se esterilizó en autoclave por 2 h (en dos periodos de 1 h, con un tiempo de reposo de 3 h entre ambos



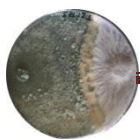
periodos de esterilización). Finalmente el grano se inoculó con el aislamiento de *Rhizoctonia* creciendo en PDA, y enseguida se incubó durante tres semanas a temperatura ambiente 23 ± 2 °C (Sneh *et al.*, 1991).

***Sclerotium* sp.** Se preparó inóculo en avena por imbibición de semillas de avena con glumas y lemmas, en agua a congelación durante la noche, y luego se llevó al autoclave durante 120 min en cada uno de los dos días sucesivos (dos veces en periodos de 60 min). Posteriormente, la semilla fue distribuida en matraces Erlenmeyer y se inoculó con *Sclerotium* creciendo en PDA de 3 días de edad. El micelio se dejó crecer durante 3 semanas en condiciones de laboratorio (25 C°) (Shokes *et al.*, 1996).

1.3.5.1 Inoculación con los hongos fitopatógenos

En cuanto a *Fusarium*, plantas de 10 días después de sembradas (etapa V2) en germinadores de poliestireno, se extrajeron y se lavaron con agua de la llave, se cortaron las puntas de las raíces secundarias (1 cm aproximadamente) con la ayuda de unas tijeras esterilizadas, para promover la infección, posteriormente se sumergieron durante 5 min en una suspensión de 1×10^6 conidios mL^{-1} (Pastor-Corrales y Abawi, 1987; Salgado y Schwartz, 1993). Las plantas inoculadas fueron trasplantadas en vasos de poliestireno conteniendo peat moss/suelo (1:3 v/v).

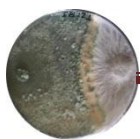
Para *Rhizoctonia* y *Sclerotium*, se mezcló el inóculo con el sustrato (peat moss/suelo, 1:3 v/v) a una proporción del 2% (p/p), posteriormente las plántulas de 10 días de sembradas en charolas de poliestireno, se trasplantaron en vasos del mismo material. Se mantuvo la humedad regando cada tercer día. Posteriormente, se monitoreó hasta observar los síntomas correspondientes a cada hongo fitopatógeno.



1.3.6 Identificación molecular de los fitopatógenos

1.3.6.1 Extracción y purificación de DNA

La extracción de ADN se llevó a cabo por el método Multisource según el fabricante (Axygen Biosciences, 2015). Se colocaron de 5 a 50 mg de micelio en un mortero y posteriormente se pulverizó con la mano de mortero. Se añadieron 350 μ L de PBS y 0.9 μ L de RNasa A. Se molió suavemente por 30 s para homogenizar el PBS con el micelio. Se transfirió el micelio homogenizado a un tubo de microcentrífuga de 2 mL. Se añadieron 20 μ L de Proteinasa K y 150 μ L de Buffer C-L. Se mezcló inmediatamente por vortex durante 1 min. Se incubó a 56 °C durante 15 min. Se centrifugó brevemente para eliminar las gotas del interior de la tapa. Se añadieron 350 μ L de Buffer P-D a la muestra y se mezcló por vortex a máxima velocidad por 30 s. Se centrifugó por 10 min a $12,000 \times g$ a temperatura ambiente para peletizar los residuos celulares. Posteriormente se colocó una columna de Miniprep en un tubo de microcentrífuga. Se pipeteó el sobrenadante clarificado obtenido en el paso anterior en la columna de Miniprep y se centrifugó a $12,000 \times g$ durante 1 min. Se desechó el filtrado del tubo de microcentrífuga. Se colocó otra vez la columna Miniprep en el tubo de microcentrífuga de 2 mL y se pipeteó 500 μ L de Buffer W1 a la columna de Miniprep y se centrifugó por 1 min a $12,000 \times g$. Se descartó el filtrado y se colocó otra vez la columna Miniprep en el tubo de microcentrífuga. Se añadieron 500 μ L de Buffer W2 y se centrifugó por 1 min a $12,000 \times g$. Se desechó el filtrado del tubo de microcentrífuga y se repitió este paso de lavado con una alícuota de 700 μ L de Buffer W2. Se desechó el filtrado del tubo de microcentrífuga de 2 mL. Se colocó la columna Miniprep de vuelta en el tubo de microcentrífuga de 2 mL y se centrifugó a $12,000 \times g$ por 1 min. Se transfirió la columna Miniprep en un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Para



la elución del ADN genómico, se añadieron 50 μ L de eluyente en el centro de la membrana. Se deja por 1 min a temperatura ambiente y se centrifuga a $12,000 \times g$ por 1 min.

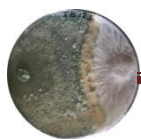
1.3.6.2 PCR y secuenciación

Las reacciones de PCR se realizaron con los oligos ITS-1fu 5'-tccgtaggatgaacctgcgg-3' y el ITS-4 5'-tcctccgcttattgatatgc-3' (White *et al.*, 1990), con una mezcla de reactivos en un volumen final de 25 μ L, cuyos componentes fueron: amortiguador de reacción 1X, $MgCl_2$ 2 mM, dNTP's 200 nM de cada uno, 20 pmoles de cada oligonucleótido y 1 unidad de *Taq* DNA polimerasa (Promega^{MR}). El programa térmico consistió en mantener una temperatura de 94°C durante 2 min, seguido de 35 ciclos a 94-55-72 °C durante 20-25-50 s respectivamente, y una extensión final de 4 min a 72 °C. Los fragmentos amplificados por PCR fueron secuenciados directamente. Las secuencias se editaron con el software BioEdit 7.2.5 (Tom Hall Ibis Biosciences) (Hall, 2004), se creó la secuencia consenso utilizando la opción CAP (Contig Assembly Program) y se compararon los resultados con las secuencias disponibles en el banco de genes (Gen Bank) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

1.3.7 Obtención de cepas nativas de *Trichoderma*

1.3.7.1 Muestreo de suelo

En varios lugares y cultivos (Cuadro 1) se obtuvieron cinco muestras de 1 kg de suelo con el método de muestreo “cinco de oros”, las cuales se mezclaron y homogeneizaron para tomar una muestra representativa de 1 kg (Arzate, 2006). En cada sitio de muestreo, se eliminó la materia orgánica superficial y los primeros 10 cm de suelo, y se colectó suelo a una profundidad de 20 cm (Michel *et al.*, 2001), se transportó en bolsas de polietileno al laboratorio de Posgrado en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad



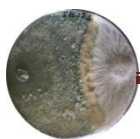
Autónoma Chapingo, en donde se mantuvieron en refrigeración a 4 °C, hasta el momento de su procesamiento.

Cuadro 1. Cultivos y localización geográfica de lugares de muestreo

Lugar	Localización geográfica	Cultivo	Cultivo anterior
Axochiapan, Mor.	18° 34' 15" N 98° 46' 28" W	Frijol ejotero	Cebolla
Acámbaro, Gto.	-----	Trigo	Maíz
San Cristóbal, Chis.	16° 40' 38" N 92° 42' 0" S	Frijol negro	Maíz
Teapa, Tab.	17° 30' 21" N 92° 54' 30" O	Cacao	Cacao
Edo. De México	-----	Esparrago	-----
Los Mochis, Sinaloa	-----	Jitomate	Jitomate

1.3.7.2 Aislamiento e identificación morfológica de *Trichoderma* spp.

Los aislados de *Trichoderma* spp. se obtuvieron mediante el método de dilución en placa (Nelson *et al.*, 1983). De la muestra compuesta, se utilizó 1 g de suelo diluido en 10 mL (proporción 1/10 p/v) de agua destilada estéril hasta obtener diluciones 1/100 y 1/1000, de las cuales se tomaron alícuotas de 0.5 mL y se distribuyeron homogéneamente sobre la superficie de placas con medio de cultivo V8-agar acidificado [(200 mL de jugo V8, 25 g de agar (Difco Laboratories, Detroi, MI) en 1,000 mL de agua destilada y 1 mL de ácido láctico adicionado antes de vaciar] (Michel *et al.*, 2001) y PDA, se incubaron a temperatura de laboratorio hasta que se observó el desarrollo de colonias fungosas (Guigón y González, 2004). Las colonias de *Trichoderma* spp. se reconocieron por su forma de crecimiento al formar anillos concéntricos de conidios. Para identificarlas morfológicamente se utilizaron las claves propuestas por Bissett (1984, 1991a, 1991b) y Samuels *et al.*, (2015).

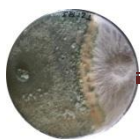


1.3.7.3 Identificación molecular

1.3.7.3.1 Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó a partir de micelio de 3 cajas Petri con cepas de *Trichoderma* aisladas de diferente origen geográfico, y crecidas en medio PDA, para unas cepas se utilizó el estuche DNeasy Plant Mini Kit siguiendo las instrucciones del fabricante (QIAGEN, 2012) para las cepas CHI1, SIN2, GTO, y para las restantes, TB2, MOR4, SIN3, MOR2, CHI2, por el método de CTAB 2% con ligeras modificaciones (Doyle y Doyle, 1990).

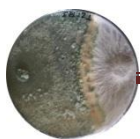
Kit de QIAGEN®. Se maceró de 5 a 50 mg de micelio usando Tissue Ruptor®. Se añadieron 400 µL de buffer AP1 y 4 µL de RNasa A. Se dio una agitación con vortex y se incubó por 10 min a 65 °C. Se invirtió el tubo 2-3 veces durante la incubación. Se colocaron 130 µL de buffer P3 y se mezcló e incubó por 5 min en hielo. Se centrifugó el lisado a 20,000 × g por 5 min. Se pipeteó el lisado en la columna giratoria trituradora QIA, puesto en un tubo de 2 mL y se centrifugó por 2 min a 20,000 × g. Se transfirió el flujo a un nuevo tubo sin perturbar el sedimento. Se añadieron 1.5 volúmenes de buffer AW1, y se mezcló por pipeteo. Posteriormente se transfirieron 650 µL de la mezcla en una columna giratoria DNeasy Mini puesto en un tubo colector de 2 mL. Se centrifugó por 1 min a 6,000 × g y se descartó el sobrenadante. Se colocó la columna giratoria en un nuevo tubo colector de 2 mL. Se añadieron 500 µL de buffer AW2, se centrifugó por 1 min a 6,000 × g y se desechó el sobrenadante. Se añadieron otros 500 µL de buffer AW2 y se centrifugó por 2 min a 20,000 × g. Después se removió la columna giratoria del tubo, cuidadosamente, de modo que la columna no estuviera en contacto con el sobrenadante, y se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga de 2 mL. Por último, se añadieron 100 µL de buffer AE para la elución. Se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 6,000 × g. Se repitió el último paso.



Método CTAB 2%. Se precalentó el CTAB 2% en baño maría, posteriormente se agregó 1 mL de CTAB en un tubo Eppendorf de 2 mL y se agregó micelio con una punta de micropipeta. Se incubó a baño María a 96 °C por 60 min y se mezcló a intervalos de 10 min. Se centrifugó a $11,500 \times g$ por 5 min y se pasó el sobrenadante a tubos de 2 mL nuevos. Se agregó 500 μ L de cloroformo-alcohol isoamilico (24:1) y se agitó por inversión 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a $11,500 \times g$ durante 10 min. Se extrajo la fase acuosa y se colocó en tubos nuevos de 2 mL. Se agregaron 700 μ L de cloroformo-alcohol isoamilico (24:1), se agitó por inversión durante 10 min y se centrifugó a $11,500 \times g$ por 10 min. Se transfirió la fase acuosa a tubos nuevos de 1.5 mL con 950 μ L de etanol al 100% previamente enfriados a -20 °C, se mezcló muy suavemente por inversión por al menos 10 veces. Se incubó por 2 h a -20 °C. Se centrifugó a $11,500 \times g$ durante 30 min y decantó evitando perder la pastilla. Posteriormente, se resuspendió la pastilla en 400 μ L de agua HPLC e incubó a 55 °C por 15 min. Se añadieron 34 μ L de NaOAc 3M y 1 mL de etanol 95% e incubó a -20 °C por 1 h. Se lavó con 600 μ L de isopropanol 70% y centrifugó por 10 min a $11,500 \times g$. Se secó por 30 min. Pasado este tiempo, se resuspendió la pastilla en 50 μ L de agua HPLC e incubó a 80 °C por 10 min. Se extrajo solo la parte superior del ADN dejando 10-20 μ L de sobrenadante. Por último, se dio un spin, se cuantificó por espectrofotometría y se almacenó a -20 °C.

1.3.7.3.2 Amplificación por PCR y secuenciación

Se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) universales para hongos, para las cepas CHI1, SIN2 y GTO se utilizaron los oligos ITS-1fu (5'-tccgtaggtgaacctgcgg-3') y el ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990), los cuales amplifican dos espaciadores internos transcritos (ITS) y el gen 5.8S del ARN ribosomal; además del gen que codifica para el factor de elongación (*tef1*) utilizando los oligos EF-1/EF-2 cuyas secuencias

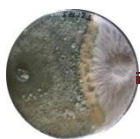


son: 5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3' y 5'-GGARGTAACAGTSATCATGTT-3', respectivamente (O'Donnell *et al.*, 1998). Para el resto de las cepas se utilizaron los oligos ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). El programa del termociclador para amplificación de la región ITS, se llevó a cabo como se mencionó anteriormente; mientras que para el factor de elongación se siguió el programa 95°C durante 2 min, seguido de 35 ciclos a 94-50-72 °C durante 45-45-60 s respectivamente, y una extensión final de 4 min a 72 °C. Los productos de las reacciones de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa a 1.5% y las bandas se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta marca UVP. Los fragmentos amplificados por PCR fueron secuenciados directamente. Se ensamblaron las secuencias consenso y se editaron con la opción CAP (Contig Assembly Program) del Software BioEdit 7.2.5 (Tom Hall Ibis Biosciences) (Hall, 2004) y se compararon con secuencias disponibles en el GenBank del NCBI.

1.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.4.1 Identificación morfológica de hongos fitopatógenos aislados de plantas

Las colonias aisladas de las raíces y tallos de plantas de frijol ejotero, mostraron características diferentes en cuanto a pigmentación y crecimiento micelial; se obtuvieron colonias cafés, rosada-purpuras y blancas algodonosas (Figura 5). La identificación se logró hasta nivel especie para *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*, mientras que solo se logró a nivel género para *Fusarium* spp. En el predio Tepalcingo se encontró una alta incidencia de pudrición radicular (92 %); y en ambos predios se encontró una alta frecuencia de *S. rolfsii*, seguido de las cepas de *Fusarium* (Cuadro 2). Sin embargo, ha sido demostrado que la frecuencia de



aislamiento de hongos que afectan la raíz en frijol, varía por región y ciclo de cultivo (Rusuku *et al.*, 1997).

Cuadro 2. Incidencia y frecuencia de aislamientos de hongos fitopatógenos en los predios muestreados.

Predio	Superficie (Ha)	Incidencia (%)	<i>S. rolfsii</i>	<i>R. solani</i>	<i>Fusarium</i> spp.
Telixtac, Mor.	14	66	31	20	18
Tepalcingo, Mor.	4	92	44	5	30

1.4.1.1 *Rhizoctonia solani*

Se aisló un hongo que mostró las características fenotípicas siguientes: colonias con pigmentación café claro, micelio color café oscuro, hifas gruesas con ramificaciones en ángulo recto, constricción en el punto de origen de la ramificación, formación de una septa cercana al origen de la rama y un septo típico dolíporo. También presentó células monilioides, y algunas veces agregados de micelio formando esclerocios en medio de cultivo PDA (Figura 6); estas características coinciden con las citadas para *R. solani* por Sneh (1996), y Watanabe (2002).

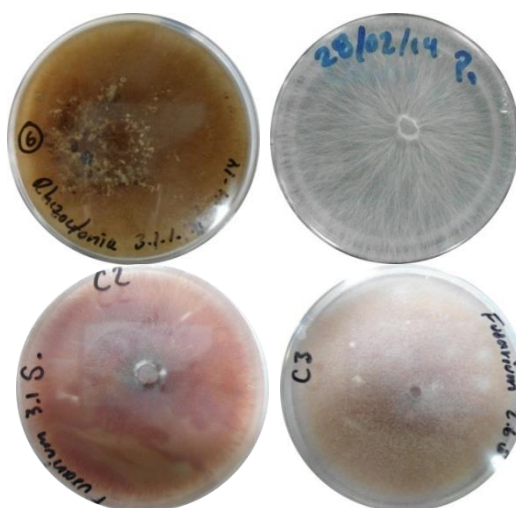


Figura 5. Hongos aislados del hipocotilo y raíz de plantas de frijol con síntomas de pudrición.

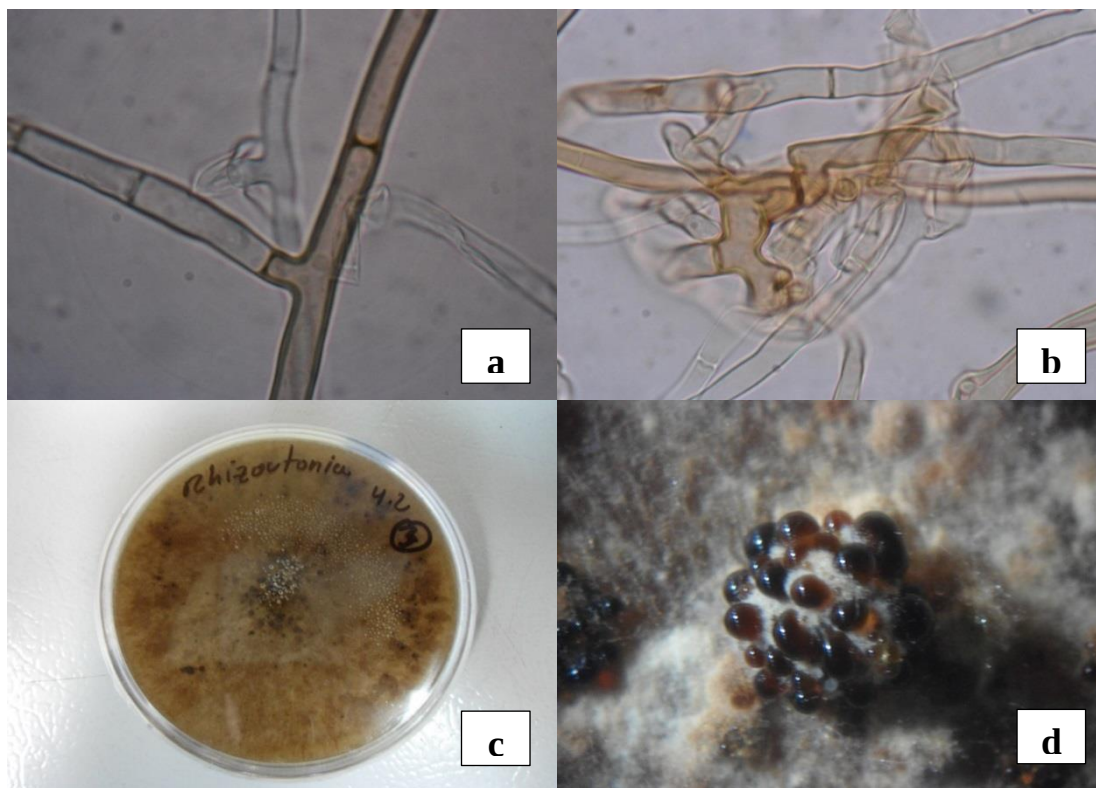
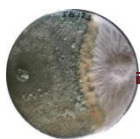


Figura 6. *Rhizoctonia solani*. **a**, micelio en ángulo recto; **b**, células monilioides; **c**, cultivo en PDA; **d**, formación de esclerocio.

1.4.1.2 *Sclerotium rolfsii*

Este hongo mostró características muy distintivas en medio de cultivo PDA, produciendo micelio aéreo blanco y formación de abundantes esclerocios color café claro, con una longitud de 1.0-1.5 mm de diámetro. El crecimiento micelial fue rápido. Se observaron hifas hialinas, con pared celular delgada, formación de septaciones y diversidad de ramificaciones. Los esclerocios globosos o subglobosos, superficie lisa, lustrosos, compactos (Figura 7).

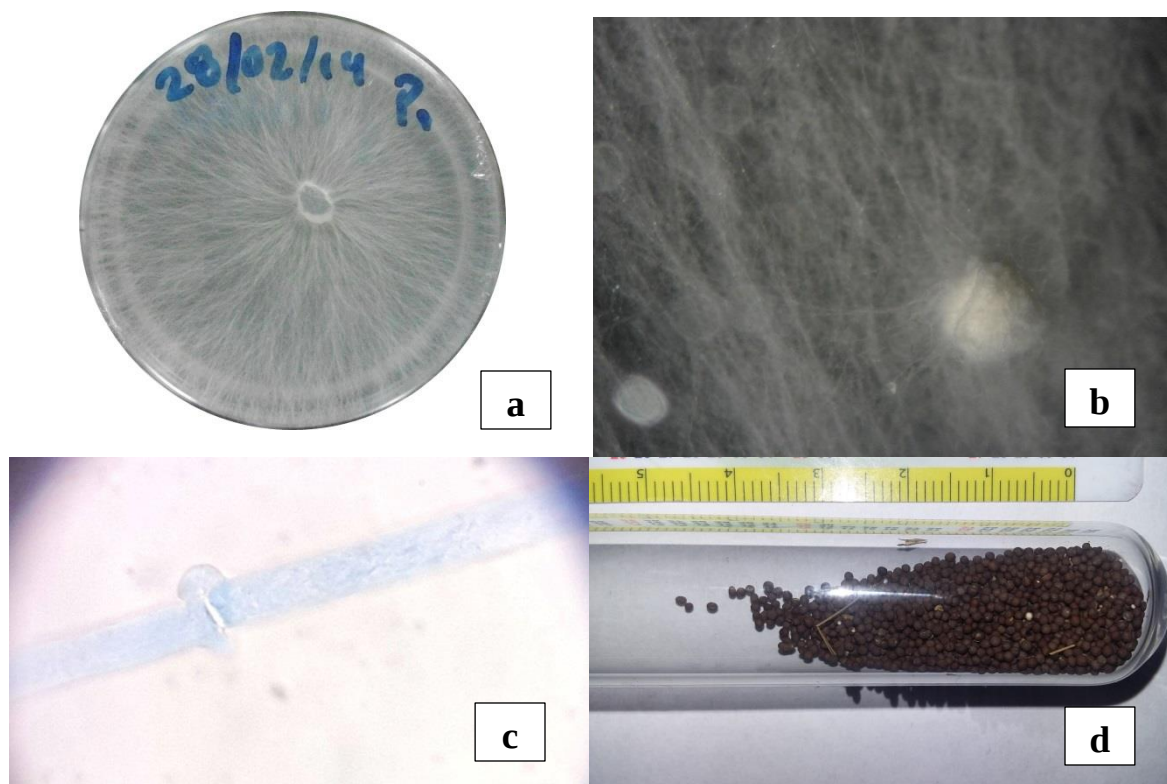
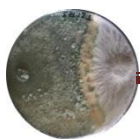


Figura 7. *Sclerotium rolfsii*. **a**, cultivo en PDA; **b**, formación de esclerocio; **c**, fíbula; **d**, esclerocios.

1.4.1.3 *Fusarium* spp.

Las cepas mostraron una tasa de crecimiento lenta, color rosado-purpura, las cuales formaron microconidios abundantes, con dos septos, hialinos y elípticos. Los macroconidios presentan de tres a seis septos, ligeramente curvados, delgadas paredes celulares. Alta producción de microconidios en medio PDA, en condiciones de laboratorio (25 ± 3 °C) (Figura 8). Esto concuerda con Barnett y Hunter (1998) y Leslie y Summerell (2002).

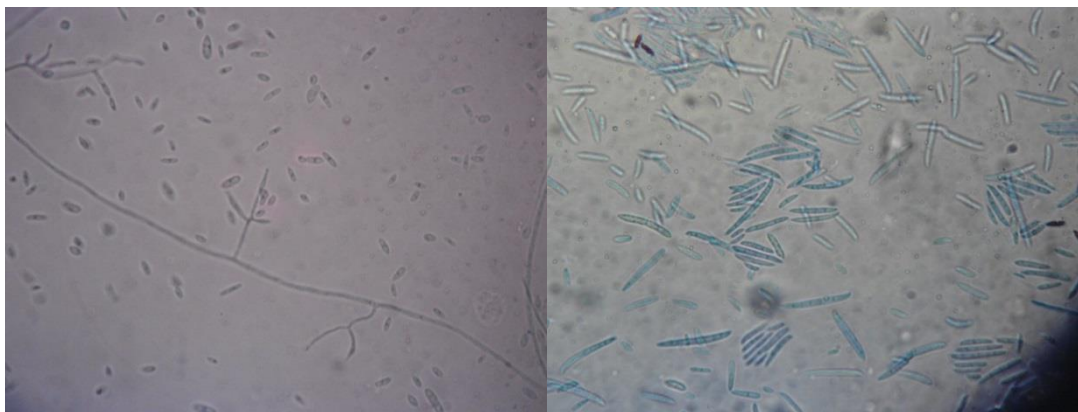
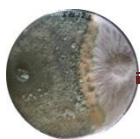
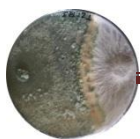


Figura 8. Microconidios y macroconidios de *Fusarium* spp.

1.4.2 Identificación morfológica de hongos aislados de semilla

Alrededor del 90% de los cultivos para alimento son sembrados utilizando semillas, los cuales son atacados por patógenos, que son en su mayoría transmitidos por la semilla. Las semillas que presentan patógenos reducen el vigor y potencial germinativo, produciendo desarrollo de enfermedades después de la germinación, decoloración, cambios bioquímicos y, por lo tanto, reducción del rendimiento (Agarwal y Sinclair, 1996).

En la presente investigación, los hongos aislados de semillas de frijol ejotero variedad ‘Strike’, correspondieron al género *Aspergillus* (Figura 9 y 10), los cuales no fueron de importancia patogénica en el cultivo, además, en el ensayo con semillas tratadas con Cruiser Maxx Beans® (fludioxonil + metalaxil-M + tiametoxam) las frecuencias de aislamiento fueron muy bajas (Cuadro 3). Se ha reportado en diversos cultivos la transmisión por semilla de *Rhizoctonia* (Sivalingam *et al.*, 2006) y *Fusarium* spp. (Mbofung y Pryor, 2010; Sousa *et al.*, 2015), especies presentes en la mayoría de las enfermedades de raíz; además, se han reportado hongos productores de micotoxinas que se transmiten por semilla en frijol (Costa y Scussel,



2002; Domijan *et al.*, 2005), lo cual tiene relevancia cuando las semillas son para consumo humano y animal.

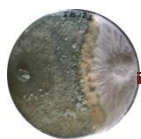
También se encontró en baja frecuencia de aislamiento el género *Cheatomium* sp. (7 %) (Figura 10), lo cual podría ser benéfico para el cultivo debido a que ha sido demostrado que posee efectividad como agente de biocontrol contra *Fusarium*, *S. rolfsii*, *Phytophthora*, *R. solani* y *Colletotrichum capsici* (Soytong *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2005; Tomilova y Shternshis, 2006), debido a la alta capacidad de competencia por nutrientes, antibiosis y enzimas (Aggarwal, 2015).



Figura 9. Prueba de hongos en semillas de frijol ejotero variedad "Strike".



Figura 10. Hongos encontrados en semillas de frijol ejotero variedad "Strike". **a, b**, conidióforo y conidios de *Aspergillus* sp.; **c**, ascosporas de *Chaetomium* sp.



Cuadro 3. Frecuencia de asilamiento (FA) y abundancia relativa (AR) de los hongos presentes en las semillas de frijol ejotero variedad “Strike”.

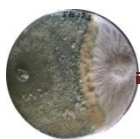
HONGO	NO TRATADA		TRATADA	
	FA (%)	AR (%)	FA (%)	AR (%)
<i>Aspergillus</i> spp.	32	84.21	0	0
<i>Chaetomium</i> sp.	7	15.79	0	0

1.4.3 Prueba de patogenicidad

A los 4 días después de la inoculación de *R. solani*, se observaron síntomas severos en la planta (Figura 11), los cuales son una pudrición acuosa superficial del hipocotilo de las plantas, además de coloración rojiza; mientras que *S. rolfsii* fue a los 6 días después de la inoculación, en las cuales las lesiones son más profundas (Figura 12). Para el caso de los aislamientos de *Fusarium*, no resultaron ser patogénicas, tomando como base la evaluación a los 25 días después de la inoculación, pudiendo ser endófitas. Se han encontrado diversidad de aislamientos de *F. oxysporum* endófitos no patogénicos en hipocotilos y raíces de frijol (Alves-Santos *et al.*, 1999; Dhingra *et al.*, 2006); los cuales también poseen potencial antagónico contra la misma especie pero patogénica (Postma y Rattink, 1992; Shishido *et al.*, 2005), debido a que induce resistencia sistémica y/o compite por nutrientes con las especies patógenas (Larkin y Fravel, 1999), aunque se ha demostrado que puede haber transferencia horizontal de cromosomas entre cepas de *F. oxysporum*, convirtiéndose de una cepa no patogénica a patogénica (Ma *et al.*, 2010).

1.4.4 Identificación molecular de hongos fitopatógenos

Se logró la amplificación de la región ITS del DNA ribosomal de los hongos fitopatógenos que se encontraron con mayor frecuencia y resultaron altamente patogénicos en las pruebas de



invernadero. Se obtuvieron productos de longitud variable, de 611 y 649 pb, aproximadamente (Figura 13). Las secuencias obtenidas se compararon con las del GenBank para encontrar similitud de especies (Cuadro 4).



Figura 11. Síntomas causados por *R. solani* Kühn en plántulas de frijol.

Cuadro 4. Identificación morfológica y molecular por PCR-ITS de los hongos causantes de la pudrición radicular del frijol ejotero, basada en la comparación de sus secuencias con la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Identificación morfológica	Identificación molecular	Índice de similitud (%)	Secuencia con mayor similitud
<i>R. solani</i>	<i>R. solani</i>	100	JQ616856
<i>S. rolfsii</i>	<i>Athelia rolfsii</i>	100	HQ420816

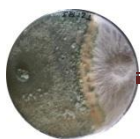


Figura 12. Síntomas causados por *S. rolfsii* Sacc. en plántulas de frijol.

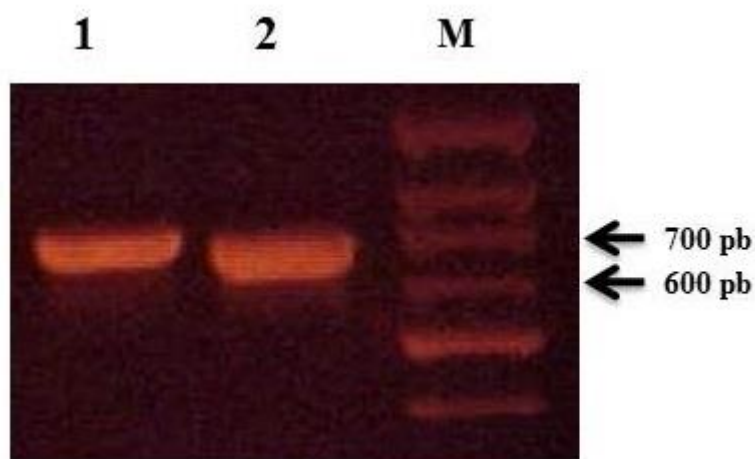
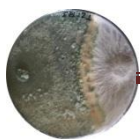


Figura 13. Amplificación por PCR a partir de DNA extraído del micelio de 1. *R. solani* y 2. *S. rolfsii*. Los productos de amplificación obtenidos en los carriles 1 y 2 fueron de 649 y 611 pb respectivamente. M es el marcador de peso molecular 100 bp-Ladder de Axygen.

1.4.5 Identificación de cepas de *Trichoderma*

1.4.5.1 Identificación morfológica

Las colonias aisladas de muestras de suelo recolectadas en varios estados de la república mexicana mostraron características diferentes en cuanto a pigmentación y crecimiento



micelial; se obtuvieron colonias verdes, blanco amarillentas y blanco verdosas (Figura 14); las cuales se identificaron a nivel de especie, tomando en cuenta las características morfológicas de: conidios hialinos, ovoides y unicelulares, desarrollándose en la parte terminal de las filíades (Figura 15) (Bissett, 1984; 1991a; 1991b; Samuels *et al.*, 2015). Se incluye una cepa comercial y la cepa COCULA (*T. asperellum*), identificada y proporcionada por Díaz *et al.*, (2015).

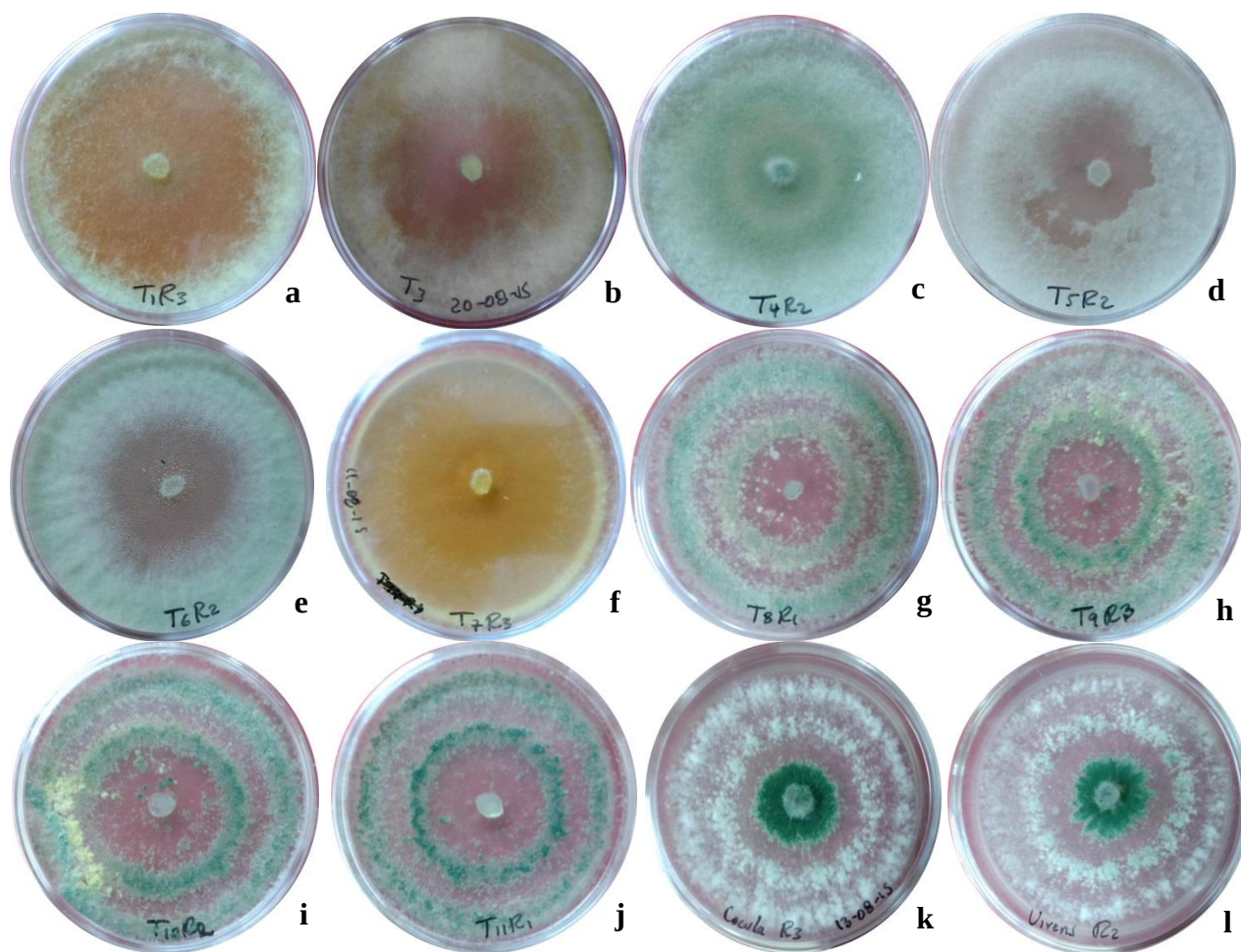


Figura 14. Cepas de *Trichoderma* aisladas de suelo de diferentes lugares y cepa comercial. **a-c, f**, *T. harzianum* (MOR2, MOR4, GTO, CHI2); **d, e**, *T. koningiopsis* (TB2, CHI1); **g, h**, *T. spp.* (ESP, SIN1); **i-k**, *T. asperellum* (SIN2, SIN3, COCULA); **l**, *T. virens* (cepa comercial).

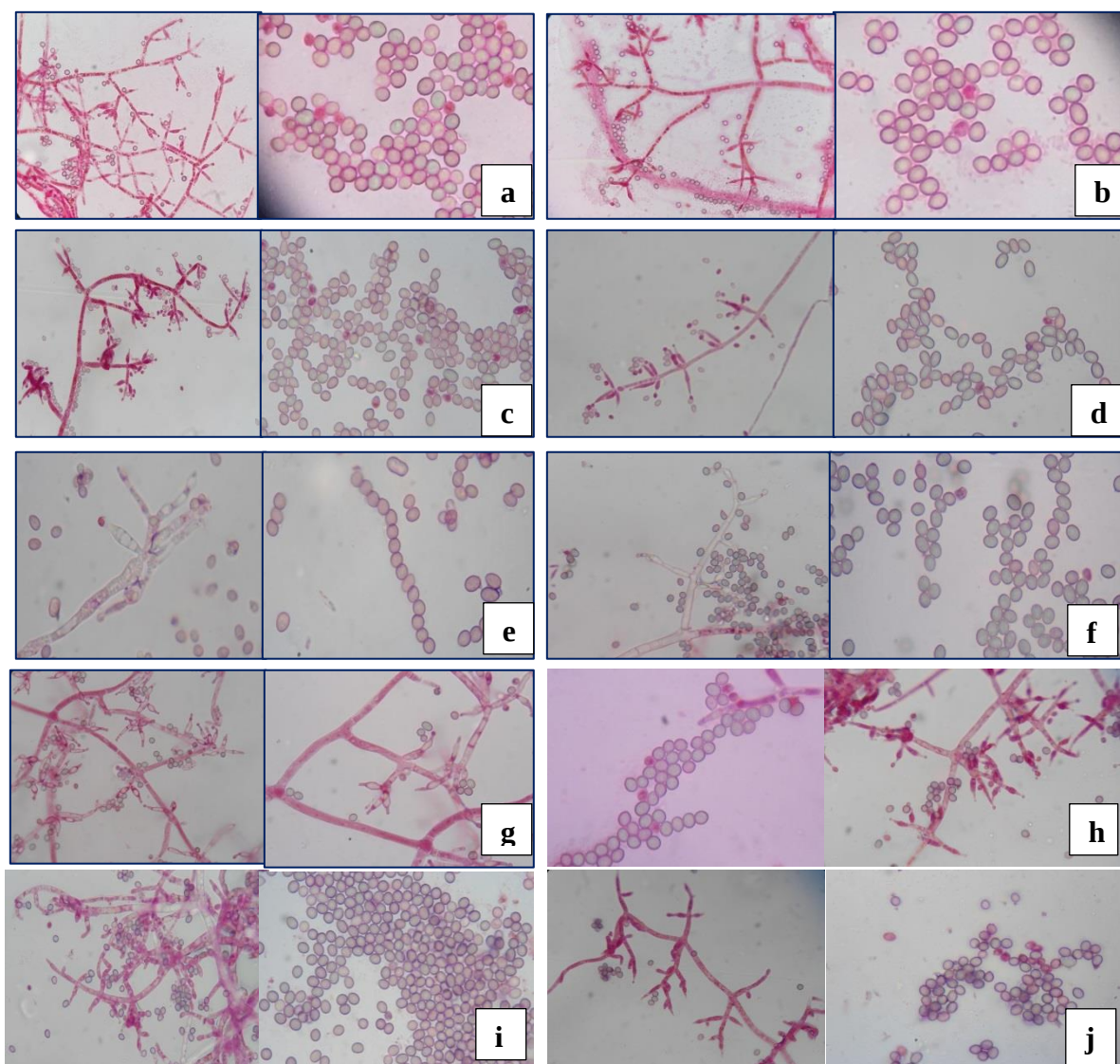


Figura 15. Características morfológicas de las cepas aisladas del suelo. Conidióforos, fiálides y conidios. **a**, MOR2; **b**, MOR4; **c**, GTO; **d**, TB2; **e**, CHI1; **f**, ESP; **g**, SIN1; **h**, COCULA; **i**, SIN2; **j**, SIN3.

1.4.5.2 Identificación molecular

A partir de las amplificaciones con los primers ITS4/ITS5, y EF-1/EF-2 se obtuvieron fragmentos de 600 y 900 pares de bases (bp) aproximadamente para la región ITS y el Factor de elongación, respectivamente (Figura 16). Los resultados del alineamiento BLAST confirmaron que los aislamientos MOR2, MOR4, GTO, CHI2 correspondieron a *T.*



harzianum, TB2 y CHI1 a *T. koningiopsis* y, SIN2 y SIN3 a *T. asperellum*. Los aislamientos ESP y SIN1, se identificaron solamente con métodos morfológicos, resultando *T. asperellum* para ambos (Cuadro 5).

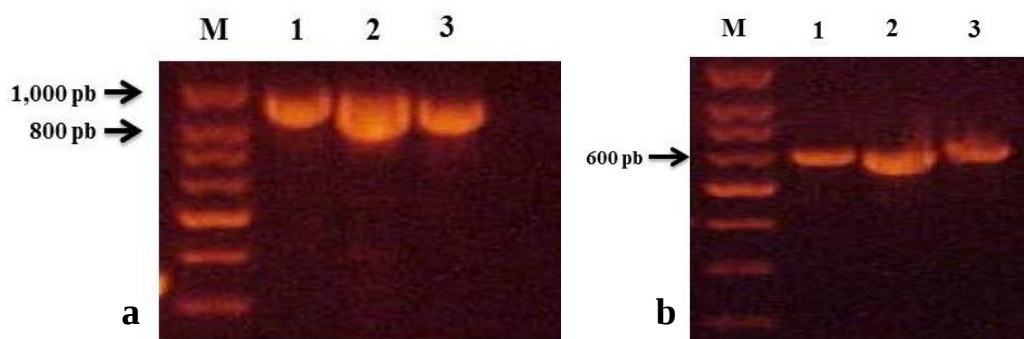
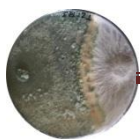


Figura 16. Amplificación por PCR del ADN de micelio de *Trichoderma*. Carril 1, CHI1; carril 2, SIN2; carril 3, GTO. M, marcador de peso molecular 100 bp-Ladder de Axygen. **a**, Factor de elongación (gen *tef1*); **b**, región ITS.

Cuadro 5. Identificación de las cepas de *Trichoderma* aisladas.

Cepa	Procedencia	I. Morfológica	I. Molecular	Comparación con GenBank
MOR2	Morelos	<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i>	KP340282
MOR4	Morelos	<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i>	GU197857
GTO	Guanajuato	<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i> ³	KP340274
TB2	Tabasco	<i>T. sp.</i> ²	<i>T. koningiopsis</i>	HQ608031
CHI1	Chiapas	<i>T. sp.</i> ²	<i>T. koningiopsis</i> ³	KR296904
CHI2	Chiapas	<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i>	KM278037
ESP	Edo. México	<i>T. asperellum</i>	-----	-----
SIN1	Sinaloa	<i>T. asperellum</i>	-----	-----
SIN2	Sinaloa	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperellum</i> ³	KM527926
SIN3	Sinaloa	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperellum</i>	LC075715
COCULA ¹	Guerrero	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperellum</i>	-----

¹Proporcionada por Díaz *et al.*, (2015). ²Identificada a nivel género. ³Misma especie obtenida en el BLAST con la región ITS y Factor de Elongación (gen *tef1*).



1.5 CONCLUSIONES

Los hongos causantes de la pudrición radicular del frijol ejotero fueron *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*, mismos que fueron identificados morfológicamente, y corroborados por PCR y secuenciación. Estas especies indujeron síntomas a los 4 y 6 días después de la inoculación, para *R. solani* y *S. rolfsii*, respectivamente. *R. solani* indujo pudrición acuosa superficial y coloración rojiza del hipocotilo de las plántulas; por su parte, *S. rolfsii* las lesiones acuosas son más profundas. *Fusarium* sp. no produjo síntomas a los 25 días después de la inoculación.

En la semilla comercial de frijol ejotero variedad “Strike” sin tratar con algún fungicida, se encontraron *Aspergillus* sp. y *Chaetomium* sp., hongos sin relevancia fitopatogénica, mientras que en la semilla tratada con Cruiser Maxx Beans (fludioxonil + metalaxyl-M + thiametoxam) no se observó presencia de ningún hongo. En cuanto al agente de biocontrol *Trichoderma*, se aislaron 10 cepas diferentes en suelos de cinco cultivos diferentes, las cuales se identificaron con método morfológicos y moleculares amplificando por PCR y secuenciación, la región ITS y, [en algunas cepas además el factor de elongación (*Tef1*)], resultando cuatro cepas como *T. harzianum*, dos como *T. koningiopsis* y cuatro *T. asperellum*.



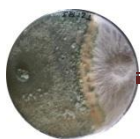
CAPITULO III. POTENCIAL ANTAGÓNICO *in vitro* DE CEPAS DE *Trichoderma* CONTRA *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc., CAUSANTES DE LA PUDRICIÓN RADICULAR DEL FRIJOL EJOTERO

1.1 INTRODUCCIÓN

Trichoderma spp. juega un papel importante como agente de control biológico, debido a su alto potencial como biofungicida (Howell, 2003), bioherbicida (Verma *et al.*, 2007), bionematicida (Affokpon *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2015), inductor de resistencia (Harman *et al.*, 2004) y promotor de crecimiento de las plantas (Verma *et al.*, 2007; Hoyos *et al.*, 2009). La mayoría de las especies producen metabolitos difusibles y volátiles tóxicos con efectos negativos en el crecimiento y desarrollo de hongos fitopatógenos (Qualhato *et al.*, 2013), así como su alto potencial micoparasítico (Brotman *et al.*, 2010).

Está ampliamente demostrado que controla hongos patógenos de la raíz de muchos cultivos, tales como *Rhizoctonia solani* (Anees *et al.*, 2010), *Sclerotium rolfsii* (Elad *et al.*, 1980; Harman, 2000), *Fusarium* spp. (Rojo *et al.*, 2007), y *Pythium* (Naseby *et al.*, 2000; Kamala & Indira, 2011).

Los estudios actuales aseguran la eficiencia de *Trichoderma* como agente de control biológico contra hongos fitopatógenos del suelo e indican la necesidad de la producción y desarrollo de agentes de biocontrol basado en *Trichoderma*, para servir como un modelo de control favorable al medio ambiente (John *et al.*, 2010; Schuster & Schmoll, 2010). Además, la aplicación de metabolitos de *Trichoderma* para la protección de cultivos, tales como los inductores de defensa del hospedante y antibióticos, pueden llegar a ser una realidad en un



futuro próximo, debido a que pueden ser producidos a bajo costo y en grandes cantidades a escala industrial (Vinale *et al.*, 2008).

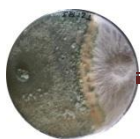
La caracterización e identificación de cepas a nivel especie es el primer paso en la utilización del potencial total de especies de *Trichoderma* para aplicaciones específicas (Lieckfeldt *et al.*, 1999), y el estudio *in vitro* con diferentes bioensayos es un método efectivo y rápido para identificar cepas con potencial antagónico (Schubert *et al.*, 2008; Narsimha *et al.*, 2014). El mejor método para obtener cepas con potencial antagónico es aislarlas de suelos o plantas donde está creciendo bajo condiciones de temperatura, humedad y disponibilidad de nutrientes, y donde está presente la enfermedad a controlar (Howell, 2003). Por las consideraciones anteriores, se evaluaron cepas nativas de *Trichoderma* aisladas en diferentes estados de la república mexicana, para el control de los hongos fitopatógenos causantes de la pudrición radicular del frijol ejotero.

1.2 OBJETIVOS E HIPÓTESIS

1.2.1 Objetivos

- ✓ Determinar la tasa de crecimiento de los hongos fitopatógenos y las cepas de *Trichoderma* aisladas e identificadas previamente (Capítulo II)
- ✓ Evaluar el efecto micoparasítico de las cepas aisladas, en *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*
- ✓ Evaluar el efecto antagónico de los metabolitos difusibles y volátiles producidos por las cepas de *Trichoderma* contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*

1.2.2 Hipótesis



- ✓ Las cepas de *Trichoderma* tienen efecto micoparasítico contra los hongos fitopatógenos
- ✓ Las cepas de *Trichoderma* producen metabolitos difusibles o volátiles con efecto antagónico contra *R. solani* y/o *S. rolfsii*.

1.3 MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Posgrado en Protección Vegetal, perteneciente al Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. Las cepas fueron previamente identificadas con métodos moleculares y morfológicos (Capítulo II).

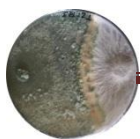
1.3.1 Tasa de crecimiento y esporulación

Para caracterizar las cepas, la tasa de crecimiento del micelio y su capacidad de esporulación, se sembraron discos de 5 mm de diámetro con micelio de 5 días de incubación del borde de los cultivos activos y se colocaron en el centro de la caja Petri con PDA por triplicado y se incubó a 25 C°, 12 horas luz/oscuridad y 40% de humedad relativa. Se midió el crecimiento radial en dos direcciones diametralmente opuestas hasta que se cubriera totalmente la superficie del medio (Michel, 2001). Las tasas de crecimiento de las cepas fueron calculadas de acuerdo con Zadoks y Schein (1979) utilizando la ecuación:

$$TC = \frac{C_2 - C_1}{T_2 - T_1}$$

Dónde, TC=Tasa de crecimiento (mm h⁻¹); C₂=crecimiento final (mm); C₁=crecimiento inicial (mm); T₂=tiempo final; T₁=tiempo inicial.

Este bioensayo se realizó usando 13 tratamientos que corresponden a las cepas aisladas de *Trichoderma* spp., una cepa comercial de referencia y el testigo, arreglados en un diseño



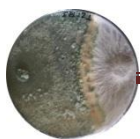
completamente al azar con 3 repeticiones. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y comparaciones múltiples de medias usando la prueba de Fisher (Diferencia Mínima Significativa: DMS) con nivel de significancia al 5%, utilizando el paquete estadístico SAS (SAS, 2014).

Por otra parte, la esporulación asexual de especies de hongos con potencial antagónico como *Trichoderma*, es de gran importancia agrícola, debido a que los conidios son usados como inoculo en formulaciones convencionales y comerciales contra diversidad de hongos fitopatógenos (Carreras-Villaseñor, 2012). El grado de esporulación se estimó visualmente después de 12 días de incubación. Se clasificó como muy abundante cuando fue muy visible y cubría toda la superficie del medio; abundante cuando cubría más del 50% de la superficie; y escaso cuando cubría menos del 10% de la superficie (Michel, 2001).

1.3.2 Prueba de micoparasitismo

Con el objeto de evaluar la acción micoparasítica de *Trichoderma spp.* sobre los fitopatógenos aislados se utilizó la técnica de cultivos duales (Dhingra y Sinclair, 1995; Rahaman *et al.*, 2009), estudiando la interacción entre cada una de las cepas de *Trichoderma* con cada una de las especies de fitopatógenos.

Se prepararon cajas Petri de 8 cm de diámetro con PDA, en las cuales se pusieron un disco de 8 mm con los fitopatógenos en crecimiento activo, colocados a 0.5 cm de la periferia; así mismo, se colocaron cada una de las cepas de *Trichoderma* a 0.5 cm de la periferia en el lado opuesto del patógeno. Posteriormente se incubaron a 25 C°. Se midió el crecimiento radial de ambas colonias cada 24 h con ayuda de una regla graduada en milímetros (mm). Las lecturas de crecimiento radial fueron transformadas en porcentaje de inhibición usando la formula desarrollada por Skidmore y Dickinson (1976):



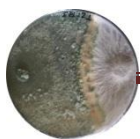
$$PI = ((R1-R2)/R1) \times 100,$$

Donde, R2=crecimiento radial del patógeno en confrontación con *Trichoderma*, y R1=crecimiento radial del patógeno en el control. Los tratamientos se arreglaron en un diseño completamente al azar con tres repeticiones. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y comparaciones múltiples de medias usando la prueba de Fisher (Diferencia Mínima Significativa: DMS) con nivel de significancia al 5%, utilizando el paquete estadístico SAS (SAS, 2014).

Las cepas se caracterizaron de acuerdo a la clasificación de antagonismo de Bell *et al.* (1982), donde 1=*Trichoderma* sobrepasa completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio, 2=*Trichoderma* sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio, 3=*Trichoderma* y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie y ningún organismo parece dominar al otro, 4=el patógeno coloniza las dos terceras partes de la superficie del medio y parece resistir a la invasión por *Trichoderma* y 5=el patógeno sobrecrece completamente a *Trichoderma* y ocupa la superficie total del medio.

1.3.3 Prueba de metabolitos difusibles

Se llevó a cabo utilizando el método del celofán (Dennis y Webster, 1971a), que se describe a continuación: papel celofán estéril cortado a la medida de la caja Petri (8 cm de diámetro) se colocó en condiciones asépticas sobre el medio papa-dextrosa-agar (PDA); inmediatamente se inoculó cada caja en la parte central sobre el papel celofán con discos de 8 mm de diámetro con cada uno de los diferentes aislados de *Trichoderma* spp. de 10 días de edad, crecidos en PDA. Después de la inoculación, las cajas se incubaron a 25 °C, 12 horas luz/oscuridad por 72 h; pasado este tiempo, el papel celofán con el crecimiento del hongo antagonista se retiró cuidadosamente para evitar que cayeran conidios en el medio PDA. Inmediatamente se

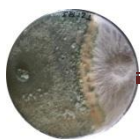


inoculó nuevamente en el centro de esta misma caja Petri, con un disco de 8 mm de los hongos fitopatógenos. El cultivo se incubó a 25 °C, y el diámetro de la colonia se midió a las 72 h, tiempo en el que los testigos cubrieron totalmente la caja. Se utilizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones.

El porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio de las especies fitopatógenos, se calculó con la siguiente formula, % inhibición = $[(D1 - D2) / D1 \times 100]$ en donde, D1 = diámetro de la colonia del fitopatógenos creciendo en donde antes creció el mismo fitopatógeno y D2 = diámetro de la colonia del fitopatógenos creciendo en cajas donde antes creció *Trichoderma* spp. (Worasatit *et al.*, 1994).

1.3.4 Prueba de metabolitos volátiles

Los metabolitos volátiles tienen importancia agrícola debido a su potencial antagónico para el manejo de fitopatógenos y reducir o combinar el uso de fungicidas en la protección de cultivos (Morath *et al.*, 2012). El efecto de los metabolitos volátiles de las cepas de *Trichoderma* fue evaluado mediante el crecimiento micelial del patógeno por el método de Dennis y Webster (1971b). Se colocó un disco de 8 mm de diámetro de cultivos de 7 días, obtenidos del margen de crecimiento de cada cepa de *Trichoderma*, y puestos en el centro de placas Petri con PDA e incubadas a 25 ± 2 °C por 48 h. En las placas testigo, se colocó un disco de PDA estéril en el centro de éstas. Al finalizar el periodo de incubación, la tapa de cada placa fue remplazada con la base de otra, en la cual previamente se colocó un disco de 8 mm de PDA con el patógeno y, se sellaron con papel adhesivo. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones. El crecimiento radial de los patógenos fue registrado cada 24 h y el porcentaje de inhibición se calculó como se mencionó anteriormente (Worasatit *et al.*, 1994).



1.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.4.1 Tasa de crecimiento

La tasa de crecimiento (TC) es una herramienta fisiológica útil para predecir la habilidad de biocontrol de las cepas de *Trichoderma* (Uzunovic and Webber, 1998) por lo que es utilizada como una primera referencia al caracterizar cepas nuevas (Hermosa *et al.*, 2000), así como también la TC de los hongos fitopatógenos, la cual está relacionada con la capacidad de escape al antagonismo y antibiosis de *Trichoderma*.

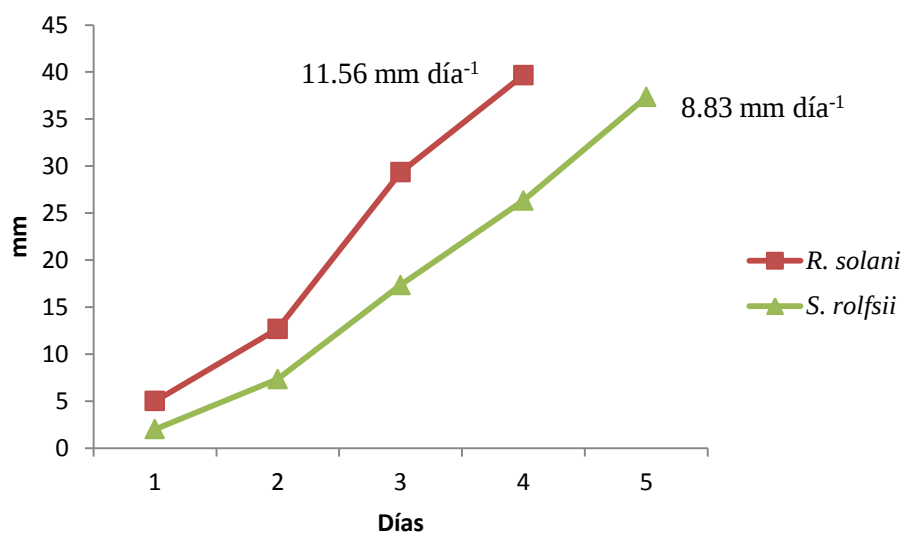
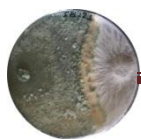


Figura 17. Tasa de crecimiento de los fitopatógenos

Para los hongos fitopatógenos la mayor TC la presentó *R. solani* (11.55 mm día⁻¹) sobre *S. rolfsii* (8.83 mm día⁻¹) (Figura 17); por su parte, *Sclerotium* indujo síntomas severos a los 7 días en las pruebas de patogenicidad con respecto a *Rhizoctonia*, a los 4 días (Capítulo II).

En cuanto a las cepas de *Trichoderma*, en el Análisis de Varianza se observaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en la TC. La cepa que resultó crecer más rápido fue *T. harzianum*



(CHI2) (14 mm día^{-1}), y la que presentó menor TC fue *T. koningiopsis* (TB2) ($10.66 \text{ mm día}^{-1}$) (Cuadro 6).

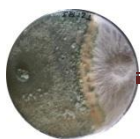
Cuadro 6. Grado de esporulación, clase de antagonismo y TC de las cepas de *Trichoderma*

CEPA	Especie	Grado de Esporulación	Clase de Antagonismo		TC (mm día ⁻¹)	
			<i>R. solani</i>	<i>S. rolfsii</i>		
CHI2	<i>Trichoderma harzianum</i>	Abundante	IV	IV	14	a
SIN2	<i>Trichoderma asperellum</i>	Muy abundante	II	II	12.66	ab
MOR4	<i>Trichoderma harzianum</i>	Abundante	IV	IV	12.66	ab
ESP	<i>Trichoderma asperellum</i> **	Muy abundante	IV	II	12.66	ab
SIN3	<i>Trichoderma asperellum</i>	Abundante	II	II	12.66	ab
SIN1	<i>Trichoderma asperellum</i> **	Muy abundante	IV	II	12.33	b
MOR2	<i>Trichoderma harzianum</i>	Abundante	III	IV	12.33	b
CHI1	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	Abundante	III	III	12	bc
VIRENS	<i>Trichoderma virens</i>	Muy abundante	III	III	11.66	bc
COCULA	<i>Trichoderma asperellum</i>	Muy abundante	IV	III	11.5	bc
GTO	<i>Trichoderma harzianum</i>	Muy abundante	III	IV	11.33	bc
TB2	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	Escasa	III	III	10.66	c
	P>F				0.0176	
	C.V.				7.28	
	DMS				1.49	

* Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes, prueba de Fisher (DMS), con nivel de significancia al 5%. **Identificación morfológica.

Lo anterior no fue consistente con el porcentaje de inhibición de los hongos fitopatógenos *in vitro* evaluados en este trabajo, puesto que la cepa CHI2 presentó resultados inferiores en los tres ensayos de antagonismo con respecto a la cepa TB2, que fue una de las mejores (Cuadro 7). Por su parte *R. solani* tuvo una TC similar a la mayoría de las cepas de biocontrol, mientras que *S. rolfsii* fue menor a todas ellas, Nuevamente, estos resultados no tienen relación al porcentaje de inhibición debido a que presentaron un comportamiento contrario, mostrando inhibiciones menores a *S. rolfsii* respecto a *R. solani*.

En relación al grado de esporulación en medio de cultivo PDA y 12 h luz/oscuridad, en todas las cepas evaluadas se observó esporulación muy abundante y abundante, excepto para



Trichoderma koningiopsis (TB2), la cual fue muy escasa (Cuadro 6). Los mecanismos moleculares de producción de conidios por las cepas de *Trichoderma* es muy complejo, puesto que está influenciado por diversos factores como la luz, recurso del carbón y nitrógeno, ritmos circadianos, relación C:N, pH del medio de cultivo, señalización celular por Ca^+ , daño micelial y por compuestos orgánicos volátiles (Steyaert *et al.*, 2010); por lo tanto, es muy difícil medir con precisión la esporulación y establecer con certeza que factor está inhibiendo la producción de conidios, lo cual puede cambiar si varía algún factor mencionado anteriormente.

1.4.2 Ensayos de antagonismo

En el ensayo de micoparasitismo, las cepas SIN2 (*T. asperellum*), SIN3 (*T. asperellum*) y TB2 (*T. koningiopsis*) resultaron ser las más eficientes para inhibir el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* (57.38, 54.54 y 53.40 %, respectivamente) (Figura 18 y 20), las cuales se clasificaron en grado de antagonismo II y III, las dos primeras cepas y la última mencionada, respectivamente (Cuadro 7); estos resultados fueron altos en contraste con resultados de diversos ensayos, donde los máximos porcentajes de inhibición fueron 46.31 % con *T. gamsii* (Anees *et al.*, 2010), 42.50 % con *T. harzianum* (Sallam *et al.*, 2008), mientras que en otros ensayos se encontraron porcentajes mayores (59%) con las especies *T. longibrachiatum*, *T. virens*, *T. viride* y *T. harzianum* (Rini y Sulochana, 2007) y 100 % de inhibición con la especie *T. aureoviride* (Kotasthane *et al.*, 2015). Mientras que para *Sclerotium rolfsii*, las mejores cepas fueron SIN3 (*T. asperellum*), SIN1 (*T. asperellum*) y ESP (*T. asperellum*) (49.21, 49.21 y 46.08 %, respectivamente) (Figura 18 y 22), las cuales presentaron grado II de antagonismo. Paramasivan *et al.* (2014) obtuvieron porcentajes de inhibición que variaron del 71.19 al 22.92 % con *T. viride*, resultados similares con el presente trabajo.

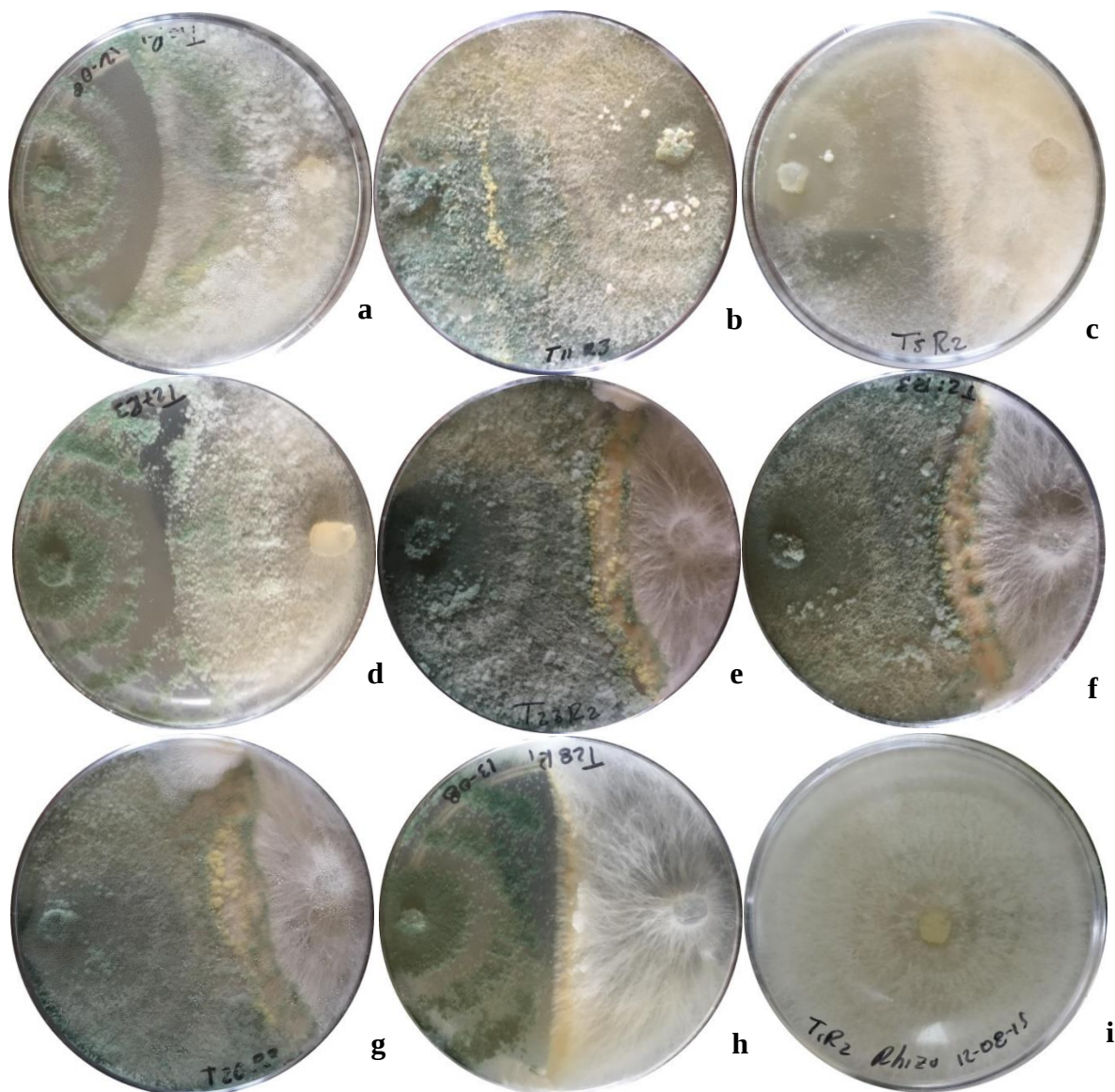
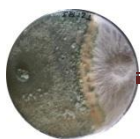


Figura 18. Inhibición por micoparasitismo a las 72 h. **a-d**, *R. solani*; **e-h**, *S. rolfsii*; **a**, *T. asperellum* (SIN2); **b**, **e**, *T. asperellum* (SIN3); **c**, *T. koningiopsis* (TB2); **d**, **h**, cepa comercial (*T. virens*); **f**, SIN1; **g**, ESP, **i**, Control *R. solani*.

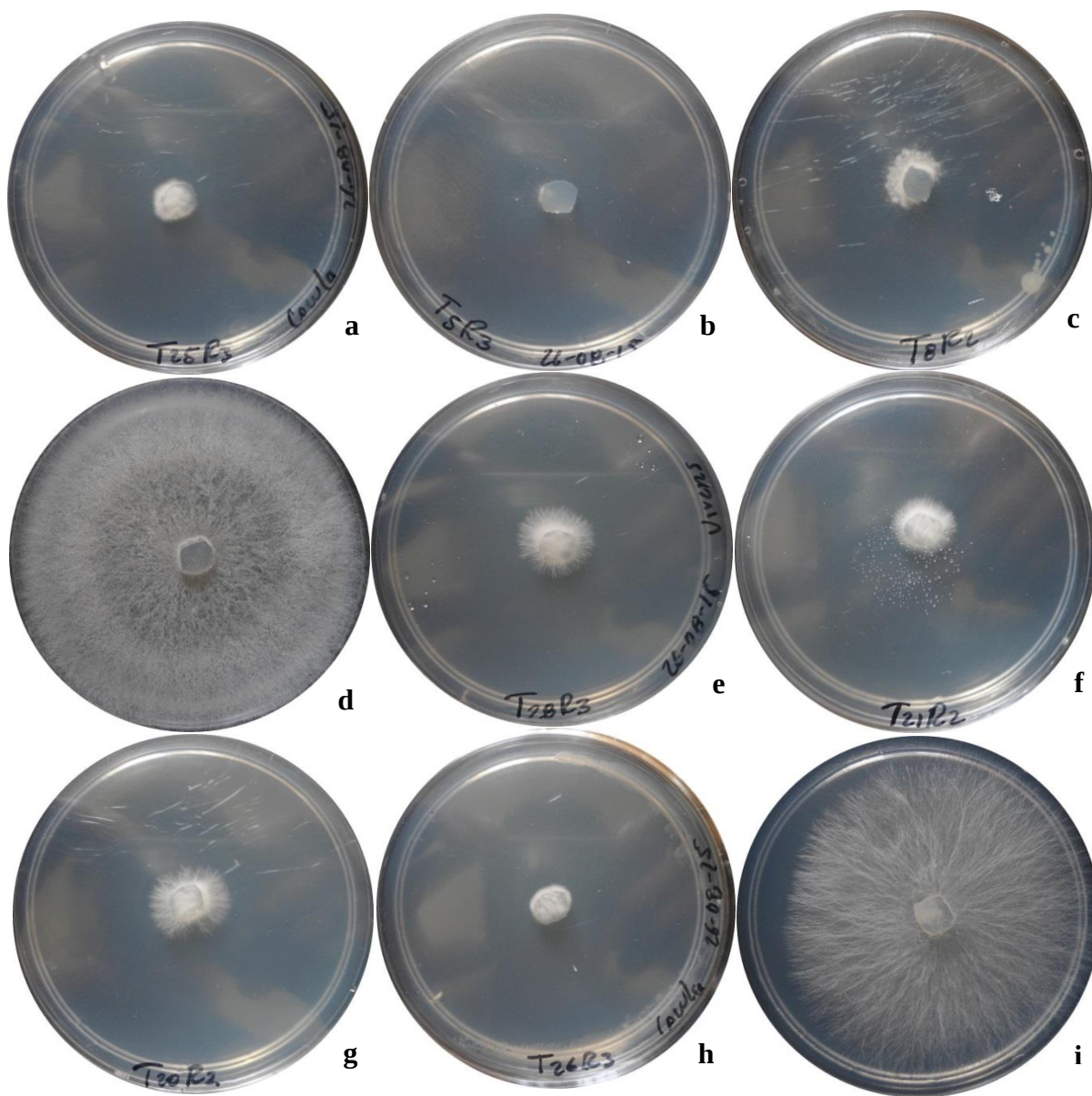
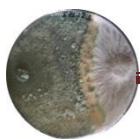
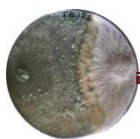


Figura 19. Inhibición por metabolitos difusibles a las 72 h. a-c, *R. solani*; e-h, *S. rolfsii*. a, h, *T. asperellum* (COCULA); b, *T. koningiopsis* (TB2); c, g, ESP; d, control *R. solani*; e, *T. virens* (cepa comercial); f, SIN1; i, control *S. rolfsii*.

En metabolitos difusibles, las mejores cepas inhibiendo a *R. solani* fueron *T. asperellum* (COCULA), *T. koningiopsis* (TB2), *T. virens* (Comercial), y *T. asperellum* (ESP) con 100, 99.04, 98.09 y 95.24 % (Figura 19 y 20), aunque no hubo diferencia estadística significativa



con las cepas *T. asperellum* (SIN2 y SIN3), *T. asperellum*. (SIN1), y *T. koningiopsis* (CHI1) (Cuadro 7). En otros estudios, se obtuvo un porcentaje de inhibición menor con las especies *T. asperellum* (74.4 %), *T. harzianum* (67.8 %) (Asad *et al.*, 2014), *T. gamsii* (75.62 %) (Anees *et al.*, 2010). En el caso del *S. rolfii*, las mejores cepas fueron *T. virens* (Comercial), *T. asperellum* (SIN1, ESP y COCULA), con porcentajes de inhibición del 97.72 % para las primeras tres, y 95.45 % para la última (Figura 19), aunque no se observó diferencia estadística con *T. asperellum* (SIN2 y SIN3). Resultados similares se obtuvieron con *T. asperellum* (100 y 99.96 %), *T. harzianum* (86.45 %) (John *et al.*, 2015), *T. viride* (63.4 y 70.10 %) (Paramasivan *et al.*, 2014; Parmar *et al.*, 2015).

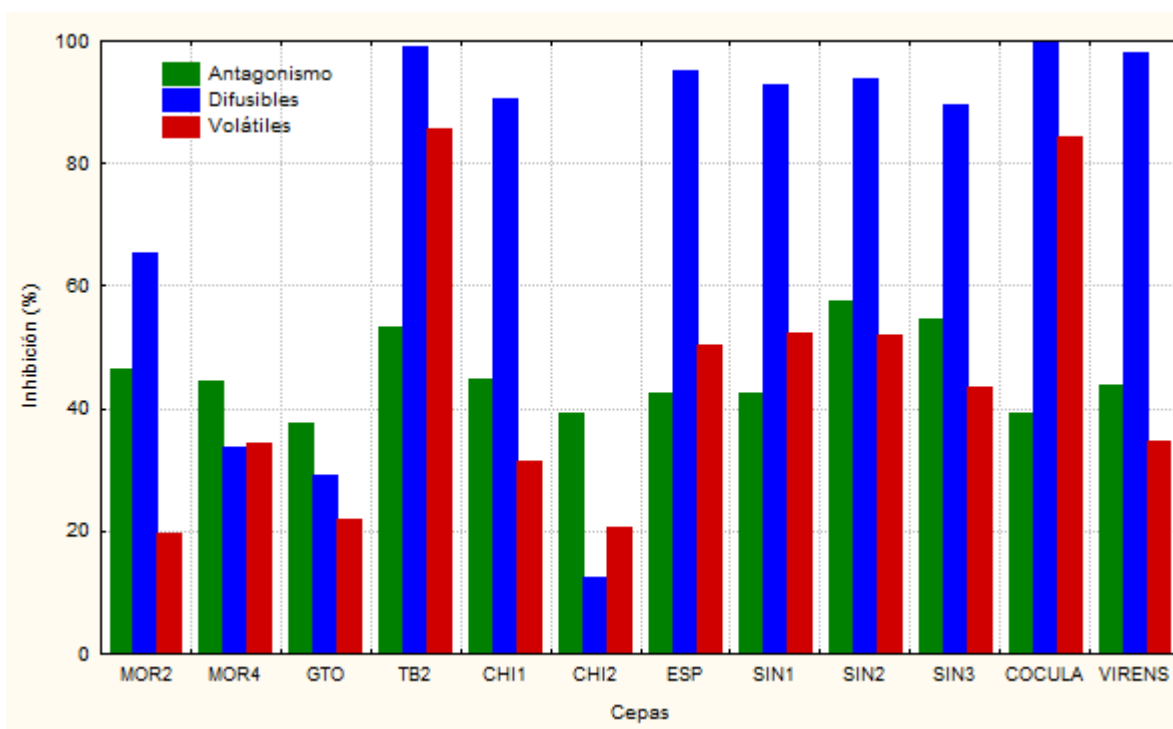
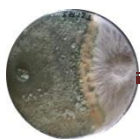


Figura 20. Antagonismo de las cepas de *Trichoderma* contra *Rhizoctonia solani*.

Por último, en los metabolitos volátiles que inhibieron *R. solani*, las cepas con mayores eficacias fueron *T. koningiopsis* (TB2) y *T. asperellum* (COCULA) con 85.71 y 84.28 % de



inhibición (Figura 20 y 21); mientras que en algunos estudios se reportan valores inferiores, 32.09 % con *T. atroviride* (Anees et al., 2010), y 66 % con *T. asperellum* (Qualhato et al., 2013).

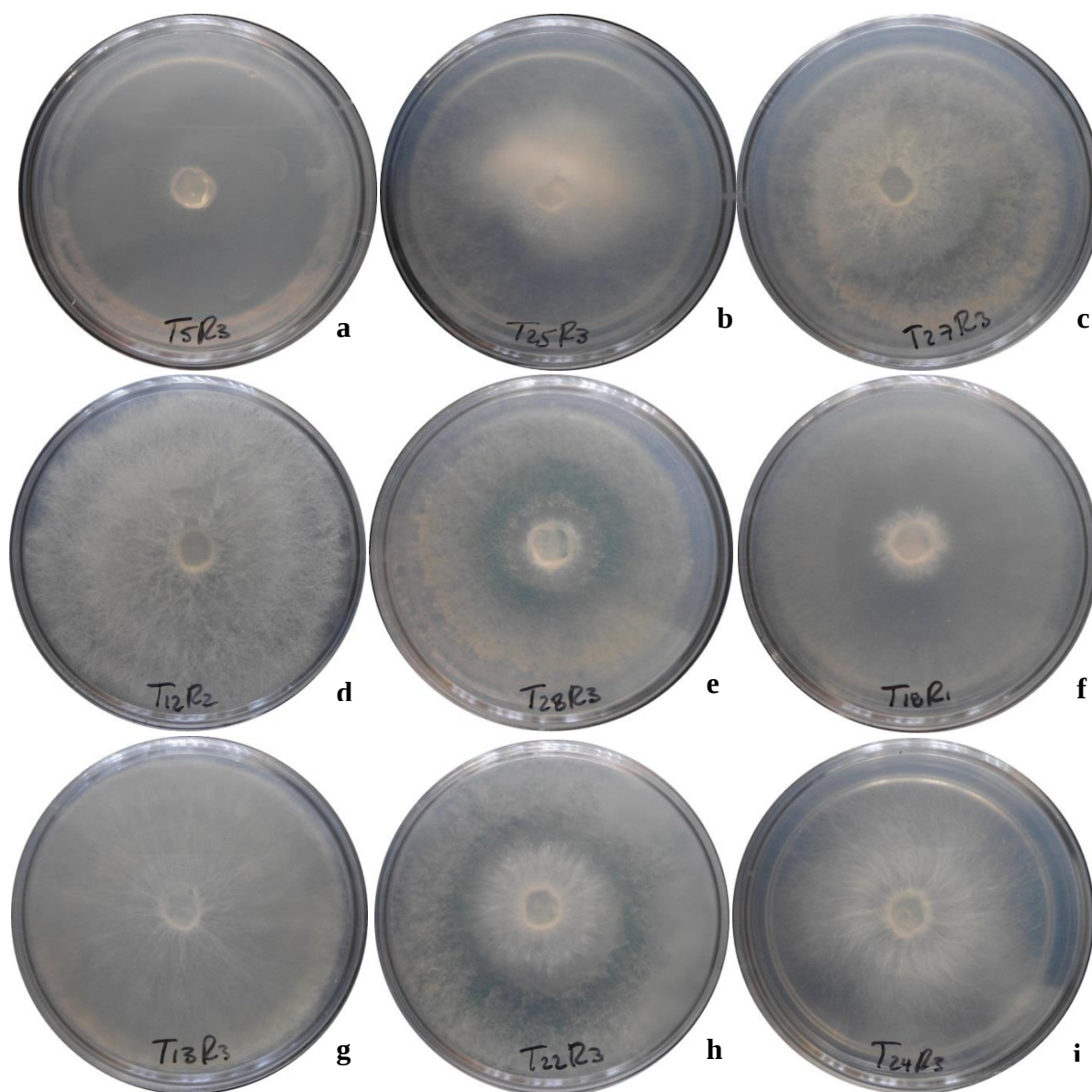
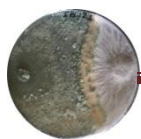


Figura 21. Inhibición por metabolitos volátiles. **a-c**, *R. solani*; **e-h**, *S. rolfsii*. **a**, *T. koningiopsis* (TB2); **b**, *T. asperellum* (COCULA); **c**, **e**, *T. virens* (comercial); **d**, control *R. solani*; **f**, *T. koningiopsis* (CHI1); **g**, *T. harzianum* (MOR2); **h**, *T. asperellum* (SIN2).



En el caso de *S. rolfsii* todas las cepas no mostraron diferencias significativas (Cuadro 7), fluctuando el porcentaje de inhibición del 21 al 70.47 %, excepto para MOR2 (*T. harzianum*), que alcanzó el 3.34 % (Figura 21 y 22). Resultados similares se encontraron con *T. viride* (63.87 %) (Paramasivan *et al.*, 2014).

Aunque se evaluaron las mismas especies, el porcentaje de inhibición varía, esto podría deberse al lugar de aislamiento de las cepas (Paramasivan *et al.*, 2014), así mismo, el tiempo de evaluación incrementa ligeramente los porcentajes de inhibición. También se ha observado que la misma cepa evaluada contra diferentes hongos fitopatógenos presenta diferentes resultados, posiblemente a las características biológicas de los fitopatógenos.

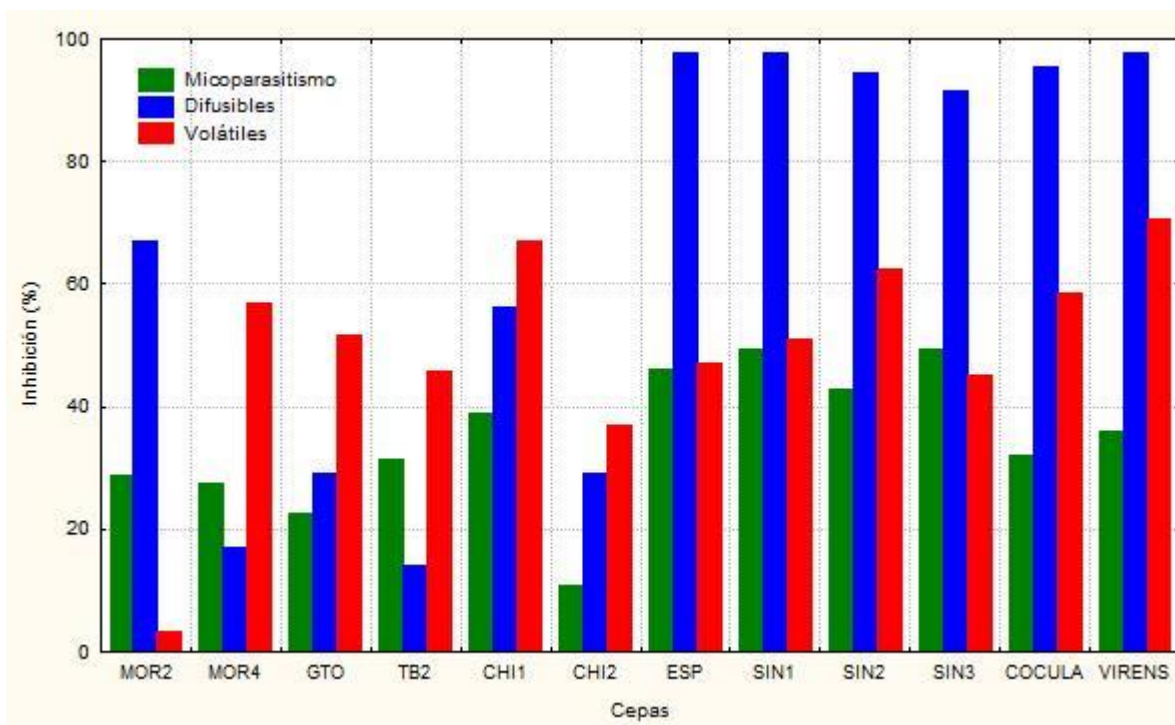


Figura 22. Antagonismo de las cepas de *Trichoderma* contra *Sclerotium rolfsii*.



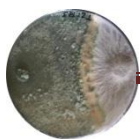
Cuadro 7: Efecto *in vitro* del micoparasitismo y compuestos difusibles y volátiles sobre la inhibición de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc.

Cepa	Identificación Molecular	<i>Rhizoctonia solani</i>			<i>Sclerotium rolfsii</i>		
		MIC ^a .	DIF.	VOL.	MIC.	DIF.	VOL.
MOR2	<i>Trichoderma harzianum</i> *	46.58 b	65.23 b	19.52 d	28.89 de	67.04 b	3.34 b
MOR4	<i>Trichoderma harzianum</i> *	44.31 bc	33.81 c	34.29 bcd	27.33 de	17.03 e	57.04 a
GTO	<i>Trichoderma harzianum</i> **	37.47 d	29.04 c	21.9 cd	22.64 ef	28.97 d	51.67 a
TB2	<i>Trichoderma koningiopsis</i> *	53.40 a	99.04 a	85.71 a	31.24 cde	14.19 e	45.63 ab
CHI1	<i>Trichoderma koningiopsis</i> **	44.87 b	90.47 a	31.43 bcd	39.05 abcd	56.24 c	67.11 a
CHI2	<i>Trichoderma harzianum</i> *	39.19 cd	12.38 d	20.47 cd	10.92 f	28.97 d	36.90 ab
ESP	<i>Trichoderma asperellum</i> . ⁺	42.60 bcd	95.24 a	50.47 b	46.08 ab	97.72 a	46.98 ab
SIN1	<i>Trichoderma asperellum</i> . ⁺	42.60 bcd	92.85 a	52.38 b	49.21 a	97.72 a	51.00 a
SIN2	<i>Trichoderma asperellum</i> **	57.38 a	93.81 a	51.91 b	42.96 abc	94.31 a	62.41 a
SIN3	<i>Trichoderma asperellum</i> *	54.54 a	89.52 a	43.33 bc	49.21 a	91.47 a	44.96 ab
COCULA	<i>Trichoderma asperellum</i> *	39.19 cd	100.00 a	84.28 a	32.02 cde	95.45 a	58.39 a
VIRENS	<i>Trichoderma virens</i>	43.74 bc	98.09 a	34.76 bcd	35.92 bcd	97.72 a	70.47 a
	Prob>F	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0699
	C.V.	7.28	9.76	31.81	22.46	9.90	58.29

^aMedias dentro de las columnas con la misma letra no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha=0.05$).

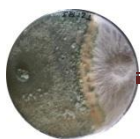
*Amplificación y secuenciación de la región ITS; **ITS y Factor de elongación; ⁺Identificación morfológica.

MIC: micoparasitismo; DIF: compuestos difusibles; VOL: compuestos volátiles



1.5 CONCLUSIONES

Las TC de los fitopatógenos fueron similares con respecto a todas las cepas de *Trichoderma*. No hubo relación en cuanto a la efectividad de inhibición y la TC, puesto que la cepa con menor TC (*Trichoderma koningiopsis*, TB2) presentó mayor porcentaje de inhibición en los tres ensayos de antagonismo, respecto a la que creció más rápido. En general, los metabolitos difusibles presentaron mayor inhibición en ambos patógenos con respecto a los dos restantes mecanismos de antagonismo; así como, la mayoría de las cepas fueron mejores inhibiendo *in vitro* a *Rhizoctonia solani* que a *S. rolfsii*, presentando mayor potencial de biocontrol las cepas correspondientes a *T. asperellum* con respecto a *T. harzianum*. Basándose en los tres ensayos de antagonismo, las cepas TB2 (*T. koningiopsis*) para *R. solani* y, ESP y SIN1 (*T. asperellum*) para *S. rolfsii*, mientras que SIN2, SIN3 y COCULA (*T. asperellum*) para ambos patógenos, presentan alto potencial antagónico para utilizarse en ensayos de invernadero, y posteriormente su uso en campo.

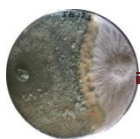


CAPITULO IV. EFECTIVIDAD BIOLÓGICA EN INVERNADERO DE FUNGICIDAS Y CEPAS DE *Trichoderma* CONTRA *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc.

1.1 INTRODUCCIÓN

El uso de fungicidas produce diversidad de beneficios, como generar productos agrícolas de alta calidad y a un precio razonable, proteger de micotoxinas y la indispensabilidad en la producción a gran escala (The American Phytopathology Society, 1990). El uso eficiente y seguro de los fungicidas debe seguir ciertas reglas, primero diagnosticar correctamente el problema y posteriormente seguir las indicaciones de cada fungicida para evitar problemas hacia la salud y de resistencia a los hongos (Saalau, 2011). La mayoría de los fungicidas necesitan ser aplicados antes de que la enfermedad ocurra o cause daños a las plantas, debido a que solo protegen tejido no infectado (McGrath, 2004).

Sin embargo, hoy en día hay estrictas regulaciones del uso de plaguicidas y presión pública para remover el uso de plaguicidas muy peligrosos del mercado; por ello, diversos investigadores se han enfocado a desarrollar alternativas viables, como los productos biológicos para el control de plagas y enfermedades (Pal y Gardener, 2006). El uso de agentes de biocontrol para patógenos de la raíz ha sido propuesto en numerosas ocasiones, como el uso de *Bacillus subtilis* y diversas especies de *Trichoderma* (Chet e Inbar, 1994; Estevez de Jensen *et al.*, 2002), aunque actualmente los productos biológicos constituyen menos del 1% del mercado de fungicidas, indudablemente contribuirán más en el futuro (Morton y Staub, 2008). No todos los fungicidas pueden matar o inhibir el crecimiento de todos los hongos, por lo tanto, antes de que se recomiende la aplicación de cierto fungicida a un cultivo y hongo específico, se deben realizar pruebas de eficacia biológica, las cuales muestran el



comportamiento de los fungicidas hacia la enfermedad, en las cuales se descubren los posibles candidatos con potencial de control, así como la presencia o ausencia de fitotoxicidad (Oliver y Hewitt, 2014).

1.2 OBJETIVOS E HIPÓTESIS

1.2.1 Objetivos

- ❖ Evaluar la efectividad biológica de fungicidas contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* en invernadero
- ❖ Evaluar la efectividad biológica en invernadero de las cepas de *Trichoderma* que presentaron potencial antagónico *in vitro*, contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*

1.2.2 Hipótesis

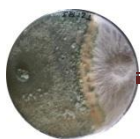
- ❖ Los fungicidas propuestos en este estudio controlan eficientemente la pudrición radicular del frijol ejotero causada por *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*
- Las cepas de *Trichoderma* a evaluar presentan capacidad antagónica y reducen la severidad de la enfermedad de pudrición radicular del frijol ejotero

1.3 MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el invernadero perteneciente al Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

1.3.1 Material vegetal

Se utilizó la variedad de frijol ejotero “Strike”, de crecimiento tipo I (determinado arbustivo). Las semillas de frijol fueron desinfestadas en una disolución de hipoclorito de sodio al 3% durante 5 min seguido de tres lavados con agua de la llave durante 5 min. Se sembraron las



semillas en charolas de poliestireno de 128 cavidades, con limo y “Peat Moss” (proporción 2:1) y se regaron cada tercer día para mantener una humedad constante.

1.3.2 Obtención, preparación y cuantificación de inóculo

De un muestreo previamente realizado en Axochiapan y Tepalcingo, Mor., se obtuvieron dos cultivos por medio de punta de hifa, de *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*. Los patógenos se sembraron en medio papa-dextrosa-agar (PDA) (Singleton *et al.*, 1992). Todos los patógenos fueron identificados morfológicamente, y los que fueron patogénicos, se identificaron a nivel molecular (Capítulo II). Los aislamientos antes mencionados se cultivaron y se incrementaron para realizar la inoculación como se mencionó en el capítulo II.

1.3.3 Inoculación con los hongos fitopatógenos

Para ambos hongos fitopatógenos, se mezcló 10 g inóculo (grano de avena infectada) con 2.5 kg de sustrato (suelo limoso: peat moss, proporción 4:1 v/v). En este sustrato las plantas recién emergidas se trasplantaron en bolsas de 22 × 22 cm, colocando cuatro plantas por maceta. Inmediatamente se aplicaron los tratamientos correspondientes, y se regó cada tercer día para mantener constante la humedad.

1.3.4 Tratamientos

Se llevaron a cabo dos experimentos, uno por cada hongo fitopatógeno, variando solamente en las cepas de *Trichoderma*, las cuales presentaron un alto porcentaje de inhibición *in vitro* a cada fitopatógeno correspondiente, probando una dosis de 1×10^8 conidios por maceta, mezclando previamente en 50 mL de agua destilada esterilizada (Cuadro 8).

1.3.5 Obtención y preparación del inóculo de *Trichoderma*

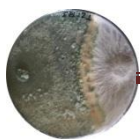


El inóculo se incrementó en avena como se mencionó en el capítulo II. Cuando se enfriaron las bolsas con avena, cada bolsa se inoculó con cada cepa que mostró potencial antagónico y se incubaron por 10 días a 25 °C y 12 horas luz/oscuridad. Una vez transcurrido ese tiempo, se cosecharon los conidios extrayendo 5 g de sustrato infestado de cada bolsa, se agregó 30 mL de agua destilada esterilizada para desprender los conidios. Se contabilizó el número de conidios de la suspensión con el apoyo de una cámara de Neubauer Improved (Marienfeld Germany©). Se obtuvieron concentraciones mínimas de 2×10^7 conidios mL⁻¹ y máximos de 1×10^8 conidios mL⁻¹, utilizando la concentración máxima.

Cuadro 8. Tratamientos químicos y biológicos usados en el experimento en invernadero

Trat	Fungicida (s)	Nombre comercial (®)	Dosis recomendada ha ⁻¹ (i. a.)	50 mL maceta ⁻¹ (mg L ⁻¹ de i. a.)
1	Tiabendazol	TECTO 60®	1.0 kg	750
2	piraclostrobin	HEADLINE®	0.5 L	157
3	procloraz	SPORTAK®	1.5 L	844
4	iprodiona	ROVRAL 50PH®	2.0 kg	1250
5	ciprodinil + fludioxonil	SWITCH	0.8 kg	370+250
6	quintozeno + thiram	INTERGUZAN 30-30®	2.0 kg	750+750
7	<i>Bacillus subtilis</i>	PROBAC	2.0 L	12.5×10^6 UFC**
8	<i>T. harzianum</i>	TRICHO-BIO®	1×10^6	2×10^6 conidios
9	TB2/ESP*	<i>T. koningiopsis</i>	1×10^6	2×10^6 conidios
10	SIN2/SIN1*	<i>T. asperellum</i>	1×10^6	2×10^6 conidios
11	SIN3/SIN2*	<i>T. asperellum</i>	1×10^6	2×10^6 conidios
12	COCULA/SIN3*	<i>T. asperellum</i>	1×10^6	2×10^6 conidios
13	TB2 + SIN2 /SIN1+SIN3*	<i>T. koningiopsis</i> + <i>T. asperellum</i>	$(1 \times 10^6) + (1 \times 10^6)$	$2 \times 10^6 + 1 \times 10^6$ conidios
14	TESTIGO	-----	-----	-----

*Tratamientos diferentes para *R. solani* y *S. rolfsii*, respectivamente. **UFC: unidades formadoras de colonias.



1.3.6 Aplicación de los tratamientos

La aplicación de los *Trichoderma* se realizó inmediatamente después de inocular con los hongos fitopatógenos, agregando 50 mL de la suspensión (2×10^6 conidios mL⁻¹) a cada maceta. Se realizó una segunda aplicación con el mismo método y cantidad de conidios, dos días después de la primera aplicación, debido a que las cepas de hongos fitopatógenos son altamente patogénicas. Para el caso de los fungicidas, se realizó con la misma metodología, obteniendo la concentración correspondiente realizando solamente una aplicación.

1.3.7 Diseño experimental

Los tratamientos se arreglaron en un diseño completamente al azar con tres repeticiones, donde la unidad experimental fueron 8 plantas, cuatro plantas por maceta de 22 × 22 cm.

1.3.8 Variables medidas

Las variables se midieron una vez que las plantas del tratamiento control presentaron 100% de severidad de la enfermedad.

a) Severidad de la enfermedad. Se midió utilizando una escala de 7 categorías (Cuadro 9) (Schneider y Kelly, 2000).

b) Eficacia de los fungicidas. La eficacia fue calculada con la fórmula de Abbott (1925):

$$Ef (\%) = \left(\frac{X - Y}{X} \right) \times (100)$$

Dónde; X, severidad de la enfermedad en el control; y Y, severidad de la enfermedad en el tratamiento.



1.3.9 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza y una prueba de comparación múltiple de medias con la prueba de Fisher (DMS) con nivel de significancia al 5%, utilizando el paquete estadístico SAS (2014).

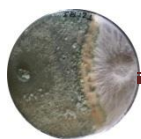
Cuadro 9. Escala para la medición de la severidad de la pudrición radicular.

Categoría	Descripción
0	Sistema radical sano sin descoloración del tejido radical o hipocotilo, sin reducción en la masa radical.
1	Apariencia de pequeñas lesiones café rojizas, de 0.1-0.2 cm de largo, en la base del hipocotilo, con apariencia normal de la masa radical.
2	Incremento en la intensidad y tamaño de las lesiones localizadas raíz/hipocotilo, coalesciendo en anillado de 180° en el tallo, con lesiones de 0.5-1.0 cm y 10% a 20% de descoloración de las raíces pero sin reducción en el tamaño de la masa radical.
3	Incremento en la intensidad de descoloración y el tamaño de las lesiones en el hipocotilo, con lesiones que se pueden llegar a extenderse y anillar completamente el tallo; 5% a 10% en la reducción de la masa radical con 95% de raíces descoloridas.
4	Lesiones del hipocotilo cada vez más descoloridas y extendidas. 100% de las raíces café-rojizas con un 20% a 50% en reducción de la masa radical.
5	Lesiones del hipocotilo anillando el tallo llegan a ser más extendidas (2 cm), masa radical intensamente descolorida y reducida del 50% al 80%.
6	Hipocotilo hueco con lesiones muy extendidas. La masa radical es reducida hasta 80%.
7	Planta muerta

1.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para ambos hongos fitopatógenos se presentaron diferencias significativas ($P < 0.0001$) y la prueba de comparación múltiple de medias generó varios grupos (DMS, $\alpha = 0.5$). Los tratamientos químicos mostraron mayor eficacia con respecto a los biológicos (Cuadro 10).

Para el control de *Rhizoctonia solani*, los fungicidas químicos que redujeron considerablemente la severidad fueron el quintozeno + thiram, iprodiona, fludioxonil +



ciprodinil y tiabendazol, con eficacias del 88.09, 86.90, 84.52 y 71.42 %, respectivamente (Figura 23 y 24); mientras que para *Sclerotium rolfsii* fueron piraclostrobin, quintozeno + thiram, iprodiona y fludioxonil + ciprodinil con eficacias del 91.66, 90.47, 84.52 y 76.78 %, respectivamente (Figura 26).

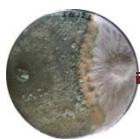
Cuadro 10. Efecto de los fungicidas químicos y biológicos en el control de los agentes causales de la pudrición radicular del frijol ejotero en invernadero

	<i>Rhizoctonia solani</i>		<i>Sclerotium rolfsii</i>	
	SEV	EF	SEV	EF
TECTO 60	28.57 de	71.42 ab	92.85 ab	7.14 ef
HEADLINE	41.07 d	58.93 b	8.33 f	91.66 a
SPORTAK	67.26 c	32.73 c	76.78 cd	23.21 cd
ROVRAL	13.09 e	86.90 a	15.48 ef	84.52 ab
SWITCH	15.47 e	84.52 a	23.21 e	76.78 b
INTERGUZAN	11.90 e	88.09 a	9.52 ef	90.47 ab
PROBAC	100.00 a	0.00 e	66.07 d	33.9 c
TRICHO-BIO	80.95 bc	19.04 cd	95.83 ab	4.16 ef
TB2/ESP**	80.35 bc	19.64 cd	82.14 bc	17.85 de
SIN2/SIN1**	89.28 ab	10.71 de	74.4 cd	25.59 cd
SIN3/SIN2**	86.90 ab	13.09 de	84.52 bc	15.47 de
COCULA/SIN3**	91.66 ab	8.33 de	91.07 ab	8.93 ef
TB2+SIN2/SIN1+SIN3**	95.23 ab	4.76 de	92.26 ab	7.74 ef
TESTIGO	100.00 a	0.00 e	100 a	0.00 f
Prob > F	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
DMS	17.09	17.09	13.88	13.88
C.V.	15.86	28.72	12.73	23.83

*Letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (DMS, $\alpha=0.05$).

**Cepas a la izquierda y derecha evaluadas para *R. solani* y *S. rolfsii*, respectivamente. SEV=severidad; EF=eficacia

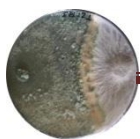
El quintozeno + thiram (INTERGUZAN®) fue muy eficaz para controlar *R. solani* y *S. rolfsii* (88.09 y 90.47%, respectivamente) (Figura 23 y 24). El quintozeno fue muy popular por mucho tiempo (1935-1965) para el manejo de *Rhizoctonia* en diversos cultivos, hasta la



aparición del fungicida sistémico carboxin lanzado al mercado en 1966, mostrando buena eficacia en aplicación a la semilla y suelo (Kataria y Gisi, 1996). Además, con una concentración de menos de 3 mg L⁻¹ se redujo el crecimiento en 50 % de *S. rolfii* obtenidos de cultivos de cacahuete (Franke *et al.*, 1998). Aunque se ha utilizado por bastante tiempo, ha sido prohibido en Canadá y Australia en el 2010, la Unión Europea en el 2000, y en el 2006 en EEUU, debido al alto riesgo que presenta a organismos no objetivos, operadores y consumidores, y su alto potencial de persistencia y bioacumulación (Arora y Bae, 2014); además, se han obtenido resultados positivos y negativos como carcinogénico, esta discrepancia es debida probablemente al nivel de hexaclorobenceno (HCB) como contaminante presente en el quitozeno, por lo que el HCB está clasificado por la EPA (Environmental Protection Agency) en el grupo B2 (probable en humanos) y el quitozeno en D (evidencia inadecuada) (Jones, 1993).

Iprodiona ha mostrado alta eficacia contra especies de *Rhizoctonia* en ensayos *in vitro* (Kataria *et al.*, 1991; Kataria y Gisi, 1996), con una Concentración Efectiva Media (CE₅₀) menor a 10 mg L⁻¹ de ingrediente activo (i. a.) (Carling *et al.*, 1990; Kataria *et al.*, 1991); así como contra *S. rolfii* con 3,300 mg L⁻¹ de i. a. (Alacalá de Mercano, 2005; Pérez *et al.*, 2009). Esto se refleja en las eficacias alcanzadas de este i. a. contra *R. solani* (86.90 %) y *S. rolfii* (84.52 %) en frijol ejotero (Figura 23-26).

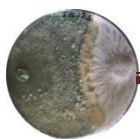
El fenilpyrrol (fludioxonil), muestra fuerte actividad contra *R. solani*, excelente control del damping off, cancro del tallo, pudrición de raíz y tizón foliar en diversos cultivos, y exhibe resultados promisorios con bajas cantidades de i.a. para el tratamiento de semillas y aplicaciones foliares (Kataria y Gisi, 1996). Por ejemplo, se han encontrado altas eficacias para el manejo de este hongo en el cultivo de papa aplicando fludioxonil (MAXIM®) a la



semilla (Bains *et al.*, 2002) y aplicado a la semilla de cacahuete en condiciones de invernadero (Akgul *et al.*, 2011); coincidiendo con el presente trabajo en el cual, el fludioxonil + ciprodinil (SWITCH®) presentó alta eficacia para *R. solani* (84.52 %), así como para *S. rolfsii* (76.78%) en frijol ejotero aplicado en drench en condiciones de invernadero.



Figura 23. Control de *Rhizoctonia solani* con diferentes fungicidas. **a**, piraclostrobin; **b**, quintozeno+thiram; **c**, iprodiona; **d**, procloraz; **e**, ciprodinil+fludioxonil; **f**, tiabendazol.

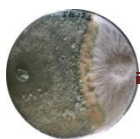


No existen reportes del uso de ciprodinil para el control de *R. solani* y *S. rolfsii*, es más utilizado para el control de *Botrytis cinerea* en varios cultivos, *Didymella bryoniae* en melón, *Erysiphe graminis* en trigo, *Dreschslera teres* en cebada, *Venturia inaequalis* en manzano, *Penicillium digitatum* en postcosecha en naranjo, obteniendo buenas eficacias (Knauf-Beiter *et al.*, 1995; Foster y Staub, 1996; Schirra *et al.*, 2009; Keinath, 2015); sin embargo, se ha detectado alta residualidad en frutos de vid (5.54 mg kg^{-1}) (Cabras *et al.*, 1997).

En cuanto al benzimidazol (tiabendazol), presentó buena eficacia (70.83 %) en el control de *R. solani*, concordando con lo afirmado por Kataria y Gisi (1996). En pruebas *in vitro* se han obtenido inhibiciones del 100% con 7 mg i.a. L^{-1} (Leach y Murdoch, 1985) y una CE_{90} menor de $40 \text{ mg i.a. L}^{-1}$ en diversos grupos de anastomosis (Kataria *et al.*, 1991). En contraste con *S. rolfsii*, presentó muy baja eficacia (7.18%), no habiendo diferencia estadística significativa con el testigo. Pérez *et al.* (2009) reporta muy poca inhibición del crecimiento *in vitro* de *S. rolfsii* con una concentración de $4,000 \text{ mg L}^{-1}$, demostrando que no es un buen fungicida para el control de este patógeno. Este i.a. es ampliamente utilizado para controlar y prevenir enfermedades postcosecha de diversos cultivos (Eckert y Ogawa, 1988).

Los fungicidas piraclostrobin y procloraz presentaron un menor control sobre *R. solani* (Figura 23); se ha demostrado la pobre eficacia del procloraz para controlar especies de *Rhizoctonia* (Carling *et al.*, 1990; Kataria y Gisi, 1996). Sin embargo, fue el mejor i. a. para controlar *S. rolfsii*, con una eficacia del 91.66 % (Figura 24 y 26).

En cuanto a los agentes de biocontrol estudiados, aunque presentaron menores eficacias con respecto a los fungicidas químicos, *T. koningiopsis* (TB2) fue la mejor contra *R. solani*, así como *T. asperellum* (SIN1) contra *S. rolfsii*; mientras que la cepa comercial no mostró



diferencias estadísticas con TB2 para inhibir a *R. solani*, y fue la menos eficiente para controlar a *S. rolfsii* (Figura 25 y 26).



Figura 24. Control de *Sclerotium rolfsii*. **a**, piraclostrobin; **b**, quintozeno+thiram; **c**, iprodiona; **d**, procloraz; **e**, ciprodinil+fludioxonil; **f**, tiabendazol.



Bacillus subtilis solo mostró eficacia para *S. rolfsii* (33.90 %), debido a que fue nula para *R. solani*. Esta eficacia fue mejor incluso que los fungicidas químicos tiabendazol y procloraz. En tomate, aplicado al suelo para el control de *R. solani* en invernadero, redujo la incidencia en un 67 % a los 14 días después de la siembra (Asaka y Shoda, 1996). La aplicación de bacterias benéficas y antagonicas debe realizarse de forma preventiva antes de que el patógeno infecte la planta, debido a que no poseen características curativas como los fungicidas químicos.

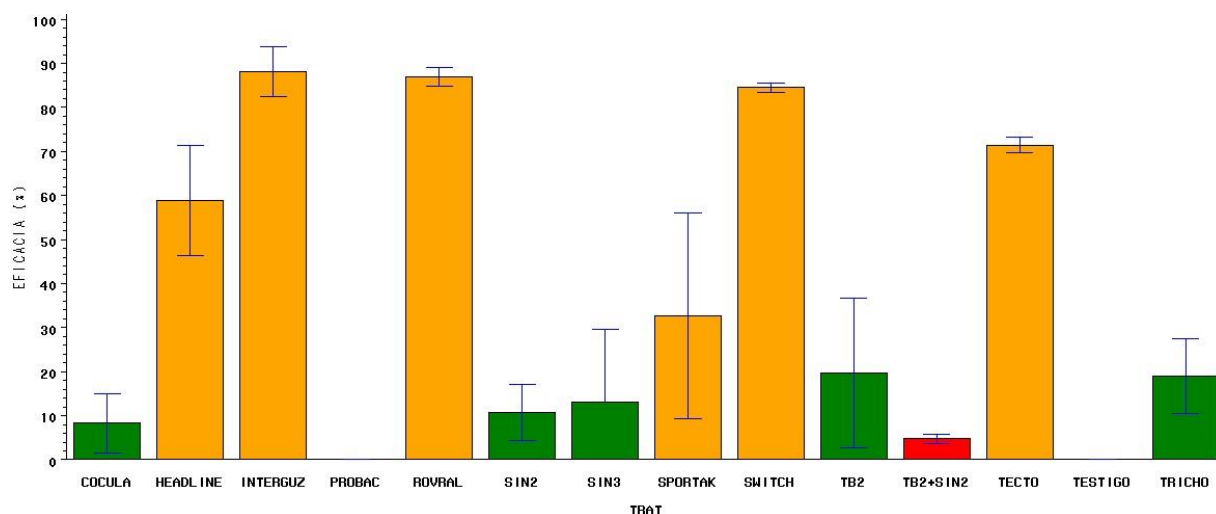


Figura 25. Eficacia de los fungicidas químicos y biológicos contra *Rhizoctonia solani*

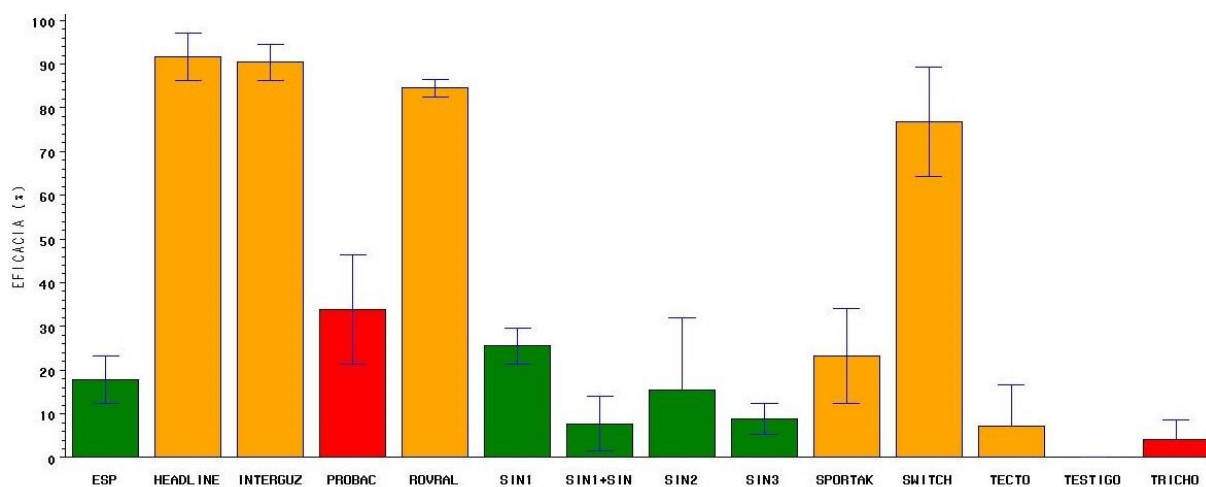
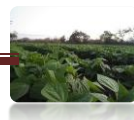
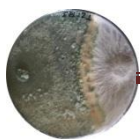


Figura 26. Eficacia de los fungicidas químicos y biológicos contra *Sclerotium rolfsii*

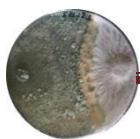


En varios trabajos con *Trichoderma*, el control biológico de *S. rolfsii* con *T. harzianum*, redujo en un 97 % la incidencia y un 57% de *R. solani* (Elad *et al.*, 1980), mostrando un excelente control; mientras que Cardoso y Echandi (1987) no encontraron diferencias significativas en el control de *R. solani* en frijol ejotero, utilizando *Trichoderma hamatum* en condiciones de invernadero, reduciendo la incidencia en un 17% y la severidad en un 9.9 %.



Figura 27. Control de *R. solani* con agentes de biocontrol. **a**, *Bacillus subtilis*; **b**, TRICHOBIO; **c**, Mezcla; **d**, *T. koningiopsis* (TB2); **e**, **f**, **g**, *T. asperellum* (COCULA, SIN2, SIN3, respectivamente); **h**, **i**, Testigo.

La aplicación de *Gliocladium virens* (*Trichoderma virens*) a una dosis de 3×10^3 UFC por gramo de suelo (1.35×10^6 UFC maceta⁻¹) mantuvo erectas más del 80% de las plantas inoculadas con *Sclerotium rolfsii* (Lewis *et al.*, 1993) mostrando un excelente control; en

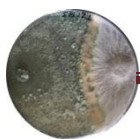


contraste con el presente estudio, la menor severidad fue de 80.35 y 80.95 % con *T. koningiopsis* (TB2) y *T. harzianum* (TRICHO-BIO®), reduciendo la severidad un 19% con respecto al control.

Existen varios reportes de *T. koningiopsis* para el control de hongos que afectan la raíz, algunos aislamientos han sido efectivos contra *Macrophomina phaseolina* en sorgo (Larralde-Corona *et al.*, 2008), además de inducir resistencia y promover el crecimiento de raíces en tomate (Moreno *et al.*, 2009).



Figura 28. Control de *Sclerotium rolfsii* con agentes de biocontrol. **a**, *Bacillus subtilis*; **b**, TRICHO-BIO; **c**, mezcla; **d**, **e**, **f**, **g**, *T. asperellum* (SIN1, SIN2, SIN3, ESP, respectivamente); **h**- **i**, Testigo.



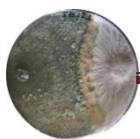
La variedad utilizada puede no tener influencia en la severidad, puesto que se han encontrado diferencias de menos del 2% entre variedades de frijol (Muyolo *et al.*, 1993a). Cabe señalar que en pruebas de patogenicidad en diversos trabajos se registró la severidad a los 14, 16 días y 30 días con bajas severidades (Phillips, 1991; Muyolo *et al.*, 1993b; Balali y Kowsari, 2004), mientras que en el presente se realizó a los 4 días para *R. solani* y a los 6 días para *S. rolfsii*, cuando las plántulas mostraron el 100% de severidad (Capítulo II), teniendo menos tiempo los agentes de biocontrol para inhibir el crecimiento del patógeno.

Trichoderma debe ser usado estrictamente como medida preventiva, debido a que no puede curar infecciones existentes, especialmente con *Rhizoctonia*, debido a la alta presión de la enfermedad; por lo tanto, se recomienda utilizar un fungicida apropiado cuando se presenten estas situaciones (Harman, 2000).

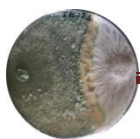
1.5 CONCLUSIONES

Los fungicidas químicos fueron mejores con respecto a los biológicos para el control de los agentes causales de la pudrición radicular del frijol ejotero. Se recomienda la aplicación de iprodiona, fludioxonil+ciprodinil y/o tiabendazol para el control de *R. solani*, y piraclostrobin, iprodiona y/o fludioxonil+ciprodinil para *S. rolfsii*. En condiciones de campo es conveniente utilizar una mezcla para controlar ambos patógenos, realizando rotaciones de éstos cada ciclo de cultivo para evitar la resistencia. La mejor mezcla posible es piraclostrobin + fludioxonil+ciprodinil, debido a que son tres modos de acción involucrados, disminuyendo el riesgo de resistencia.

Los organismos usados para control biológico no fueron eficaces para controlar ambos patógenos, debido posiblemente al corto tiempo entre la infección del patógeno y la muerte de



la planta. Sin embargo en base a los resultados encontrados, se recomienda volver a evaluar la especie *T. koningiopsis* (TB2) y *T. asperellum* (SIN1), incrementando la dosis y realizando la aplicación días antes de la inoculación del fitopatógeno.

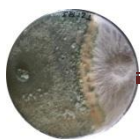


CAPITULO V. MANEJO DE LA PUDRICIÓN RADICULAR DEL FRIJOL EJOTERO EN CAMPO, EN EL ESTADO DE MORELOS

1.1 INTRODUCCIÓN

La pudrición radicular del frijol ejotero es una enfermedad grave y genera pérdidas económicas considerables, aunque éstas son variables entre diferentes predios durante el mismo periodo de crecimiento y en el mismo predio en diferentes años (Abawi *et al.*, 1985). Entre los hongos causantes se encuentran una diversidad de especies de *Fusarium* (Guzmán *et al.*, 2004; Montiel *et al.*, 2005), *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* (Garibaldi *et al.*, 2013; Songvilay *et al.*, 2013), *Pythium* (Nzungize *et al.*, 2011; Buruchara *et al.*, 2007), entre los más importantes.

El objetivo de un buen manejo de las enfermedades de las plantas es reducir el daño económico causado por éstas, y es fundamental anticipar la ocurrencia de la enfermedad y atacar los eslabones débiles de la cadena de infección (Maloy, 2005). Los fungicidas son a menudo una parte vital del manejo de las enfermedades dado que controlan satisfactoriamente muchas de éstas, y debido a que no están disponibles o no están aceptados en el mercado cultivares resistentes, y además ciertos cultivos de alto valor tienen una muy baja tolerancia a síntomas de la enfermedad (McGrath, 2004). Para mantener la calidad y competitividad en nuestro sistema de producción de alimentos los agentes de control biológico juegan un papel importante en el Manejo Integrado de Enfermedades y proveen una atractiva opción para la agricultura sustentable (Pal y Gardener, 2006). Se ha demostrado ampliamente la actividad antagónica de *Bacillus subtilis* (Zhang *et al.*, 2009; Dawar *et al.*, 2010) y *Trichoderma* spp. (Harman *et al.*, 2004), contra hongos fitopatógenos causantes de pudriciones radiculares en



diversos cultivos, además de presentar compatibilidad con varios fungicidas (Jacobsen *et al.*, 2004; Mohiddin y Khan, 2013).

1.2 OBJETIVOS E HIPÓTESIS

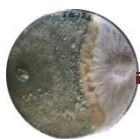
1.2.1 Objetivos

- ❖ Comparar el rendimiento de dos genotipos de frijol ejotero bajo condiciones de campo donde se presentan problemas de pudrición radicular
- ❖ Evaluar alternativas de manejo químico y biológico de los agentes causantes de la pudrición radicular del frijol
- ❖ Comparar la eficacia de productos químicos y biológicos para el manejo de la pudrición radicular
- ❖ Determinar la estructura de costos y rentabilidad de los tratamientos mediante un análisis económico

1.2.2 Hipótesis

- ❖ Los dos genotipos a evaluar producen rendimientos similares bajo condiciones de campo
- ❖ Los tratamientos químicos y biológicos evaluados son eficaces para el manejo de la pudrición radicular del frijol ejotero
- ❖ Los grupos de tratamientos químicos y biológicos generan rendimientos similares
- ❖ Los costos asociados en la utilización de productos químicos y biológicos para el manejo de la pudrición radicular del frijol ejotero, son similares

1.3 MATERIALES Y MÉTODOS



1.3.1 Área de estudio

El ensayo en campo se llevó a cabo en un predio de riego en la comunidad de Telixtac, municipio de Axochiapan, Morelos, ubicado entre los paralelos 18° 34' 15.07" N y 98° 46' 28.98" W (Google Earth, 2015). El municipio de Axochiapan se caracteriza por tener un clima cálido Aw_0 (w), Aw_1 (w), con temperatura media anual entre 22 y 26°C, temperatura media del mes más caliente mayor de 18°C, las lluvias son de verano (de mayo a octubre), con invierno seco (menos del 5% de la precipitación total anual) (García, 2004). El tipo de suelo en los terrenos agrícolas en el poblado de Telixtac es una combinación de regosol éutrico - vertisol pélico con textura media (Guerrero, 1993).

1.3.2 Material vegetal

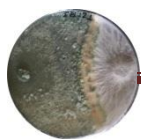
En este ensayo se utilizaron las variedades de frijol ejotero "Strike" y "Palma". Las semillas se sembraron en el talud del surco con ayuda de una estaca de madera, depositando dos semillas por golpe, a una distancia aproximadamente de 9 cm entre matas.

1.3.3 Tratamientos

Se evaluaron varios fungicidas con diferentes mecanismos de acción, solos y en mezcla, además dos productos biológicos comerciales (*Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis*), (Cuadro 11). Los fungicidas solos y mezclados fueron aplicados dos veces, a los 14 y 21 días después de la siembra (dds) y la semilla sin ser tratada con algún fungicida, a excepción del tratamiento 6 con Cruiser Maxx Beans.

1.3.4 Aplicación de los tratamientos

Se realizaron dos aplicaciones con una aspersora de mochila de 20 L, en drench a la base del tallo, asegurándose que hubiera buena humedad.



Cuadro 11. Fungicidas químicos, biofungicidas y dosis, evaluados en campo

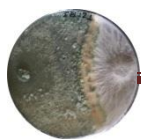
Trat	Fungicida (s)	Nombre comercial (®)	Dosis ha ⁻¹	Modo de acción (FRAC, 2014)
1	Polyoxin-D, sal de zinc	ENDORSE	0.7 kg	H4
2	Tiabendazol	TECTO 60	1.0 kg	B1
3	Piraclostrobin	HEADLINE	0.5 L	C3
4	Procloraz	SPORTAK	1.5 L	G1
5	Iprodiona	ROVRAL 50PH	2.0 kg	E3
6	Fludioxonil Metalaxil M Thiametoxam	+ CRUISER MAXX + BEANS	75 mL (100 kg semilla)	E2 + A1 + insecticida
7	Fludioxinil + ciprodinil	SWITCH	0.8 kg	E2 + D1
8	<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma</i>	PROBAC + T22	2.0 L + 2.0 kg	F6 + biológico
9	Fluxapyrosad piraclostrobin	+ MERIVON	0.5 L	C2 + C3
10	HEADLINE SPORTAK	+ -----	0.5 L + 1.5 L	-----
11	SWITCH HEADLINE	+ -----	0.8 kg + 0.5 L	-----
12	TECTO 60 + SWITCH	-----	1.0 kg + 0.8 kg	-----
13	ROVRAL + TECTO 60	-----	2.0 kg + 1.0 kg	-----
14	Testigo	Sin tratamiento	-----	

A1: ARN polimerasa; B1: ensamble de β -tubulina en la mitosis; C3: inhibidores del complejo III citocromo bc1; C2: inhibición del complejo II succinato dehidrogenasa; D1: biosíntesis de metionina; E1, E3: transducción de señal osmótica; F6: microbios disruptores de membranas; G1: C14-demetilasa en la biosíntesis de esterol; H4: quitin sintasa.

1.3.5 Manejo agronómico del cultivo

Preparación del terreno. En un terreno infestado de forma natural con los agentes causantes de la pudrición radicular del frijol ejotero, el cual se preparó de forma convencional con un barbecho, rastreo y surcado, este último a una distancia de 0.70 m entre surcos (Figura 29).

Siembra. Se dio un riego (por gravedad) previo a la siembra, para obtener las condiciones adecuadas de humedad del suelo. Al día siguiente, se procedió a sembrar en el talud del surco



con ayuda de una estaca de madera, depositando dos semillas por golpe a una profundidad aproximada de 2 cm y a una distancia de 9 cm entre matas, aproximadamente.

Riegos. El agua de riego fue extraída de pozo profundo. Se aplicaron riegos por gravedad según las condiciones del suelo (8 riegos durante el ciclo de cultivo).

Fertilización edáfica. Se aplicó al fondo del surco, posteriormente se cubrió con un paso de arado con tracción animal. Se usaron como fuentes sulfato de amonio, cloruro de potasio y DAP (18-46-00), obteniendo un tratamiento de fertilización de 100-80-40.

Control de plagas. Se realizaron aplicaciones de insecticidas para el control de plagas del follaje (Cuadro 12).

Cuadro 12. Plaguicidas aplicados para el control de plagas del follaje

Nombre comercial	Ingrediente activo	Dosis ha ⁻¹	Plaga	Aplicación (dds)
Muaralla Max	imidacloprid+ betacyflutrin	250 mL	Mosca blanca	15 y 34
Movento	spirotetramat	500 mL	Mosca blanca	40
Plenum	pymetrozine	200 g	Mosca blanca	20 y 28

1.3.6 Diseño experimental

Los tratamientos se distribuyeron en un diseño de parcelas divididas, en el cual las parcelas grandes correspondientes a los genotipos, se arreglaron en bloques completos al azar, y en las parcelas chicas se aplicaron los fungicidas y fueron arregladas completamente al azar (Figura 30). La unidad experimental constó de 4 surcos de 0.70 m de ancho por 8.5 m de largo. Los surcos externos se utilizaron para evaluar la severidad de la enfermedad, en los surcos centrales se evaluó a los componentes del rendimiento.

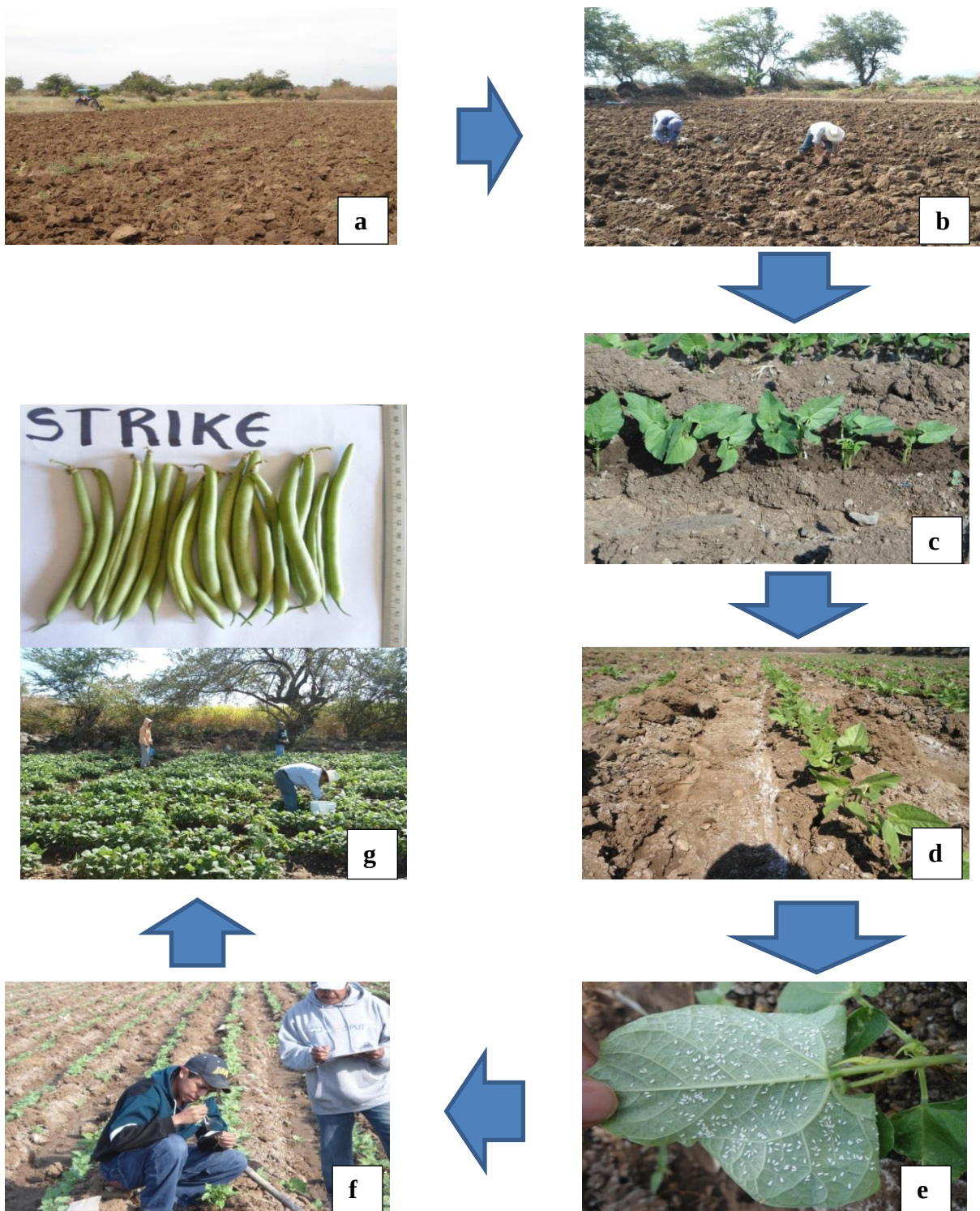
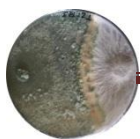


Figura 29. Actividades realizadas en el ensayo en campo. **a**, preparación del terreno; **b**, siembra directa; **c**, aplicación de los tratamientos en drench; **d**, fertilización; **e**, control de plagas; **f**, evaluación de la severidad de la enfermedad; **g**, cosecha y evaluación de las variables de rendimiento.

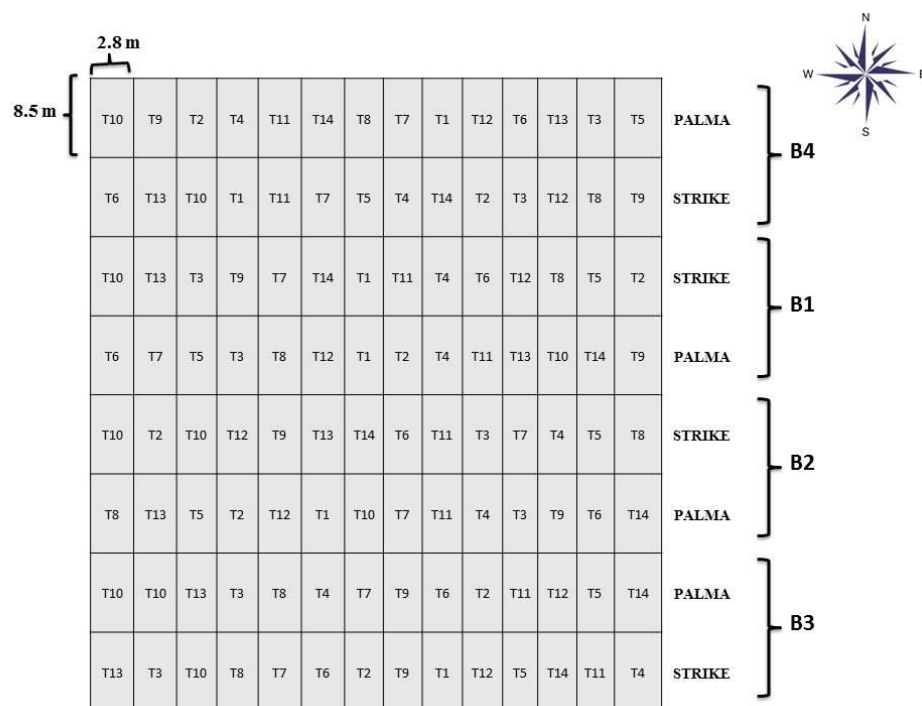
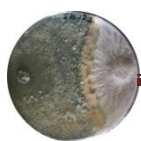


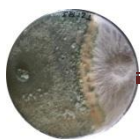
Figura 30. Diseño experimental en campo

1.3.7 Variables estudiadas

Se evaluaron las siguientes variables:

1) Severidad de la enfermedad y Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE). Se realizaron cuatro mediciones en intervalos iguales, calculada con la escala propuesta por Schneider y Kelly (2000) (Cuadro 13), evaluado mediante muestreo destructivo. Se tomaron 10 plantas en cada fecha de evaluación (en los surcos de cada extremo), sin afectar la densidad de plantas del centro de la parcela útil para evaluar el rendimiento de ejote. El cálculo del porcentaje de severidad se realizó mediante la fórmula propuesta por Townsend y Heuberger (1943):

$$S = \frac{\sum nv}{NV} * 100$$



Dónde: n , grado de severidad según la escala; v , número de plantas por categoría; V , total de plantas evaluadas; N , valor numérico de la categoría más alta.

Posteriormente, tomando en cuenta las cuatro evaluaciones, se calculó el ABCPE con la siguiente fórmula (Pedroza y Samaniego, 2009):

$$ABCPE = \sum_i \frac{Y_i + Y_{i+1}}{2} \times (t_{i+1} - t_i)$$

Dónde, Y_i es la severidad de la enfermedad, y t es el período de evaluación en días después de la siembra.

2) Rendimiento de ejote. Se calculó en la etapa R8 (llenado de vaina) (Schoonhoven y Pastor, 1987). Se cosecharon las plantas de un surco central (4.25 m lineales). Se midieron los siguientes parámetros: longitud de 10 vainas, peso medio de 10 vainas, y rendimiento de ejote por calidad, de acuerdo a la NMX-FF-019-1982 (SEMARNAT, 2012) extrapolado por hectárea.

3) Eficacia de los fungicidas. La eficacia fue calculada con la fórmula de Abbott (1925):

$$Ef (\%) = \frac{X - Y}{X} \times 100$$

Dónde; X , severidad de la enfermedad en el control; y Y , severidad de la enfermedad en el tratamiento.

4) Rentabilidad de los tratamientos. Se realizó el análisis de los costos de producción para cada tratamiento, calculando los costos totales, ingreso neto y ganancia por peso invertido. Se calcularon para los análisis individuales y combinados, solo tomando en cuenta el rendimiento de ejote de primera calidad.



Cuadro 13. Escala de evaluación de la pudrición radicular propuesta por Schneider y Kelly (2000).

Categoría	Descripción
1	Sistema radicular sano sin descoloración del tejido radicular o hipocotilo, sin reducción en la masa radicular.
2	Apariencia de pequeñas lesiones café rojizas, de 0.1-.02 cm de largo, en la base del hipocotilo, con apariencia normal de la masa radicular.
3	Incremento en la intensidad y tamaño de las lesiones localizadas raíz/hipocotilo, coalesciendo en anillado de 180° en el tallo, con lesiones de 0.5-1.0 cm y 10% a 20% de descoloración de las raíces pero sin reducción en el tamaño de la masa radicular.
4	Incremento en la intensidad de descoloración y el tamaño de las lesiones en el hipocotilo, con lesiones que se pueden llegar a extenderse y anillar completamente el tallo; 5% a 10% en la reducción de la masa radicular con 95% de raíces descoloridas.
5	Lesiones del hipocotilo cada vez más descoloridas y extendidas. 100% de las raíces café-rojizas con un 20% a 50% en reducción de la masa radicular.
6	Lesiones del hipocotilo anillando el tallo llegan a ser más extendidas (2 cm), masa radicular intensamente descolorida y reducida del 50% al 80%.
7	Hipocotilo hueco con lesiones muy extendidas. La más radicular es reducida del 80% al 100% y está funcionalmente muerta.

Costo total de la producción (CT): incluye todos los gastos del proceso de producción desde la renta y preparación del terreno hasta la venta del producto.

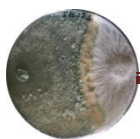
Ingreso Total (IT): es el capital obtenido por la venta del producto, tomando en cuenta el rendimiento y precio del producto al momento de la venta. Se calcula como sigue:

$$IT = Py * Y$$

Dónde: IT, ingreso total; Py, precio del producto por unidad; Y, rendimiento por hectárea.

Ingreso Neto (IN): es la ganancia obtenida una vez deducidos los costos de producción. Se calcula como sigue:

$$IN = IT - CT$$



Dónde: IN, ingreso neto; IT, ingreso total; CT=costo total de la producción.

Ganancia por Peso Invertido (GPI): es la rentabilidad en relación con la inversión realizada.

Se calcula como sigue:

$$GPI = IN/CT$$

Dónde: GPI, ganancia por peso invertido; IN, ingreso neto; CT, costo total de producción.

1.3.8 Análisis estadístico

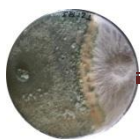
Los datos obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza individuales para cada genotipo como un diseño en bloques completos al azar y análisis combinado para los dos genotipos como un diseño en parcelas divididas, así como mediante pruebas de comparaciones múltiples de medias con el método de Tukey a un nivel de significancia al 5%. Así mismo, se realizaron contrastes entre grupos de tratamientos y un análisis de correlación entre la severidad de la enfermedad y el rendimiento. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SAS (SAS, 2014).

1.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.4.1 Severidad de la enfermedad y Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE)

Los resultados de los análisis de varianza, las comparaciones múltiples de medias, los contrastes de la severidad de la enfermedad, y la correlación con el rendimiento para cada evaluación, se encuentran en los cuadros 1-A al 8-A del apéndice.

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas en los análisis individuales y para los fungicidas en los análisis combinados pero no para las variedades en ninguna fecha de evaluación. La comparación múltiple de medias de Tukey formó varios grupos. En los análisis individuales, para la variedad Palma no hubo diferencia estadística en la aplicación de



fungicidas, aun así, los que presentaron mayor severidad fueron Edorse, Tecto, Probac+T22 y Headline+Sportak (40.00, 40.35, 40.35 y 41.42 % respectivamente) (Cuadro 14 y Figura 31).

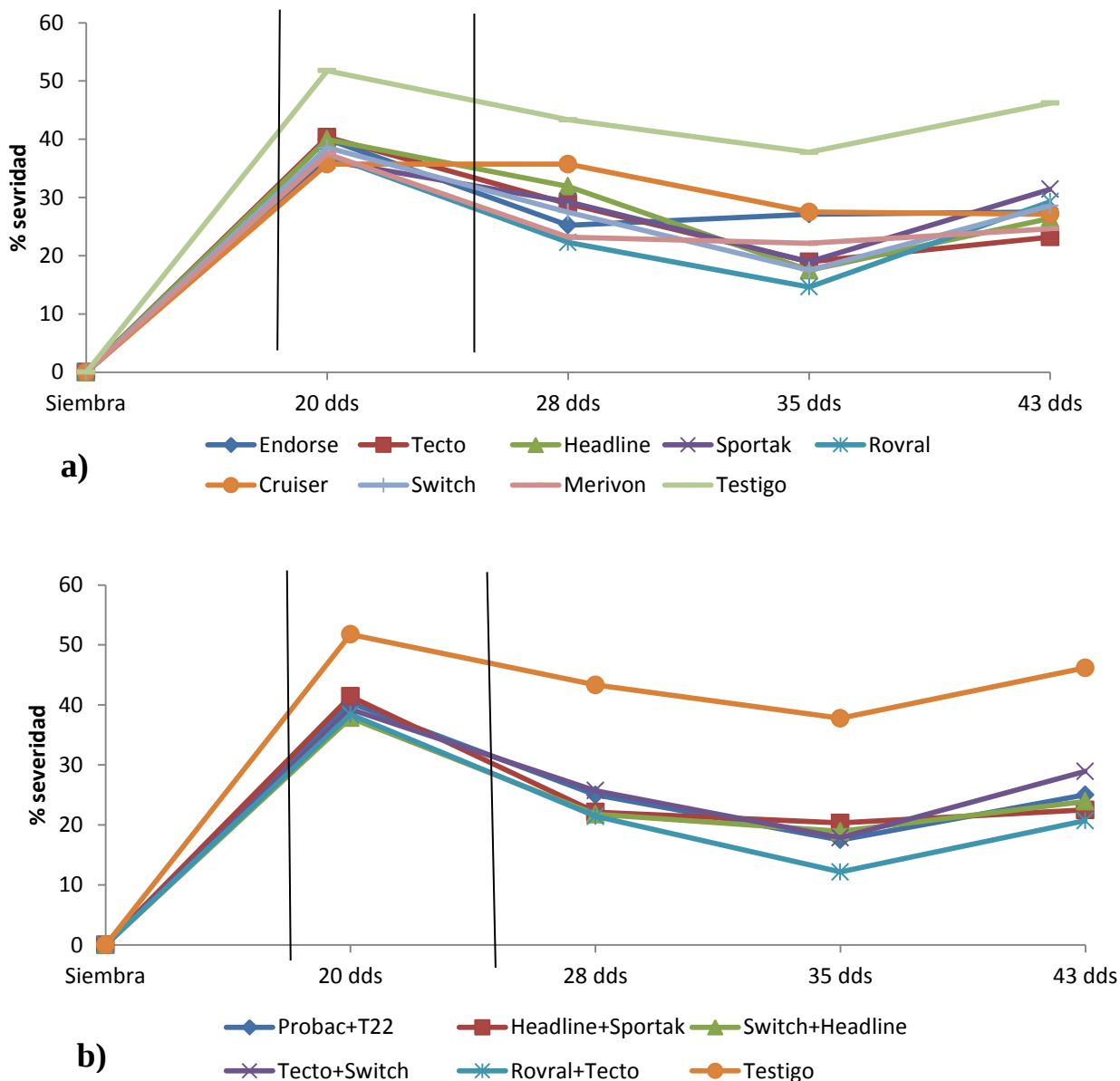


Figura 31. Severidades de la variedad Palma. a) Fungicidas solos, b) fungicidas mezclados. Las líneas negras son las aplicaciones de los fungicidas, a los 14 y 21 dds, respectivamente.

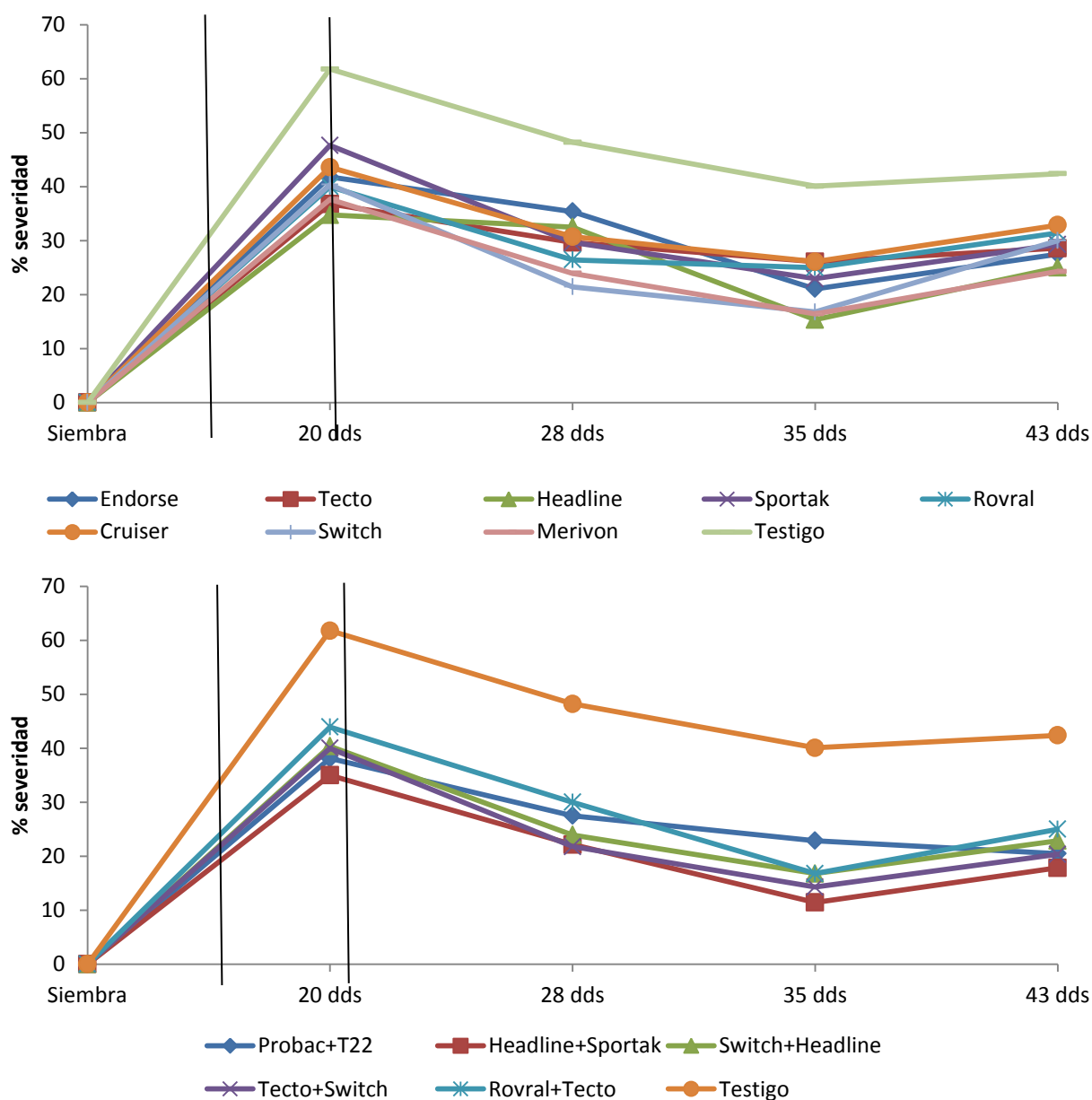
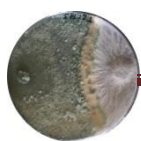
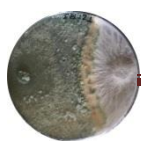


Figura 32. Severidades de la variedad Strike. a) Fungicidas solos, b) fungicidas mezclados. Las líneas negras son las aplicaciones de los fungicidas, a los 14 y 21 dds, respectivamente.

La aplicación de Crusier (Cruiser Maxx Beans) a la semilla antes de la siembra no presentó diferencia estadística en la primera evaluación, sin embargo, a partir de la tercera evaluación este tratamiento fue uno de los que presentó mayor severidad ($P=0.0001$), debido a que



posiblemente solo protege en las etapas tempranas de desarrollo de las plántulas, siendo susceptible a los hongos causantes de la pudrición radicular en el desarrollo de la raíz.

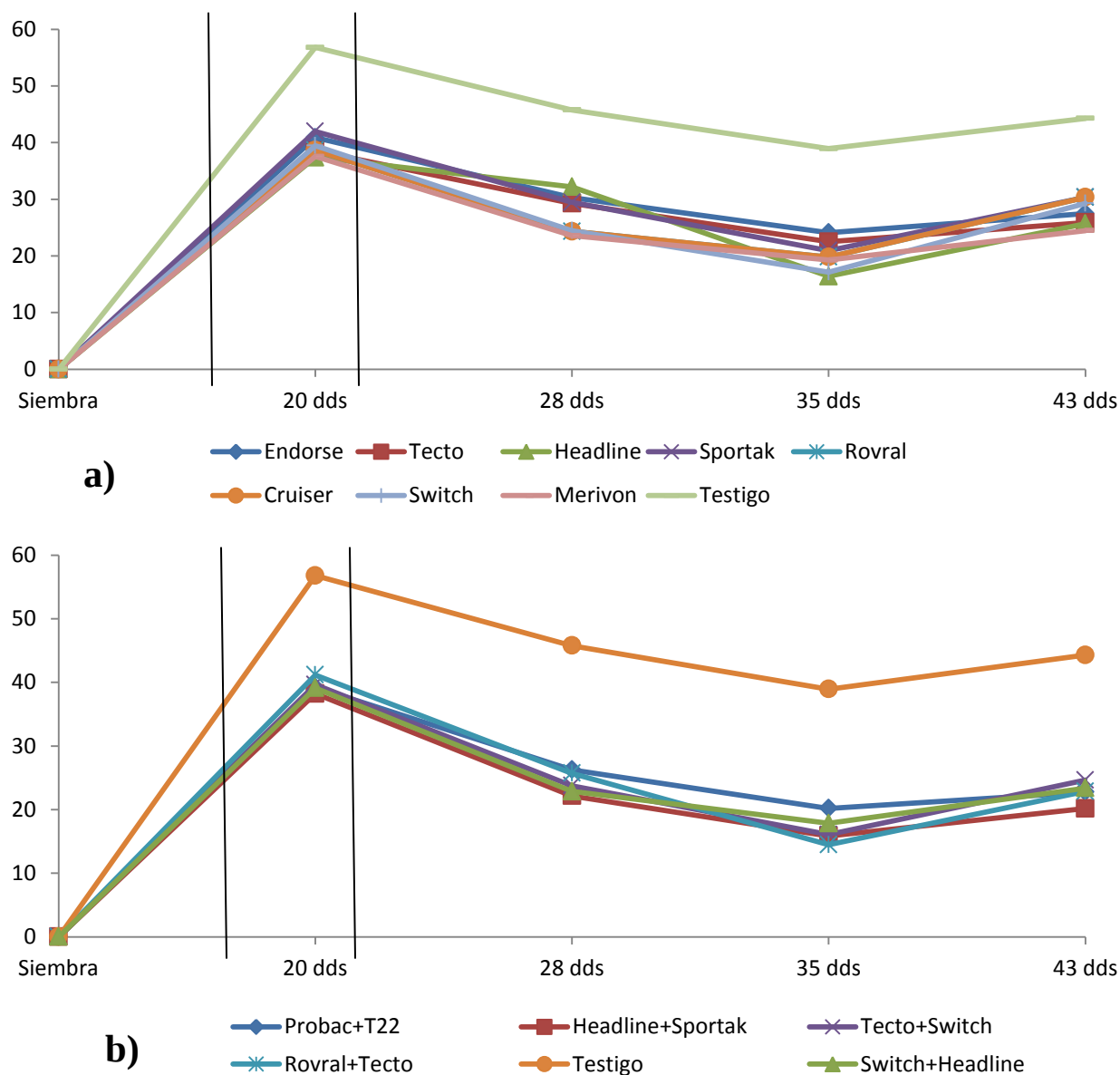


Figura 33. Severidades en el análisis combinado a través de los fungicidas. a) Fungicidas solos, b) fungicidas mezclados. Las líneas negras son las aplicaciones de los fungicidas, a los 14 y 21 dds, respectivamente.

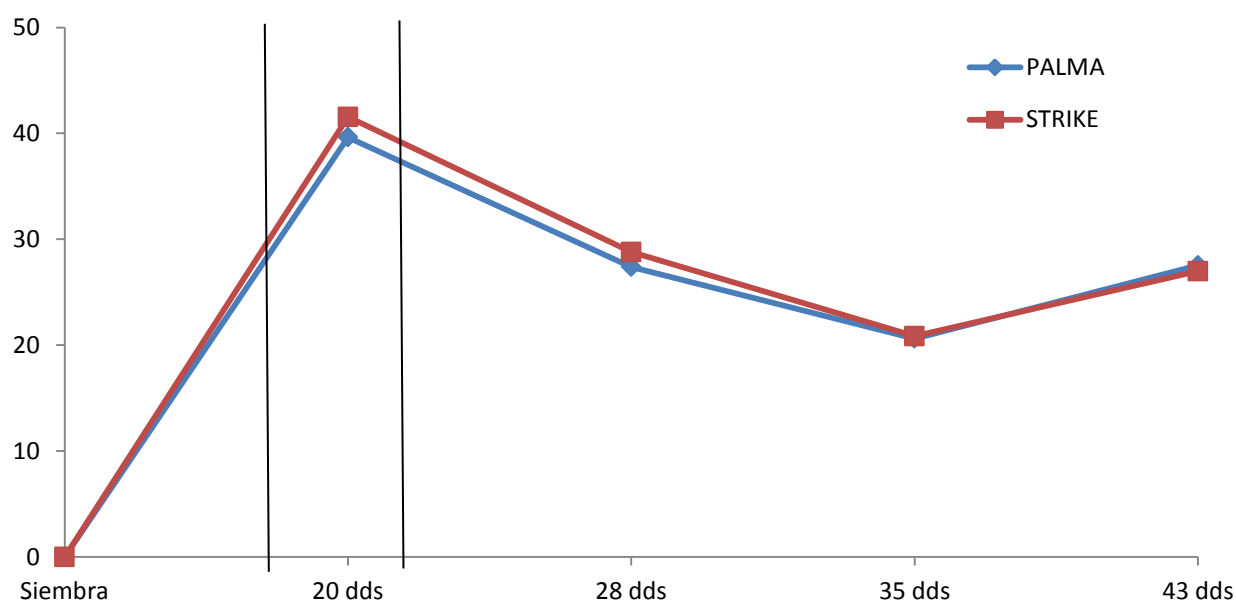
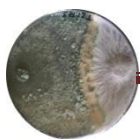
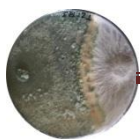


Figura 34. Severidades en el análisis combinado a través de las variedades. Las líneas negras son las aplicaciones de los fungicidas, a los 14 y 21 dds, respectivamente.

En cuanto a la variedad Strike, en las primeras tres evaluaciones solamente se observaron diferencias estadísticas contra el testigo, mientras que en la aplicación de fungicidas se observó diferencias en la última evaluación, siendo Headline+Sportak el tratamiento con menor severidad (17.85 %) y Cruiser con mayor severidad (32.85 %). (Figura 32 y cuadro 14). En el análisis combinado a través de los fungicidas (Figura 33), se observaron diferencias significativas, siendo las mezclas las que presentaron las menores severidades. Desde la tercer evaluación se observa la diferencia en severidad de los fungicidas aplicados, siendo el mejor Headline+Sportak con una severidad de 20.17 % en la última evaluación. La aplicación de Probac+T22 (*Bacillus subtilis*+*Trichoderma harzianum*) no presentó diferencias significativas con los demás fungicidas en todas las evaluaciones, sin embargo en base a la última evaluación, se obtuvo menor severidad (22.74 %) que todos los fungicidas aplicados solos y la

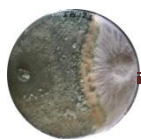


mezclas de Switch+Headline y Tecto+Switch, por lo que es una opción alternativa con un enfoque integrado para el manejo de la pudrición radicular del frijol ejotero.

En el análisis combinado a través de las variedades (Figura 34), no se presentaron diferencias significativas en ninguna fecha de evaluación (Cuadro 14), respondiendo de forma similar ante el ataque de los hongos causantes de la pudrición radicular, donde la mayor severidad alcanzada fue de 27.53 % con la variedad Palma en la última evaluación. En general en los análisis solos y combinados, se observa una disminución de las severidades en todos los tratamiento a los 7 días después de la segunda aplicación, alcanzando el máximo a los 14 días después de la segunda aplicación, posteriormente las severidades tienden a incrementarse hacia los 22 días después de la segunda aplicación.

Según los resultados del ABCPE en los diferentes análisis individuales y combinados (Cuadro 14), indica claramente que los mejores tratamientos que disminuyeron las severidades fueron los fungicidas mezclados, destacando Rovral+Tecto y Headline+Sportak, mismos que resultaron con las mejores eficacias en condiciones de invernadero, a excepción de Sportak (Capítulo IV). En cuanto la respuesta de la variedad utilizada, respondieron a la severidad de manera similar, siendo ligeramente más resistente la variedad Palma; sin embargo, también debe tomarse en cuenta el efecto de las variedades en el rendimiento de ejote.

Desde otra perspectiva, podrían estar interactuando otros fitopatógenos no estudiados en la presente investigación, incrementando la velocidad de infección o severidad de la enfermedad en condiciones de campo. Se ha demostrado la interacción de *Rhizoctonia* con *Meloidogyne incognita* en frijol ejotero, incrementando la severidad de la enfermedad (Al-Azmi y Al-Nadary, 2015), así como en cultivos de tomate, chile, papa y okra (Chahal y Chhabra, 1984; Abusar, 2013; Safiuddin *et al.*, 2014), debido a cambios fisiológicos y anatómicos en los



tejidos de las raíces predisponiendo las plantas a las infección por hongos; por lo tanto, es conveniente realizar estudios de la interacción de los hongos asociados a la pudrición radicular del frijol ejotero con nematodos que podrían afectar al cultivo.

Cuadro 14. Análisis de varianza individuales y combinado del ABCPE (% días).

Tratamiento	Individuales		Combinado	
	Palma	Strike	Variedad	Fungicidas
Endorse	662.8 bc	700.4 b	Palma	628.8 a 681.6 bc
Tecto	613.2 bc	679.3 b	Strike	646.6 a 646.2 bc
Headline	636.2 bc	598.0 b	DSH	127.1 617.1 bc
Sportak	632.7 bc	702.1 b		667.4 bc
Rovral	543.3 bc	671.4 b		607.4 bc
Cruiser	725.5 b	731.6 b		728.6 b
Switch	606.1 bc	568.0 b		587.1 bc
Probac+T22	580.1 bc	612.0 b		596.1 bc
Merivon	588.8 bc	550.3 b		569.5 bc
Headline+Sportak	574.2 bc	463.2 b		557.5 c
Switch+Headline	552.5 bc	558.2 b		555.4 c
Tecto+Switch	599.7 bc	512.0 b		555.8 c
Rovral+Tecto	488.3 c	626.6 b		557.5 c
Testigo	1000.2 a	1078.9 a		1039.6 a
DSH	184.5	285.9		164.9

1.4.2 Rendimiento de ejote

1.4.2.1 Calidad primera

Para el rendimiento de ejote de primera calidad en el primer corte, se observan diferencias estadísticas diferentes para la variedad Palma en los análisis individuales ($P=0.0741$) y para los tratamientos en los combinados ($P=0.0943$), mientras que altamente significativas para la variedad en el análisis combinado ($P=0.0083$). Para la variedad Strike, el análisis de varianza, correlación y contrastes no presentaron significancia.

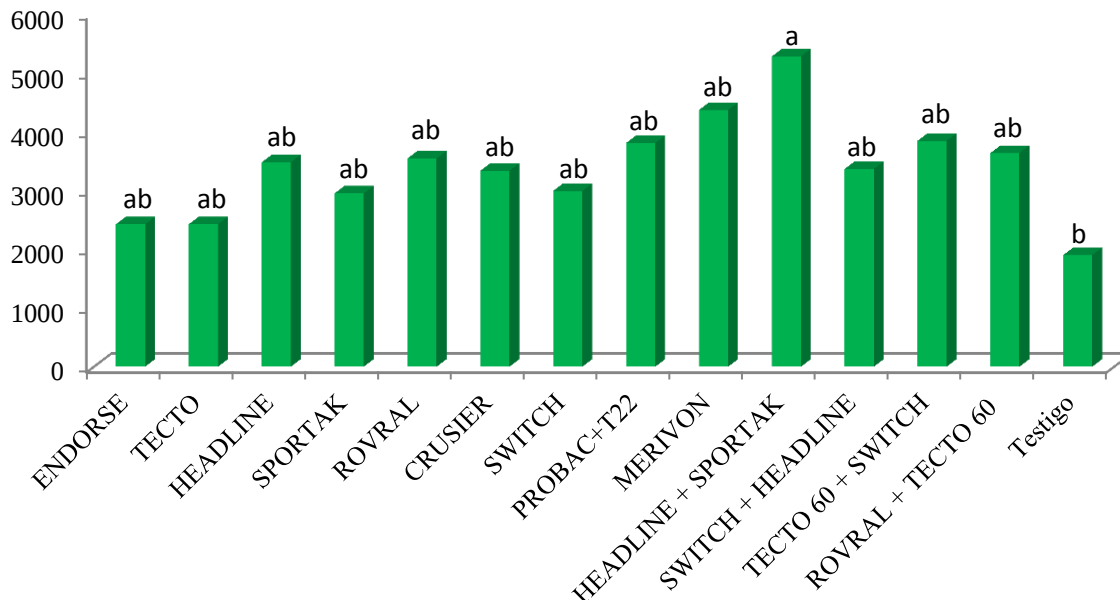
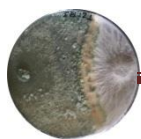
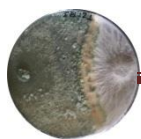


Figura 35. Rendimiento de ejote de primera calidad en el primer corte para el análisis individual de la variedad Palma.

Para la variedad Palma, la comparación múltiple de medias separó en 3 grupos los tratamientos, siendo el mejor la mezcla de Headline+Sportak ($5,274.6 \text{ kg ha}^{-1}$) y no mostrando diferencias significativas los demás tratamientos a excepción del testigo (Figura 35).

El análisis individual de contrastes para la variedad Palma presentó diferencias altamente significativas en la comparación de la aplicación de cualquier tratamiento ($P=0.0125$) o los fungicidas sin mezclar ($P=0.0277$) con el testigo, siendo recomendable la aplicación de algún tratamiento; mientras que la comparación de los fungicidas sin mezclar contra los biológicos y las mezclas no mostraron significancia.

Mientras tanto, el análisis de correlación del rendimiento con la severidad no fue significativa, a excepción de la segunda evaluación de la severidad ($P=0.0179$), mostrando ligera correlación (-0.31) inversamente proporcional; es decir, al incrementarse la severidad de la



enfermedad disminuye el rendimiento de ejote. Para las demás evaluaciones aunque no fueron significativas, también existe una ligera correlación. Conner *et al.* (2014) demostró que *Rhizoctonia solani* afecta la emergencia pero no afecta el rendimiento de frijol común, así mismo la compactación del suelo, pobre drenaje y la baja fertilidad no mostraron diferencias en el rendimiento de frijol común.

Para la variedad Strike aunque no se detectó diferencias significativas en el análisis de varianza ($P=0.5146$), el tratamiento con mayor rendimiento fue, como en la variedad Palma, la mezcla de Headline+Sportak ($3,866.3 \text{ kg ha}^{-1}$). Los menores rendimientos se obtuvieron con Tecto, la mezcla de biológicos y el testigo.

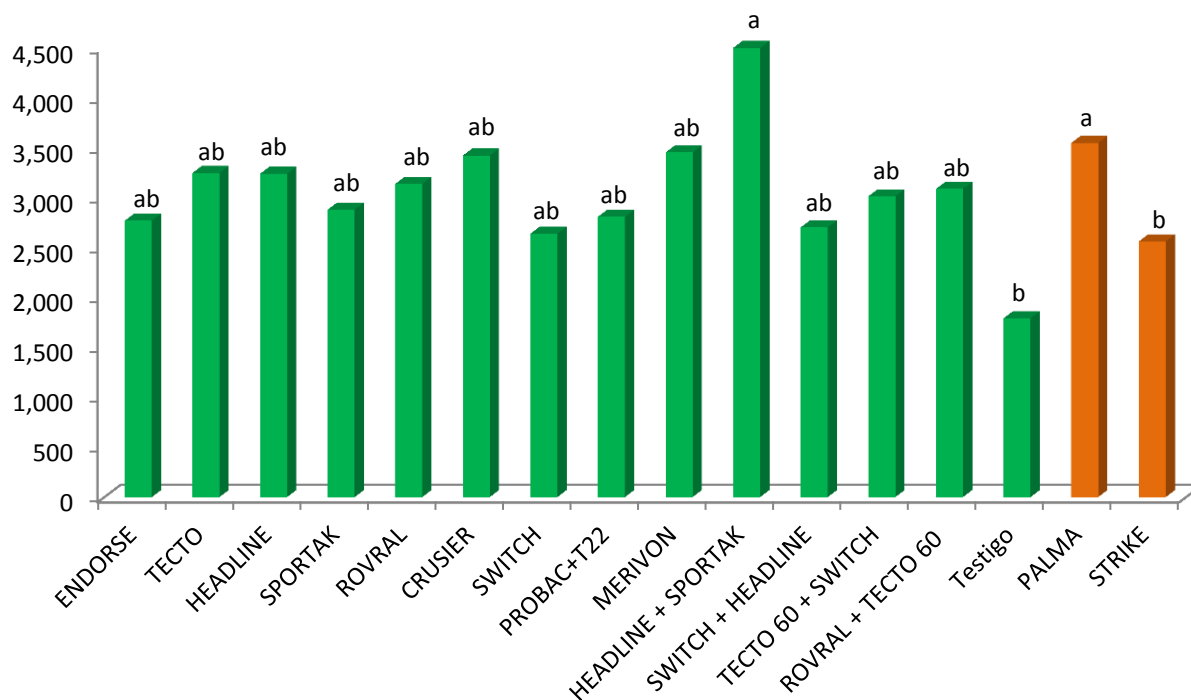
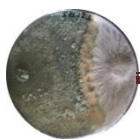


Figura 36. Rendimiento de ejote de primera calidad del primer corte del análisis combinado a través de los fungicidas y variedades.



Los análisis de contrastes y correlación no mostraron diferencias significativas para la variedad Strike; por lo tanto, la severidad de la enfermedad no está relacionada con el rendimiento para este caso.

Por último en el análisis combinado, se observaron diferencias altamente significativas ($P=0.0083$) y significativas ($P=0.0943$) para variedad y fungicidas, respectivamente.

Igualmente que en el análisis individual, la mezcla Headline+Sportak resultó ser la de mayor rendimiento ($4,570.4 \text{ kg ha}^{-1}$), así mismo la variedad Palma fue mejor que Strike, con una diferencia de 986 kg ha^{-1} . Los contrastes solo mostraron diferencia altamente significativa al comparar cualquier tratamiento ($P=0.0069$) y los fungicidas sin mezclar ($P=0.0109$) contra el testigo (Figura 36).

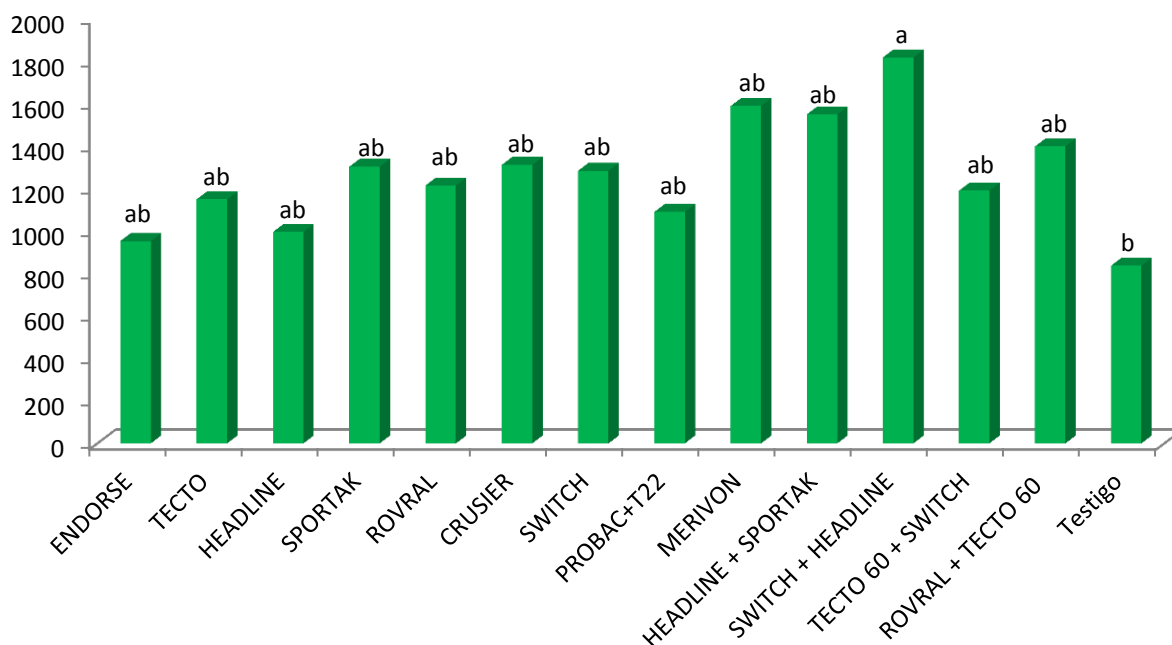
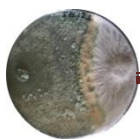


Figura 37. Rendimiento de ejote de primera calidad en el segundo corte para la variedad Palma



En el segundo corte, en los análisis individuales solamente se observaron diferencias significativas en la variedad Palma ($P=0.0404$), mientras que en los combinados fue altamente significativa para los tratamientos ($P=0.0056$).

En base a la comparación múltiple de medias (Tukey, $\alpha=0.05$) para la variedad Palma, la mezcla de Swith+Headline fue la mejor, con un rendimiento medio de $1,816.7 \text{ kg ha}^{-1}$; mientras que la aplicación de cualquier otro fungicida no mostró diferencias significativas entre sí (Figura 37). En base al análisis de contrastes, la aplicación promedio de los tratamiento ($P=0.0217$) o de fungicidas sin mezclar ($P=0.0550$) fue mejor que el testigo, además la aplicación en mezcla de fungicidas químicos se obtuvo mayor rendimiento que la aplicación sin mezclas ($P=0.0249$). Aunque no hubo diferencias significativas en el contraste de los biológicos contra los fungicidas solos ($P=0.4953$), la mezcla de los biológicos (Probac+T22) presentó mayor rendimiento que Endorse y Headline.

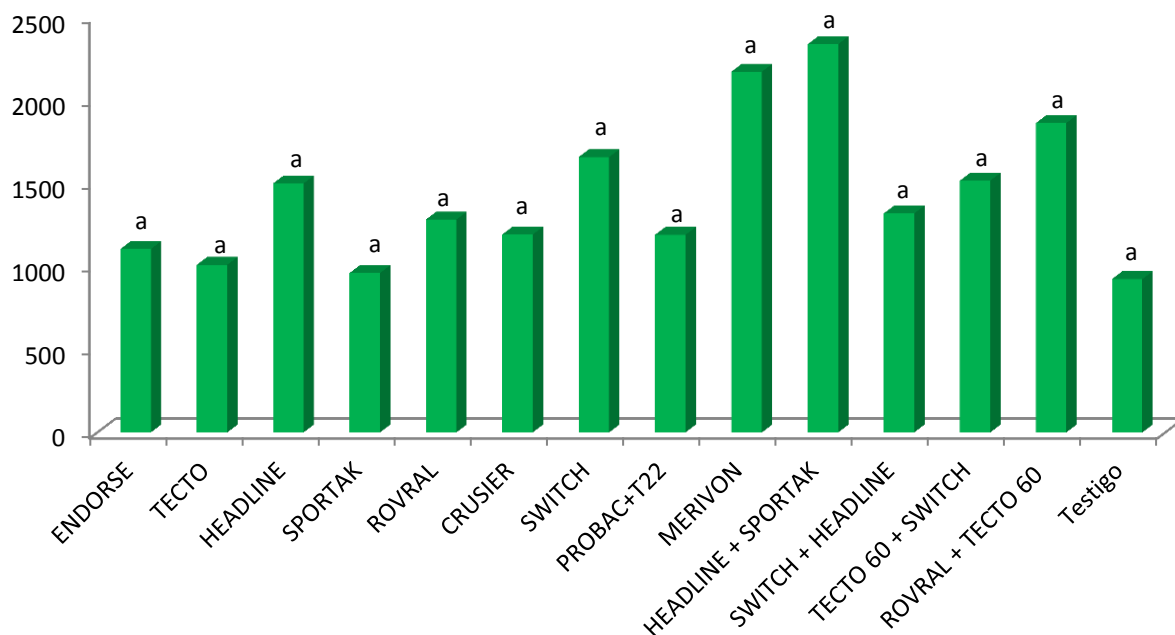
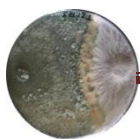


Figura 38. Rendimiento de ejote de primera calidad en el segundo corte de la variedad Strike.



Para la variedad Strike no se observaron diferencias significativas ($P=0.1278$), sin embargo los mayores rendimientos se obtuvieron con Headline+Sportak y Merivon con 2,338.7 y 2,171.9 kg ha^{-1} , respectivamente; y el testigo fue el menor con 923.7 kg ha^{-1} (Figura 38).

En los análisis combinados, la comparación múltiple de medias mostró que los mejores rendimientos se obtuvieron con Merivon y Headline+Sportak (1,880.2 y 1,943.7 kg ha^{-1} , respectivamente). En el análisis a través de las variedades, no se encontraron diferencias significativas, aun así, con la variedad Palma se obtuvieron 168.7 kg ha^{-1} más que la Strike (Figura 39).

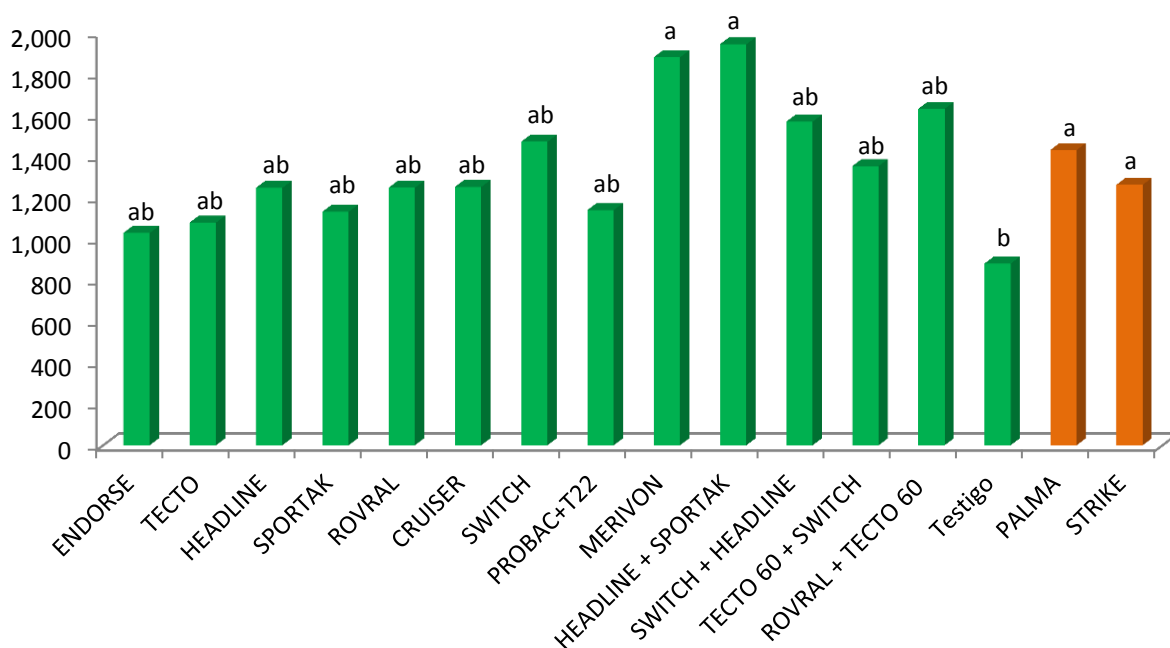
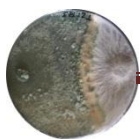


Figura 39. Rendimiento de ejote de primera calidad en el segundo corte en los análisis combinados

Los análisis de contrastes sugieren que es recomendable la aplicación de los fungicidas en mezcla, en comparación con los fungicidas solos ($P=0.0076$), puesto que se obtuvieron mayores rendimientos al comparar los grupos. La mezcla de los biológicos obtuvo los menores



rendimientos, a la par con Endorse, Tecto y Sportak. Por otra parte, se observó una ligera correlación inversamente proporcional con la severidad de la enfermedad en todas las evaluaciones, siendo mayor en las dos últimas (-0.27 , $P=0.0029$ y -0.30 , $P=0.0012$).

1.4.2.2 Calidad segunda

El análisis de varianza para el rendimiento de segunda calidad para el primer y segundo corte no mostró diferencias significativas en los análisis individuales ni combinados; por lo tanto, no existe correlación entre la severidad de la enfermedad y producción de ejote de calidad no comercializable. Sin embargo, tomando en cuenta la producción de los dos cortes, se observó que Headline+Sportak y la variedad Palma produjeron mayor cantidad de ejote de la calidad en cuestión, esto puede estar relacionado con el rendimiento en general, puesto que fueron los tratamientos con mayor producción de ejote de primera calidad.

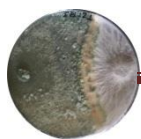
Además, la producción de esta calidad puede deberse a otros factores, como la temperatura y plagas que se alimentan de la vaina. Además, la producción de esta calidad puede deberse a otros factores, como la temperatura y plagas que se alimentan de la vaina.

1.4.3 Peso de vainas y longitud de vainas

Estas dos variables no mostraron diferencias significativas en los análisis individuales y combinados, puesto que ambas variedades generan vainas de 12.08 cm de longitud media, las cuales se clasifican en la categoría C en tamaño (SEMARNAT, 2012). Por otra parte, el peso medio por vaina fue 4.28 g sin haber diferencias significativas entre las variedades evaluadas.

1.4.4 Eficacia de los fungicidas

Se observaron diferencias altamente significativas para todas las evaluaciones en los análisis individuales y combinados, excepto para las variedades en los análisis combinados.



En la primera evaluación para el análisis individual ($P=0.0001$ y $P=0.0006$, para Palma y Strike, respectivamente), en general se obtuvieron mejores eficacias con la variedad Strike, siendo los mejores Headline y Headline+Sportak (41.97 y 41.26%, respectivamente), mientras que para Palma fueron Cruiser y Sportak con 30.01 y 27.99%, respectivamente. (Figura 40). Esto puede deberse al grado de resistencia de los genotipos de frijol, puesto que se han observado diferencias en la severidad de la enfermedad en frijol atacado por *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*, así como la etapa fenológica de la planta y la competencia entre los hongos fitopatógenos para invadir los tejidos del hospedante (Rodríguez *et al.*, 1995; Navarrete y Acosta, 1999; Navarrete *et al.*, 2009).

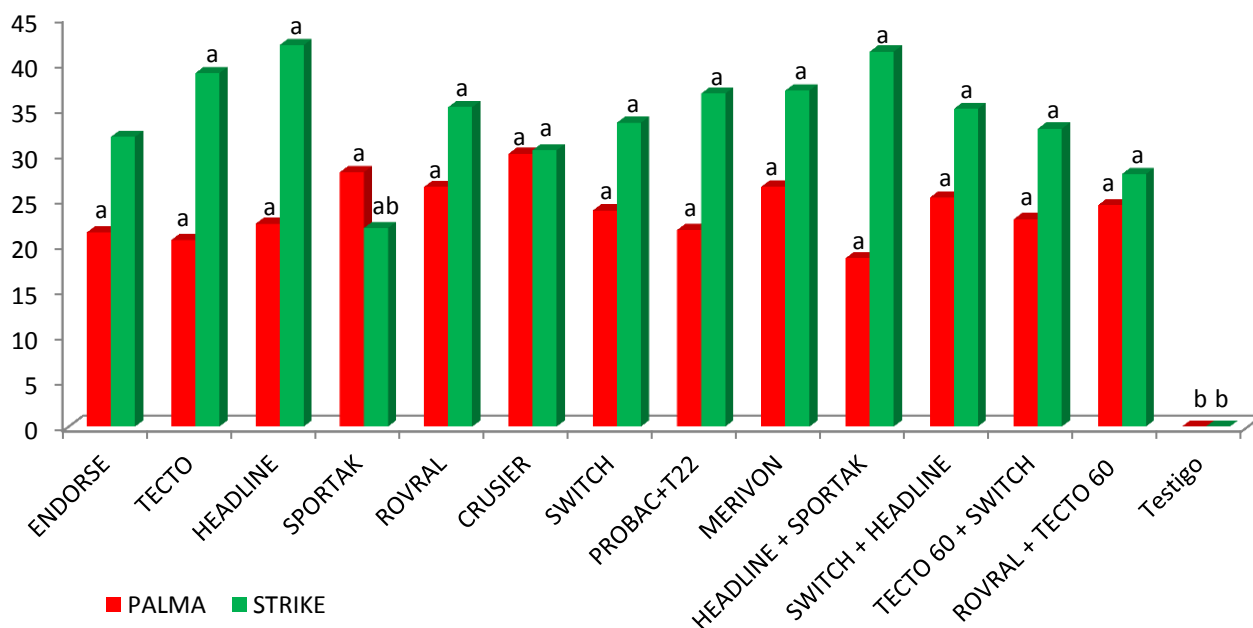
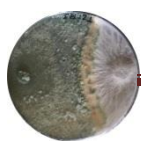


Figura 40. Eficacia de los fungicidas en la primera evaluación en los análisis individuales

Además, la producción de fitoalexinas por los genotipos de frijol está relacionada con la resistencia a *Rhizoctonia solani* (Muyolo *et al.*, 1993), igualmente cepas de *Rhizoctonia*



binucleadas pueden inducir resistencia contra *Rhizoctonia* patogénica en frijol, debido a la presencia de fenoles, sustancias pécticas y suberina (Jabaji-Hare *et al.*, 1999).

En los análisis combinados (Figura 41), aunque no hubo diferencias entre los fungicidas aplicados, se obtuvo la mayor eficacia con la aplicación de Headline (32.14 %). En cuanto a las variedades, se alcanzó una mayor eficacia utilizando la variedad Strike (31.71 %). Al realizar el análisis de contrastes, comparando las mezclas contra fungicidas solos y no detectar significancia, se sugiere la aplicación de algún fungicida ($P=0.0001$).

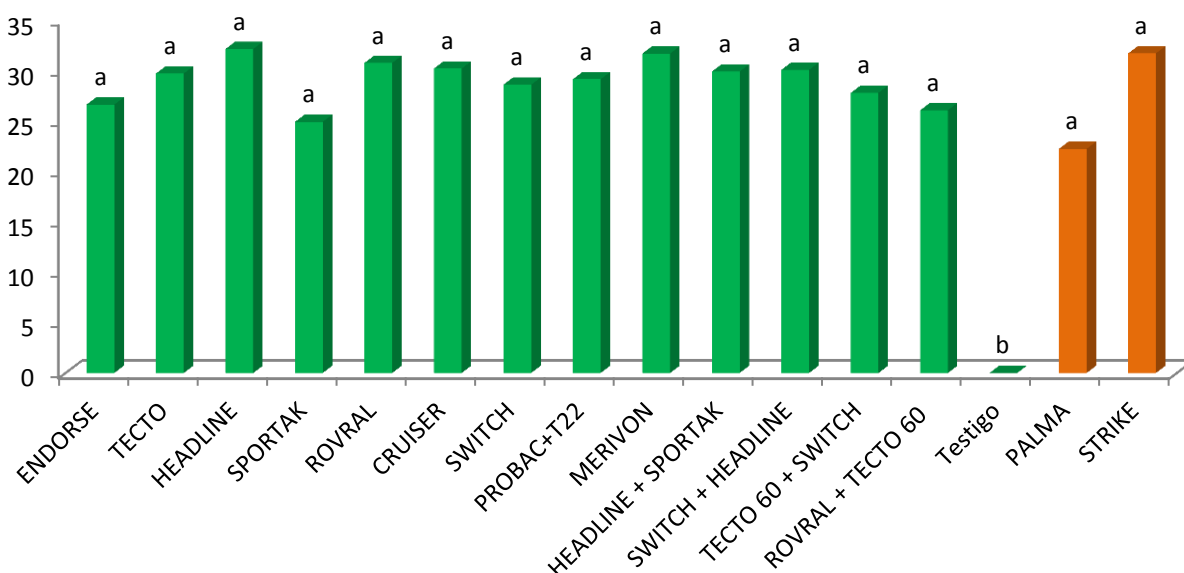
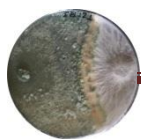


Figura 41. Eficacia de los fungicidas de los análisis combinados de la primera evaluación

En la segunda evaluación, los mejores tratamientos fueron Rovral+Tecto (50.53 %) para la variedad Palma, y Switch (53.23 %), Tecto+Switch (53.23 %), Switch+Headline (51.14 %) para Strike (Figura 42). A pesar de no haber diferencias significativas entre los fungicidas evaluados, los tratamientos más eficaces fueron con Switch, solo o en mezcla, corroborado en



las pruebas de invernadero contra *R. solani* y *S. rolfii*, obteniendo las mejores eficacias (Capítulo IV).

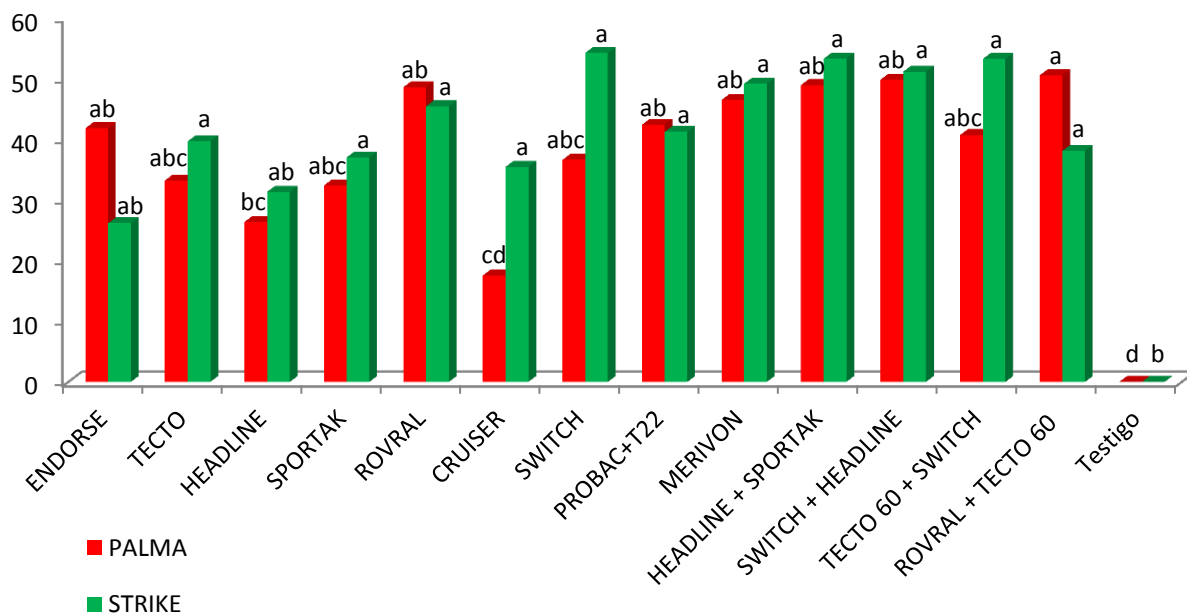


Figura 42. Eficacia de los fungicidas en la segunda evaluación en los análisis individuales

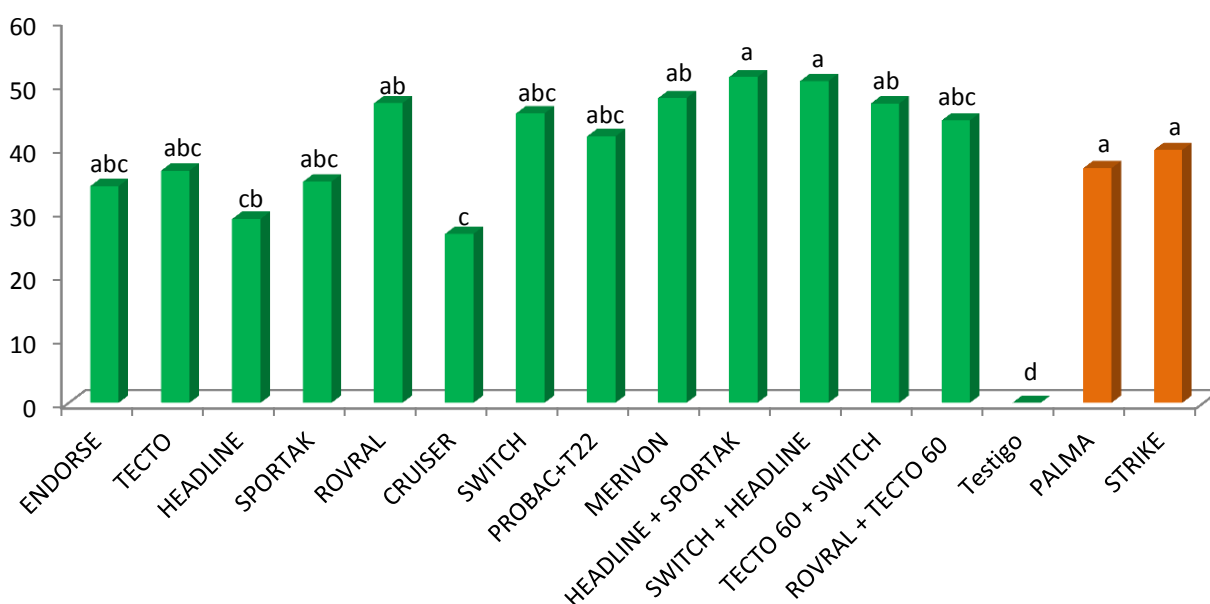
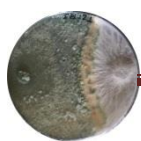


Figura 43. Eficacia de los fungicidas de los análisis combinados de la segunda evaluación



Por último, en el análisis combinado los mejores tratamientos fueron Headline+Sportak, Switch+Headline, Tecto+Switch, Merivon y Rovral con eficacias del 51.10, 50.48, 46.97, 47.81 y 47.02 %, respectivamente. Los contrastes sugieren que la aplicación de los fungicidas químicos en mezcla fueron mejores que aplicarlos sin mezclar ($P=0.0001$). En el caso de los biológicos, obtuvo mayor eficacia (41.81 %) que Endorse, Tecto, Headline, Sportak y Cruiser. Éste último, fue el que obtuvo menor eficacia, debido que solo se aplicó a la semilla al momento de la siembra, protegiendo solamente en las etapas iniciales de crecimiento de la planta.

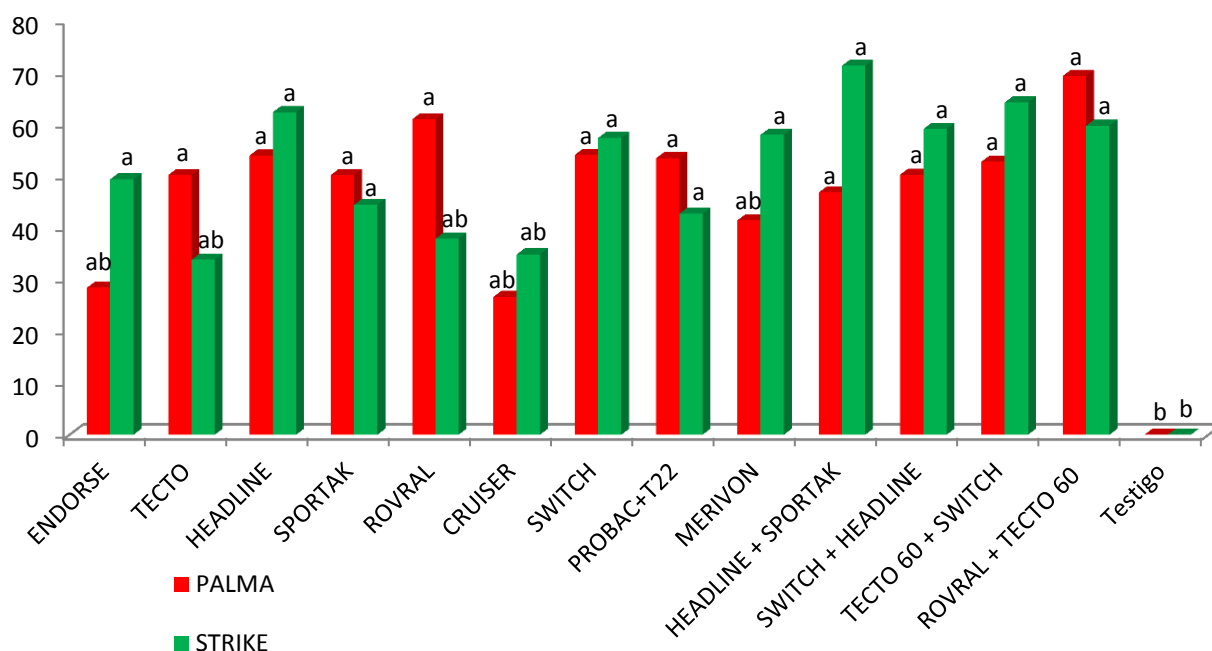
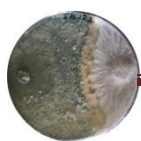


Figura 44. Eficacias de los fungicidas de la tercera evaluación en los análisis individuales

En la tercera evaluación se observaron diferencias altamente significativas para todos los casos, excepto para la variedad en los análisis combinados ($P=0.4508$). Para la variedad Palma, ($P=0.0004$) aunque no hubo diferencias entre los fungicidas aplicados, la mezcla de



Rovral+Tecto y Rovral solo, generaron las mejores eficacias con 69.27 y 60.89 %, respectivamente (Figura 44).

Los contrastes indicaron mejores resultados cuando se aplican los fungicidas en mezcla ($P=0.0941$). Las menores eficacias se obtuvieron con la aplicación de Endorse y el tratamiento de la semilla con Cruiser (Figura 44). Para la variedad Strike ($P=0.0001$), las mezclas Headline+Sportak, Tecto+Switch y el Headline solo, alcanzaron las mejores eficacias con 71.22, 64.14 y 62.26 %. Igualmente que en la variedad Palma, es recomendable aplicar los fungicidas en mezclas ($P=0.0016$).

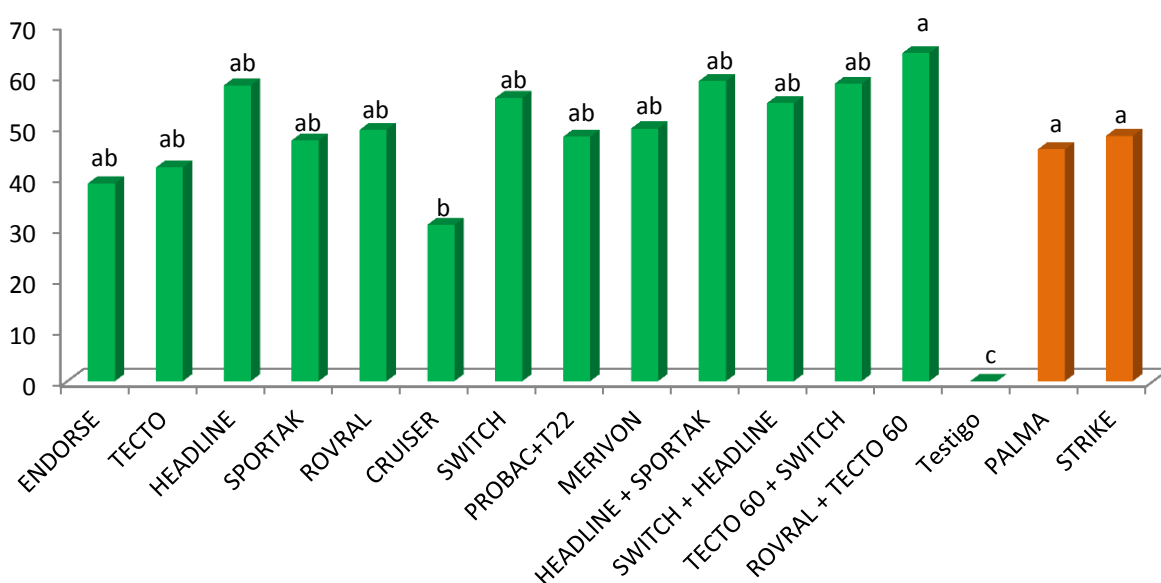
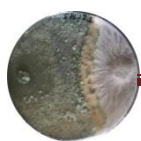


Figura 45. Eficacias de los fungicidas de la tercera evaluación en los análisis combinados

En los análisis combinados, el análisis detectó diferencias altamente significativas ($P=0.0001$) para los fungicidas, siendo el mejor la mezcla de Rovral+Tecto; mientras que la aplicación de Cruiser a la semilla fue la menos eficaz. En el caso de las variedades no se observaron diferencias estadísticas ($P=0.4508$), sin embargo se obtuvo una eficacia ligeramente mejor al



utilizar la variedad Strike (Figura 45). Es recomendable la aplicación de los fungicidas en mezcla, puesto que se observaron diferencias altamente significativas al contrastar contra los fungicidas solos ($P=0.0006$).

En la última evaluación, el análisis de varianza detectó diferencias altamente significativas en los análisis individuales y combinados, a excepción de la variedad, en los combinados ($P=0.1614$).

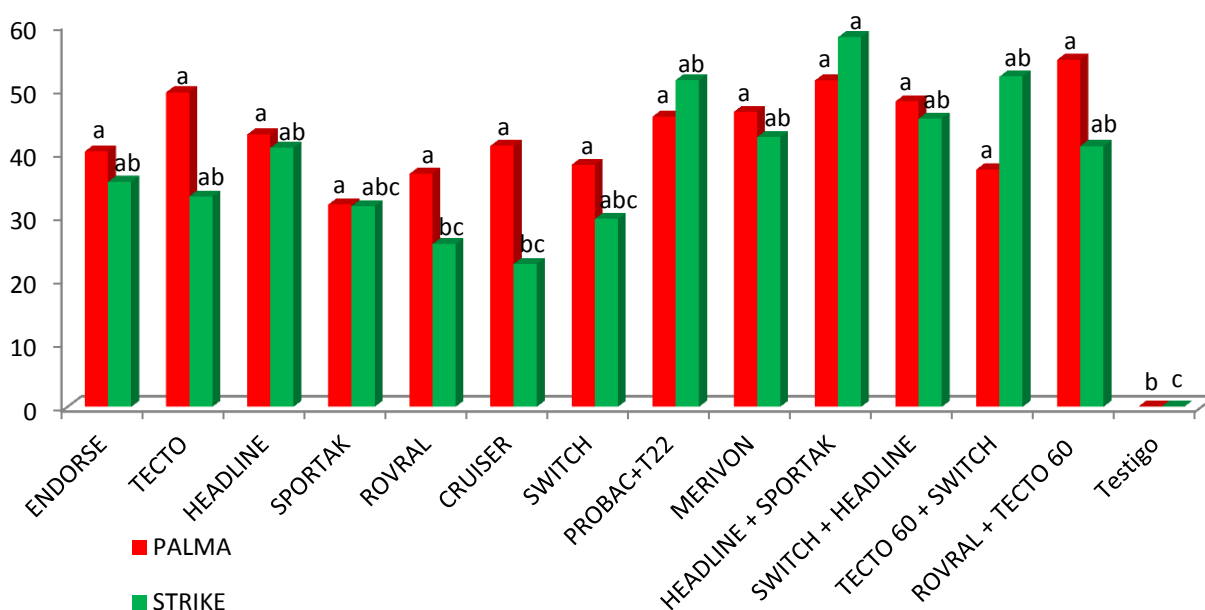
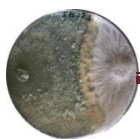


Figura 46. Eficacia de los fungicidas en los análisis combinados de la cuarta evaluación

Para la variedad Palma los mejores tratamientos fueron las mezclas de Rovral+Tecto (54.58 %) y Headline+Sportak (51.30 %), aunque no existe diferencias estadísticas entre los demás fungicidas aplicados; mientras que para Strike fue la mezcla de Headline+Sportak (58.11 %). Al realizar el análisis de contrastes de cada variedad ($P=0.0335$ y $P=0.0001$ para Palma y Strike, respectivamente) entre las mezclas de fungicidas y solos, se recomienda aplicar los fungicidas en mezcla para obtener mejores eficacias. También se observó que para la variedad,



la mezcla de los biológicos fue mejor al contrastar con el grupo de fungicidas aplicados sin mezclar, a excepción de Tecto (Figura 46).

En los análisis combinados, el mejor tratamiento fue Headline+Sportak (54.70 %). Los análisis de contrastes sugieren que es mejor la aplicación de los fungicidas en mezcla ($P=0.0001$), además, al comparar la aplicación de los fungicidas solos contra la mezcla de biológicos ($P=0.0080$), resultó con mayor eficacia el grupo de los biológicos (48.50 %) (Figura 47).

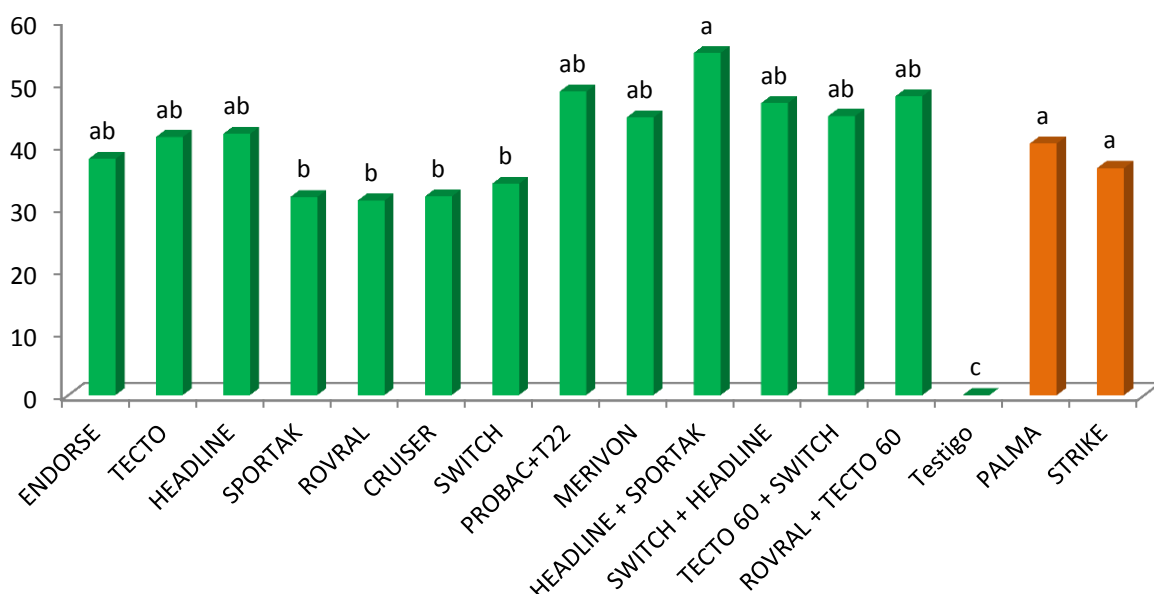
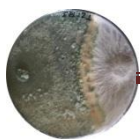


Figura 47. Eficacias de los fungicidas de los análisis combinados de la cuarta evaluación

Culbreath *et al.* (2002) menciona que la aplicación de piraclostrobin solo, resulta en un bajo control de *R. solani* en cacahuete en condiciones de campo, concordando con los resultados obtenidos para el manejo de *R. solani* en frijol ejotero cuando se aplicó solo. Esto puede deberse a que el piraclostrobin es fuertemente adsorbido por las partículas del suelo, resultando en baja desorción, así como ser inmóvil en el suelo (Reddy *et al.*, 2013) y mostrar



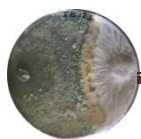
una periodo de disipación de 13 a 16 días en el suelo (Zhang *et al.*, 2012). Sin embargo, al ser mezclado con procloraz, se obtuvo la mayor eficacia en todas las fechas de evaluación, sin embargo, en los ensayos de invernadero (capítulo IV), procloraz fue el fungicida químico menos eficaz para el control de ambos patógenos, igualmente en el ensayo en campo aplicado solo. Aunque no se ha estudiado el sinergismo entre procloraz y piraclostrobin, se ha demostrado ampliamente que el procloraz tiene efecto sinérgico con insecticidas piretroides afectando principalmente a abejas (*Aphis mellifera* L.) (Chalvet-Monfray *et al.*, 1996; Meled *et al.*, 1998) y especies acuáticas (Bjergager *et al.*, 2012), además de mejorar el control de algunos hongos que afectan al limón en postcosecha al mezclarlo con té de saponina (extracto de semillas de *Camelia* sp.) (Hao *et al.*, 2010).

Las variedades no mostraron diferencia estadística, sin embargo, se obtuvo una ligera mayor eficacia con la variedad Palma (3.92 % más), al contrario con las primeras tres evaluaciones, en las cuales se observaron mayores eficacias con la variedad Strike. Esto puede estar relacionado con la pérdida de la residualidad de los fungicidas en el suelo.

1.4.5 Rentabilidad de los tratamientos

El cálculo de los costos de producción, ingresos totales y ganancia por peso invertido se encuentran en los cuadros 10-A al 52-A del Apéndice. Se realizó el análisis tomando en cuenta el análisis individual a través de las variedades y el combinado, los cuáles se resumen en los cuadros 15 al 17.

Para la variedad Palma, el mejor tratamiento fue la mezcla de Headline+Sportak y Merivon, con un GPI de 0.47 y 0.26, respectivamente; mientras que la mezcla Switch+Headline fue menor que el tratamiento a la semilla con Cruiser. Puede notarse que el tratamiento de la semilla como medida de protección temprana se obtuvo un GPI de 0.14, mucho mayor que la

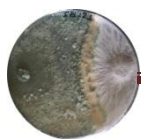


aplicación de cualquier fungicida solo y en mezcla en etapa de plántula (Cuadro 15). Puede atribuirse este efecto al evitar el desarrollo e infección de los hongos fitopatógenos en la raíz del hospedante.

Cuadro 15. Resumen del análisis económico de la variedad Palma

No.	Tratamiento	CT	IT	IN	GPI
1	Endorse	28,998.30	21,761.66	-7,236.64	-0.25
2	Tecto	28,138.30	23,027.15	-5,111.15	-0.18
3	Headline	27,343.30	28,825.05	1,481.75	0.05
4	Sportak	28,308.30	27,397.67	-910.63	-0.03
5	Rovral	29,198.30	30,657.50	1,459.20	0.05
6	Cruiser	26,345.85	29,935.10	3,589.25	0.14
7	Switch	29,571.90	27,551.82	-2,020.08	-0.07
8	Probac+T22	29,998.30	31,547.60	1,549.30	0.05
9	Merivon	30,558.30	38,384.60	7,826.30	0.26
10	Headline + Sportak	29,908.30	44,009.64	14,101.34	0.47
11	Switch + Headline	30,502.50	33,401.33	2,898.83	0.10
12	Tecto 60 + Switch	31,966.90	32,435.12	468.22	0.01
13	Rovral + Tecto 60	31,593.30	32,428.67	835.37	0.03
14	Testigo	25,608.30	17,628.50	-7,979.80	-0.31

En el caso de la variedad Strike, las mayores ganancias se alcanzaron con la aplicación de Headline+Sportak y el tratamiento de la semilla con Cruiser, con un GPI de 0.34 y 0.15, respectivamente. El tratamiento sin aplicación generó un GPI negativo de -0.34 (Cuadro 16). Por último, en los análisis combinados, se generaron mayores ganancias con la aplicación de Headline+Sportak, Merivon y el tratamiento de la semilla con Cruiser, con GPIs de 0.40, 0.13 y 0.14, respectivamente. Cabe señalar que las ganancias fueron muy bajas debido al bajo rendimiento obtenido en general, puesto que el rendimiento medio nacional ronda en las 9.10 t ha⁻¹ (SAGARPA, 2014), esto posiblemente debido a la alta incidencia de mosca blanca.

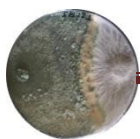


Cuadro 16. Resumen de análisis económico de la variedad Strike.

No.	Tratamiento	CT	IT	IN	GPI
1	Endorse	28,998.30	27,235.77	-1,762.53	-0.06
2	Tecto	28,138.30	17,468.54	-10,669.76	-0.38
3	Headline	27,343.30	29,049.51	1,706.21	0.06
4	Sportak	28,308.30	24,334.56	-3,973.74	-0.14
5	Rovral	29,198.30	25,912.23	-3,286.07	-0.11
6	Crusier	26,345.85	30,345.32	3,999.47	0.15
7	Switch	29,571.90	25,471.70	-4,100.20	-0.14
8	Probac+t22	29,998.30	19,392.57	-10,605.73	-0.35
9	Merivon	30,558.30	30,422.72	-135.58	0.00
10	Headline + Sportak	29,908.30	40,022.25	10,113.95	0.34
11	Switch + Headline	30,502.50	21,688.13	-8,814.37	-0.29
12	Tecto 60 + Switch	31,966.90	23,897.90	-8,069.00	-0.25
13	Rovral + Tecto 60	31,593.30	28,429.02	-3,164.28	-0.10
14	Testigo	25,608.30	16,836.44	-8,771.86	-0.34

Cuadro 17. Resumen del análisis económico combinado para las dos variedades.

No.	Tratamiento	CT	IT	IN	GPI
1	Endorse	28,998.30	24,498.39	-4499.91	-0.16
2	Tecto	28,138.30	27,906.57	-231.73	-0.01
3	Headline	27,343.30	28,937.28	1593.98	0.06
4	Sportak	28,308.30	25,865.79	-2442.51	-0.09
5	Rovral	29,198.30	28,284.54	-913.76	-0.03
6	Crusier	26,345.85	30,140.21	3794.36	0.14
7	Switch	29,571.90	26,511.44	-3060.46	-0.10
8	Probac+T22	29,998.30	25,469.76	-4528.54	-0.15
9	Merivon	30,558.30	34,403.01	3844.71	0.13
10	Headline + Sportak	29,908.30	42,015.95	12107.65	0.40
11	Switch + Headline	30,502.50	27,544.73	-2957.77	-0.10
12	Tecto 60 + Switch	31,966.90	28,166.51	-3800.39	-0.12
13	Rovral + Tecto 60	31,593.30	30,429.17	-1164.13	-0.04
14	Testigo	25,608.30	17,232.47	-8375.83	-0.33

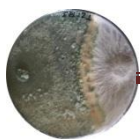


1.5 CONCLUSIONES

En base a los resultados de los análisis individuales y combinados, el mejor tratamiento fue la aplicación de Headline+Sportak para reducir la severidad de la enfermedad (20.17 %) y por lo tanto se logró la mejor eficacia en la última evaluación (54.70 %), así mismo se obtuvo el mayor rendimiento de ejote de primera calidad (6514.1 kg ha⁻¹), obteniendo el mayor GPI con 0.40.

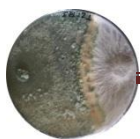
En cuanto a la aplicación de la mezcla de *Bacillus subtilis*+*Trichoderma harzianum* se obtuvo menor severidad y mayor eficacia que con los fungicidas aplicados solos, y que las mezclas Switch+Headline, Tecto+Switch y Rovral+Tecto, sin embargo el rendimiento de ejote es menor que los tratamientos mencionados y el precio de estos productos es elevado, por tanto el GPI fue negativo (-0.15).

Con el tratamiento a la semilla con Cruiser se obtuvo un GPI positivo debido al bajo costo y al realizar solamente una aplicación, aunque no hubo diferencias significativas en el rendimiento con los demás tratamientos, esto sugiere que la protección temprana de la raíz mediante la aplicación de un fungicida permite el desarrollo adecuado de la planta y evita la infección en las primeras etapas, teniendo efecto positivo en el rendimiento de ejote. Por lo tanto, visto desde un enfoque de manejo integrado de enfermedades, se recomienda la aplicación de Cruiser a la semilla, posteriormente usar la mezcla de Headline+Sportak en rotación con los productos biológicos.

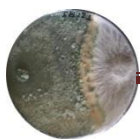


REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

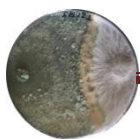
- Abawi, G. S. 1989. Root rots. In: Bean production problems in the tropics. Second edition. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). pp: 105-158.
- Abawi, G. S.; Crosier, D. C. and Cobb, A. C. 1985. Root rot of snap beans in New York. New York's Food and Life Sciences Bulletin 110. Department of Plant Pathology. Cornell University, Ithaca. 7 p.
- Abbott, S. W. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology 18: 265-267.
- Abusar, S. 2013. Antagonistic effects of some fluorescents pseudomonas strains against root-rot fungi (*Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*) and root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on chili (*Capsicum annum*). World Applied Sciences Journal 27 (11): 1455-1460.
- Acea, M. J., C. R. Moore, and M. Alexander. 1988. Survival and growth of bacteria introduced into soil. Soil Biology and Biochemistry 20 (4): 509-515.
- Ackermann, P., G. Knauf-Beiter, and R. Zeun. 2007. Chemistry and biology of fludioxonil, fenpiclonil and quinoxifen. In: Modern crop protection compounds. Volume 1-3. W. Krämer and U. Schirmer (Eds.). WILEY-VCH. pp: 568-580.
- Affokpon, A., D. L. Coyne, C. C. Htay, R. D. Agbede, L. Lawouin, and J. Coosemans. 2011. Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems. Soil Biology & Biochemistry 43 (3): 600-608.
- Agarwal, K. V., and J. B. Sinclair. 1996. Principles of Seed Pathology. Second edition. CRC Lewis Publishers. USA. 543 p.



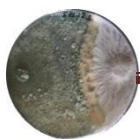
- Aggarwal, R. 2015. *Chaetomium globosum*: a potential biocontrol agent and its mechanism of action. *Indian Phytopathology* 68 (1): 8-24.
- Agrios, N. G. 2005. *Plant pathology*. Fifth edition. Elsevier Academic Press. USA. 922 p.
- Aguiar, J., F. Laemmlen., A. Baameur, y K. Mayberry. 1998. *Snap bean production in California*. University of California. Division of Agriculture and Natural Resources. Publication 7280.
- Akgul, D. S., H. Ozgonen, and A. Erkilic. 2011. The effects of seed treatments with fungicides o stem rot caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc., in peanut. *Pakistan Journal of Botany* 43 (6): 2991-2996.
- Al-Azmi, A. S., and S. N. Al-Nadary. 2015. Interaction between *Meloidogyne incognita* and *Rhizoctonia solani* on green beans. *Saudi Journal of Biological Sciences* 22 (5): 570-574.
- Alcalá de Marcano, D., N. Vargas y A. Pire. 2005. Efecto de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento micelial *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis basicola*. *Revista de la Facultad de Agronomía* 22 (4).
- Allied Market Research. 2014. Global fungicides market- (type-geographic) size, industry, analysis, trends, opportunities, growth and forecast, 2013-2020. *Online*: <http://www.prnewswire.com/news-releases/global-fungicides-market-is-expected-to-reach-162-billion-by-2020---allied-market-research-283962651.html>
- Altschul, F. S., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403-410.



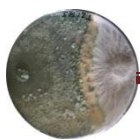
- Alves-Santos, M. F., E. P. Benito, A. P. Eslava, and J. M. Díaz-Mínguez. 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (8): 3335-3340.
- Anderson, N. A. 1982. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. *Annual Review of Phytopathology* 20: 329-347.
- Anees, M., A. Tronsmo, V. Edel-Hermann, L. G. Hjeljord, C. Heraud, C. Steinberg. 2010. Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biology* 114 (9): 691-701.
- APS (American Phytopathological Society). 1990. Medicines for plant health: fungicides. Online: <http://www.apsnet.org/members/outreach/ppb/positionstatements/Pages/Fungicides.aspx>
- Arora, P. K., and H. Bae. 2014. Toxicity and microbial degradation of nitrobenzene, monochloronitrobenzenes, polynitrobenzenes, and pentachloronitrobenzene. Review Article. *Journal of Chemistry*. 12 p.
- Arzate, V. J., A. C. Michel, A., V. M. Domínguez, M. y O. A. Santos, E. 2006. Antagonismo de *Trichoderma spp.*, sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la sigatoka negra del plátano (*Musa sp.*) in vitro e invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24 (2): 98-104.
- Asad, A. S., N. Ali, A. Hameed, S. A. Khan, R. Ahmad, M. Bilal, M. Shahzad, and A. Tabassum. 2014. Biocontrol efficacy of different isolates of *Trichoderma* against soil borne pathogen *Rhizoctonia solani*. *Polish Journal of Microbiology* 63 (1): 95-103.



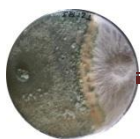
- Asaka, O., and M. Shoda. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (11): 4081-4085.
- Atkins, D. S. and I. M. Clark. 2004. Fungal molecular diagnostics: a mini review. *Journal of Applied Genetics* 45(1): 3-15.
- Averre, W. C. 2000. Root rots of green beans and lima beans. *Vegetable Disease Information Note 7*. Plant Pathology Extension, North Carolina State University.
- Axygen Biosciences. 2015. AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit. pp:7-8. Online: www.axigenbio.com
- Bains, P. S., H. S. Bennypaul, D. R. Lynch, L. M. Kawchuk, and C. A. Schaupmeyer. 2002. *Rhizoctonia* disease of potatoes (*Rhizoctonia solani*): fungicidal efficacy and cultivar susceptibility. *American Journal of Potato Research* 79 (2): 99-106.
- Balali, G. R., and M. Kowsari. 2004. Pectic zymogram variation and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* AG-4 to bean (*Phaseolus vulgaris* L.) isolates in Isfahn, Iran. *Mycopathologia* 158 (3): 377-384.
- Barnett, H., and Hunter, B. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 1998. The American Phytopathological Society. Minesota. 4^a. ed. 217 pp.
- Bateman, L. G. 2005. The contribution of ground-level inoculum of *Fusarium culmorum* to ear blight of winter wheat. *Plant pathology* 54 (3): 299-307.
- Baysal, Ö., M. Çalışkan, Ö. Yeşilova. 2008. An inhibitory effect of new *Bacillus subtilis* strain (EU07) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 73 (1-3): 25-32.



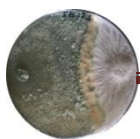
- Bell, D. K., H. D. Wells, and C. R. Markham. 1982. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72 (4):379-382.
- Benítez, T., A. M. Rincón, M. C. Limón, and A. C. Codón. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7 (4): 249-260.
- Bissett, J. 1984. A revision of the the genus *Trichoderma* I. Section Longibrachiatum sect. nov. *Canadian Journal of Botany* 62 (5): 924-931.
- Bissett, J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma* III. Section Pachibasium. *Canadian Journal of Botany* 69 (11): 2373-2417.
- Bissett, J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma* II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany* 69 (11): 2357-2372.
- Bjergager, A. M., M. L. Hanson, K. R. Solomon, and N. Cedergreen. 2012. Synergy between prochloraz and esfenvalerate in *Daphnia magna* from acute and subchronic exposures in the laboratory and microcosms. *Aquatic Toxicology* 110-111:17-24
- Brotman, Y.; Kapuganti, G. J. and Viterbo, A. 2010. *Trichoderma*. *Current Biology* 20 (9): 390-391.
- Buruchara R.A., Mahuku G., Mukalazi J. & Levesque A., 2007. *Pythium species associated with Pythium root rot of beans (Phaseolus vulgaris L.) in Eastern Africa*. Cali, Colombia: CIAT, 42-53.
- Cabras, P., A. Angioni, V. L. Garau, M. Melis, F. M. Pirisi, E. V. Minelli, F. Cabitza, and M. Cubeddu. 1997. Fate of some new fungicides (cyprodinil, fludioxonil, pyremethanil, and tebuconazole) from vine to wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (7): 2708-2710.



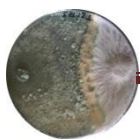
- Capote, N., A. M. Pastrana, A. Aguado, and P. Sánchez-Torres. 2012. Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance. In: Plant pathology. C. J. Cumagun (Ed.). InTech. Shanghai, China. pp: 153-202.
- Cardoso, J. E., and E. Ehandi. 1987. Biological control of *Rhizoctonia* root rot of snap bean with binucleate *Rhizoctonia*-like fungi. Plant Disease 71 (2): 167-170.
- Carling, D. E., D. J. Helm, and R. H. Leiner. 1990. *In vitro* sensitivity of *Rhizoctonia solani* and other multinucleate and binucleate *Rhizoctonia* to selected fungicides. Plant Disease 74 (11): 860-863.
- Carling, E. D., R. E. Baird, R. D. Gitaitis, K. A. Brainard, and S. Kuninaga. 2002. Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 92 (8): 893-899.
- Carnegie, F. S., A. M. Cameron, and P. Haddon. 2008. Effects of fungicide and rate of application on the development of isolates of *Polyscytalum pustulans* resistant to thiabendazole and on the control of skin spot. Potato Research 51 (2): 113-129.
- Carreras-Villasenor, N., J. A. Sanchez-Arreguin, and A. H. Herrera-Estrella. 2012. *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. Microbiology 158: 3-6.
- Carsolio, C., A. Gutierrez, B. Jiménez, M. V. Montagu, and A. Hererra-Estrella. 1994. Characterization of *ech-42*, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America 91 (23): 10903-10907.



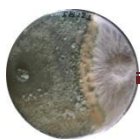
- Castle, A., D. Speranzini, N. Rghei, G. Alm, D. Rinker, and J. Bisset. 1998. Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on North American Mushrooms Farms. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (1): 133-137.
- Chahal, P. P. K., and H. K. Chhabra. 1984. Interaction of *Meloidogyne incognita* with *Rhizoctonia solani* on tomato. *Indian Journal of Nematology* 14: 56-57.
- Chalvet-Monfray, K., P. Sabatier, L. P. Belzunces, M. E. Colin, and C. Fléché. 1996. Synergy between deltamethrin and prochloraz in bees: modeling approach. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15 (4): 525-534.
- Chet, I., and J. Inbar. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 48 (1): 37-43.
- Cilliers, J. A., L. Herselman, and Z. A. Pretorius. 2000. Genetic variability within among mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* in South Africa. *Phytopathology* 90 (9): 1026-1031.
- Conner, L. R., A. Hou, P. Balasubramanian, D. L. McLaren, M. A. Henriquez, K. Chang, and K. B. McRae. 2014. Reaction of dry bean cultivars grown in western Canada to root rot inoculation. *Canadian Journal of Plant Sciences* 94 (7): 1219-1230.
- Costa, F. L. L., and V. M. Scussel. 2002. Toxigenic fungi in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) classes black and color cultivated in the state of Santa Catarina, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 33: 138-144.
- Culbreath, A. K., T. B. Brenneman, and R. C. Kemerait. 2002. Management of early leaf spot of peanut with pyraclostrobin as affected by rate and spray interval. *Online: Plant Health Progress*.



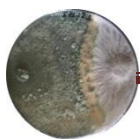
- Daguerre, Y., K. Siegel, V. Edel-Hermann, and C. Steinberg. 2014. Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens: a review. *Fungal Biology Reviews* 28: 97-125.
- Dawar, S., S. Wahab, M. Tariq, and M. J. Zaki. 2010. Application of *Bacillus* species in the control of root rot diseases of crop plants. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 43 (4): 412-418.
- De Vos, P., G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K. H. Scheleifer, and W. B. Whitman. 2009. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Volume 3. The Firmicutes. Second edition. SPRINGER. USA. 1422 p.
- Debouck, D. G. y R. Hidalgo H. 1984. *Morfología de la planta de frijol común (Phaseolus vulgaris L.)* 2da ed. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. Cali, Colombia. 56 p.
- Dennis, C. and J. Webster. 1971a. Antagonism properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society* 57 (1): 25-39.
- Dennis, C. and J. Webster. 1971b. Antagonism properties of species groups of *Trichoderma* II, production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society* 57 (1): 41-48.
- Dhingra, D. O., and J. B. Sinclair. 1995. *Basic plant pathology methods*. Second edition. CRC Press. USA. 435 p.



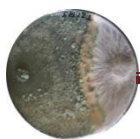
- Dhingra, D. O., R. A. Coelho-Netto, F. A. Rodrigues, G. J. Silva Jr., and C. B. Maia. 2006. Selection of endemic nonpathogenic endophytic *Fusarium oxysporum* from bean roots and rhizosphere competent fluorescent *Pseudomonas* species to suppress Fusarium-yellow of beans. *Biological Control* 39 (1): 75-86.
- Díaz N., J. F., O. G. Alvarado G., S. G. Leyva M., S. Ayvar S., A. C. Michel A. y M. Vargas H. 2015. Identification and control of fungi causing fruits rot in pipiana pumpkin (*Curcubita argyrosperma* Huber). *African Journal of Agricultural Research* 10 (11): 1150-1157.
- Díaz, L. E., J. A. Escalante E., T. Rodríguez G. y A. Gaytán A. 2010. Producción de frijol ejotero en función del tipo de espaldera. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 16 (3): 215-221.
- Domijan, M. A., M. Peraica, V. Žlender, B. Cvjetković, Ž. Jurjević, S. Topolovec-Pintarić, and D. Ivić. 2005. Seed-borne fungi and ochratoxin A contamination of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Republic of Croatia. *Food and Chemical Toxicology* 43 (3): 427-432.
- Doyle, J. J., and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Druzhinina, S. I., A. G. Kopchinskiy, M., Komon, J. Bissett, G. Szakacs, C. P. Kubicek. 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology* 42 (10): 813-828.
- Eckert, J. W. and J. M. Ogawa. 1985. The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits. *Annual Review of Phytopathology* 23: 421-454.
- Elad, Y., I. Chet, and J. Katan. 1980. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70 (2): 119-121.



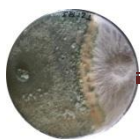
- Environmental Protection Agency, 2004. Thiram. Prevention, pesticides and toxic substances. 11 p.
- Estevez de Jensen, C., J. A. Percich, and P. H. Graham. 2002. Integrated management strategies of bean root rot with *Bacillus subtilis* and *Rhizobium* in Minnesota. Field Crops Research 74 (2-3): 107-115.
- FAO, 2009. FAO specifications and evaluations for agricultural pesticides. 21 p.
- FAO, 2013. Producción, exportación e importación por producto. FAOSTAT. En línea: faostat.fao.org/
- Fernández H., E., M. Acosta R., F. Ponce G. y V. Manuel P. 2007. Manejo biológico de *Phytophthora capsici* Leo., *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. y *Rhizoctonia solani* Kunh en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Revista Mexicana de Fitopatología 25 (1): 35-42.
- Fiers, M., V. Edel-Hermann, C. Heraud, N. Gautheron, C. Chatot, Y. L. Hingrat, K. Boucheck-Mechiche, and C. Steinberg. 2011. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* associated with potato tubers in France. Mycologia 103 (6): 1230-1244.
- Foster, B., and T. Staub. 1996. Basis for use strategies of anilinopyrimidine and phenylpyrrole fungicides against *Botrytis cinerea*. Crop Protection 15 (6): 529-537.
- FRAC. 2015. FRAC code list 2015: fungicides sorted by mode of action (including FRAC code numbering). Fungicide Resistance Action Committee. 10 p.
- Franke, M. D., T. B. Brenneman, K. L. Stevenson, G. B. Padgett. 1998. Sensitivity of isolates of *Sclerotium rolfsii* from peanut in Georgia to selected fungicides. Plant Disease 82 (5): 578-583.



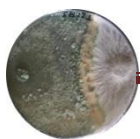
- Gao, K., X. Liu, Z. Kang, and K. Mendgen. 2005. Mycoparasitism of *Rhizoctonia solani* by endophytic *Chaetomium spirale* ND35: ultrastructure and cytochemistry of the interaction. *Journal of Phytopathology* 153 (5): 280-290.
- García, A. E. 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 5^a ed. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 90 p.
- Garibaldi, A., G. Gilardi, G. Ortu, M. L. Gullino, and M. Testa. 2013. First report of southern blight cause by *Sclerotium rolfsii* on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Italy. *Disease Notes* 97 (10): 1386.
- Gisi, U., and U. Müller. 2007. Anilinopyrimidines: methionine biosynthesis inhibitors. In: *Modern crop protection compounds. Volume 1-3.* W. Krämer and U. Schirmer (Eds.). WILEY-VCH. pp: 551-560.
- Godfrey, A. C. R. 1995. Fungicides and bactericides. In: *Agrochemicals from natural products.* C. R. A. Godfrey (Ed.). Marcel Dekker, Inc. USA. pp: 311-340.
- González, H. D. 2002. Estado actual de la taxonomía de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20 (2): 200-205.
- Google Earth. 2015. Software. US Dept of State Geographer. Data SIO, NOAA, U. S. Navy, NGA, GEBCO.
- Groenewold L., B., N. Mayek P. y J. S. Padilla R. 2003. Hongos asociados a la semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21 (3): 375-378.
- Grube, A., D. Donaldson, T. Kiely, and L. Wu. 2011. Pesticides industry sales and usage, 2006 and 2007 market estimates. United States Environmental Protection Agency. 33 p.



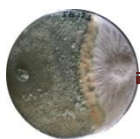
- Guerrero, G. M. A. 1993. Suelos Agropecuarios del Estado de Morelos. Centro Regional de Investigaciones Multidisciplinarias. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Mor., México. pp: 39-46.
- Guerrero, R. J. C. 1983. Soil populations and chemical control of *Macrophomina phaseolina* on beans in Mexico. Master of science. Univesrity of Arizona. 21 p.
- Guigón L., C., y P. A. González G. 2004. Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagónica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 22 (1): 117-124.
- Guzmán, P. R. A.; Gómez, P. R.; García, E. R. y Gavi, R. F. Distribución espacial de la pudrición radical del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) por *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *phaseoli* (Burk.) Snyder y Hans. en la Vega de Metztitlán, Hidalgo, México. Revista Mexicana de Fitopatología 22 (2): 246-258.
- Hall, T. 2004. BioEdit version 7.0.0. Isis Pharmaceutics, Inc. 192 p.
- Hallman, J., R. Rodriguez-Kábana, J. W. Kloepper. 1998. Chitin mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere, and internal roots of cotton in relation to nematode control. Soil Biology and Biochemistry 31 (4): 551-560.
- Hao, W., G. Zhong, M. Hu., J. Luo, Q. Weng, and M. Rizwan-ul-Haq. 2010. Control of citrus postharvest green and blue mold and sour rot by tea saponin combined with imazalil and prochloraz. Postharvest Biology and Technology 56 (1): 39-43.
- Harman, E. G. 2000. Myths and dogmas of biocontrol, changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease 84 (4): 377-393.



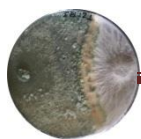
- Harman, E. G., C. R. Howell, A. Viterbo, I. Chet, and M. Lorito. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2 (1): 43-56.
- Harrington, C. T.; Steimel, J.; Workneh, F. and Yang, B. X. 2000. Molecular identification of fungi associated with vascular discoloration of soybean in the north Central United States. *Plant Disease* 84 (1): 83-89.
- Harveson, R. M. 2011. Soilborne Root and Stem Diseases on Dry Beans in Nebraska. University of Nebraska. Disponible en: <http://extension.unl.edu/publications>
- Hermosa, M. R., I. Grondona, E. A. Iturriaga, J. M. Diaz-Minguez, C. Castro, E. Monte, and I. Garcia-Acha. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied Environmental Microbiology* 66 (5):1890–1898.
- Hernández, V. F. 1999. Conservas caseras de alimentos. 3ª ed. Ed. Mundi-prensa. Madrid, España. 198 p.
- Hibbett, S. D.; M. Binder, J. F. Bischoff, M. Blackwell, P. F. Cannon, O. E. Eriksson, S. Huhndorf, T. James, P. M. Kirk, R. Lücking, H. T. Lumsch, F. Lutzoni, P. B. Matheny, D. J. Mclaughlin, M. J. Powell, S. Redhead, C. L. Schoch, J. W. Spatafora, J. A. Stalpers, R. Vilgalys, M. C. Aime, A. Aptroot, R. Bauer, D. Begerow, G. L. Benny, L.A. Castlebury, P. W. Crous, Y. C. Dai, W. Gams, D. M. Geiser, G. W. Griffith, C. Gueidan, D. L. Hawksworth, G. Hestmark, K. Hosaka, R. A. Humberk, K. D. Hyde, J. E. Ironside, U. Koljalg, C. P. Kurtzman, K. H. Larsson, R. Lichtwardt, J. Lomgcore, J. Miadlikowska, A. Miller, J. M. Moncalvo, S. Mozley-Standdridge, F. Oberwinkler, E. Parmasto, V. Reeb, J. D. Rogers, C. Roux,



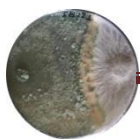
- L. Ryvarden, J. P. Sampaio, A. Schübler, J. Sugiyama, R. G. Thorn, L. Tibell, W. A. Untereiner, C. Walker, Z. Wang, A. Weir, M. Weiss, M. M. White, K. Winka, Y. J. Yao, and N. Zhang. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111 (5): 509-547.
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87 (1): 4-10.
- Hoyos, C. L., S. Orduz, and Bissett, J. 2009. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological Control* 51 (3): 409-416.
- INIFAP. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 2002. Principales enfermedades del frijol ejotero (*Phaseolus vulgaris* L.) en las principales regiones del estado de Morelos. Centro de Investigación Regional; Campo experimental "Zacatepec". Zacatepec, Morelos, México. 32 p.
- ISTA. International Rules for Seed Testing. 2014. Detection of *Colletotrichum lindemuthianum* on *Phaseolus vulgaris* L. (Bean). Annexe to Chapter 7: Seed Health Testing Methods. Switzerland. 6 p.
- Jabaji-Hare, S., H. Chamberland, and P. M. Charest. 1999. Cell wall alterations in hypocotyls of bean seedlings protected from *Rhizoctonia* stem canker by the binucleate *Rhizoctonia* isolate. *Mycological Research* 103 (8): 1035-1043.
- Jacobsen, J. B., N. K. Zidack, and B. J. Larson. 2004. The role of *Bacillus*-based biological control agents in integrated pest management systems: plant diseases. *Phytopathology* 94 (11): 1272-1275.



- John, P. R., D. R. Tyagi, D. Prévost, K. S. Brar, S. Pouleur, and Y. R. Surampalli. 2010. Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. *Crop Protection* 29 (12): 1452-1459.
- John, S. N., I. P. Anjanadevi, V. S. Nath, S. A. Sankar, M. L. Jeeva, K. S. John, and R. S. Misra. 2015. Characterization of *Trichoderma* isolates against *Sclerotium rolfsii*, the collar root pathogen of *Amorphophallus* – A polyphasic approach. *Biological Control* 90: 164-172.
- Jones, T. D. 1993. Hazardous substances, regulation by government agencies. In: *Handbook of hazardous materials*. M. Corn (Ed.). Academic Press, Inc. USA. pp.:321-332.
- Kamala, T. and Indira, S. 2011. Evaluation of indigenous *Trichoderma* isolates from Manipur as biocontrol agent against *Pythium aphanidermatum* on common beans. *3 Biotech* 1 (4): 217-225.
- Kataria, H. R., and U. Gisi. 1996. Chemical control of *Rhizoctonia* species. In: *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular, biology, ecology, pathology and disease control*. B. Sneh, S. Jabaji-Hare, S. Neate and G. Dijst (Eds.). SPRINGER-SCIENCE+BUSINESS MEDIA, B. V. pp.: 537-547.
- Kataria, H. R., P. R. Verma, and U. Gisi. 1991. Variability in the sensitivity of *Rhizoctonia solani* anastomosis groups to fungicides. *Journal of Phytopathology* 133 (2): 121-133.
- Kataria, R. H., and R. K. Grover. 1978. Comparison of fungicides for the control of *Rhizoctonia solani* causing damping off of mung bean (*Phaseolus aureus*). *Annals of Applied Biology* 88 (2): 257-263.



- Keinath, A. P. 2015. Baseline sensitivity of *Didymella bryoniae* to cyprodinil and fludioxonil and field efficacy of these fungicides against isolates resistant to pyraclostrobin and boscalid. *Plant Disease* 99 (6): 815-822.
- Knauf-Beiter, G., H. Dahmen, U. Heye, and T. Staub. 1995. Activity of cyprodinil: optimal treatment timing and site of action. *Plant Disease* 79 (11): 1098-1103.
- Kotasthane, A., T. Agrawal, R. Kushwah, and O. V. Rahatkar. 2015. *In-vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* and their response towards growth of cucumber, bottle gourd and bitter gourd. *European Journal of Plant Pathology* 141 (3): 523-543.
- Kubicek, P. C., J. Bissett, I. Druzhinina, C. Kullnig-Grading, and G. Szakacs. 2003. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genetics and Biology* 38 (3): 310-319.
- Kullnig, C., G. Szakacs, and C. P. Kubicek. 2000. Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya. *Mycological Research* 104 (9): 1117-1125.
- Langston, D. 2013. Diseases. *In: Commercial snap bean production in Georgia*. US Department of Agriculture. The University of Georgia. Bulletin 1369.
- Larkin, P. R. and D. R. Fravel. 1999. Mechanism of action and dose-response relationships governing biological control of *Fusarium* wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology* 89 (12): 1152-1161.
- Larralde-Corona, C. P., M. R. Santiago-Mena, A. M. Sifuentes-Rincón, I. C. Rodríguez-Luna, M. A. Rodríguez-Pérez, K. Shirai, and J. A. Narváez-Zapata. 2008. Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoerma* strains



against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean.

Applied Microbiology Biotechnology 80 (1): 167-177.

Leach, S. S., and C. W. Murdoch. 1985. Evaluation of thiabendazol and pentachloronitrobenzene for control of the Rhizoctonia disease complex on white potato (*Solanum tuberosum* L.). American Potato Journal 62 (9): 459-469.

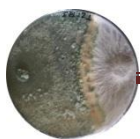
Leroux, P. 1996. Recent developments in the mode of action of fungicides. Pesticide Science 47 (2): 191-197.

Leslie, J. F. and Summerell B. A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Kansas Agricultural Experiment Station, Manhattan. 388 p.

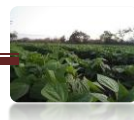
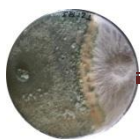
Lewis, J. A., G. C. Papavizas, and M. D. Hollenbeck. 1993. Biological control of damping-off of snapbeans caused by *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse and field with formulations of *Gliocladium virens*. Biological Control 3 (2): 109-115.

Lieckfeldt, E.; Samuels, J. G.; Nirenberg, I. H. and Petrini, O. 1999. A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: Is it one or two species? Applied Environmental Microbiology 65 (6): 2418-2428.

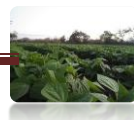
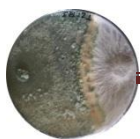
Ma, J. L., H. Charlotte van der Does, K. A. Borkovich, J. J. Coleman, M. J. Daboussi, A. D. Pietro, M. Dufresne, M. Freitag, M. Grabherr, B. Henrissat, P. M. Houterman, S. Kang, W. B. ShiM, C. Woloshuk, X. Xie, J. R. Xu, J. Antoniw, S. E. Baker, B. H. Bluhm, A. Breakspear, D. W. Brown, R. A. E. Butchko, S. Chapman, R. Coulson, P. M. Coutinho, E. G. J. Danchin, A. Diener, L. R. Gale, D. M. Gardiner, S. Goff, K. E. Hammond-Kosack, K. Hilburn, A. Hua-Van, W. Jonkers, K. Kazan, C. D. Kodira, M. Koehrsen, L. Kumar, Y. H. Lee, L. Li, J. M. Manners, D. Miranda-Saavedra, M. Mukherjee, G. Park, J. Park, S. Y. Park, R. H. Proctor, A. Regev, M.



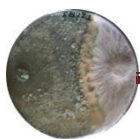
- C. Ruiz-Roldan, D. Sain, S. Sakthikumar, S. Sykes, D. C. Schwartz, B. G. Turgeon, I. Wapinski, O. Yoder, S. Young, Q. Zeng, S. Zhou, J. Galagan, C. A. Cuomo, H. C. Kistler and M. Rep. 2010. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* 464 (7287): 367-373.
- Mahmoud M., S. Y., M. H. Hossey, K. A. A. El-Shaikh, A. H. A. Obiadalla, and Y. A. Mohamed. 2013. Seed borne fungal pathogens associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds and their impact on germination. *Journal of Environmental Studies* 11: 19-26.
- Mahoney, J. K., and C. L. Gillard. 2014. Plant health and yield of dry bean not affected by strobilurin fungicides under disease-free or simulated hail conditions. *Canadian Journal of Plant Science* 94 (8): 1385-1389.
- Mahoney, J. K., R. J. Vyn, and C. L. Gillard. 2015. The effect of pyraclostrobin on soybean plant health, yield, and profitability in Ontario. *Canadian Journal of Plant Science* 95 (2): 285-292.
- Maloy, O. C. 2005. Plant Disease Management. *The Plant Health Instructor*. APS. In: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/PlantDiseaseManagement.aspx>
- Mbofung, Y. G. C. and B. M. Pryor. 2010. A PCR-based assay for detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in lettuce seed. *Plant Disease* 94 (7): 860-866.
- McCartney, A. H., S. J. Foster, B. A. Fraaije, and E. Ward. 2003. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science* 59 (2): 129-142.
- McGrath, T. M. 2004. What are fungicides? *The Plant Health Instructor*. *On line*: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/fungicides.aspx>.



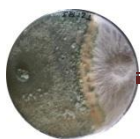
- Meled, M., A. Thrasyvoulou, and L. P. Belzunces. 1998. Seasonal variations in susceptibility of *Apis mellifera* to the synergistic action of prochloraz and deltamethrin. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17 (12): 2517-2520.
- Michel A., A. C., O. Rebolledo D., R. Lezama G., M. E. Ochoa M., J. C. Mesina E. y G. Samuels. 2001. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mango afectados por Escoba de bruja y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *Fusarium subglutinans*. *Revista Mexicana Fitopatología* 19 (2): 154-160.
- Michel, A. A. C. 2001. Cepas nativas de *Trichoderma spp.* (Euascomycetes: Hypocreales), su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* (Hyphomycetes: Hyphales). Tesis Doctoral. Universidad de Colima. Tecomán, Colima, México. 140 p.
- Mohidding, A. F., and M. R. Khan. 2013. Tolerance of fungal and bacterial biocontrol agents to six pesticides commonly used in the control of soil borne plant pathogens. *African Journal of Agricultural Research* 8 (43): 5331-5334.
- Monte, E. 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology* 4 (1): 1-4.
- Montesinos, E., Badosa, E., Bonnaterra, A., R., Peñalber, y López, M. M. 2007. Aplicación de la biotecnología en el control biológico de bacterias y hongos fitopatógenos. *Herramientas biotecnológicas en fitopatología*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. pp: 317-344.
- Montiel, G. L.; González, F. F.; Sánchez, G. B. M.; Guzmán, R. S.; Gámez, V. F. P.; Acosta, G. J. A.; Rodríguez, G. R.; Simpson, W. J.; Cabral, M. E. y Mendoza, E. M. 2005. Especies de *Fusarium* presentes en raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con



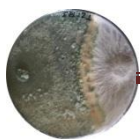
- daños de pudrición, en cinco estados del centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23 (1): 1-7.
- Morath, U. S., R. Hung, and J. W. Bennett. 2012. Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews* 26: 73-83.
- Moreno, C. A., F. Castillo, A. González, D. Bernal, Y. Jaimes, M. Chaparro, C. González, F. Rodríguez, S. Restrepo, and A. M. Cotes. 2009. Biological and molecular characterization of the response of tomato plants treated with *Trichoderma koningiopsis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74 (2):111-120.
- Morton, V., and T. Staub. 2008. A short history of fungicides. *Online*: <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Fungicides.aspx>
- Mount, W. D. 2007. Using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). *Cold Spring Harbor Protocols*.
- Mullen, J. 2001. Southern blight, southern stem blight, white mold. The Plant Health Instructor. *Online*: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/SouthernBlight.aspx>
- Munkvold, P. G. 2009. Seed pathology progress in academia and industry. *Annual Review of Phytopathology* 47: 285-311.
- Muyolo, N. G., P. E. Lipps, and A. F. Schmitthenner. 1993a. Reactions of dry bean, lima bean, and soybean cultivars to *Rhizoctonia* root and hypocotyl rot and web blight. *Plant Disease*: 77 (3):234-238.



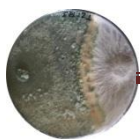
- Muyolo, N. G., P. E. Lipps, and A. F. Schmitthenner. 1993b. Anostomosis grouping and variation in virulence among isolates of *Rhizoctonia solani* associated with dry bean and soybean in Ohio and Zaire. *Phytopathology* 83 (4): 438-444.
- Narsimha, R. B.; Venkata, S. K. and Hindumathi, A. 2014. In vitro screening for antagonistic potential of seven species of *Trichoderma* against different plant pathogenic fungi. *Research Journal of Biology* 2: 29-36.
- Naseby, C. D.; Pascual, A. J. and Lynch, M. J. 2000. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. *Journal of Applied Microbiology* 88 (1): 161-169.
- Navarrete, M. R. y J. Acosta G. 1999. Reacción de variedades de frijol común a *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia solani* en el antiplano de México. *Agronomía Mesoamericana* 10 (1): 37-46.
- Navarrete, M. R., E. Trejo A., J. Navarrete M., J. M. Prudencio S. y J. A. Acosta G. 2009. Reacción de genotipos de frijol a *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia solani* bajo condiciones de campo e invernadero. *Agricultura Técnica en México* 35 (4): 455-466.
- Neergaard, P. 1977. Seed pathology. Volume 1. John Wiley & Sons, New York, USA. 839 p.
- Nelson, P. E., A. Toussoun, T., y F. O. Marasas, W. 1983. *Fusarium* Species, an Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press. University Park and London. 193 p.
- Nzungize, J., P. Gepts, R. Buruchara, S. Buah, P. Ragama, J. P. Busogoro, and J. P. Baudoin. 2011. Pathogenic and molecular characterization of *Pythium* species inducing root



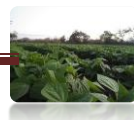
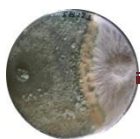
- rot symptoms on common bean in Rwanda. *African Journal of Microbiology Research* 5 (10): 1169-1181.
- O'Donnell, K., H. C. Kistler, E. Cigelnik, and R. C. Ploetz. 1998. Multiple evolutionary origins of fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America* 95 (5): 2044-2049.
- Okabe, I., and N. Matsumoto. 2003. Phylogenetic relationship of *Sclerotium rolfsii* (teleomorph *Athelia rolfsii*) and *S. delphinii* based on ITS sequences. *Mycological Research* 107 (2): 164-168.
- Oliver, P. R., and H. G. Hewitt. 2014. *Fungicides in crop protection*. Second edition. CABI. 200 p.
- Olmedo, M. V., and S. Casas-Flores. 2014. Molecular mechanism of biocontrol in *Trichoderma* spp. and their applications in agriculture. In: *Biotechnology and biology of Trichoderma*. V. K. Gupta, M. Schmoll, A. Herrera-Estrella, R. S. Upadhyay, I. Druzhinina, M. G. Tuohy (Eds.). ELSEVIER. Poland. pp: 429-453.
- Orzolek, M. D., Greaser, G. L. y Harper, J. K. 2002. *Snap bean production*. Agricultural Alternatives. The Pennsylvania State University.
- Pal, K. K., and B. M. Gardener. 2006. *Biological control of plant pathogens*. The Plant Health Instructor. 25 p.
- Paramasivan, M., A. Chandrasekaran, S. Mohan, and N. Muthukrishnan. 2014. Ecological management of tropical sugar beet (TSB) root rot *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) by rhizosphere *Trichoderma* species. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 47 (13): 1629-1644.



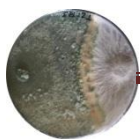
- Paranjape, K., V. Gowariker, V. N. Krishnamurthy, and S. Gowariker. 2015. The pesticide encyclopedia. CABI. UK. 611 p.
- Paredes E., J. E., J. A. Carrillo F., R. S. García E., R. Allende M., J. A. Sañudo B. y J. B. Valdez T. 2009. Microorganismos antagonistas para el control del complejo del hongos causantes de la rabia del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el estado de Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 27 (1): 27-35.
- Parmar, H. J., N. P. Bodar, N. V. Bhadja, S. V. Patel, U. K. Kandoliya, and B. A. Golakiya. 2015. *In vitro* antagonism between biocontrol agent *Trichoderma* and pathogen *Sclerotium rolfsii* causing stem rot in *Arachis hypogaea* L. Journal of Cell and Tissue Research 15 (1): 4921-4928.
- Pastor-Corrales, M. A. and G. S. Abawi. 1987. Reactions of selected bean germ plasms to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Plant Disease 71: 990-993.
- Pathak N., and R. K. Zaidi. 2013. Studies on seed-borne fungi of wheat in seed health testing programme. Archives of Phytopathology and Plant Protection 46 (4): 389-401.
- Pedroza, S. A., y J. A. Samaniego. 2009. Análisis del área bajo la curva del progreso de las enfermedades (ABCPE) en patosistemas agrícolas. En: Tópicos selectos de estadística aplicados a la fitosanidad. N. Baustista M., L. Soto R., y R. Pérez P. (Eds.). Colegio de Postgraduados. IPN-CIIDIR-Oaxaca. México. pp: 179-189.
- Pérez, L. M., J. J. Villalpando M., C. Castaneda C., y R. Ramírez M. 2009. Sensibilidad *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* Saccardo, a los fungicidas comúnmente usados para su combate. Revista Mexicana de Fitopatología 27 (1): 11-17.
- Phillips, A. J. L. 1991. Variation in virulence to dry beans, soybeans and maize among isolates of *Rhizoctonia solani* from beans. Annals of Applied Biology 118 (1): 9-17.



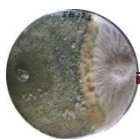
- Postma, J., and H. Rattink. 1992. Biological control of *Fusarium* wilt of carnation with a nonpathogenic isolate of *Fusarium oxysporum*. *Canadian Journal of Botany* 70 (6): 119-1205.
- Prasad, D. R., and M. K. Naik. 2008. Advances in plant diseases caused by *Sclerotium rolfsii* and their management. In: *Advances in soil borne plant diseases*. M. K. Naik and D. Rani (Eds.). New Delhi, India. pp: 89-127.
- Pschjeidt, J., W., and C. M. Ocamb. 2015. *Pacific Northwest plant disease management handbook*. Oregon State University.
- Punja, K. Z. 1985. The biology, ecology, and control of *Sclerotium rolfsii*. *Annual Review of Phytopathology* 23: 97-127.
- Punja, K. Z. 1988. *Sclerotium (Athelia) rolfsii*, a pathogen of many plant species. In: *Advances in plant pathology*. D. S. Ingram and P. H. Williams (Eds.). Volume 6. Genetics of plant pathogenic fungi. G. S. Sidhu (Ed.). Academic Press. Great Britain. pp: 523-534.
- Punja, K. Z., and S. F. Jenkins. 1984. Influence of temperature, moisture, modified gaseous atmosphere, and depth in soil of eruptive sclerotial germination of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 74 (6): 749-754.
- Punja, K. Z., R. G. Grogan, and G. C. Adams Jr. 1982. Influence of nutrition, environment, and the isolate, on basidiocarp formation, development, and structure in *Athelia (Sclerotium) rolfsii*. *Mycologia* 74 (6): 917-926.
- QIAGEN, 2012. DNeasy® Plant Handbook. Sample & Assay Technologies. 56 p.
- Qualhato, F. T., F. A. C. Lopes, A. S. Steindorff, R. S. Brandao, R. S. A. Jesuino and C. J. Ulhoa. 2013. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three



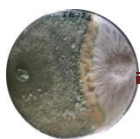
- pathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters* 35 (9): 1461-1468.
- Rahman, A. M.; Begum, F. M. and Alam, F. M. 2009. Screening of *Trichoderma* isolates as a biological control agent against *Ceratocystis paradoxa* causing pineapple disease of sugarcane. *Mycobiology* 37 (4): 277-285.
- Reddy, S. N., S. Gupta, and V. T. Gajbhiye. 2013. Adsorption-desorption and leaching of pyraclostrobin in Indian soils. *Journal of environmental science and health, part B: pesticides, food contaminants, and agriculture wastes* 48 (11): 948-959.
- Reithner, B., E. Ibarra-Laclette, R. L. Mach, and A. Herrera-Estrella. 2011. Identification of mycoparasitism-related genes in *Trichoderma atroviride*. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (13): 4361-4370.
- Remesal, E., B. B. Landa, M. M. Jimenez-Gasco, and J. A. Navas-Cortés. 2013. Sequence variation in two protein-coding genes correlates with mycelial compatibility groupings in *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 103 (5): 479-487.
- Riley, B. M.; Williamson, R. M. and Maloy, O. 2002. Plant Disease Diagnosis. The Plant Health Instructor. APS. Online: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/PlantDiseaseDiagnosis.aspx>
- Rini, R. C., and K. K. Sulochana. 2007. Usefulness of *Trichoderma* and *Pseudomonas* against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* infecting tomato. *Journal of Tropical Agriculture* 45 (1-2): 21-28.
- Rodríguez, E., A. Garda, G. Frías y S. Beebe. 1995. Interacción entre genotipos de frijol y aislamiento de *Rhizoctonia solani* Kuhn. Heredabilidad de la resistencia a la mustia hilachosa *Thanatephorus cucumeris* (Frank) (Donk) en cultivares y



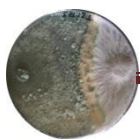
- poblaciones F1 y F2 de frijol común *Phaseolus vulgaris* L. *Agronomía Mesoamericana* 6:50-60.
- Rojo, G. F.; Reynoso, M. M.; Ferez, M.; Chulze, N. S. and Torres, M. A. 2007. Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop Protection* 26 (4): 549-555.
- Rusuku, G., R. A. Buruchara, M. Gatabazi, and M. A. Pastor-Corrales. 1997. Occurrence and distribution in Rwanda of soilborne fungi pathogenic to the common bean. *Plant Disease* 81 (5): 445-449.
- Saalau, E. 2011. Fungicides and how to use them effectively. Horticulture and home pest news. Iowa State University.
- Safiuddin, S. A. T., R. Rizvi, and I. Mahmood. 2014. Biological control of disease complex involving *Meloidogyne incognita* and *Rhizoctonia solani* on growth of okra through microbial inoculants. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 4 (5): 46-51.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2014. Cierre de la producción agrícola por Estado. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). En línea: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
- Salgado O., M., and H. F. Schwartz. 1993. Physiological specialization and effects of inoculum concentration of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* on common beans. *Plant Disease* 77 (5): 492-496.



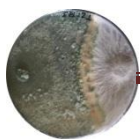
- Salinas R. N. 2010. Cultivares de frijol ejotero de diferente hábito de crecimiento en función del manejo en ambientes contrastantes. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Texcoco, Edo. De México. 89 p.
- Sallam, A. N. M., K. A. M. Abo-Elyours and M. A. E. Hassan. 2008. Evaluation of *Trichoderma* species as biocontrol agents for damping-off and wilt diseases of *Phaseolus vulgaris* L. and efficacy of suggested formula. Egyptian Journal of Phytopathology 36 (1-2): 81-93.
- Samuels, G.J., P. Chaverri, D. F. Farr, and E. B. McCray. 2015. *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Online: taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm
- Samuels, J. G. 2006. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. Phytopathology 96 (2): 195-206.
- Santacruz, V. V. y Santacruz, V. C. 2007. Cultivos poblanos y sus opciones de industrialización. Ed. Universitaria. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. pp: 61-63.
- SAS (Statistics Analysis System). 2014. SAS/STAT User's guide. 13.2. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Schirra, M., S. D'Aquino, P. Cabras, and A. Angioni. 2009. Influence of post-harvest applications rates of cyprodinil, treatment time and temperature on residue levels, and efficacy in controlling green mould on 'Valencia' oranges. Food Additives and Contaminants: Part A: 26 (7): 1033-1037.
- Schneider, A. K. and J. Kelly, D. 2000. A greenhouse screening protocol for *Fusarium* root rot in bean. HortScience, 35 (6): 1095-1098.



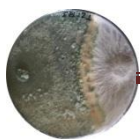
- Schoch, L. C., K. A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J. L. Spouge, C. A. Levesque, W. Chen, and Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (16): 6241-6246.
- Schoonhoven, A. y M. A. Pastor-Corrales. 1991. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT. Cali, Colombia. 56 p.
- Schubert, M.; Fink, S. and Schwarze, W. M. R. F. 2008. *In vitro* screening of an antagonistic *Trichoderma* strain against wood decay fungi. *Arboricultural Journal* 31: 227-248.
- Schuster, A. and Schmoll, M. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87 (3): 787-799.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2012. NMX-FF-019-1982. Productos alimenticios no industrializados para uso humano. Leguminosa. Ejote (*Phaseolus vulgaris* L.). En: <http://www.semarnat.mx/leyes-y-normas/normas>
- Sharma, M., S. K. Gupta, and T. R. Sharma. 2005. Characterization of variability of *Rhizoctonia solani* by using morphological and molecular markers. *Journal of Phytopathology* 153 (7-8): 449-456.
- Shetley, J., K. A. Nelson, W. G. Stevens, D. Dunn, B. Burdick, P. P. Motavalli, J. T. English, and C. J. Dudenhoefter. 2015. Corn yield to pyraclostrobin with foliar fertilizers. *Journal of Agriculture Science* 7 (7): 18-34.



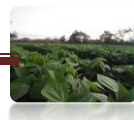
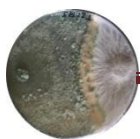
- Shishido, M., C. Miwa, T. Usami, Y. Amemiya, and K. B. Johnson. 2005. Biological control efficiency of Fusarium wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo-B2 in different environments. *Phytopathology* 95 (9): 1072-1080.
- Shokes, F. M., K. Rozalski, D. W. Gorbet, T. B. Brenneman and D. A. Berger. 1996. Techniques for inoculation of peanut with *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse and field. *Peanut Science* 23 (2): 124-128.
- Singleton, L. L., J. D. Mihail, and C. M. Rush. 1992. Methods for Research on Soil-borne Phytopathogenic Fungi. American Phytopathology Society. St. Paul, MN. USA. 264 p.
- Sivalingam, N. P., S. N. Vishwakarma, and U. S. Singh. 2006. Role of seed-borne inoculum of *Rhizoctonia solani* in sheath blight of rice. *Indian Phytopathology* 59 (4): 445-452.
- Sivasithamparam, K., and E. L. Ghisalberti. 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: *Trichoderma and Gliocladium*. Volume 1. Basic biology, taxonomy and genetics. C. P. Kubicek, and G. E. Harman (Eds.). pp: 139-191.
- Skidmore, A. M. and Dickinson, C. H. 1976. Colony interactions and hyphal interference between *Septoria Nodorum* and phylloplane fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 66 (1):57-64.
- Sneh, B., L. Burpee, and A. Ogoshi, 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. APS Press. St. Paul, Minnesota. 133 p.
- Sneh, B.; Jabaji-Hare, S.; Neate, S. and Dijst, G. 1996. *Rhizoctonia* species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Springer-Science+Bussines Media, B.V. Netherlands. 578 p.



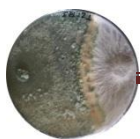
- Songvilay, P., P. Vongphachanh, S. Sayapattha, and Chittarath. 2013. First report of *Sclerotium rolfsii* in the Lao PDR. Australian Plant Disease Notes 8: 13-15.
- Sousa, V. M., J. da C. Machado, H. E. Simmons, and G. P. Munkvold. 2015. Real-time quantitative PCR assays for the rapid detection and quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* (common bean) seeds. Plant Pathology 64 (2): 478-488.
- Soytong, K., S. Kanokmedhakul, V. Kukongviriyapa, and M. Isobe. 2001. Application of *Chaetomium* species (Ketomium®) as a new broad spectrum biological fungicide for plant disease control: a review article. Fungal Diversity 7: 1-15.
- Stewart, A., and R. Hill. 2014. Applications of *Trichoderma* in plant growth promotion. In: Biotechnology and biology of *Trichoderma*. V. K. Gupta, M. Schmoll, A. Herrera-Estrella, R. S. Upadhyay, I. Druzhinina, M. G. Tuohy (Eds.). ELSEVIER. Poland. pp. 415-428.
- Steyaert, M. J., R. J. Weld, A. Mendoza-Mendoza, and A. Stewart. 2010. Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. Microbiology 156: 2887-2900.
- Swain, R. M., and R. C. Ray. 2009. Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. Microbiological Research 164 (2): 121-130.
- Tas, O. D., and S. G. Pavlostathis. 2010. Microbial transformation of pentachloronitrobenzene under nitrate reducing conditions. Biodegradation 21 (5): 691-702.



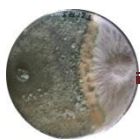
- Tomilova, O. G. and M. V. Shternshis. 2006. The effect of a preparation from *Chaetomium* fungi on the growth of phytopathogenic fungi. *Applied Biochemistry and Microbiology* 42 (1): 67-71.
- Townsend, G. R. and J. V. Heuberger. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Report* 24: 340-343.
- Tsui, K. M. C.; J. Woodhall, W. Chen, L. C. Andre, A. Lauu, D. C. Schoen, C. Baschien, J. M. Najafzadeh, and G. Sybren de Hood. 2011. Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment. *IMA Fungus*, 2 (2): 177-189.
- Uzunovic, A. and Webber, J. F. 1998. Comparison of bluestain fungi grown in vitro and in freshly cut pine billets. *European Journal of Forestal Pathology*. 28: 323- 334.
- Vanni, A., R. Gamberini, A. Calabria, and P. Nappi. 2000. Determination and identification of metabolites of the fungicides iprodione and procymidone in compost. *Chemosphere* 41 (9): 1431-1439.
- Velásquez V., R., M. D. Amador R., M. M. Medina A. y F. Lara V. 2007. Presencia de patógenos en almácigos y semillas de chile (*Capsicum annuum* L.) en Aguascalientes y Zacatecas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25 (1): 75-79.
- Verma, M., S. K. Brar, R. D. Tyagi, R. Y. Surampalli, and J. R. Valéro. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* 37 (1): 1-20.



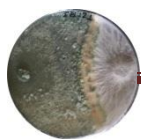
- Vey, A., R. E. Hoagland, and T. M. Butt. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Fungi as biocontrol agents. Progress, problems and potential. T. M. Butt, C. Jackson, and N. Magan. CABI Publishing. pp: 311-346.
- Vinale, F., K. Sivasithamparam, L. E. Ghisalberti, R. Marra, L. S. Woo, and M. Lorito. 2008. Trichoderma-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40 (1): 1-10.
- Vincelli, P. 2002. QoI (Strobilurin) fungicides: benefits and risks. The Plant Health Instructor. Online: <http://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/Pages/StrobilurinFungicides.aspx>
- Vinggaard, M. A., U. Hass, M. Dalgaard, H. R. Andersen, E. Bonefeld-Jorgensen, S. Christiansen, P. Laier, and M. E. Poulsens. 2006. Prochloraz: and imidazole fungicide with multiple mechanism of action. *International Journal of Andrology* 23 (1): 186-192.
- Virgen C., G., V. Olalde P. y D. E Carling. 2000. Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* on potato in central Mexico and potential for biological and chemical control. *American Journal of Potato Research* 77 (4): 219-224.
- Viterbo, A., O. Ramot, L. Chernin, and I. Chet. 2002. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 549-556.
- Wang, L., L. M. Liu, Y. X. Hou, L. Li, and S. W. Huang. 2015. Pathotypic and genetic diversity in the population of *Rhizoctonia solani* AG1-IA causing rice sheath blight in China. *Plant Pathology* 64 (3): 718-728.



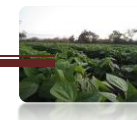
- Watanabe, T. 2010. Pictorial atlas of soil and seed fungi. Morphologies of cultured fungi and key to species. Third edition. CRC Press. 397 p.
- White, J. T., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*. Innis, A. M., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (Eds.). Academic Press, Inc. USA. pp: 315-322
- Wong, F. 2010. Fungicides review: polyoxin D. *Online*:
<http://turfdiseases.blogspot.mx/2010/11/polyoxin-d-mother-natures-gift-for.html>
- Woo, L. S., F. Scala, M. Ruocco, and M. Lorito. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology* 96 (2): 181-185.
- Worasatit, N., K. Sivasithamparam, E. L. Ghisalberti, and C. Rowland. 1994. Variation in pyrone production, lytic enzymes and control of *Rhizoctonia* root rot of wheat among single-spores isolates of *Trichoderma koningii*. *Mycological Research* 98 (12): 1357-1363.
- Yang, C., C. Hamel, V. Vujanovic, and Y. Gan. 2011. Fungicide: mode of action and possible impact on nontarget microorganisms. *International Scholarly Research Network Ecology* 2011: 1-8.
- Yang, D., B. Wang, J. Wang, Y. Chen, and M. Zhou. 2009. Activity and efficacy of *Bacillus subtilis* strain NJ-18 against rice sheath blight and *Sclerotinia* stem rot of rape. *Biological Control* 51 (1): 61-65.
- Zadoks, J., C. and R. D. Schein. 1979. *Epidemiology and plant disease management*. Oxford University Press, New York, USA. 427 p.



- Zhang, F., L. Wang, L. Zhou, D. Wu, H. Pan, and C. Pan. 2012. Residue dynamics of pyraclostrobin in peanut and field soil by QuEChERS and LC-MS/MS. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 78: 116-122.
- Zhang, S., Y. Gan, and B. Xu. 2015. Biocontrol potential of a native species of *Trichoderma longibrachiatum* against *Meloidogyne incognita*. *Applied Soil Ecology* 94: 21-29.
- Zhang, X. J., A. G. Xue and J. T. Tambong. 2009. Evaluation of seed and soil treatments with novel *Bacillus subtilis* strains for control of soybean root rot caused by *Fusarium oxysporum* and *F. graminearum*. *Plant Disease* 93 (12): 1317-1323.



APÉNDICE



Cuadro 1-A. Análisis de varianza individuales y combinados de las variables evaluadas.

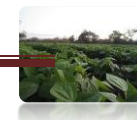
	Variedad	rendc11	rendc12	rendc21	rendc22	peso10v	long10v	sev2	sev3	sev4	sev5	ABCPE	EF2	EF3	EF4	EF5
INDIVIDUAL	Palma	0.0741	0.1406	0.0404	0.6161	0.2930	0.7753	0.0002	0.0001	0.0003	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0004	0.0001
	Strike	0.5146	0.8508	0.1278	0.7784	0.1096	0.5483	0.0021	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0006	0.0001	0.0001	0.0001
COMBINADO	Variedad	0.0083	0.9080	0.5360	0.1660	0.2787	0.4171	0.2620	0.5589	0.9241	0.7091	0.6156	0.9270	0.3351	0.4508	0.1614
	Tratamiento	0.0943	0.0753	0.0056	0.7700	0.5419	0.4410	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

*rend11=rendimiento del primer corte calidad primera; rend12=rendimiento primer corte calidad segunda; sev=severidad; EF=eficacia de los fungicidas.

Cuadro 2-A. Comparación múltiple de medias de los análisis individuales para la variedad 'palma'.

TRATAMIENTO	rendc11	rendc12	rendc21	rendc22	peso10v	long10v	sev2	sev3	sev4	sev5	EF2	EF3	EF4	EF5
Endorse	2421.4 ab	303.5 a	952.5 ab	258.7 a	37.14 a	11.57 a	40.00 b	25.23 cd	27.14 ab	27.50 b	21.37 a	41.82 ab	28.39 a	40.17 a
Tecto	2421.4 ab	564.9 a	1148.7 ab	202.1 a	40.29 a	11.91 a	40.35 b	28.92 bcd	18.93 b	23.21 b	20.52 a	33.21 abc	50.14 a	49.44 a
Headline	3474.2 ab	326.9 a	994.8 ab	193.9 a	43.42 a	11.95 a	39.99 b	31.90 bc	17.50 b	26.42 b	22.31 a	26.37 bc	53.91 a	42.81 a
Sportak	2945.6 ab	519.9 a	1302.1 ab	302.9 a	43.39 a	11.92 a	36.34 b	29.28 bcd	18.93 b	31.42 b	27.99 a	32.39 abc	50.16 a	31.80 a
Rovral	3539.4 ab	538.7 a	1213.7 ab	325.5 a	42.65 a	11.70 a	37.31 b	22.27 cd	14.64 b	29.28 b	26.38 a	48.59 ab	60.89 a	36.62 a
Crusier	3330.3 ab	373.1 a	1310.8 ab	278.9 a	45.82 a	11.94 a	35.71 b	35.71 ab	27.50 ab	27.14 b	30.01 a	17.57 cd	26.63 ab	41.03 a
Switch	2988.6 ab	400.5 a	1283.0 ab	331.7 a	42.24 a	12.08 a	38.57 b	27.49 bcd	17.50 b	28.57 b	23.77 a	36.60 abc	54.02 a	38.05 a
Probac+t22	3801.9 ab	505.0 a	1089.2 ab	296.9 a	40.27 a	11.67 a	40.35 b	25.00 cd	17.50 b	25.00 b	21.63 a	42.40 ab	53.37 a	45.64 a
Merivon	4363.5 ab	400.2 a	1587.6 ab	311.2 a	43.84 a	12.16 a	37.50 b	23.21 cd	22.14 ab	24.64 b	26.40 a	46.47 ab	41.37 ab	46.37 a
Headline + Sportak	5274.6 a	657.4 a	1548.6 ab	356.6 a	42.39 a	12.20 a	41.42 b	22.14 cd	20.31 b	22.49 b	18.54 a	48.93 ab	46.74 a	51.30 a
Switch + Headline	3361.8 ab	359.6 a	1816.7 a	328.7 a	40.70 a	11.88 a	37.85 b	21.78 cd	18.92 b	23.93 b	25.19 a	49.82 ab	50.19 a	48.04 a
Tecto 60 + Switch	3839.3 ab	436.0 a	1189.4 ab	248.2 a	42.68 a	12.12 a	39.28 b	25.71 bcd	17.85 b	28.93 b	22.82 a	40.70 abc	52.71 a	37.33 a
Rovral + Tecto 60	3630.2 ab	450.2 a	1397.5 ab	304.2 a	38.93 a	11.74 a	38.41 b	21.43 d	12.14 b	20.71 b	24.35 a	50.53 a	69.27 a	54.58 a
Testigo	1896.8 b	506.8 a	836.3 b	293.0 a	43.80 a	11.90 a	51.78 a	43.33 a	37.77 a	46.19 a	0.00 b	0.00 d	0.00 b	0.00 b
DSH	3302.2	406.1	933.4	262.6	10.3	1.17	9.38	10.25	16.09	12.34	15.9	23.85	43.44	26.3

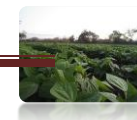
*Medias con diferente letra en la misma columna son estadísticamente diferentes; DSH: Diferencia Significativa Honesta de Tukey (p=0.05)



Cuadro 3-A. Comparación múltiple de medias de los análisis individuales para la variedad “strike”.

Tratamiento	rendc11	rendc12	rendc21	rendc22	peso10v	long10v	sev2	sev3	sev4	sev5	EF2	EF3	EF4	EF5
Endorse	3117.8 a	276.5 a	1104.8 a	353.7 a	46.54 a	12.30 a	41.78 b	35.35 ab	21.06 b	27.50 bc	31.88 a	26.16 ab	49.31 a	35.38 ab
Tecto	1698.7 a	289.8 a	1009.6 a	364.0 a	45.97 a	12.01 a	36.78 b	29.64 b	26.07 ab	28.57 bc	38.89 a	39.67 a	33.79 ab	33.07 ab
Headline	3003.8 a	348.8 a	1500.0 a	364.9 a	45.16 a	12.28 a	34.76 b	32.50 ab	15.35 b	25.00 bc	41.97 a	31.34 ab	62.26 a	40.70 ab
Sportak	2812.8 a	275.7 a	960.0 a	367.5 a	38.20 a	11.67 a	47.61 ab	29.64 b	22.95 b	29.28 abc	21.84 ab	37.01 a	44.40 a	31.54 abc
Rovral	2735.4 a	306.1 a	1282.0 a	259.6 a	41.71 a	11.97 a	40.00 b	26.43 b	25.00 ab	31.42 abc	35.15 a	45.45 a	37.82 ab	25.58 bc
Crusier	3512.3 a	389.5 a	1192.4 a	351.8 a	42.66 a	11.66 a	43.57 ab	30.71 b	26.07 ab	32.85 ab	30.40 a	35.46 a	34.82 ab	22.47 bc
Switch	2290.7 a	527.2 a	1658.4 a	343.6 a	46.14 a	11.84 a	40.35 b	21.43 b	16.78 b	30.00 abc	33.43 a	54.22 a	57.28 a	29.53 abc
Probac+t22	1816.4 a	307.9 a	1190.2 a	355.0 a	44.83 a	11.89 a	38.09 b	27.50 b	22.86 b	20.48 bc	36.64 a	41.21 a	42.65 a	51.37 ab
Merivon	2543.8 a	429.8 a	2172.9 a	415.7 a	46.58 a	12.33 a	37.61 b	23.93 b	16.42 b	24.28 bc	36.98 a	49.16 a	57.90 a	42.38 ab
Headline + sportak	3866.3 a	247.5 a	2338.7 a	447.8 a	42.61 a	16.11 a	35.00 b	22.14 b	11.42 b	17.85 c	41.26 a	53.27 a	71.22 a	58.11 a
Switch + headline	2043.2 a	310.3 a	1319.3 a	310.3 a	43.45 a	11.86 a	40.35 b	23.92 b	16.78 b	22.85 bc	34.95 a	51.14 a	59.00 a	45.32 ab
Tecto 60 + switch	2188.4 a	299.9 a	1516.7 a	402.0 a	40.18 a	11.50 a	40.00 ab	21.78 b	14.28 b	20.35 bc	32.77 a	53.23 a	64.14 a	51.92 ab
Rovral + tecto 60	2543.8 a	352.1 a	1863.8 a	304.1 a	43.38 a	11.71 a	43.92 ab	30.00 b	16.78 b	25.00 bc	27.78 a	38.09 a	59.66 a	40.98 ab
Testigo	1686.6 a	167.4 a	923.7 a	337.4 a	43.44 a	12.28 a	61.78 a	48.21 a	40.08 a	42.38 a	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 c
DSH	3448.3	566.4	1766.0	291.3	9.71	6.05	19.01	16.86	15.73	13.75	27.39	33.08	39.59	31.91

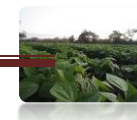
*Medias con diferente letra en la misma columna son estadísticamente diferentes; DSH: Diferencia Significativa Honesta de Tukey (p=0.05).



Cuadro 4-A. Comparación múltiple de medias de los análisis combinados.

Variedades	rendc11	rendc12	rendc21	rendc22	peso10v	long10v	sev2	sev3	sev4	sev5	EF2	EF3	EF4	EF5
Palma	3547.4 a	453 a	1430.9 a	288 a	41.97 a	11.91 a	39.63 a	27.39 a	20.62 a	27.53 a	22.23 a	36.81 a	45.55 a	40.23 a
Strike	2561.4 b	323.4 a	1262.2 a	355.5 a	43.63 a	12.24 a	41.54 a	28.8 a	20.85 a	26.98 a	31.71 a	39.67 a	48.15 a	36.31 a
DSH	502.4	154.1	770.2	113.9	4.01	1.13	4.4	6.85	6.92	4.22	12.37	7.93	9.58	6.73
Fungicidas														
Endorse	2769.6 ab	289.9 a	1028.6 ab	306.2 a	41.84 a	11.95 a	40.89 b	30.29 bcd	24.10 bc	27.50 bc	26.62 a	33.99 abc	38.85 ab	37.77 ab
Tecto	3247.5 ab	427.3 a	1079.1 ab	283.0 a	43.13 a	11.96 a	38.57 b	29.28 bcd	22.50 bc	25.89 bc	29.71 a	36.44 abc	41.96 ab	41.25 ab
Headline	3239.0 ab	337.8 a	1247.4 ab	279.4 a	44.29 a	12.12 a	37.38 b	32.20 bc	16.42 bc	25.71 bc	32.14 a	28.85 cb	58.08 ab	41.75 ab
Sportak	2879.2 ab	397.8 a	1131.0 ab	335.3 a	40.79 a	11.79 a	41.97 b	29.46 bcd	20.94 bc	30.35 b	24.91 a	34.70 abc	47.28 ab	31.67 b
Rovral	3137.4 ab	422.3 a	1247.8 ab	292.5 a	42.18 a	11.83 a	38.65 b	24.35 bcd	19.82 bc	30.35 b	30.76 a	47.02 ab	49.35 ab	31.10 b
Crusier	3421.3 ab	381.3 a	1251.6 ab	315.4 a	44.24 a	11.80 a	39.64 b	33.21 b	26.78 b	29.29 b	30.20 a	26.51 c	30.72 b	31.75 b
Switch	2639.6 ab	463.8 a	1470.7 ab	337.7 a	44.19 a	11.95 a	39.46 b	24.46 bcd	17.14 bc	29.28 b	28.60 a	45.41 abc	55.64 ab	33.79 b
Probac+T22	2809.1 ab	406.4 a	1139.7 ab	325.9 a	42.55 a	11.78 a	39.22 b	26.25 bcd	20.18 bc	22.74 bc	29.14 a	41.81 abc	48.00 ab	48.50 ab
Merivon	3453.6 ab	414.9 a	1880.2 a	363.5 a	45.21 a	12.24 a	37.55 b	23.57 cd	19.28 bc	24.46 bc	31.69 a	47.81 ab	49.63 ab	44.38 ab
Headline + sportak	4570.4 a	452.4 a	1943.7 a	402.2 a	42.50 a	14.16 a	38.21 b	22.14 d	15.87 c	20.17 c	29.90 a	51.10 a	58.97 ab	54.70 a
Switch + headline	2702.5 ab	334.9 a	1568.0 ab	319.5 a	42.08 a	11.87 a	39.10 b	22.85 cd	17.85 bc	23.39 bc	30.07 a	50.48 a	54.59 ab	46.68 ab
Tecto 60 + switch	3013.8 ab	367.9 a	1353.1 ab	325.1 a	41.43 a	11.81 a	39.64 b	23.75 bcd	16.07 bc	24.64 bc	27.79 a	46.97 ab	58.42 ab	44.62 ab
Rovral + tecto 60	3087.0 ab	401.1 a	1630.7 ab	304.2 a	41.16 a	11.72 a	41.17 b	25.71 bcd	14.46 c	22.85 bc	26.06 a	44.31 abc	64.46 a	47.78 ab
Testigo	1791.7 b	337.0 a	880.0 b	315.2 a	43.62 a	12.09 a	56.78 a	45.77 a	38.93 a	44.28 a	0.00 b	0.00 d	0.00 c	0.00 c
DSH	2313.5	337.7	967.9	190.0	6.86	2.98	10.27	9.56	10.9	8.95	15.34	19.76	28.48	20.03

*Medias con diferente letra en la misma columna son estadísticamente diferentes; DSH: Diferencia Significativa Honesta de Tukey (p=0.05)

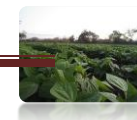


Cuadro 5-A. Contrastes de análisis individuales para la variable rendimiento.

		Rend11	Mejor grupo	Rend12	Mejor grupo	Rend21	Mejor grupo	Rend22	Mejor grupo
Palma	Todos vs Testigo	0.0125	Todos	0.4921	Testigo	0.0217	Todos	0.9210	Testigo
	Solos vs Testigo	0.0277	Solos	0.3641	Testigo	0.0550	Solos	0.7537	Testigo
	Solos vs Biológicos	0.6476	Biológicos	0.3751	Biológicos	0.4953	Solos	0.7015	Biológicos
	Solos vs Mezclas	0.1819	Mezclas	0.3423	Mezclas	0.0249	Mezclas	0.2480	Mezclas
Strike	Todos vs Testigo	0.1913	Todos	0.1565	Todos	0.1402	Todos	0.7464	Todos
	Solos vs Testigo	0.1637	Solos	0.1219	Solos	0.2464	Solos	0.8055	Solos
	Solos vs Biológicos	0.2223	Solos	0.6917	Solos	0.6496	Solos	0.9689	Biológicos
	Solos vs Mezclas	0.8979	Solos	0.4451	Solos	0.0695	Mezclas	0.7052	Mezclas

Cuadro 6-A. Contrastes de análisis individuales para la variable severidad de la enfermedad y ABCPE.

		SEV2	Mejor grupo	SEV3	Mejor grupo	SEV4	Mejor grupo	SEV5	Mejor grupo	ABCPE	Mejor grupo
Palma	Todos vs Testigo	0.0001	Testigo	0.0001	Testigo	0.0001	Testigo	0.0001	Testigo	0.0001	Testigo
	Solos vs Testigo	0.0001	Testigo	0.0001	Testigo	0.0001	Testigo	0.0001	Testigo	0.0001	Testigo
	Solos vs Biológico	0.2855	Biológicos	0.1710	Solos	0.3745	Solos	0.3854	Solos	0.2431	Solos
	Solos vs Mezclas	0.3747	Orgánicos	0.0001	Solos	0.1063	Solos	0.0354	Solos	0.0025	Solos
Strike	Todos vs Testigo	0.0001	Testigo	0.0001	Testigo	0.0001	Testigo	0.0001	Testigo	0.0001	Testigo
	Solos vs Testigo	0.0001	Testigo	0.0001	Testigo	0.0001	Testigo	0.0001	Testigo	0.0001	Testigo
	Solos vs Biológicos	0.5815	Solos	0.7351	Solos	0.6217	Biológicos	0.0076	Solos	0.5286	Solos
	Solos vs Mezclas	0.8327	Solos	0.0446	Solos	0.0018	Solos	0.0001	Solos	0.0029	Solos



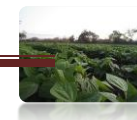
Cuadro 7-A. Contrastes de análisis individuales para la variable eficacia biológica de los fungicidas.

		EF2	Mejor grupo	EF3	Mejor grupo	EF4	Mejor grupo	EF5	Mejor grupo
PALMA	Todos vs Testigo	0.0001	Todos	0.0001	Todos	0.0001	Todos	0.0001	Todos
	Solos vs Testigo	0.0001	Solos	0.0001	Solos	0.0001	Solos	0.0001	Solos
	Solos vs Biológicos	0.3421	Solos	0.1686	Biológicos	0.4056	Biológicos	0.3846	Biológicos
	Solos vs Mezclas	0.2787	Solos	0.0002	Mezclas	0.0941	Mezclas	0.0335	Mezclas
STRIKE	Todos vs Testigo	0.0001	Todos	0.0001	Todos	0.0001	Todos	0.0001	Todos
	Solos vs Testigo	0.0001	Solos	0.0001	Solos	0.0001	Solos	0.0001	Solos
	Solos vs Biológicos	0.6263	Biológicos	0.8412	Biológicos	0.5875	Solos	0.0078	Biológicos
	Solos vs Mezclas	0.912	Mezclas	0.0285	Mezclas	0.0016	Mezclas	0.0001	Mezclas

Cuadro 8-A. Contrastes del análisis combinado para las variables rendimiento, severidad de la enfermedad y eficacia biológica de los fungicidas.

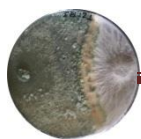
RENDIMIENTO	Rend11	Mejor grupo	Rend12	Mejor grupo	Rend21	Mejor grupo	Rend22	Mejor grupo
Todos vs Testigo	0.0069	Todos	0.4437	Todos	0.0166	Todos	0.8615	Todos
Solos vs Testigo	0.0109	Solos	0.4556	Solos	0.053	Solos	0.9782	Testigo
Solos vs Biológicos	0.5655	Solos	0.8434	Biológicos	0.4697	Solos	0.7744	Biológicos
Solos vs Mezcla	0.3998	Mezclas	0.947	Solos	0.0076	Mezclas	0.3232	Mezclas

SEVERIDAD	SEV2	Mejor grupo	SEV3	Mejor grupo	SEV4	Mejor grupo	SEV5	Mejor grupo	ABCPE	Mejor grupo
Todos vs Testigo	0.0001	Testigo	0.0001	Testigo	0.0001	Testigo	0.0001	Testigo	0.0001	Testigo
Solos vs Testigo	0.0001	Testigo	0.0001	Testigo	0.0001	Testigo	0.0001	Testigo	0.0001	Testigo
Solos vs Biológicos	0.9846	Solos	0.3128	Solos	0.769	Solos	0.0089	Solos	0.2429	Solos
Solos vs Mezclas	0.8368	Mezclas	0.0002	Solos	0.0007	Solos	0.0001	Solos	0.0001	Solos



Continuación...

EFICACIA	EF2	Mejor grupo	EF3	Mejor grupo	EF4	Mejor grupo	EF5	Mejor grupo
Todos vs Testigo	0.0001	Todos	0.0001	Todos	0.0001	Testigo	0.0001	Testigo
Solos vs Testigo	0.0001	Solos	0.0001	Solos	0.0001	Testigo	0.0001	Testigo
Solos vs Biológicos	0.9535	Solos	0.3281	Biológicos	0.8009	Biológicos	0.008	Biológicos
Solos vs Mezclas	0.6501	Solos	0.0001	Mezclas	0.0006	Mezclas	0.0001	Mezclas



Cuadro 9-A. Análisis individuales y combinados de la correlación entre la severidad y el rendimiento de ejote.

VARIEDAD		SEV2	SEV3	SEV4	SEV5
PALMA	rend11	-0.11	-0.31	-0.32	-0.36
		0.3794	0.0179	0.1458	0.6718
	rend12	0.02	-0.05	-0.19	0.05
		0.8691	0.6821	0.1458	0.6718
	rend21	-0.22	-0.19	-0.2	-0.22
		0.0976	0.1583	0.1285	0.0968
STRIKE	rend22	-0.04	-0.09	0.08	-0.05
		0.7676	0.4673	0.5561	0.7005
	rend11	-0.07	-0.008	-0.22	-0.09
		0.5631	0.9478	0.1003	0.4741
	rend12	-0.15	-0.14	-0.16	-0.08
		0.2499	0.2948	0.2141	0.5162
COMBINADOS	rend21	-0.2	-0.27	-0.33	-0.35
		0.1359	0.0406	0.0115	0.0074
	rend22	-0.07	-0.11	0.07	-0.06
		0.5931	0.4137	0.5609	0.6341
	Rend11	-0.12	-0.16	-0.26	-0.2
		0.1945	0.0801	0.0056	0.0287
	rend12	-0.12	-0.12	-0.17	-0.009
		0.1766	0.1756	0.0639	0.9175
	rend21	-0.18	-0.23	-0.27	-0.3
		0.0477	0.014	0.0029	0.0012
	rend22	-0.02	-0.07	0.07	-0.06
		0.7993	0.4205	0.4025	0.4807

A continuación se presentan la estructura de los costos de producción para cada tratamiento y variedad, y posteriormente del análisis combinado. En los primeros cuadros se presentan la estructura completa de los costos, posteriormente solo se contemplan los costos totales, costo unitario, ingreso total, rendimiento, ingreso neto y ganancia por peso invertido. Cabe señalar que el precio por kg de las semillas de cada variedad es el mismo.

*El precio se tomó de la media mensual del mes de cosecha del experimento (marzo de 2015) en base a los datos del SNIIM, suponiendo que el producto es vendido en la Central de Abasto del D.F.



Cuadro 10-A. Estructura de costos del tratamiento ENDORSE para la variedad “Palma”.

CONCEPTO	CANTIDAD	UNIDAD	P.U. (\$)	COSTO (\$)	IMPORT E (\$)	%
1. Renta del terreno	1	ha	4,500.00	4,500.00	4,500.00	15.52
2. Preparación del terreno					1,500.00	5.17
2.1 Barbecho	1	ha	800.00	800.00		
2.2 Surcado	1	ha	700.00	700.00		
3. Siembra					4,710.00	16.24
3.1 Semilla	35	kg	86.00	3,010.00		
3.2 Mano de obra	1	ha	1,700.00	1,700.00		
4. Fertilización edáfica y foliar					4,971.80	17.15
4.1 Sulfato de amonio	488	kg	3.40	1,659.20		
4.2 DAP	174	kg	7.80	1,357.20		
4.3 Cloruro de potasio	67	kg	6.20	415.40		
4.4 AGRO-K	2	kg	120.00	240.00		
4.5 MAS FOLLAJE	2	lt	100.00	200.00		
4.6 AGROMIL	1	lt	350.00	350.00		
4.7 Mano de obra	5	jornal	150.00	750.00		
5. Control de plagas y enfermedades					5,453.50	18.81
5.1 MURALLA MAX	2	250 mL	375.00	750.00		
5.2 MOVENTO	0.5	lt	1,179.00	589.50		
5.3 PLENUM	2	sobre 50 g	137.00	274.00		
5.5 ENDORSE (tratamiento)	1.4	kg	2,100.00	2,940.00		
5.6 Mano de obra	6	jornal	150.00	900.00		
6. Labores culturales					1,150.00	3.97
6.1 Paso de cultivo	1	ha	1,000.00	1,000.00		
6.2 Destape de mata y escarda	1	jornal	150.00	150.00		
7. Riegos					1,800.00	6.21
7.1 Pago de agua	40	h	15.00	600.00		
7.2 Mano de obra	8	jornal	150.00	1,200.00		
8. Cosecha					2,750.00	9.48
8.1 Recolección	20	jornal	100.00	2,000.00		
8.2 Lavado y evasado	3	jornal	200.00	600.00		
8.3 Envase	50	arpilla	3.00	150.00		
9. Flete	1	Flete	1,500.00	1,500.00	1,500.00	5.17
10. Depreciación					663.00	2.29
COSTO TOTAL (CT)					28,998.30	100.0
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)					8.59	
INGRESO TOTAL (IT)					21,761.66	
RENDIMIENTO (kg ha-1)					3,373.90	
INGRESO NETO (IN=IT-CT)					-7,236.65	
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)					-0.25	
Precio kg-1					6.45	



Cuadro 11-A. Estructura de costos del tratamiento TECTO 60 para la variedad “Palma”.

COSTO TOTAL (CT)	28,138.30
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	7.88
INGRESO TOTAL (IT)	23,027.15
RENDIMIENTO (kg ha-1)	3,570.10
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	-5,111.16
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	-0.18
Precio kg-1	6.45

Cuadro 12-A. Estructura de costos del tratamiento HEADLINE para la variedad “Palma”

COSTO TOTAL (CT)	27,343.30
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	6.12
INGRESO TOTAL (IT)	28,825.05
RENDIMIENTO (kg ha-1)	4,469.00
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	1,481.75
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	0.05
Precio kg-1	6.45

Cuadro 13-A. Estructura de costos del tratamiento SPORTAK para la variedad “Palma”

COSTO TOTAL (CT)	28,308.30
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	6.66
INGRESO TOTAL (IT)	27,397.67
RENDIMIENTO (kg ha-1)	4,247.70
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	-910.63
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	-0.03
Precio kg-1	6.45

Cuadro 14-A. Estructura de costos del tratamiento ROVRAL para la variedad “Palma”

COSTO TOTAL (CT)	29,198.30
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	6.14
INGRESO TOTAL (IT)	30,657.50
RENDIMIENTO (kg ha-1)	4,753.10
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	1,459.20
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	0.05
Precio kg-1	6.45



Cuadro 15-A. Estructura de costos del tratamiento CRUISER para la variedad “Palma”.

COSTO TOTAL (CT)	26,345.85
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	5.68
INGRESO TOTAL (IT)	29,935.10
RENDIMIENTO (kg ha-1)	4,641.10
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	3,589.25
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	0.14
Precio kg-1	6.45

Cuadro 16-A. Estructura de costos del tratamiento SWITCH para la variedad “Palma”.

COSTO TOTAL (CT)	29,571.90
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	6.92
INGRESO TOTAL (IT)	27,551.82
RENDIMIENTO (kg ha-1)	4,271.60
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	-2,020.08
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	-0.07
Precio kg-1	6.45

Cuadro 17-A. Estructura de costos del tratamiento PROBAC+T22 (biológicos) para la variedad “Palma”.

COSTO TOTAL (CT)	29,998.30
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	6.13
INGRESO TOTAL (IT)	31,547.60
RENDIMIENTO (kg ha-1)	4,891.10
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	1,549.30
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	0.05
Precio kg-1	6.45

Cuadro 18-A. Estructura de costos del tratamiento MERIVON para la variedad “Palma”.

COSTO TOTAL (CT)	30,558.30
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	5.13
INGRESO TOTAL (IT)	38,384.60
RENDIMIENTO (kg ha-1)	5,951.10
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	7,826.30
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	0.26
Precio kg-1	6.45



Cuadro 19-A. Estructura de costos del tratamiento HEADLINE+SPORTAK para la variedad “Palma”.

COSTO TOTAL (CT)	29,908.30
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	4.38
INGRESO TOTAL (IT)	44,009.64
RENDIMIENTO (kg ha-1)	6,823.20
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	14,101.34
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	0.47
Precio kg⁻¹	6.45

Cuadro 20-A. Estructura de costos del tratamiento SWITCH + HEADLINE para la variedad “Palma”.

COSTO TOTAL (CT)	30,502.50
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	5.89
INGRESO TOTAL (IT)	33,401.33
RENDIMIENTO (kg ha-1)	5,178.50
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	2,898.83
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	0.10
Precio kg⁻¹	6.45

Cuadro 21-A. Estructura de costos del tratamiento TECTO 60 + SWITCH para la variedad “Palma”.

COSTO TOTAL (CT)	31,966.90
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	6.36
INGRESO TOTAL (IT)	32,435.12
RENDIMIENTO (kg ha-1)	5,028.70
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	468.21
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	0.01
Precio kg⁻¹	6.45

Cuadro 22-A. Estructura de costos del tratamiento ROVRAL + TECTO 60 para la variedad “Palma”.

COSTO TOTAL (CT)	31,593.30
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	6.28
INGRESO TOTAL (IT)	32,428.67
RENDIMIENTO (kg ha-1)	5,027.70
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	835.37
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	0.03
Precio kg⁻¹	6.45

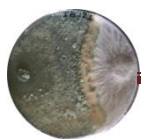


Cuadro 23-A. Estructura de costos del TESTIGO para la variedad “Palma”.

COSTO TOTAL (CT)	25,608.30
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	9.37
INGRESO TOTAL (IT)	17,628.50
RENDIMIENTO (kg ha-1)	2,733.10
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	-7,979.81
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	-0.31
Precio kg-1	6.45

Cuadro 24-A. Estructura de costos del tratamiento ENDORSE para la variedad “Strike”.

CONCEPTO	CANTIDAD	UNIDAD	P.U. (\$)	COSTO (\$)	IMPORT E (\$)	%
1. Renta del terreno	1	ha	4,500.00	4,500.00	4,500.00	15.52
2. Preparación del terreno					1,500.00	5.17
2.1 Barbecho	1	ha	800.00	800.00		
2.2 Surcado	1	ha	700.00	700.00		
3. Siembra					4,710.00	16.24
3.1 Semilla	35	kg	86.00	3,010.00		
3.2 Mano de obra	1	ha	1,700.00	1,700.00		
4. Fertilización edáfica y foliar					4,971.80	17.15
4.1 Sulfato de amonio	488	kg	3.40	1,659.20		
4.2 DAP	174	kg	7.80	1,357.20		
4.3 Cloruro de potasio	67	kg	6.20	415.40		
4.4 AGRO-K	2	kg	120.00	240.00		
4.5 MAS FOLLAJE	2	lt	100.00	200.00		
4.6 AGROMIL	1	lt	350.00	350.00		
4.7 Mano de obra	5	jornal	150.00	750.00		
5. Control de plagas y enfermedades					5,453.50	18.81
5.1 MURALLA MAX	2	250 mL	375.00	750.00		
5.2 MOVENTO	0.5	lt	1,179.00	589.50		
5.3 PLENUM	2	sobre 50 g	137.00	274.00		
5.5 ENDORSE (tratamiento)	1.4	kg	2,100.00	2,940.00		
5.6 Mano de obra	6	jornal	150.00	900.00		
6. Labores culturales					1,150.00	3.97
6.1 Paso de cultivo	1	ha	1,000.00	1,000.00		
6.2 Destape de mata y escarda	1	jornal	150.00	150.00		
7. Riegos					1,800.00	6.21
7.1 Pago de agua	40	h	15.00	600.00		
7.2 Mano de obra	8	jornal	150.00	1,200.00		
8. Cosecha					2,750.00	9.48



8.1 Recolección	20	jornal	100.00	2,000.00		
8.2 Lavado y envasado	3	jornal	200.00	600.00		
8.3 Envase	50	arpilla	3.00	150.00		
9. Flete	1	Flete	1,500.00	1,500.00	1,500.00	5.17
10. Depreciación					663.00	2.29
COSTO TOTAL (CT)					28,998.30	100.0
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)					6.87	
INGRESO TOTAL (IT)					27,235.77	
RENDIMIENTO (kg ha-1)					4,222.60	
INGRESO NETO (IN=IT-CT)					-1,762.53	
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)					-0.06	
Precio kg-1					6.45	

Cuadro 25-A. Estructura de costos del tratamiento TECTO 60 para la variedad “Strike”.

COSTO TOTAL (CT)	28,138.30
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	10.39
INGRESO TOTAL (IT)	17,468.54
RENDIMIENTO (kg ha-1)	2,708.30
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	-10,669.77
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	-0.38
Precio kg-1	6.45

Cuadro 26-A. Estructura de costos del tratamiento HEADLINE para la variedad “Strike”

COSTO TOTAL (CT)	27,343.30
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	6.07
INGRESO TOTAL (IT)	29,049.51
RENDIMIENTO (kg ha-1)	4,503.80
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	1,706.21
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	0.06
Precio kg-1	6.45



Cuadro 27-A. Estructura de costos del tratamiento SPORTAK para la variedad “Strike”

COSTO TOTAL (CT)	28308.3
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	7.50
INGRESO TOTAL (IT)	24,334.56
RENDIMIENTO (kg ha-1)	3,772.80
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	-3,973.74
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	-0.14
Precio kg-1	6.45

Cuadro 28-A. Estructura de costos del tratamiento ROVRAL para la variedad “Strike”

COSTO TOTAL (CT)	29,198.30
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	7.27
INGRESO TOTAL (IT)	25,912.23
RENDIMIENTO (kg ha-1)	4,017.40
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	-3,286.07
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	-0.11
Precio kg-1	6.45

Cuadro 29-A. Estructura de costos del tratamiento CRUISER para la variedad “Strike”.

COSTO TOTAL (CT)	26,345.85
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	5.60
INGRESO TOTAL (IT)	30,345.32
RENDIMIENTO (kg ha-1)	4,704.70
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	3,999.47
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	0.15
Precio kg-1	6.45

Cuadro 30-A. Estructura de costos del tratamiento SWITCH para la variedad “Strike”.

COSTO TOTAL (CT)	29,571.90
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	7.49
INGRESO TOTAL (IT)	25,471.70
RENDIMIENTO (kg ha-1)	3,949.10
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	-4,100.21
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	-0.14
Precio kg-1	6.45



Cuadro 31-A. Estructura de costos del tratamiento PROBAC+T22 (biológicos) para la variedad “Strike”.

COSTO TOTAL (CT)	29,998.30
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	9.98
INGRESO TOTAL (IT)	19,392.57
RENDIMIENTO (kg ha-1)	3,006.60
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	-10,605.73
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	-0.35
Precio kg-1	6.45

Cuadro 32-A. Estructura de costos del tratamiento MERIVON para la variedad “Strike”.

COSTO TOTAL (CT)	30,558.30
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	6.48
INGRESO TOTAL (IT)	30,422.72
RENDIMIENTO (kg ha-1)	4,716.70
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	-135.58
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	0.00
Precio kg-1	6.45

Cuadro 33-A. Estructura de costos del tratamiento HEADLINE+SPORTAK para la variedad “Strike”.

COSTO TOTAL (CT)	29,908.30
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	4.82
INGRESO TOTAL (IT)	40,022.25
RENDIMIENTO (kg ha-1)	6,205.00
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	10,113.95
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	0.34
Precio kg-1	6.45

Cuadro 34-A. Estructura de costos del tratamiento SWITCH + HEADLINE para la variedad “Strike”.

COSTO TOTAL (CT)	30,502.50
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	9.07
INGRESO TOTAL (IT)	21,688.13
RENDIMIENTO (kg ha-1)	3,362.50
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	-8,814.38
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	-0.29
Precio kg-1	6.45



Cuadro 35-A. Estructura de costos del tratamiento TECTO 60 + SWITCH para la variedad “Strike”.

COSTO TOTAL (CT)	31,966.90
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	8.63
INGRESO TOTAL (IT)	23,897.90
RENDIMIENTO (kg ha-1)	3,705.10
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	-8,069.01
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	-0.25
Precio kg-1	6.45

Cuadro 36-A. Estructura de costos del tratamiento ROVRAL + TECTO 60 para la variedad “Strike”.

COSTO TOTAL (CT)	31,593.30
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	7.17
INGRESO TOTAL (IT)	28,429.02
RENDIMIENTO (kg ha-1)	4,407.60
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	-3,164.28
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	-0.10
Precio kg-1	6.45

Cuadro 37-A. Estructura de costos del TESTIGO para la variedad “Strike”.

COSTO TOTAL (CT)	25,608.30
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	9.81
INGRESO TOTAL (IT)	16,836.44
RENDIMIENTO (kg ha-1)	2,610.30
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	-8,771.87
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	-0.34
Precio kg-1	6.45



Cuadro 38-A. Estructura de costos del tratamiento ENDORSE del análisis combinado.

CONCEPTO	CANTIDAD	UNIDAD	P.U. (\$)	COSTO (\$)	IMPORTE (\$)	%
1. Renta del terreno	1	ha	4,500.00	4,500.00	4,500.00	15.52
2. Preparación del terreno					1,500.00	5.17
2.1 Barbecho	1	ha	800.00	800.00		
2.2 Surcado	1	ha	700.00	700.00		
3. Siembra					4,710.00	16.24
3.1 Semilla	35	kg	86.00	3,010.00		
3.2 Mano de obra	1	ha	1,700.00	1,700.00		
4. Fertilización edáfica y foliar					4,971.80	17.15
4.1 Sulfato de amonio	488	kg	3.40	1,659.20		
4.2 DAP	174	kg	7.80	1,357.20		
4.3 Cloruro de potasio	67	kg	6.20	415.40		
4.4 AGRO-K	2	kg	120.00	240.00		
4.5 MAS FOLLAJE	2	lt	100.00	200.00		
4.6 AGROMIL	1	lt	350.00	350.00		
4.7 Mano de obra	5	jornal	150.00	750.00		
5. Control de plagas y enfermedades					5,453.50	18.81
5.1 MURALLA MAX	2	250 mL	375.00	750.00		
5.2 MOVENTO	0.5	lt	1,179.00	589.50		
5.3 PLENUM	2	sobre 50 g	137.00	274.00		
5.5 ENDORSE (tratamiento)	1.4	kg	2,100.00	2,940.00		
5.6 Mano de obra	6	jornal	150.00	900.00		
6. Labores culturales					1,150.00	3.97
6.1 Paso de cultivo	1	ha	1,000.00	1,000.00		
6.2 Destape de mata y escarda	1	jornal	150.00	150.00		
7. Riegos					1,800.00	6.21
7.1 Pago de agua	40	h	15.00	600.00		
7.2 Mano de obra	8	jornal	150.00	1,200.00		
8. Cosecha					2,750.00	9.48
8.1 Recolección	20	jornal	100.00	2,000.00		
8.2 Lavado y envasado	3	jornal	200.00	600.00		
8.3 Envase	50	arpilla	3.00	150.00		
9. Flete	1	Flete	1,500.00	1,500.00	1,500.00	5.17
10. Depreciación					663.00	2.29
COSTO TOTAL (CT)					28,998.30	100
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)					7.63	
INGRESO TOTAL (IT)					24,498.39	
RENDIMIENTO (kg ha-1)					3,798.20	
INGRESO NETO (IN=IT-CT)					-4,499.91	



GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	-0.16
Precio kg-1	6.45

Cuadro 39-A. Estructura de costos del tratamiento TECTO 60 del análisis combinado.

COSTO TOTAL (CT)	28,138.30
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	6.50
INGRESO TOTAL (IT)	27,906.57
RENDIMIENTO (kg ha-1)	4,326.60
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	-231.73
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	-0.01
Precio kg-1	6.45

Cuadro 40-A. Estructura de costos del tratamiento HEADLINE del análisis combinado.

COSTO TOTAL (CT)	27,343.30
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	6.09
INGRESO TOTAL (IT)	28,937.28
RENDIMIENTO (kg ha-1)	4,486.40
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	1,593.98
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	0.06
Precio kg-1	6.45

Cuadro 41-A. Estructura de costos del tratamiento SPORTAK del análisis combinado.

COSTO TOTAL (CT)	28,308.30
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	7.06
INGRESO TOTAL (IT)	25,865.79
RENDIMIENTO (kg ha-1)	4,010.20
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	-2,442.51
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	-0.09
Precio kg-1	6.45



Cuadro 42-A. Estructura de costos del tratamiento ROVRAL del análisis combinado.

COSTO TOTAL (CT)	29,198.30
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	6.66
INGRESO TOTAL (IT)	28,284.54
RENDIMIENTO (kg ha-1)	4,385.20
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	-913.76
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	-0.03
Precio kg-1	6.45

Cuadro 43-A. Estructura de costos del tratamiento CRUISER del análisis combinado.

COSTO TOTAL (CT)	26,345.85
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	5.64
INGRESO TOTAL (IT)	30,140.21
RENDIMIENTO (kg ha-1)	4,672.90
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	3,794.36
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	0.14
Precio kg-1	6.45

Cuadro 44-A. Estructura de costos del tratamiento SWITCH del análisis combinado.

COSTO TOTAL (CT)	29,571.90
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	7.19
INGRESO TOTAL (IT)	26,511.44
RENDIMIENTO (kg ha-1)	4,110.30
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	-3,060.47
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	-0.10
Precio kg-1	6.45

Cuadro 45-A. Estructura de costos del tratamiento PROBAC+T22 (biológicos) del análisis combinado.

COSTO TOTAL (CT)	29,998.30
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	7.60
INGRESO TOTAL (IT)	25,469.76
RENDIMIENTO (kg ha-1)	3,948.80
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	-4,528.54
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	-0.15
Precio kg-1	6.45



Cuadro 46-A. Estructura de costos del tratamiento MERIVON del análisis combinado.

COSTO TOTAL (CT)	30,558.30
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	5.73
INGRESO TOTAL (IT)	34,403.01
RENDIMIENTO (kg ha-1)	5,333.80
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	3,844.71
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	0.13
Precio kg-1	6.45

Cuadro 47-A. Estructura de costos del tratamiento HEADLINE+SPORTAK del análisis combinado.

COSTO TOTAL (CT)	29,908.30
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	4.59
INGRESO TOTAL (IT)	42,015.95
RENDIMIENTO (kg ha-1)	6,514.10
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	12,107.65
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	0.40
Precio kg-1	6.45

Cuadro 48-A. Estructura de costos del tratamiento SWITCH + HEADLINE del análisis combinado.

COSTO TOTAL (CT)	30,502.50
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	7.14
INGRESO TOTAL (IT)	27,544.73
RENDIMIENTO (kg ha-1)	4,270.50
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	-2,957.78
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	-0.10
Precio kg-1	6.45

Cuadro 49-A. Estructura de costos del tratamiento TECTO 60 + SWITCH del análisis combinado.

COSTO TOTAL (CT)	31,966.90
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	7.32
INGRESO TOTAL (IT)	28,166.51
RENDIMIENTO (kg ha-1)	4,366.90
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	-3,800.40
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	-0.12
Precio kg-1	6.45



Cuadro 50-A. Estructura de costos del tratamiento ROVRAL + TECTO 60 del análisis combinado.

COSTO TOTAL (CT)	31,593.30
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	6.70
INGRESO TOTAL (IT)	30,429.17
RENDIMIENTO (kg ha⁻¹)	4,717.70
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	-1,164.14
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	-0.04
Precio kg-1	6.45

Cuadro 51-A. Estructura de costos del TESTIGO del análisis combinado.

COSTO TOTAL (CT)	25,608.30
COSTO UNITARIO (CU=CT/y)	9.59
INGRESO TOTAL (IT)	17,232.47
RENDIMIENTO (kg ha⁻¹)	2,671.70
INGRESO NETO (IN=IT-CT)	-8,375.84
GANANCIA POR PESO INVERTIDO (GPI=IN/CT)	-0.33
Precio kg-1	6.45

Cuadro 52-A. Depreciación anual del equipo utilizado en el experimento (pesos ha⁻¹).

CONCEPTO	CANT ID.	UNIDAD	P.U.	COSTO	IMPORTE	VU	DA (%)	DA (\$)
Equipo					13,260.00			2,652.00
Azadón	4	Pieza	80.00	320.00		5	0.20	64.00
Pala	2	Pieza	120.00	240.00		5	0.20	48.00
Aspersora manual	4	Equipo	650.00	2,600.00		5	0.20	520.00
Aspersora motorizada	1	Equipo	9,500.00	9,500.00		5	0.20	1,900.00
Tonel	3	Pieza	200.00	600.00		5	0.20	120.00
Depreciación anual								2,652.00
Depreciación por ciclo (3 meses)								663.00