



**UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO**

*"Enseñar la explotación de la tierra, no la del hombre"*

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRIA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

**CONTROL BIOLÓGICO DE LA MOLE HÚMEDA EN EL  
CULTIVO DE CHAMPIÑÓN EN LAS VIGAS DE RAMÍREZ,  
VERACRUZ.**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

Presenta:

**VICTOR HERNÁNDEZ ANGELES**

Bajo la supervisión de: **M.C. María de Lourdes Rodríguez Mejía**



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



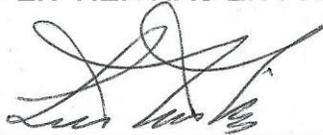
*Chapingo, Estado de México, Diciembre 2017.*

**CONTROL BIOLÓGICO DE LA MOLE HÚMEDA EN EL CULTIVO DE CHAMPIÑÓN EN LAS VIGAS DE RAMÍREZ, VERACRUZ.**

Tesis realizada por **Victor Hernández Angeles** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

Director: \_\_\_\_\_



M.C. María de Lourdes Rodríguez Mejía

Asesor: \_\_\_\_\_



Dr. Marcelo Acosta Ramos

Asesor: \_\_\_\_\_



Dr. Juan Fernando Solís Aguilar

## ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS .....	3
2.1. Objetivo general .....	3
2.2. Objetivo específico.....	3
3. HIPÓTESIS .....	3
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
4.1. Importancia económica del Champiñón .....	5
4.2. Historia del champiñón .....	5
4.3. Demanda .....	8
4.4. Características de <i>Agaricus bisporus</i> .....	9
4.4.1. Ciclo biológico y aspectos genéticos .....	9
4.4.2. Cultivo de champiñón .....	11
4.4.3. Fabricación de “semilla” de Champiñón. ....	11
4.5. <i>Mycogone perniciosa</i> .....	18
4.5.1. Taxonomía .....	18
4.5.2. Importancia .....	19
4.5.3. Morfología del patógeno .....	19
4.5.4. Sintomatología.....	20
4.5.5. Dispersión.....	21
4.5.6. Rango de hospederos .....	22
4.5.7. Manejo .....	22
4.5.8. Manejo biológico .....	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
5.1. UBICACIÓN .....	29
5.2. FASE DE LABORATORIO.....	29
5.2.1. Aislamiento e identificación del agente causal de la mole.....	29
5.2.2. Prueba de patogenicidad.....	30

5.2.3.	Evaluación <i>in vitro</i> de bacterias antagónicas sobre el agente causal de la mole del champiñón. ....	32
5.3.	FASE DE CAMPO.....	34
5.3.1.	Establecimiento del experimento en invernadero para el control biológico de agente causal de la mole del champiñón. ....	34
5.3.2.	VARIABLES EVALUADAS .....	38
5.4.	Análisis estadístico .....	39
6.	RESULTADOS.....	41
6.1.	Frecuencia de aislamiento de hongos causantes de la mole húmeda. ...	41
6.2.	Aislamiento e identificación del agente causal de la mole.....	42
6.2.1.	Morfología del hongo en el hospedante .....	42
6.2.2.	Prueba de Patogenicidad. ....	43
6.3.	Evaluación <i>in vitro</i> de bacterias antagónicas sobre <i>M. pernicioso</i> .....	45
6.4.	Evaluación <i>in vivo</i> de bacterias antagónicas sobre <i>M. pernicioso</i> . ....	48
6.4.1.	Incidencia.....	48
7.	DISCUSIÓN.....	54
8.	CONCLUSIONES.....	58
9.	LITERATURA CITADA .....	59

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Composición nutritiva de <i>A. bisporus</i> según Crisan y Sands (1978)	10
<b>Cuadro 2.</b> Prueba de patogenicidad del hongo aislado del champiñón con síntomas de mole, en Chapingo, Edo. de México, 2016.....	31
<b>Cuadro 3.</b> Tratamientos in vitro para determinar la capacidad antagónica de bacterias, contra el agente causal de la mole del champiñón en el Dpto. de Parasitología Agrícola.....	33
<b>Cuadro 4.</b> Tratamientos establecidos en el cultivo de champiñón para evaluar el control biológico de la mole, en Carretera Federal Jalapa-Perote Km. 118, Las Vigas De Ramírez, Ver en 2017 .	35
<b>Cuadro 5.</b> Calendario de aplicación de los tratamientos, posterior a la aplicación del sustrato de cobertura. ....	37
<b>Cuadro 6.</b> Frecuencia de aislamiento de <i>M. pernicioso</i> asociada a las moles en diferentes muestreos en Las Vigas de Ramírez, Veracruz, 2016 .....	42
<b>Cuadro 7.</b> Porcentaje de inhibición de bacterias antagonistas sobre el crecimiento in vitro de <i>M. pernicioso</i> .....	47
<b>Cuadro 8.</b> Comparación de medias del porcentaje de incidencia de la mole del champiñón en Las Vigas de Ramírez, Veracruz, 2017.....	49
<b>Cuadro 9.</b> Comparación de medias del porcentaje de incidencia de la mole del champiñón en Chapingo, Texcoco, 2017.....	50
<b>Cuadro 10.</b> Comparación de medias del porcentaje de severidad de la mole húmeda del Champiñón en Las Vigas de Ramírez, Veracruz, 2017.....	51
<b>Cuadro 11.</b> Comparación de medias del porcentaje de severidad de la mole húmeda del Champiñón en Chapingo, Texcoco, 2017. ....	52

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> A) Características estructurales de <i>Agaricus bisporus</i> . B) Esporas de <i>Agaricus bisporus</i> observadas bajo microscopio electrónico.....	9
<b>Figura 2.</b> Características morfológicas de <i>M. pernicioso</i> . A) Micelio blanco, B) Ramificaciones verticiladas y subverticiladas y C) Clamidosporas bicelulares.	20
<b>Figura 3.</b> Síntomas de esporóforos con síntomas de mole húmeda. A) masas deformes y B) esporóforos parcialmente deformados .....	21
<b>Figura 4.</b> Distribución de los tratamientos para el control biológico de la mole del champiñón. ....	38
<b>Figura 5.</b> A) Vista general de una cama cultivada con champiñones mostrando hogos deformes y de menor tamaño y B) Acercamiento de champiñones enfermos donde se puede apreciar su deformación y crecimiento micelial blanco del posible agente causal en Las Vigas de Ramírez, Veracruz, 2017. ....	41
<b>Figura 6.</b> A). Colonia del hongo en medio PDA, aislado a partir de champiñones con síntomas de mole, el micelio de color blanco, tornándose café conforme avanza el desarrollo del patógeno, B: Microfotografía (40X) de Conidioforos verticilados, y C: Microfotografía (40X) de aleuriosporas.....	43
<b>Figura 7.</b> A) Manchas vellosas de micelio. B) Champiñones deformes. C) Acercamiento de un champiñón afectado por mole deformados, D) Champiñones sanos. ....	44
<b>Figura 8.</b> Inhibición resultante en la evaluación in vitro contra <i>M. pernicioso</i> : a) Cepa Chapingo b) Cepa Col bII c) Cepa Col 3 d) Testigo sembrado con <i>M. pernicioso</i> . ....	46
<b>Figura 9.</b> Inhibición in vitro del agente causal de la mole húmeda frente a tres bacterias antagónicas .....	47

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico recibido durante mi formación profesional.

A la Universidad Autónoma Chapingo, por otórgame la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y por la alta calidad de su personal docente.

A la MC. María de Lourdes Rodríguez Mejía por su orientación, experiencia, muestras de dedicación, paciencia y esfuerzo durante el desarrollo de este trabajo y sobre todo por su gran apoyo y amistad.

A José Leónides García Rosas por compartir sus conocimientos y experiencia, por su paciencia, apoyo y amistad.

Al Dr. Marcelo Acosta Ramos y Dr. Juan Fernando Solís Aguilar por su disponibilidad, orientación, aportaciones y observaciones realizadas a la presente investigación.

A María Magdalena por su amor, motivación, comprensión y confianza.

A mis padres y mi hermana por todo su amor, apoyo y confianza.

## **DATOS BIOGRAFICOS**

### **Datos personales**

Nombre: Victor Hernández Angeles  
Fecha de nacimiento: 10 de Agosto de 1989  
Lugar de nacimiento: Puebla, Puebla  
CURP: HEAV890810HPLRNC07  
Profesión: Ingeniero Agrónomo  
Cédula profesional: 09713235

### **Desarrollo académico**

Preparatoria: Lic. Benito Juárez, BUAP  
Licenciatura: Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia,  
Universidad Autónoma Chapingo.

## RESUMEN

### CONTROL BIOLÓGICO DE LA MOLE HÚMEDA EN EL CULTIVO DE CHAMPIÑÓN EN LAS VIGAS DE RAMÍREZ, VERACRUZ.

Las enfermedades fungosas son responsables de grandes pérdidas en el cultivo del champiñón, y la mole húmeda es una de las enfermedades más importantes. La resistencia que van desarrollando los patógenos hacia los fungicidas, implica la necesidad de encontrar alternativas más amigables para su control (Tanovic, 2006). Por lo que se estableció como objetivo determinar el potencial de antagonismo de cepas bacterianas *in vitro* e *in vivo* contra la mole húmeda del champiñón. Se realizaron dos colectas de 50 champiñones cada una en Las Vigas de Ramírez, Ver. En laboratorio, a los organismos aislados de champiñones momificados se les determinaron sus características morfológicas, se realizaron pruebas de patogenicidad. El experimento de antagonismo *in vitro* se realizó mediante pruebas de enfrentamiento, se probaron 15 cepas bacterianas, con 16 tratamientos, cada tratamiento tuvo 3 repeticiones, se evaluó el porcentaje de inhibición y se analizó con un modelo lineal completamente al azar. El primer experimento *in vivo* se estableció en la empresa "Hongos Rioxal", el segundo experimento se estableció en la Universidad Autónoma Chapingo, el sustrato se inoculó con una suspensión de bacterias ( $1 \times 10^8$  UFC/mL) correspondiente a cada tratamiento, siete días después se asperjaron 50 mL de una suspensión del patógeno ( $10^6$  conidios/mL). Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, cada unidad experimental contó con 3 repeticiones. Los resultados muestran que la mole húmeda del champiñón en Las Vigas de Ramírez, Veracruz, es causada por *Mycogone pernicioso*. En el experimento *in vitro* se determinaron a Col BII, Chapingo, Col 3 como las mejores cepas antagonicas, con inhibición del 40-60%, 38-66% y 38-51% respectivamente. Ninguno de los tratamientos con bacterias inoculados al sustrato inhibió la incidencia y severidad de la mole húmeda *in vivo*, por lo que las cepas utilizadas en este trabajo con actividad antagonica *in vitro* no son una alternativa para su uso *in vivo*.

Palabras clave: Mole húmeda, antagonismo, *M. pernicioso*, bacteria.

Tesis de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Victor Hernández Angeles.

Director: M.C. María de Lourdes Rodríguez Mejía.

## ABSTRACT

### BIOLOGICAL CONTROL OF THE WET BUBBLE DISEASE OF WHITE BUTTON MUSHROOM IN LAS VIGAS DE RAMÍREZ, VERACRUZ.

Fungal diseases are responsible of high losses in the White button mushroom cultivation, and wet bubble diseases is one of the most important diseases. The resistance developed by pathogens impose the necessity of finding friendlier alternatives for their control (Tanovic, 2006). For that reason, the objective of this study was to determine the antagonism potential of bacterial strains *in vitro* and *in vivo* against the wet bubble disease. In Las Vigas de Ramirez, Ver. two samplings were carried out. The isolates were tested in order to determine their morphological characteristics, and the pathogenicity was tested. *In vitro* were made the antagonism trials by dual confrontation assays between fifteen bacterial strains and the pathogen, sixteen treatments with three repetitions were carried out, and the percentage of inhibition was evaluated and analyzed with a lineal model completely randomized. The first trial *in vivo* was established in the Company "Hongos Rioxal", the second trail was established in the Universidad Autónoma Chapingo, the substrate was inoculated with a bacterial suspension ( $1 \times 10^8$  UFC/mL) depending of the treatment, after 7 days a conidial suspension (106 conidia/mL) was sprinkled on the Surface. A completely randomized experimental design was used. The results show that wet bubble disease of White button mushroom in Las Vigas de Ramirez, Ver. is caused by *Mycogone perniciosa*. *In vitro trials*, the strains Col BII, Chapingo and Col 3 were the best antagonistic strains, with an inhibition percentage from 40-60%, 38-66% y 38-51%, respectively. None of the treatments with bacteria inhibit the incidence and severity of the wet bubble disease *in vivo*, that's why, despite the bacterial strains showed antagonistic activity *in vitro*, they are not an alternative for their use *in vivo*.

Key words: Wet Bubble disease, antagonism, *M. perniciosa*, bacteria

Thesis: Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Victor Hernández Angeles.

Advisor: M.C. María de Lourdes Rodríguez Mejía.

## 1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, el papel de los hongos en la alimentación del ser humano juegan un gran papel, estos productos proveen un alimento de aceptable valor nutrimental y medicinal para consumo humano, y representan una industria emergente generadora de empleos (Salmones *et al.*, 2012).

De toda las especies existentes de hongos, el champiñón (*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach) es la especie más cultivada a nivel mundial, con una producción cercana a los 4 millones de toneladas (Sonnenberg *et al.*, 2011).

Los champiñones son muy populares y consumidos en grandes cantidades en varios países de Asia Pacífico como India, Japón y China. Como resultado, en la actualidad, Asia Pacífico tiene la mayor participación en el mercado global de hongos en términos de consumo, la cual es seguida por América del Norte y Europa. Sobre la producción y procesamiento, Europa lidera el mercado global de hongos (Zion market research, 2017).

Los principales países productores de hongos son China con 5.3 millones de toneladas, Italia con 624 mil toneladas y E.E.U.U. con 380 mil toneladas (FAOSTAT, 2014). En China, 25 millones de personas están involucradas en esta actividad (Li, 2012).

Del año 1995 al 2006, la producción de champiñón en México se incrementó un 36%, con un estimado en 7000 t anuales (Lahmann, 2007). Las cadenas productivas de hongos comestibles han crecido en México y generan más de 62 mil toneladas anuales de productos comerciales (Martínez-Carrera *et al.*, 2007).

En el año 2014, México produjo 1,973 toneladas de hongos (SIAP, 2014), el Estado de México es la entidad que más hongos y setas produce en el país (SAGARPA, 2016). Desde el año 2011, México se ubicó como el principal productor y exportador de hongos comestibles de América Latina principalmente

con altas producciones de champiñón blanco (SAGARPA, 2016), pero a nivel mundial fue el número 13 (FAO, 2014).

De todos los patógenos que infectan a los champiñones, las enfermedades fungosas son responsables de grandes pérdidas; la mole húmeda causada por el mico patógeno *Mycogone pernicioso* (Magnus) Delacr., es considerada una de las más importantes. Esta puede provocar pérdida en rendimiento desde el 15% hasta el 62% (Sharma & Kumar, 2000), lo que representa un grave problema económico dentro del sector productivo, Bhatt y Singh (2000), han reportado pérdidas de rendimiento de hasta el 100 por ciento, como resultado de la inoculación artificial de *M. pernicioso*.

En el cultivo de champiñón no se pueden utilizar muchos fungicidas para el control de *M. pernicioso* ya que también afectan el desarrollo del cultivo. Los pocos fungicidas que se han usado son benomyl, carbendazim, prochloraz. De acuerdo a Fletcher y Yarham (1976), *V. fungicola* var. *fungicola* es resistente a benomyl, fungicida que también es usado para el control de *M. pernicioso*, prochloraz manganeso es ampliamente usado en Europa (Bonnen & Hopkins, 1997), sin embargo, igualmente se han encontrado aislados moderadamente resistentes de *V. fungicola* var. *fungicola* en Gran Bretaña (Grogan *et al.*, 2000) y España (Gea *et al.*, 2003).

La resistencia que van desarrollando los patógenos hacia los fungicidas comúnmente usados y los residuos de fungicidas en los alimentos, implica la necesidad de encontrar alternativas más amigables (Tanovic, 2006). Debido a esto, en la actualidad es imprescindible buscar métodos de controles alternativos y efectivos contra patógenos. Ya que el patógeno *M. pernicioso* muestra cierta susceptibilidad al antagonismo microbioal, y estas características pueden ser explotadas para controlar dicho patógeno. Sin embargo, los intentos para implementar agentes de control biológico o para inducir resistencia del champiñón a enfermedades en campo hasta ahora no han sido exitosos (Berendsen *et al.*, 2012).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

Determinar el potencial antagonista de cepas bacterianas *in vitro* e *in vivo* contra la mole húmeda del cultivo de champiñón.

### 2.2. Objetivo específico

1. Determinar el agente causal de la mole húmeda.
2. Evaluar el efecto antagónico de bacterias sobre el agente causal de la mole húmeda *in vitro*.
3. Determinar las tres mejores bacterias antagónicas *in vitro* contra el agente causal de la mole húmeda.
4. Evaluar en campo los tres mejores tratamientos *in vitro* mediante aplicaciones al sustrato para determinar su capacidad inhibitoria hacia el agente causal de la mole húmeda en el cultivo de Champiñón.
5. Determinar cuál es el mejor tratamiento para reducir la incidencia y severidad del agente causal de la mole húmeda *in vivo*.

## 3. HIPÓTESIS

- La enfermedad de la mole en Las Vigas de Ramírez, Veracruz es causada por el patógeno *M. perniciososa*.
- La actividad antagónica de las bacterias son una alternativa para el control de *M. perniciososa*.

- Al menos una bacteria muestra efecto antagónico contra *M. perniciosus* *in vitro*.
- Al menos uno de los tratamientos inhibirá en un 80% la incidencia y severidad de *M. perniciosus* *in vivo*.

## 4. REVISIÓN DE LITERATURA.

Los hongos son organismos muy comunes en la naturaleza, puesto que viven prácticamente en todos los medios y poseen una amplia gama de propiedades medicinales y comestibles (Ancona *et al.*, 2003).

El cultivo de las primeras especies de hongos data desde los siglos VII, X y XI en China y Japón con los hongos *Auricularia*, *Flammulina velutipes* (Seta de aguja) y *Lentinus edodes* (Shiitake) y el cultivo de *Agaricus bisporus* (Champiñón) desde el siglo XVIII en Francia. Esta industria se hizo más importante en varios países de América hacia la segunda mitad del siglo XX (Guzmán, *et al.* 1993). El cultivo de los hongos comestibles ha ido pasando de improvisaciones y técnicas caseras, a ser la base de una industria altamente tecnificada y fructífera (Ancona *et al.*, 2005).

### 4.1. Importancia económica del Champiñón

*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach, conocido popularmente como champiñón, es la especie más cultivada a nivel mundial, con un valor estimado en 2014 de 1.7 billones de euros (Kees, 2015).

### 4.2. Historia del champiñón

El método para cultivar *A. bisporus* fue desarrollado en la región de París, Francia, donde los cultivadores de melón descubrieron cómo podía propagarse este hongo e iniciaron su cultivo hacia 1650 (Royse y Schisler, 1980). Alrededor de 1700, Tournefort, un botánico francés, describió el primer método de cultivo de *A. bisporus* (Vedder 1978).

En 1780, el champiñón se comenzó a cultivar en galerías y cuevas subterráneas. La "semilla" o micelio vegetativo de champiñón exento de patógenos, empezó a obtenerse sobre compost esterilizado, sustituyendo así a la efectuada con compost invadido de micelio procedente de un cultivo previo.

Abercrombie (1817), describió el primer compostaje del substrato, apilando el estiércol de caballo en cordones, asemejándose en parte al compostaje actual. En sus comienzos se elaboraba con estiércol de caballo humedecido y fermentado hasta la pérdida del olor a amoníaco, cuando este material empezó a escasear, paulatinamente fueron añadiéndose otras sustancias suplementarias y materiales de desecho: pajas, salvados, restos de molinería, yeso, sangre seca.

Sinden, en 1932 patentó "semilla" crecida sobre granos de cereal, dedicándose también a la producción de nuevas variedades de *A. bisporus* (Marcel, 2004), Miller (1971), desarrolló un método para la hibridación de este organismo, basado en el aislamiento de esporas de basidios tetraesporados, iniciándose así el estudio de la mejora genética de variedades.

Waksman (1932), realizó estudios sobre la nutrición de hongos cultivados y el papel de los microorganismos en la descomposición de los residuos vegetales, encontrando que el champiñón tiene preferencia por ligninas, complejos de nitrógeno orgánico, celulosa, hemicelulosa y proteínas.

A la fecha, las empresas nacionales dedicadas a la producción de este hongo sustentan su actividad productiva en cepas comerciales de origen extranjero (Mata & Savoie, 2007). La mayoría de las plantas comerciales obtienen el inóculo o semilla de empresas trasnacionales de prestigio, ya que sólo algunos corporativos cuentan con laboratorios equipados para producir su micelio. Las empresas que no cuentan con instalaciones especializadas para la elaboración de semilla, dependen de la variabilidad genética disponible en las empresas proveedoras (Mata & Savoie, 2007).

El cultivo comercial de champiñón requiere un manejo cuidadoso en cada una de las etapas del ciclo del hongo. *A. bisporus* presenta un ciclo biológico característico que le diferencia de otras especies de *Agaricus* y del resto de los hongos basidiomicetos por su condición de homotálico secundario (Raper *et al.*, 1972), a diferencia de los anteriores que son heterotálicos. La obtención de los cuerpos fructíferos a escala industrial, se consigue después de un período de

desarrollo del micelio vegetativo secundario de 25-33 días de duración, seguido del período propiamente dicho de fructificación, que a su vez abarca entre 40 y 52 días. En muchos países, la elevación del nivel de vida ha llevado consigo un cambio en las costumbres alimenticias, provocando en los últimos años un fuerte aumento del consumo de champiñones. (Chang *et al.*, 1996).

En América Latina y especialmente en México, el cultivo de hongos comestibles se encuentra muy poco desarrollado a pesar de la potencialidad que existe en la región para cultivar hongos que se desarrollan en forma silvestre; en las regiones boscosas de México crecen alrededor de 200 especies de hongos comestibles, los cuales se desarrollan cada año de manera abundante en la época de lluvias y son utilizados en su mayoría por diversos sectores de la población indígena y mestiza del país. En México el cultivo de los hongos comestibles inicio desde 1930, sin embargo la actual industria en el país data de apenas 40 años, cultivándose solamente el champiñón (*Agaricus bisporus*, *Agaricus albidus* y *Agaricus bitorquis*), mediante técnicas extranjeras. (Villaseñor *et al.*, 1997).

El cultivo de hongos en México comenzó con la llegada de José Leben Zdravie a México en 1931. En 1933 Leben Zdravie inició los primeros ensayos del cultivo del champiñón en México, en el rancho ganadero conocido como "Tolimpa", cercano a Texcoco. El micelio o "semilla" empleado procedía de la empresa estadounidense Mushroom Supply Co. de Pensilvania, la cual ya venía funcionando desde 1924. ((Martínez-Carrera *et al.*,1991).

En 1939, Leben Zdravie logró establecer en el rancho "Tonalco" la primera planta productora de hongos en México. La "semilla" utilizada provenía de Francia. (Martínez-Carrera *et al.*, 1991).

En 1974 por primera vez en México, se cultivó en Cuajimalpa una especie de hongo comestible diferente al champiñón cuyo nombre científico corresponde a la especie *Pleurotus ostreatus*. El cultivo de este hongo se originó a raíz de la compra de cuatro pacas de paja de trigo previamente inoculadas, las cuales fueron adquiridas por Cano Faro en Europa. Se trasladaron por avión a México,

donde se incubaron y desarrollaron sus primeras fructificaciones. Inicialmente, como había ocurrido antes con el champiñón, la venta de este hongo era bastante difícil, ya que poca gente lo conocía. Sin embargo, en la actualidad su distribución en el mercado es bastante amplia y se le comercializa curiosamente con el nombre de "setas", a pesar de los diferentes nombres vernáculos que en México existen para esta especie. (Martínez-Carrera *et al.*, 1991).

En México la producción rural y comercial se encuentra localizada en la región central del país y entre el 80% y 90% de la producción nacional, se comercializa a través de la Central de Abastos de la ciudad de México encontrándose el mercado bastante centralizado y adolece de varias debilidades estructurales. En este lugar es común observar prácticas monopólicas, exceso de intermediarios, especulación disponibilidad y precios del producto al consumidor (Martínez-Carrera *et al.*, 1998). Sin embargo, su producción ofrece un área de oportunidad para las nacientes empresas situadas en otras partes del país, como son las regiones sur y sureste (Martínez-Carrera *et al.*, 1998).

### **4.3. Demanda**

La demanda de hongos comestibles se ha incrementado drásticamente durante los últimos años a medida que los consumidores modernos han incrementado la búsqueda de beneficios proporcionados con alimentos saludables (Sánchez *et al.*, 2007).

En la actualidad, 55% de la producción mundial de *A. bisporus* es procesada, principalmente para conservar el producto para consumo futuro. Aproximadamente 50% de la producción es enlatada, mientras que el 5% es secado. El restante 45% es consumido en fresco y este segmento del mercado está creciendo más rápido que el mercado procesado. En algunos países, incluyendo Estados Unidos, el consumo fresco alcanza más del 75% del mercado (USDA, 2006). En términos de consumo per cápita, los europeos están en la punta, consumen alrededor de 3 kg de hongos por año. En Europa, la especie *A.*

*bisporus* comprende cerca del 90% de las ventas de hongos comestibles, con solamente 1% de las ventas producidas de manera orgánica (Fletcher, 2001). En los Estados Unidos, el consumo se ha incrementado continuamente durante las últimas décadas. El consumo per cápita ha incrementado de 0.31 kg en 1965 a 1.82 kg por año en 2006 (USDA, 2006). Al igual que en Europa, aproximadamente 1% de las ventas de *A. bisporus* son producidas orgánicamente (USDA, 2006).

#### 4.4. Características de *Agaricus bisporus*

*Agaricus bisporus* (J.E. Lange, 1926) Imbach (1946) var. *bisporus*, tiene un sombrero de 5-6 cm de diámetro, por regla general, aunque puede llegar a sobrepasar los 10 cm en ejemplares viejos, con fondo blanquecino y presentando fibrillas radiales pardas. Pie corto, cilíndrico, blanco-crema, fistuloso, un poco bulboso. Anillo medio-súpero, ascendente, no muy amplio, membranoso, fugaz. Láminas libres, no muy apretadas, que varían desde rosa pálido a pardo-oscuras, con margen pálido (Figura 1A). Reacción de Schaeffer negativa (Heineman, 1977).

Basidios bispóricos. Esporas de 6-7,5 x 4,5-5  $\mu\text{m}$ , de ovales a elípticas, apiculadas (Figura 1B). Queilocistidios numerosos, mazudos, cilíndricos, de (13) 20-37 x (6) 8-10  $\mu\text{m}$ .

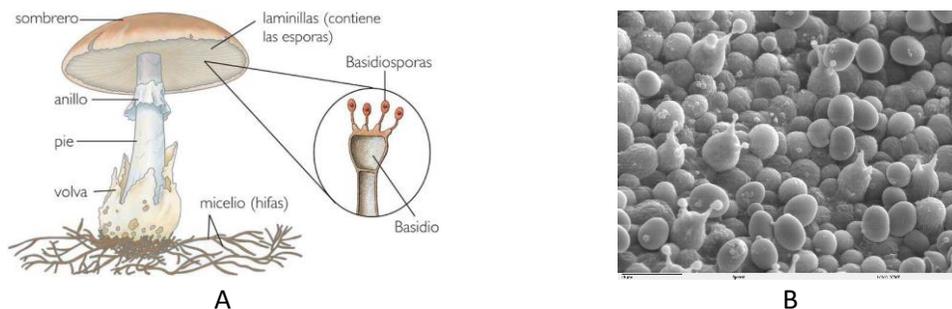


Figura 1. A) Características estructurales de *Agaricus bisporus*. B) Esporas de *Agaricus bisporus* observadas bajo microscopio electrónico.

##### 4.4.1. Ciclo biológico y aspectos genéticos

*A. bisporus* es un hongo homotálico secundario. La mayoría de las esporas tienen dos núcleos haploides, que generalmente son compatibles. Una vez que germinan estos tipos de esporas, pueden dar lugar un micelio dicariótico, capaz de diferenciarse y generar un basidiocarpo (Labarere, 1994).

Con este tipo de hongo es difícil realizar cruzamientos controlados, ya que es necesario, como condición previa, disponer de micelios homocarióticos que no son fáciles de obtener (Labarere, 1994).

El hecho de formar sólo excepcionalmente esporas mononucleadas haploides, productoras de micelios homocarióticos, confiere a este organismo una muy baja variabilidad genética, dificultando su posible hibridación con objeto de obtener nuevas cepas con características preseleccionadas. Para la obtención de dichos micelios homocarióticos se ha recurrido a la obtención de protoplastos mononucleados (Sonnemberg *et al.*, 1988). En el Cuadro 1 se pueden observar algunas propiedades nutritivas del champiñón.

Cuadro 1. Composición nutritiva de *A. bisporus* según Crisan y Sands (1978)

Humedad inicial (%)	78,3-90,5
Proteínas (N x 4,38) (%)	23,9-34,8
Grasas (%)	1,7-8,0
Carbohidratos totales (%)	51,3-62,5
Carbohidratos libres de N (%)	44,0-53,5
Fibras (%)	8,0-10,4
Cenizas (%)	7,7-12,0
Valor energético (Kcal/100 g de materia seca)	328-368

Haddad y Hayes (1978,) mencionan que la proteína en *A. bisporus* varió de un 32 a un 42% en base a su peso en seco. Abou *et al.* (1987), encontraron 46.5% de proteína en base a su peso seco. El contenido total de grasas en *A. bisporus* fue reportado de 1.66 a 2.2/100 g en base a su peso seco (Maggioni *et al.*, 1968). Los hongos también contienen vitamina C en pequeñas cantidades (Sapers *et*

*al.*, 1999; Mattila *et al.*, 2001); son pobres en Vitamina A, D, y E (Anderson & Fellers, 1942). El mayor contenido de minerales en hongos fueron de K, P, Na, Ca, Mg y elementos como Cu, Zn, Fe, Mo, Cd (Bano & Rajarathanum, 1982; Bano *et al.*, 1981; Chang, 1982). K, P, Na y Mg constituyen alrededor del 56 a 70% de contenido total de cenizas de hongos (Li & Chang, 1982), mientras que el potasio forma el 45% de las cenizas totales. Análisis de cenizas mostró una gran cantidad de K, P, Cu y Fe (Anderson y Fellers, 1942). Varo *et al.* (1980), reportó que *A. bisporus* contiene Ca (0.04 g), Mg (0.16), P (0.75 g), Fe (7.8 g), Cu (9.4 mg), Mn (0.833 mg) y Zn (8.6 mg) por kilogramo de peso fresco.

#### **4.4.2. Cultivo de champiñón**

Se pueden distinguir tres procesos básicos dentro del cultivo de champiñón, procesos que se llevan a cabo en áreas de trabajo totalmente independientes pero que están íntimamente relacionados:

-Obtención y producción de la “semilla” o inóculo del champiñón.

-Elaboración de un sustrato nutritivo apropiado para el crecimiento y desarrollo del hongo.

-Cultivo propiamente dicho, es decir, inoculación del sustrato con la “semilla”, desarrollo del micelio, fructificación y cosecha (Gea & Tello, 1997).

#### **4.4.3. Fabricación de “semilla” de Champiñón.**

Por semilla se entiende un material biológico de varias formulaciones, utilizado para sembrar el sustrato, destinado a la producción de champiñón. La semilla está constituida por hifas fúngicas crecidas sobre varias matrices orgánicas (granos de centeno y mijo sobre todo), que proporcionan soporte nutritivo, a la vez que permiten una difusión fraccionada del hongo en la masa del compost, consiguiendo así un gran número de puntos de siembra (Ferri, 1985). La semilla sobre grano (Sinden, 1932, 1936) se ha impuesto a la semilla sobre otros sustratos por sus propiedades bioquímicas y por sus ventajas en la práctica.

Las semillas se obtienen a partir de micelios dicarióticos previamente seleccionados por los fabricantes, quienes tratan de conservarlos durante muchos años sin que haya variación de sus cualidades agronómicas.

La fabricación comercial de semilla se realiza en laboratorios especializados y bajo condiciones asépticas. En la primera etapa, el micelio se cultiva generalmente en medio sólido. Cuando está en plena fase de crecimiento se utiliza para inocular el cariósido, y a continuación se incuba. En el momento en que este se encuentre completamente colonizado por el micelio, constituirá lo que se conoce como “cultivo madre”. Los cultivos madres son fragmentados después y utilizados para inocular el sustrato sobre el cual se desarrollará la semilla que posteriormente se vende (Labarère, 1994).

Según Elliot (1985), el método de fabricación de semilla sobre grano de centeno, el grano es inicialmente premojado -por cocción- en agua, lo que incrementa el contenido en humedad entre un 10-40% en peso (Stoller, 1962). El exceso de agua es drenado. Se añade yeso (sulfato de calcio), 2% en peso, para prevenir que los granos acaben pegados (Ferri, 1985). Con el grano así tratado se rellenan los contenedores (botellas de vidrio, de polietileno o bolsas autoclavables) y se esterilizan en autoclave durante 1,5-2 horas a 120°C. El prolongado autoclavado es necesario para eliminar bacterias termófilas causantes del “agriado” del grano (Bitner, 1972). Terminada la esterilización y el enfriamiento los contenedores son sembrados con micelio procedente de los cultivos madres. Los recipientes se almacenan en una sala de incubación a 24-25°C.

Al cabo de 2-3 semanas, las cariósidos están totalmente invadidos, terminada la incubación, el micelio debe ser conservado en cámara frigorífica, a una temperatura comprendida entre -2 y 2°C, según las variedades comerciales donde se pueden permanecer varias semanas.

A lo largo de todas las fases de su preparación, el micelio que constituirá la semilla debe pasar una serie de controles de calidad. El primero consiste en comprobar la ausencia de todo contaminante bacteriano-fúngico, y eliminar los

lotes contaminados. La calidad de micelio es igualmente comprobada y controlada; velocidad de crecimiento, densidad de la semilla, regularidad de la invasión, etc. (Labarere, 1994).

#### **4.4.3.1. Nutrición del champiñón**

El champiñón, como organismo heterótrofo saprófito, no es capaz de sintetizar su propio alimento, por lo que es necesario suministrarle un medio en el que estén presentes los elementos nutritivos necesarios. A este sustrato, que se produce como alimento para el champiñón, se le denomina compost.

Según Gerrits (1988), los nutrientes que necesita el champiñón se pueden dividir en varios grupos:

- Agua. Alrededor del 92% del champiñón está formado por agua, y esta sustancia la obtiene directamente del compost, y en menor medida, de la capa de cobertura.
- Fuentes de carbono. Los carbohidratos sencillos, tales como azúcares y almidón, tienen poca importancia para el champiñón. Las sustancias más importantes son compuestos complejos que forman parte de la pared celular de las plantas, tales como la celulosa, hemicelulosa y lignina, sustancias que están presentes en el compost.
- Fuentes de nitrógeno. Estas incluyen sustancias como proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos, pero también ácido úrico, urea y amoníaco, que se encuentran en varios tipos de estiércoles. Una gran parte del nitrógeno que necesitan los champiñones puede ser suministrado por el que se encuentra en la lignina después del compostaje, en lo que se conoce como “complejo lignina-humus rico en nitrógeno” (Gerrits et al., 1967).
- Vitaminas. Tiamina, biotina, etc. además de varios factores de crecimiento.
- Minerales. Fósforo, azufre, potasio, calcio, magnesio. También son importantes ciertos minerales necesarios sólo en pequeñas cantidades, tales como: zinc, manganeso y molibdeno.

Se puede definir el compost para el cultivo de champiñón, como un complejo ligno-celulósico de tipo húmico rico en nitrógeno, en el que se encuentran minerales necesarios para la nutrición y metabolismo del champiñón. Al mismo tiempo debe ser selectivo; no debe favorecer el desarrollo de otros organismos distintos al champiñón (Gea y Tello, 1997).

#### **4.4.3.2. Elaboración del compost: Compostaje**

El compostaje es un proceso de fermentación microbiana, en estado sólido, mediante el cuál diversos subproductos vegetales lignocelulósicos considerados como materiales base, junto con otros aditivos nitrogenados o materiales de enriquecimiento, son transportados en un medio de cultivo selectivo para el crecimiento y desarrollo del champiñón (Pardo, 1994).

Materiales empleados en la fabricación de compost para cultivo de champiñón.

- Materiales de base o volumen:
  - Paja de cereales (trigo, centeno, cebada, maíz).
  - Estiércol de caballo
- Aditivos (Sustancias de enriquecimiento):
  - Fertilizante
    - Urea
    - Sulfato amónico
    - Nitrato amónico
  - Materiales de residuos orgánicos:
    - Gallinaza
    - Harina de Soja, etc.
- Otros (neutralizadores y correctores):
  - Yeso
  - Carbonato de Calcio

Para la elaboración del compost se inicia con la mezcla y humidificación de las materias primas en grandes montones planos, colocados al aire libre. Los

montones son cambiados varias veces para uniformar la mezcla y homogenizar la fermentación y riego de la maza, invirtiéndose un total de 10-13 días en este proceso. Se producen varios volteos para oxigenar suficientemente el sustrato para la fermentación aerobia. Mediante las aplicaciones de agua se consigue estimular la actividad microbiana, y con la adición de activadores se asegura una suficiente cantidad de nitrógeno para mantener dicha actividad.

La fase 1 comienza la conversión inicial del sustrato, y es un periodo en el que la sucesión y acción de los diferentes microorganismos prepara el terreno para las reacciones químicas que se producen a temperaturas más elevadas. Cuando la temperatura se eleva por encima de 60°C, los termófilos comienzan a desaparecer y el calor derivado de las reacciones químicas causa la caramelización y las otras reacciones de pardeamiento esenciales para la formación de un sustrato específico para el cultivo. La fase 1 se considera completada tan pronto como las materias primas se transforman en flexibles, y son capaces de retener agua, olor a amoníaco penetrante con color marrón (Schisler, 1982), Gerrits (1988) describe al proceso completo usando el término humificación.

La fase dos tiene dos propósitos: Pasteurización (Fermentación dirigida y controlada) (Cailleux, 1973), y acondicionamiento final del compost para convertirlo en específico para el champiñón (Ausencia de amoníaco y carbohidratos fácilmente disponibles) (Gea & Tello, 1997).

El sustrato procedente de la fase 1 se introduce en las cámaras de pasteurización. La pasteurización requiere una temperatura de 60°C en el aire y en el compost, durante un mínimo de 2 horas (Schisler, 1982) o 18-24 horas (Bonet, 1986), aprovechando el calor por la masa en fermentación.

Una vez concluida la pasteurización, se inicia el llamado acondicionamiento de la masa de sustrato, introduciendo aire nuevo y enfriar el compost por debajo de 60°C y ayudar a disipar el amoníaco residual (Schisler, 1982).

Químicamente, el proceso se caracteriza por la utilización de carbohidratos fácilmente disponibles y la incorporación o volatilización del amoníaco, ya que interesa que la concentración permanezca en el compost de este producto no sea tóxica para el champiñón (Fermor *et al.*, 1985). El objetivo de esta maniobra, es hacer selectivo el sustrato para el champiñón, eliminando el amoníaco (Gea & Tello, 1997).

Terminada esta etapa y comprobada la desaparición del amoníaco libre, se puede dar por finalizado el proceso de elaboración de un sustrato selectivo para la producción de champiñón. El sustrato se coloca en sacos de plástico de aproximadamente 20 kg. de peso y 0.275 m<sup>2</sup> de superficie. La tasa de semilla, que se utiliza en la siembra, es de alrededor del 1% del peso fresco de sustrato; para un saco de 20 kg. se añaden 250 g. de semilla (Gea & Tello, 1997).

Una vez que se han realizado las operaciones de siembra y envasado, los sacos o bloques se trasladan a los locales, donde tiene lugar el cultivo de champiñón (Gea & Tello, 1997).

#### **4.4.3.3. Etapas del ciclo de cultivo**

##### **4.4.3.3.1. Compactado del compost**

Esta operación se realiza con el fin de incrementar la densidad del compost hasta valores óptimos, que permiten evitar la pérdida de humedad del sustrato, y favorecer una buena colonización del mismo por el micelio de *A. bisporus*. Una vez finalizada esta operación, se procede a espolvorear o nebulizar el compost con un insecticida para combatir las plagas de moscas, cubriendo a continuación el sustrato con láminas de plástico para evitar su desecación durante la siguiente fase de cultivo (Gea & Tello, 1997).

##### **4.4.3.3.2. Incubación del micelio**

El micelio se extiende tridimensionalmente por toda la masa del compost. La temperatura del local debe ser de 20-22°C, y la del interior del compost de 25°C.

La humedad relativa del aire debe mantenerse próxima al 95%, y así debe de permanecer hasta la etapa de fructificación (Hermans, 1988).

Al cabo de 2-3 semanas, el micelio del hongo ha colonizado totalmente el sustrato, tomando las bolsas un color blanquecino.

#### **4.4.3.3.3. Cobertura.**

La tierra de cobertura es el material que se utiliza como recubrimiento superior del compost, en el que se desarrollarán los cuerpos fructíferos. La necesidad de la cobertura, cuyo mecanismo de acción no está perfectamente comprendido, surge de la ausencia de otro medio para conseguir la producción de champiñones en cantidades que hagan el cultivo rentable (Pardo, 1990).

#### **4.4.3.3.4. Fase de prefructificación.**

Durante esta fase continúa la colonización del compost y de la capa de cobertura por parte del micelio de *A. bisporus*, manteniendo los factores climáticos con valores idénticos a los expresados en la etapa de incubación (Gea & Tello, 1997).

El objetivo inmediato, después de aplicada la capa de cobertura, es saturarla de agua pero evitando que un riego excesivo produzca una infiltración en el compost. Se realizan los siguientes tratamientos fitosanitarios.

-Primer riego: Inmediatamente después de cubrir. Se aplica formol (1 l/100 L de agua).

-Segundo riego: A los dos días de cubrir. Se aplica un insecticida.

-Tercer riego: Dos días más tarde. Se aplica Prochloraz.

#### **4.4.3.3.5. Inducción de la fructificación.**

Al cabo de 7-9 días después de la cobertura, tiene la aparición del micelio en la superficie de la tierra. Se detiene el crecimiento vegetativo del micelio variando

las condiciones climáticas, de forma que la temperatura ambiente se baja a 16-18°C y se incrementa la ventilación (Gea & tello, 1997).

#### **4.4.3.3.6. Fructificación y cosecha.**

Las condiciones medioambientales necesarias son: humedad relativa al 85% en la primera florada, disminuyendo al 70-75% hacia el final del cultivo. La temperatura ambiente debe situarse entre 15.20°C (Gea & Tello, 1997).

A los 35-40 días, tiene lugar la recolección de los primeros champiñones, esta fase tiene una duración de 35-60 días, durante la cual se recogen unos cinco flujos. El 70% de la producción total se recoge en las tres primeras floradas (Vedder, 1978), o entre el 50-60% del total de la cosecha en las dos primeras floradas, según Martínez *et al.* (1994).

### **4.5. *Mycogone perniciosa***

#### **4.5.1. Taxonomía**

Reino	Fungi
Filum	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Hypocreaceae
Género	<i>Mycogone</i>
Especie	<i>Mycogone perniciosa</i> (Magnus) Delacr. 1900

#### **4.5.2. Importancia**

La enfermedad de la mole húmeda causada por el micopatógeno *Mycogone perniciosa* (Magnus) Delacr., es considerada como una de las enfermedades más importantes del Champiñón (*Agaricus bisporus* Lange (Imb)) Bora & Özaktan (2000), Nanagulyan & Yesayan (2002), Sharma & Kumar (2000), y Sharma & Singh (2003).

La mole húmeda ha sido reportada como una de las enfermedades más serias en casi todos los países productores de champiñones. La enfermedad fue descrita primero en París en 1888, y fue responsable de fuertes pérdidas en camas de producción en Francia, Inglaterra y Estados Unidos (Nielsen, 1932).

*Mycogone perniciosa* Magn. ha sido aislado en el 3.7% de muestras coleccionadas de varias granjas productoras (Forer *et al.*, 1974), mientras que las pérdidas cualitativas y cuantitativas causadas por la mole seca y la mole húmeda en Pennsylvania (USA) fueron de 2.2 millones de dólares en lo referente a las cualidades del champiñón y 19.7 millones de dólares en cuanto a pérdidas cuantitativas en la producción (Nair, 1977).

#### **4.5.3. Morfología del patógeno**

Micelio blanco compacto, algodonoso (Figura 2A). Hifas ramificadas, entretrejidas, septadas, hialinas de 3-5 micrómetros de ancho. Produce conidios y clamidosporas, fialoconidios pequeños de pared delgada, conidióforos cortos, delgados, ramificados, hialinos midiendo 200x3-5 micrómetros, tienen ramificaciones verticiladas y subverticiladas, parecidos a *Verticillium*, de pared delgada, un conidio mide 5-10 x 4-5 micrómetros (Figura 2B). Las clamidosporas son grandes, bicelulares; la célula apical es rugosa, de pared gruesa, globosa,

colorida brillante oscura y la célula inferior es hialina, suave (Figura 2C) (Sharma & Singh, 2003).

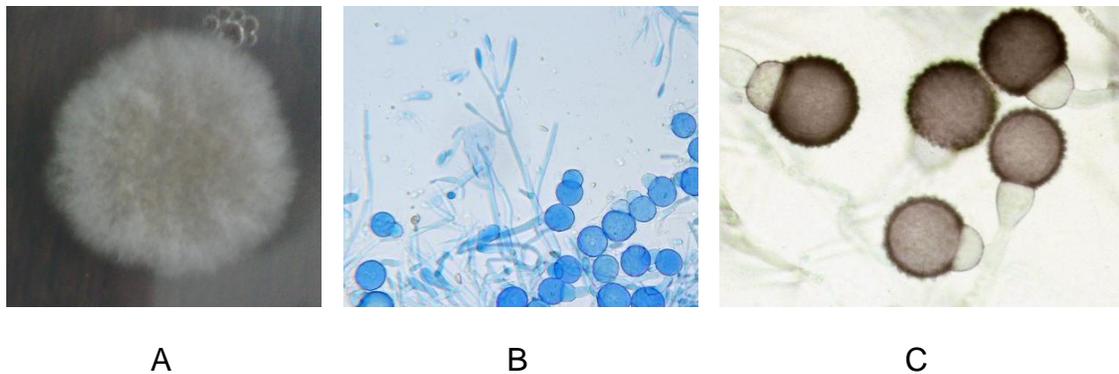


Figura 2. Características morfológicas de *M. perniciosus*. A) Micelio blanco, B) Ramificaciones verticiladas y subverticiladas y C) Clamidosporas bicelulares.

#### 4.5.4. Sintomatología.

Los síntomas de la enfermedad de la mole húmeda en diferentes estados de desarrollo han sido descritos por muchos investigadores (Smith, 1924; Fletcher y Ganney, 1968; Bech *et al.*, 1982; Geijan, 1977; Zaayen y Adriche, 1982; Figueiredo y Mucci, 1985; Tu y Liao, 1989; Sharma y Kumar, 2000; Umar *et al.*, 2000).

Smith (1924), reconoció dos principales tipos de síntomas: esporóforos infectados y masas esclerodermoides. Garcha (1978), describió los síntomas como moho blanco en las fructificaciones del hongo finalizando en masas podridas, con emisión de olores desagradables y la exudación de un líquido café dorado. Por otro lado Hsu y Han (1981), reportan que los esporóforos infectados son reconocidos por dos tipos de síntomas, uno es la forma tumerosa saliente (Figura 3A), como resultado de la infección de la cabeza y el otro es una malformación resultante de una infección en un estadio más tardío del desarrollo del esporóforo (Figura 3B). Ambos tipos de infecciones exudan algunas gotas líquidas sobre la superficie de esporóforos infectados. Estas gotas cambian a un color ámbar. Tu y Liao (1989), observaron que cuando las cabezas jóvenes son infectadas desarrollan formas monstruosas que a menudo no parecen hongos.

Sharma y Kumar (2000), describen el micelio como hifas cortas, rizadas, crecimiento blanco del patógeno sobre hongos malformados los cuales pueden ser fácilmente observados. Un corte transversal de esporóforos malformados muestra áreas circulares negras bajo la capa más externa. Fletcher y Ganny (1969), reportan que la infección en la forma de rayas negras a veces también puede ocurrir en la base del estípite en esporóforos aparentemente sanos. Las hifas de *M. pernicioso*, se enrollan alrededor de la hifa del hospedante con firmes adhesiones eventualmente penetrando las células del hospedante (Umar *et al.*, 2000).



Figura 3. Síntomas de esporóforos con síntomas de mole húmeda. A) masas deformes y B) esporóforos parcialmente deformados

#### 4.5.5. Dispersión

La dispersión de *M. pernicioso* ocurre principalmente a través de la capa de cobertura, pero la introducción del patógeno puede suceder por otros medios. La infección puede ser llevada por el aire, agua o acarreado mecánicamente por moscas y ácaros (Garcha, 1978).

Hsu y Han (1981), reportan que el salpique de agua como un factor importante para la dispersión de la mole húmeda en las camas. Bech *et al.* (1982), reportan que la dispersión ocurre durante el riego y especialmente en la cosecha a través del contacto. También observaron que los contenedores contaminados pueden ser una fuente de dispersión mayor que otros factores.

Contrario a otros reportes se sugiere que las esporas de *M. pernicioso* pueden también dispersarse por las corrientes de aire (Tu & Liao, 1989). Kumar y Sharma (1998), mencionan que el porcentaje de transmisión *in vitro*, por las moscas del champiñón (*Megaselia alterata* y *Lycoriella auripila*) fue del 100 % en medio MEA y del 4-12 % en compost.

La dispersión de las hifas de *M. pernicioso* es superficial, focal, y limitada a unos pocos milímetros bajo la superficie de los cuerpos fructíferos. Las características de la patología de la infección de *M. pernicioso* no están relacionados a la presencia de lesiones. En todas las lesiones, se pueden encontrar regularmente muchas células hospedantes atípicas. Los cambios citopáticos producen un polimorfismo el cual es caracterizado por la condensación ribosomal, ruptura y desaparición del retículo endoplásmico. Se pueden observar las hifas finales del micopatógeno alrededor de las hifas del hospedante con adhesiones firmes y crecimiento intrahifal. El crecimiento intrahifal es parecido al causado por el patógeno *Verticillium fungicola* var. *fungicola* (Umaar & Griensven, 1997).

#### **4.5.6. Rango de hospederos**

*M. pernicioso* no es un patógeno específico de *A. bisporus*, pero parece ser su principal hospedante alrededor del mundo. Ha sido reportado atacando un gran número de hongos frescos silvestres (Sharma, 1995). Figueiredo y Mucci (1985), revelan que *Mycogone pernicioso* es capaz de infectar otras especies de hongos como *A. campestris*. Las especies de *Pleurotus*, *P. eryngii* y *P. nebrodensis* se han reportado cepas susceptibles (Sisto *et al.*, 1997). Todas las cepas de *A. bisporus* y *A. bitorquis* fueron encontrados susceptibles a infecciones de *M. pernicioso* bajo condiciones *in vivo* (Sharma & Kumar, 2000).

#### **4.5.7. Manejo**

Debido a los serios daños al cultivo que el patógeno provoca, se han realizado varios intentos para controlarlo a través de diferentes estrategias (Zaayen, 1982).

Lambert (1930), señaló las temperaturas cardinales para el crecimiento en agar Thaxter: 8°C (mín.), 24°C (óptima) y 32°C (máxima). También reporta que en medio Agar *M. pernicioso* murió por exposición a temperaturas de 42°C o mayores por 6 h o más, de acuerdo a Zaayen y Rutjens (1981), el punto de muerte de *M. pernicioso* es de 48°C. Bech y Kovac (1981), reportan que la suspensión acuosa de esporas de *M. pernicioso* puede resistir a 46°C y 36°C por 10 minutos y 1 hora respectivamente. Hsu y Han (1981), reportan que la temperatura óptima para el crecimiento del micelio, esporulación y germinación de conidios fue de 25°C. También mencionan un pH de 6.0 para una óptima germinación conidial. De acuerdo a Liao (1981), las clamidosporas no germinaron en varios medios *in vitro*, aún después del tratamiento con calor o con la aplicación de químicos y solvente. La germinación ocurrió en PDA expuesto al gas producido por el micelio del hongo en compost de 26 h a 24°C. En otro estudio para revelar la habilidad de germinación de esporas de *M. pernicioso*, Bech y Kovas (1981) encontraron que las aleurosporas eran incapaces de germinar en agua.

Estudios fisiológicos del patógeno, conducido por Sharma y Kumar (2000), revelaron que el extracto de compost soportó el máximo crecimiento del hongo en medio sólido como en líquido. Ellos también reportan un pH óptimo de 5.0 en medio agar papa dextrosa extracto de malta.

Wuest y Moore (1972), sugieren que el vapor de aire a 54.4°C por 15 minutos puede eliminar *M. pernicioso* de la capa de cobertura.

Gandy (1972), encontró que la aspersion de una suspensión acuosa de benomyl a 0.5-4 g/m<sup>2</sup>, inmediatamente después de la cobertura, protege al hongo contra *M. pernicioso*.

Fletcher (1972), señala que el control de la mole húmeda fue obtenido por benomyl o tiofanato metílico a 10 g, mientras que tiabendazol fue ligeramente menos efectivo. Fletcher *et al.* (1975), encontraron relación entre el rendimiento, incidencia de la enfermedad y la aplicación de benomyl a diferentes concentraciones aplicado a la cobertura, benomyl controló la enfermedad en

todas las pruebas, donde metil-tiofanato dio buenos resultados y tiabendazol fue menos efectivo.

Munns (1975), sugiere el uso de macetas plásticas para cubrir hongos con síntomas de moles durante la temporada de corte para prevenir la dispersión de la enfermedad.

Kim (1975), reportó que *M. pernicioso* fue sensible a benomyl donde varios hongos comestibles fueron tolerantes. Gajn (1977), sugirió el control de la mole húmeda por aspersión al cultivo con carbendazim, benomyl o tiofanato metílico a 100, 150, y 200 g/100m<sup>2</sup> respectivamente, en 100-150 mL de agua inmediatamente después de la cobertura.

Kim *et al.* (1978), revelan que obtuvieron buen control de la enfermedad con basamid (Dazomet) y Vapam (metam-sodio) aplicado a 100 ppm, 15 días antes de su uso. Garcha (1978), sugiere que 2 a 3 aspersiones de Dithane z-78 pueden controlar efectivamente esta enfermedad. El uso de agua clorada conteniendo 100 ppm de cloro disponible puede ser también útil en el combate de la mole húmeda.

Stoller (1981), propone un método de preparación y uso de sulfato hidrometano de sodio de formaldehído y bisulfito de sodio que forma un compuesto sin olor y barato dando casi control completo del organismo causante de la mole húmeda.

Zayen y Adrichem (1982), reportan que el polvo humectable de prochloraz manganeso controló la enfermedad sin ser tóxico hacia *A. bisporus*, recomendando dosis de 1.5 g de i.a./m<sup>2</sup>, 4 días después de la cobertura.

Zaayen (1983), reportó que prochloraz a 3g/m<sup>2</sup>, asperjado una vez a los 9 días después de colocar la capa de cobertura dio un excelente control, y Rusell (1984), también encontró resultados similares. Eicker (1987), recomendó el uso de Prochloraz manganeso en Sudáfrica; en 1984, probó el fungicida Tecto (450 g de i.a. de Tiabendazol), el cual también controló satisfactoriamente la mole húmeda.

La formalina ha sido también reportada como inhibidora de la supervivencia de la mole húmeda. La inhibición del patógeno *in vitro* fue desde el 62.5 al 100 por ciento cuando la inoculación de los discos fueron regados con 0.5-2 por ciento de solución de formalina por 5 segundos, la exposición de cepas a vapor con 1-4 por ciento de formalina durante 6-24 horas inhibieron el crecimiento del hongo un 100 por ciento (Sharma, 1999).

Se ha reportado que si la cobertura está contaminada, el control puede alcanzarse tratando con formalina al 1%. Alternadamente, una aspersión de formalina al 0.8% en la superficie de la cobertura, inmediatamente después de colocar la capa de cobertura, puede ser efectivo, esta concentración no puede ser usada en posteriores estados de desarrollo del cultivo (Fletcher *et al.*, 1986).

Tu y Liao (1989), revelan que el uso de compost limpio, suelo de cobertura esterilizado o pasteurizado, un buen calentamiento y fumigación del invernadero, así como el uso de benomyl y tiabendazol son efectivos para el control de la mole húmeda.

Bhatt y Singh (2002), reportaron que *M. pernicioso* fue completamente inhibido por Bavistin (25 µg/ml), Captan (30 µg/ml), Ridomil MZ (300 µg/ml) y Bavistin+Formalina (12+12 µg/µl/ml). Las concentraciones más bajas de estos fungicidas también afectaron el crecimiento del patógeno significativamente. Sin embargo, Bavistin (20 µg/ml), Sporgon (15 µg/ml), Ridomil MZ (25 µg/ml), Bavistin+Formalina (10+10 µg/µl/ml) inhibieron el crecimiento del patógeno más del 90 por ciento después de 7 días de la inoculación.

Experimentos *in vitro* mostraron que prochloraz-Mn (ED<sub>50</sub>=0.006-0.064 µg/ml) y carbendazim (ED<sub>50</sub>=0.031-0.097 µg/ml) fueron los fungicidas más efectivos para inhibir el crecimiento micelial, mientras que iprodiona (ED<sub>50</sub>=1.90-3.80µg/ml) fue el menos efectivo (Francisco *et al.*, 2010).

Zhang (1990), sugirió tres métodos de prevención de la mole húmeda el cual incluye esterilización por vapor de las camas de producción, fumigación con

formaldehído y aplicación de fungicidas. Otros métodos, como muestreo y selección de razas resistentes a enfermedades y control biológico deben ser explotados.

#### **4.5.8. Manejo biológico**

La literatura menciona que el crecimiento micelial y la formación de esporoforos de *A. bisporus* puede ser estimulado por diversos tipos de bacteria, estos pueden ser inhibidores de hongos patógenos de *A. bisporus* (Eger, 1963).

Gandy (1979), menciona que *Acremonium strictum* produce un compuesto antibiótico estable (posiblemente una cefalosporina), el cuál inhibe a *M. perniciososa*, pero su uso en las camas de producción es difícil debido a que los dos hongos son patogénicos al champiñón.

Jhune *et al.* (1990), mientras buscaban el uso de control biológico sobre la enfermedad, seleccionaron 12 bacterias y 71 actinomycetos aislado del compost del champiñón y suelo de cobertura. Finalmente después de realizar las pruebas respectivas de tolerancia y no tolerancia contra el patógeno, se escogieron 3 cepas como organismos promisorios para su uso en control biológico.

Grewal y Grewal (1988), reportan que los extractos de hojas de *Azadirachta indica*, *Chrisantemum indicum*, *Tagetes erecta* mostraron propiedades fungicidas contra varios patógenos del champiñón.

Se ha reportado que microorganismos presentes en la capa de cobertura muestran potencial antagonista contra hongos patógenos de *A. bisporus* (Trogoff y Ricard, 1976). Las bacterias aisladas presentes en el suelo de cobertura inhiben a los hongos patógenos mediante competencia de iones férricos en vez de la competencia espacial, esta utilidad de la flora bacteriana en el control de patógenos que afecta el rendimiento de *Agaricus bisporus* fue reportada por Kleopfer (1992). El género *Pseudomonas* constituye una parte importante de las poblaciones de microflora de la capa de cobertura y muchos de ellos producen

sideróforos los cuales mejoran el desarrollo de *A. bisporus* y también reduce la presencia de hongos parásitos (Byer & Sikora, 1990).

Fermor *et al.* (1991), aislaron 100 *Pseudomonas* fluorescentes con potencial antagonista en la producción de hongos, las cuales se probaron *in vivo* contra la mancha bacteriana de *A. bisporus* y reportaron un 50 por ciento en la reducción de la enfermedad. Los sideróforos producidos por *Pseudomonas* contribuyeron en diferentes grados en la inhibición de *P. tolaasii* causante de la mancha bacteriana de *A. bisporus*. Los aislados de *P. fluorescens*-M. 15 y *P. putida* fueron efectivas contra *Cladobotryum dendroides* (Henry *et al.*, 1991).

Singh *et al.* (2000), aislaron 50 *Pseudomonas* fluorescentes y se evaluaron contra 8 hongos parásitos *Sepedonium chrysosporium*, *Fusarium moniliforme*, *Trichoderma harzianum*, *Neurospora crassa*, *Verticillium fungicola*, *Diehliomyces microsporus*, *Mycogone pernicioso* y *Cladobotryum dendroides*. Ellos encontraron que los sideróforos que produjeron las cepas aisladas tuvieron un papel importante en la formación de primordios, desarrollo de esporóforos y funcionaron para el control biológico de hongos patógenos que afectan a *A. bisporus*. También observó que *V. fungicola* var. *fungicola* causante de la enfermedad La mole seca fue reducida por los aislados bacterianos (C1c, C11b, y CVa) y sugiere que la micro flora existente en la cobertura puede ser usada para el manejo de diferentes enfermedades fungosas de *A. bisporus*.

Ahlawat y Rai (2000), documentaron que las bacterias inoculadas usadas *in vitro* estimularon el crecimiento del micelio y se observó producción precoz del champiñón, mostrando también una reducción en la incidencia de la enfermedad de la falsa trufa.

Bora y Ozaktan (2000), evaluaron algunas *Pseudomonas* fluorescentes antagonistas para el control biológico de los patógenos *Papulaspora byssina*, *Cladobotryum dendroides*, *Pseudomonas tolaasii* y *Mycogone pernicioso*. Ellos encontraron 2 cepas (*Pseudomonas fluorescens* M. 15 y *P. putida* 109) con

potencial antagonista, las cuales pudieron controlar *Papulaspora byssina* del 86.6% al 92.5%, respectivamente.

Varios aislados bacterianos aislados probados bajo condiciones *in vitro* contra *V. fungicola* inhibieron el crecimiento del patógeno del 40-60 por ciento en tratamientos al suelo de cobertura infestado con *V. fungicola*, los aislados bacterianos BIV y BII bajo condiciones controladas suprimieron el crecimiento de *V. fungicola* y aumentaron el rendimiento del Champiñón (Bhatt & Singh, 2000). Mishra y Singh (2003), mientras estudiaban el efecto de diferentes aislados de cobertura contra *V. fungicola*, observaron que la mayoría de los aislados suprimieron el crecimiento del patógeno e incrementaron el rendimiento de *A. bisporus*. Las *Pseudomonas* fluorescentes y actinomicetes fueron antagonistas hacia *M. pernicioso*, potenciando el rendimiento de *A. bisporus*.

Glamoclija *et al.* (2005), mencionan el uso de aceite esencial de *H. officinalis* para el control de *M. pernicioso* debido a su fuerte actividad antifúngica. Glamoclija *et al.* (2009), en su estudio demuestran que el uso de aceite esencial de *Critmun maritimum* presentaron mayor actividad antifúngica contra *M. pernicioso* que el fungicida comercial prochloraz-Mn las cuales pueden ser utilizadas para fines prácticos.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. UBICACIÓN

El experimento *in vitro* se llevó a cabo en el laboratorio de Bacteriología perteneciente al Departamento de Parasitología Agrícola en la Universidad Autónoma Chapingo, que se localiza en el km. 38.5 de la carretera México- Texcoco, en las coordenadas geográficas 19°29'23"N 98°53'37"O.

### 5.2. FASE DE LABORATORIO

#### Muestreos

Se realizaron dos colectas de 50 carpóforos de champiñones en la empresa "Hongos Rioxal", ubicada en: Carretera Federal Jalapa-Perote Km. 118, Las Vigas De Ramírez, Ver. en las coordenadas geográficas: 19°63'45" N y 98.12'65" O; la colecta se realizó mediante la toma de muestras completamente al azar el 12 de abril del 2016 y el 12 de agosto del 2016, el material colectado con síntomas de la mole se depositaron en bolsas de plástico transparente, se etiquetaron y posteriormente se trasladaron al laboratorio.

#### 5.2.1. Aislamiento e identificación del agente causal de la mole.

En el laboratorio, los carpóforos del champiñón se lavaron con agua corriente, se cortaron en pedazos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, posteriormente bajo condiciones asépticas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% durante 1 minuto, después se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril y se colocaron en cajas petri con medio agar papa dextrosa (PDA). Transcurridos 3 días, el micelio que se desarrolló sobre las muestras fue colocado en medio Agua-Agar, en el cuál se obtuvieron puntas de hifas que fueron transferidas a medio PDA.

A los hongos aislados de los carpóforos de *A. bisporus* cultivados en medio PDA, se les determinaron sus características morfológicas y culturales bajo condiciones de laboratorio para ser comparadas con los criterios taxonómicos descritos por Brady y Gibson (1976).

Posteriormente, se hicieron suspensiones acuosas del hongo aislado en agua estéril y se realizaron diluciones las cuales se colocaron en cajas Petri hasta obtener cultivos monoespóricos.

### **5.2.2. Prueba de patogenicidad.**

Con los cultivos monoespóricos obtenidos se realizaron pruebas de patogenicidad para reproducir síntomas y corroborar los postulados de Koch.

#### **5.2.2.1. Preparación del inóculo**

Se utilizó una suspensión acuosa (mas Tween 80 al 0.1%) de conidios del hongo aislado de champiñones enfermos a una concentración de  $2 \times 10^6$ /mL obtenida con ayuda de la cámara Neubauer, con la cual se realizó un conteo de conidios y aleuriosporas.

#### **5.2.2.2. Inoculación**

Se realizaron pruebas de patogenicidad en contenedores de plástico con capacidad de 5 kg de compost. Las cajas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% y se lavaron tres veces con agua destilada estéril.

Al momento del llenado de los recipientes donde se sembraría el micelio, se le aplicó la suspensión acuosa del hongo aislado de los síntomas de mole. Se establecieron dos tratamientos (Cuadro 2):

M1 (Hongo aislado de los síntomas de mole) y  
T1 (Tratamiento testigo),

Cada tratamiento tuvo 3 repeticiones.

Cuadro 2. Prueba de patogenicidad del hongo aislado del champiñón con síntomas de mole, en Chapingo, Edo. de México, 2016.

Tratamiento	Cepa de Hongo
1	M1
2	T1

### 5.2.2.3. Manejo del cultivo

El compost empleado para las pruebas de patogenicidad fue preparado con paja de trigo (65%), pollinaza (25%), bagazo de caña de azúcar (9%) y urea (1%), como fuentes principales de carbono y nitrógeno.

Después de la inoculación, las cajas se mantuvieron en una habitación aislada a una temperatura de  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  con una humedad relativa de más del 85%. También se mantuvo una caja sin inocular en condiciones similares para servir de control y se mantuvo separada para evitar la contaminación cruzada.

Los tratamientos fueron incubados en un área oscura, manteniendo una temperatura ambiental de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ . Dos días después, se hicieron pequeñas perforaciones a la cubierta plástica para favorecer el intercambio gaseoso.

Una vez que el champiñón colonizó el compost, la cubierta plástica fue retirada y a cada muestra se le aplicó sustrato de cobertura (turba y tepojal) formando una capa uniforme sobre la superficie de aproximadamente 4 cm de espesor. Las muestras se mantuvieron en incubación hasta que los micelios crecieron sobre la tierra de cobertura, y entonces se procedió a inducir la formación de los primordios con la disminución gradual de la temperatura ambiental hasta alcanzar  $20^\circ\text{C}$ . Posteriormente, se mantuvieron las condiciones ambientales adecuadas para culminar el ciclo de cultivo.

#### **5.2.2.4. Diseño experimental**

La patogenicidad del hongo aislado fue determinada mediante la evaluación de la incidencia y severidad, se utilizó un diseño experimental completamente al azar, cada unidad experimental contó con 3 repeticiones. Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) y una prueba de comparaciones múltiples de medias de Tukey ( $P = 0.05$ ). Los datos se analizaron con el Programa SAS v.9.0 para Windows.

#### **5.2.2.5. Reaislamiento del agente causal**

Durante la prueba de patogenicidad se fue monitoreando el desarrollo de los síntomas. Se realizaron re-aislamientos del microorganismo de carpóforos enfermos y los cultivos resultantes se compararon con los cultivos obtenidos en la muestra original.

### **5.2.3. Evaluación *in vitro* de bacterias antagónicas sobre el agente causal de la mole del champiñón.**

#### **5.2.3.1. Cepas antagónicas**

Las bacterias antagónicas utilizadas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Fitobacterias del Dpto. de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo; se seleccionaron 15 bacterias de diversos géneros, con los cuales se realizó la evaluación *in vitro* y se observó su efecto contra el hongo aislado.

La evaluación se realizó mediante pruebas de enfrentamiento, utilizando la técnica de cultivo dual en cajas petri de 10 cm de diámetro. Cada cepa bacteriana se sembró en cajas con medio B de King (BK) en una línea horizontal en el centro de la misma. Luego, se incubaron por 48 horas a 28°C, para después colocar en cada extremo próximo a las paredes de la caja petri un disco de agar de 5 mm de diámetro con micelio del patógeno aislado; también se establecieron en cajas separadas con medio BK discos de agar de 5 mm de diámetro con micelio del patógeno, los cuales correspondieron a los controles. Cada 24 horas se midió el

crecimiento radial del micelio del patógeno en cada una de las cajas inoculadas con la cepa bacteriana, y se comparó con el crecimiento del hongo con las cajas control.

Por el número de bacterias a evaluar se establecieron dieciséis tratamientos, cada tratamiento tuvo 3 repeticiones. Diariamente y en todos los tratamientos se midió el crecimiento del hongo con un vernier (Cuadro 3).

El antagonismo de las bacterias utilizadas se comprobó estudiando las variables: Radio de Crecimiento Patógeno (RCP) y Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR).

Se evaluó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), empleando la fórmula de Ezziyyani *et al.* (2004),  $PICR = (R1 - R2)/R1 \times 100$ , donde R1 es el radio del patógeno testigo y R2 es el radio del patógeno en enfrentamiento.

Cuadro 3. Tratamientos *in vitro* para determinar la capacidad antagónica de bacterias, contra el agente causal de la mole del champiñón en el Dpto. de Parasitología Agrícola.

<b>Trat.</b>	<b>Rizobacteria</b>	<b>Trat.</b>	<b>Rizobacteria</b>
<b>1</b>	N	<b>9</b>	3
<b>2</b>	G	<b>10</b>	Col 3
<b>3</b>	J	<b>11</b>	BA2
<b>4</b>	F	<b>12</b>	BA1
<b>5</b>	Col BII	<b>13</b>	Col BII (n)
<b>6</b>	CMV	<b>14</b>	Chapingo
<b>7</b>	H	<b>15</b>	L
<b>8</b>	I	<b>16</b>	Testigo

### **5.3. FASE DE CAMPO**

#### **5.3.1. Establecimiento del experimento en invernadero para el control biológico de agente causal de la mole del champiñón.**

Para esta fase se realizaron dos experimentos uno en el área de la empresa Hongos Rioxal y el segundo en la Universidad Autónoma Chapingo

El primer experimento de la fase de campo se estableció en la empresa “Hongos Rioxal”, ubicada en la dirección: Carretera Federal Jalapa-Perote Km. 118, Las Vigas De Ramírez, Ver. En las coordenadas geográficas: 19°63'45” N y 98.12'65” O.

El segundo experimento se estableció en instalaciones del campo experimental perteneciente al departamento de Fitotecnia, en la Universidad Autónoma Chapingo, que se localiza en el km. 38.5 de la carretera México-Texcoco.

##### **5.3.1.1. Preparación del inóculo**

El agente causal fue cultivado en medio PDA durante siete días a temperatura ambiente ( $\pm 28^\circ$ ), posteriormente se elaboró una suspensión de conidios a una concentración de  $2 \times 10^6$  conidios/mL, la suspensión fue elaborada utilizando agua destilada y Tween 80 al 0.1%.

##### **5.3.1.2. Preparación del inóculo de las bacterias antagónicas**

Las cepas bacterianas anteriormente seleccionadas se incubaron en medio Bk por 24 horas, con ellas se realizó la siembra en 1 L de medio líquido B de King y fueron incubadas en agitación a  $28^\circ\text{C}$  por 96 horas.

La concentración aproximada del inóculo bacteriano fue de  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Estas suspensiones fueron utilizadas como suspensiones madre, de donde se tomaron las alícuotas para aplicar al champiñón.

Durante este periodo también se establecieron tratamientos control, el primero fue tratado con el producto comercial Sportak (procloraz), el segundo testigo fue tratado con agua.

### 5.3.1.3. Preparación del cultivo

El compost empleado fue preparado con paja de trigo (65%), pollinaza (25%), bagazo de caña de azúcar (9%) y urea (1%), como fuentes principales de carbono y nitrógeno, siguiendo las características de la siembra del champiñón en la empresa Rioxal. Para cada tratamiento se pesaron 20 kg del sustrato, el cual se colocó dentro de bolsas de plástico transparentes.

Durante la siembra del champiñón, en cada bolsa de cultivo en el sustrato se inoculó la suspensión de bacterias correspondiente a cada tratamiento (Cuadro 4). La siembra consistió en agregar 250 g de semilla de champiñón y mezclar de manera homogénea el compost. Al finalizar la inoculación las bolsas se cerraron con la finalidad de evitar contacto directo con posibles contaminantes presentes en el ambiente.

Los tratamientos fueron incubados en un área oscura, manteniendo una temperatura ambiental de  $26 \pm 2$  °C. Dos días después, se hicieron pequeñas perforaciones a la cubierta plástica para favorecer el intercambio gaseoso.

Cuadro 4. Tratamientos establecidos en el cultivo de champiñón para evaluar el control biológico de la mole, en Carretera Federal Jalapa-Perote Km. 118, Las Vigas De Ramírez, Ver., en 2017 .

<b>Trat</b>	<b>Bacteria antagónica</b>	<b>Dosis: mL de suspensión bacteriana / 20 kg de sustrato</b>
<b>1</b>	Bacteria 1	60 mL de suspensión bacteriana
<b>2</b>	Bacteria 2	60 mL de suspensión bacteriana
<b>3</b>	Bacteria 3	60 mL de suspensión bacteriana

<b>4</b>	Mezcla 1 (B1+B2)	30 mL de suspensión bacteriana de la Cepa B1 + 30 mL de suspensión bacteriana de la cepa B2.
<b>5</b>	Mezcla 2 (B1+B3)	30 mL de suspensión bacteriana de la cepa B1 + 30 mL de suspensión bacteriana de la cepa B3.
<b>6</b>	Mezcla 3 (B2+B3)	30 mL de suspensión bacteriana de la cepa B2 + 30 mL de suspensión bacteriana de la cepa B3.
<b>7</b>	Mezcla 4 (B1+B2+B3)	20 mL de suspensión bacteriana de la cepa B1 + 20 mL de suspensión bacteriana de la cepa B2 + 30 mL de suspensión bacteriana de la cepa B3.
<b>8</b>	Testigo comercial	1g/L
<b>9</b>	Testigo sano	1 L/bolsa
<b>10</b>	Testigo enfermo	50 mL de una suspensión del hongo causante de la mole húmeda.

Transcurridos siete días después de la aplicación de las cepas antagónicas en el champiñón, se asperjaron 50 mL de una suspensión del hongo micopatógeno a una concentración de  $10^6$  conidios/mL.

Una vez que el champiñón colonizó el compost, la cubierta plástica fue retirada y a cada muestra se le aplicó sustrato de cobertura (turba y tepojal), formando una capa uniforme de aproximadamente 4 cm de espesor sobre la superficie, este material también fue proporcionado por la compañía Rioxal, S.A. de C.V. En el

Cuadro 5 se presentan las actividades realizadas en los primeros 6 días, posteriores a la aplicación del sustrato de cobertura. Las muestras se mantuvieron en el área de incubación hasta que los micelios crecieron sobre la tierra de cobertura, entonces se procedió a inducir la formación de los primordios con la disminución gradual de la temperatura ambiental hasta alcanzar 20 °C, posteriormente, se modificaron las condiciones ambientales adecuadas para culminar el ciclo del cultivo.

Cuadro 5. Calendario de aplicación de los tratamientos, posterior a la aplicación del sustrato de cobertura.

<b>Día</b>	<b>Testigo comercial</b>	<b>Tratamiento con bacterias antagónicas</b>
1	Riego con Formol.	Aplicación de bacterias antagónicas.
2	Riego con agua de riego.	Riego con agua de riego
3	Riego con fungicida Promyl.	Aplicación de bacterias antagónicas.
4	Riego con agua de riego.	Riego con agua de riego.
5	Riego con Procloraz.	Aplicación de bacterias antagónicas.
6	Riego con agua de riego.	Riego con agua de riego.

#### **5.3.1.4. Diseño experimental**

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, cada unidad experimental contó con 3 repeticiones (Figura 4).

T32	T93	T23	T61	T53	T83	T101	T42	T13	T72
T63	T11	T102	T71	T31	T92	T22	T51	T81	T41
T23	T52	T33	T82	T43	T12	T73	T62	T103	T91

Figura 4. Distribución de los tratamientos para el control biológico de la mole del champiñón.

### **5.3.2. Variables evaluadas**

Para el presente estudio se tomó en cuenta el total de champiñones sanos obtenidos dentro del experimento.

#### **5.3.2.1. Incidencia de la enfermedad.**

Se consideró el número de champiñones con la enfermedad dentro de la unidad experimental y se comparó con el número total de champiñones.

#### **5.3.2.2. Severidad de la enfermedad.**

Se estimó de manera visual durante el ciclo del cultivo mediante una escala de daño (Modificado de Berendsen *et al.*, 2012):

1. Cuerpo fructífero sano.
2. Sombrero manchado.
3. Cuerpos fructíferos parcialmente deformados.
4. Cuerpos fructíferos completamente deformados.

Se determinó el porcentaje de champiñones dentro de cada categoría por tratamiento (Berendsen *et al.*, 2012).

Estos valores se transformaron en porcentajes de infección con la Fórmula de Townsend y Heuberger (1943).

$$\% I = \sum \frac{a \times b}{NK} 100$$

Dónde:

- a. Cantidad de observaciones con una misma categoría.
- b. Valor de la escala.

N. Total de observaciones a evaluar.

K. Valor máximo de la escala.

### 5.3.2.3. Eficacia de los tratamientos

Con las medias de severidad de todo el ciclo se obtuvo el porcentaje de eficacia de cada tratamiento con la fórmula de Abbott (1925).

$$\%E = [IT - It / IT] * 100$$

Dónde:

%E= porcentaje de efectividad

IT= infección en el testigo

It= infección en el tratamiento

**Producción.** Los carpóforos cosechados fueron pesados para determinar la eficiencia biológica (EB= peso fresco de los hongos cosechados/peso seco del sustrato empleado, expresado en porcentaje) y tasa de producción (TP= EB/días de cultivo) de cada tratamiento.

**Calidad de la producción.** Se tomaron datos de la forma del carpóforo, diámetro del sombrero y longitud del pie, el cual se realizó con ayuda de un vernier.

### 5.4. Análisis estadístico

El experimento *in vitro* se analizó con un modelo lineal completamente al azar.

En el experimento de campo, los datos obtenidos de cada tratamiento de las variables de incidencia y severidad se analizaron con un diseño completamente al azar. El mejor tratamiento, en las variables de incidencia y severidad, se determinó a partir de las medias obtenidas en el ciclo, se incluyeron las medias de los tratamientos control como punto de referencia.

Para la evaluación de la calidad se conjuntaron los datos de cada tratamiento obtenidos en los cortes. Se evaluaron los factores de manera individual, así como sus interacciones para conocer el efecto sobre la tasa de producción. Además se realizó un análisis de correlación de datos para determinar si existió relación positiva entre longitud y ancho del champiñón. Los índices de productividad obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante un diseño completamente al azar para cada uno de los tratamientos probados y sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), para posteriormente aplicar la prueba de comparación de medias de rangos múltiples de Tukey con un nivel de significancia de  $p = 0.05$ , con el programa SAS para Windows.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Frecuencia de aislamiento de hongos causantes de la mole húmeda.

Durante la toma de muestras realizadas el 12 de abril, y 12 de agosto del 2016 en “Hongos Rioxal, S.A de C.V.”, Perote, Veracruz, se nos permitió tener acceso a naves cultivadas con champiñón, para mostrarnos uno de sus principales problemas al cual ellos designan como mole, el problema se encontraba en 18 naves cultivadas con champiñón, sin embargo, 12 camas presentaban mayor incidencia de la enfermedad, estas camas presentaban un 40% en la reducción del número de champiñones comercializables, así como reducción en la calidad del producto (exentos de daños causados por enfermedades). Se encontraron champiñones con formas irregulares, húmedas, con micelio blanco sobre los esporóforos; algunas muestras colectadas presentaban parte del esporóforo deforme, síntoma característico de las moles (Fig. 5), provocado por el parasitismo del patógeno sobre el champiñón. El porcentaje de incidencia en el primer muestreo fue del 30%, mientras que en el segundo muestreo fue del 45%.



A

B

Figura 5. A) Vista general de una cama cultivada con champiñones mostrando hongos deformes y de menor tamaño y B) Acercamiento de champiñones enfermos donde se puede apreciar su deformación y crecimiento micelial blanco del posible agente causal en Las Vigas de Ramírez, Veracruz, 2017.

En los dos muestreos de malformaciones de esporóforos, consistentes en falta de desarrollo de sombrero, láminas, anillo y pie, con desarrollo superficial de micelio blanco, corto, y rizado, correspondiente al síntoma al que los productores refieren como moles, del total de 50 champiñones enfermos colectados y analizados siempre se aisló únicamente un hongo (cuadro 6), lo que representó una frecuencia de aislamiento del 100%.

Cuadro 6. Frecuencia de aislamiento de *M. pernicioso* asociada a las moles en diferentes muestreos en Las Vigas de Ramírez, Veracruz, 2016

Hongo	Frecuencia (%)	
	Muestreo 12-04-16	Muestreo 12-08-16
1x	100	100

## 6.2. Aislamiento e identificación del agente causal de la mole.

De los 50 champiñones enfermos con la mole, solamente se aisló un solo tipo de hongo. Caracteres morfológicos y culturales fueron estudiados en laboratorio y en el hospedero; de acuerdo con los criterios taxonómicos descritos por Brady y Gibson (1978), el agente causal se identificó como *Mycogone pernicioso*.

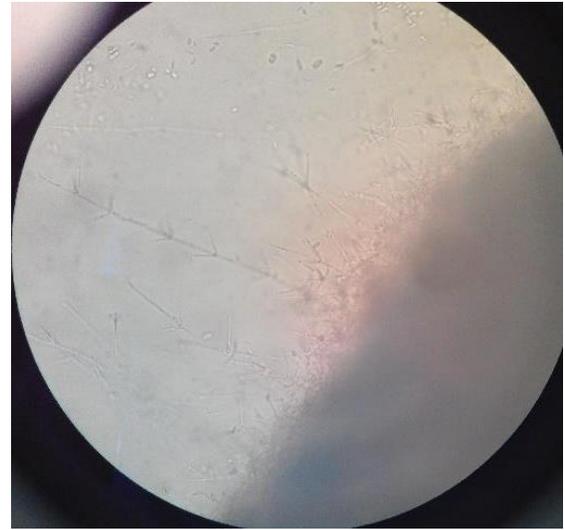
### 6.2.1. Morfología del hongo en el hospedante

El micelio fue de color blanco en las primeras horas de desarrollo y después de 48 horas va adquiriendo una coloración café clara (Figura 6A), mullido, conidióforos rectos, hialinos, septados y con ramificación verticilada (Figura 6B) conidios y aleuriosporas bicelulares (Figura 6C).

Cuando los champiñones enfermos se mantenían en condiciones de 85% de humedad ambiental, sobre ellos se desarrollaba un micelio blanco con conidióforos, conidios y aleuriosporas iguales a las descritas previamente sobre el hongo desarrollado en el medio de cultivo.



A



B



C

Figura 6. A). Colonia del hongo en medio PDA, aislado a partir de champiñones con síntomas de mole, el micelio de color blanco, tornándose café conforme avanza el desarrollo del patógeno, B: Microfotografía (40X) de Conidioforos verticilados, y C: Microfotografía (40X) de aleuriosporas.

### 6.2.2. Prueba de Patogenicidad.

Cuando el sustrato se trató con el hongo aislado de los champiñones con síntomas de mole todos los cuerpos fructíferos que emergieron mostraron los mismos síntomas que aquellos observados en hongos infectados naturalmente.

Los síntomas comenzaron a aparecer a los 7 días después de la inoculación la capa de cobertura, como manchas blancas vellosas de micelio.

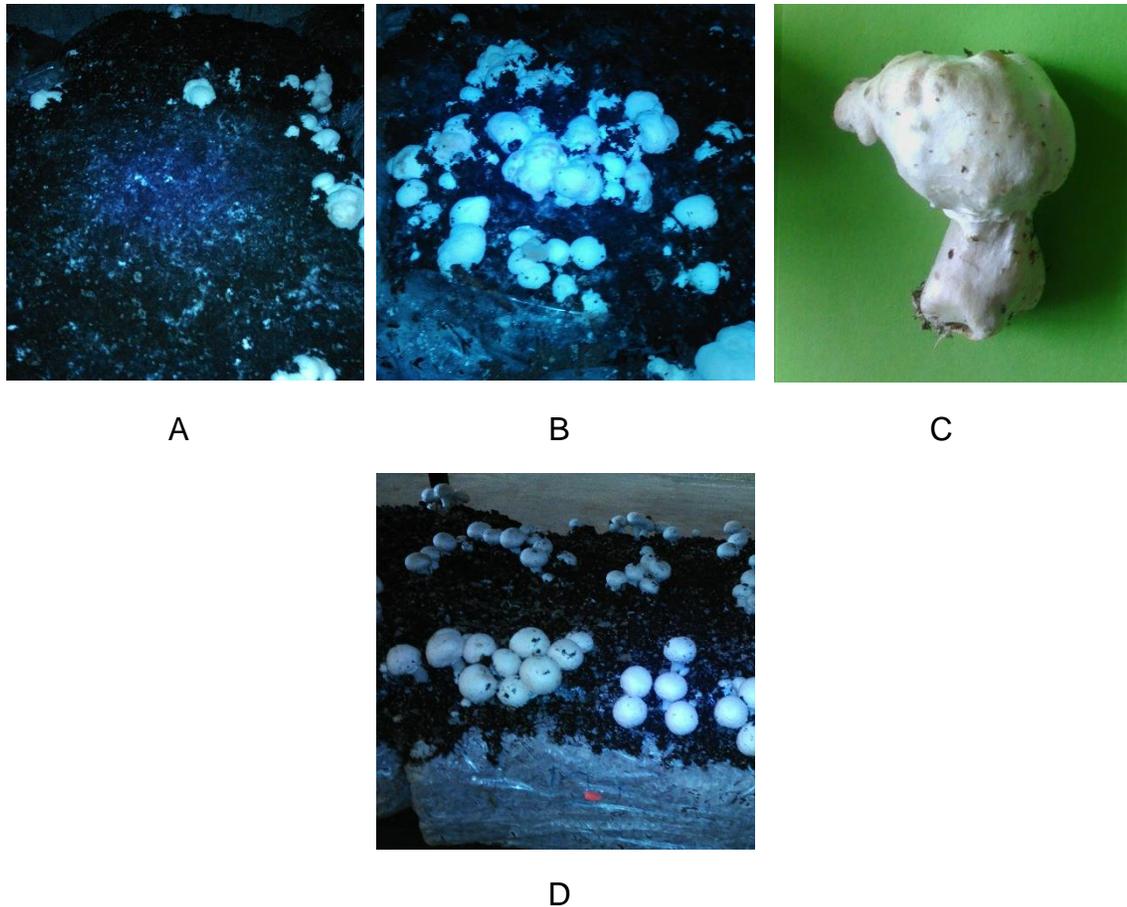


Figura 7. A) Manchas vellosas de micelio. B) Champiñones deformes. C) Acercamiento de un champiñón afectado por mole deformados, D) Champiñones sanos.

Los hongos atacados antes de la diferenciación aparecieron como masas deformes. La infección en estados maduros del hongo mostró un brotado inicial, pero una gran porción del tejido fue colonizado cuando los champiñones fueron infectados después de la diferenciación del pie, sombrero y laminilla (Figura 7). Cuando los hongos infectados fueron incubados de 18-20°C a una alta humedad relativa del 95 por ciento, un número enorme de esporas apareció en el micelio del patógeno. Los champiñones más grandes cuando fueron infectados también mostraron estípites inflados o botones deformados con decoloración de tejidos y también crecimiento difuso. La superficie del hongo se tornó húmeda. Los re-

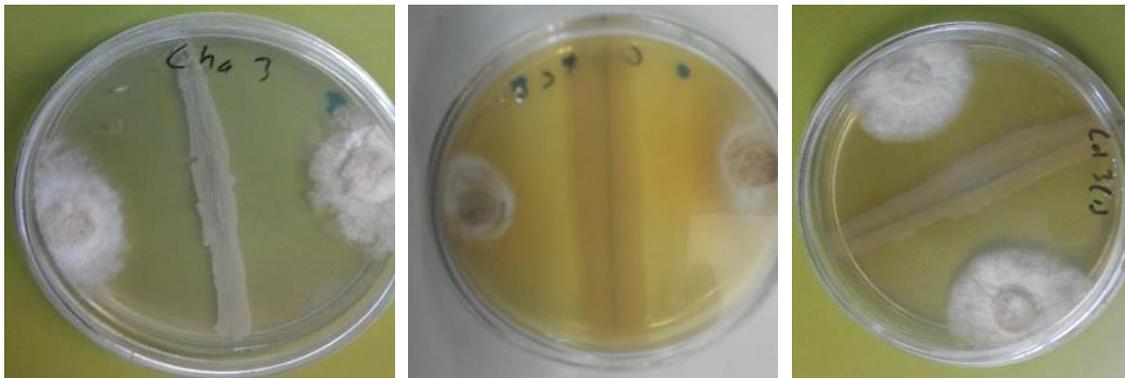
aislamientos de las masas infectadas mostraron cultivos con crecimiento típico del hongo y se corroboraron los postulados de Koch.

A los 30 días después de iniciar el ciclo de cultivo, al determinar la incidencia de la enfermedad se encontró un 100% de incidencia en las bolsas inoculadas con el patógeno.

El porcentaje de severidad de la enfermedad fue del 100% a los 7 días desde que los champiñones presentaron tamaño de guisante.

### **6.3. Evaluación in vitro de bacterias antagonicas sobre *M. pernicioso*.**

De las dieciocho cepas bacterianas antagonicas utilizadas sobre *M. pernicioso*, las cepas Chapingo, Col bII, y Col 3 presentaron halos de inhibición en contra del patógeno, mientras que en la caja testigo se observó un crecimiento rápido del patógeno tal como se puede observar en la Figura 8.



a

b

c



d

Figura 8. Inhibición resultante en la evaluación *in vitro* contra *M. pernicioso*.: a) Cepa Chapingo b) Cepa Col bII c) Cepa Col 3 d) Testigo sembrado con *M. pernicioso*.

La cepa antagonista Chapingo presentó una mayor inhibición en el crecimiento de *M. pernicioso* hasta el día 9 después de realizada la inoculación del hongo.

La cepa antagonista Col bII presentó un porcentaje menor de inhibición en condiciones de laboratorio a los 9 días de realizarse la inoculación de *M. pernicioso*.

La cepa antagonista Col 3 produjo una menor inhibición de *M. pernicioso* en comparación con las cepas Chapingo y Col bII

En un ambiente controlado la cepa Chapingo, presentó un rango de inhibición del 40-60%, la cepa Col bII mostró inhibición del 38-66% y la cepa Col 3 una inhibición del 38-51%, en comparación al testigo inoculado con *M. pernicioso* (Figura 9).

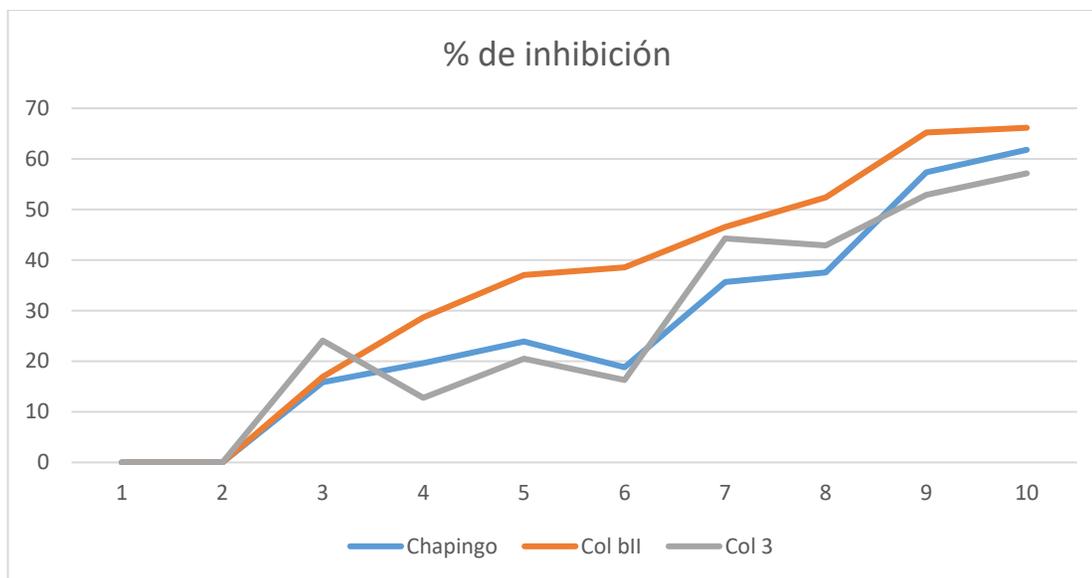


Figura 9. Inhibición *in vitro* del agente causal de la mole húmeda frente a tres bacterias antagonicas

Se usó una prueba de comparación múltiple TUKEY con la cual se diferenciaron los mejores tratamientos como se observa en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Porcentaje de inhibición de bacterias antagonistas sobre el crecimiento *in vitro* de *M. perniciosa*.

Tratamiento	% de inhibición final	Agrupación Tukey
Col bII	38.35 – 66.14	A
Chapingo	35.49 – 61.79	AB
Col 3	38.47 – 57.14	B

Tratamiento	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9
Chapingo	18-16	13-20	22-24	19-21	35-36	34-38	43-57	35-62
Col Bii	17-27	27-29	30-37	30-39	47-50	49-52	50-65	38-66

Col 3	13-14	17-26	23-34	18-34	28-46	34-50	37-50	38-51
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

#### **6.4. Evaluación *in vivo* de bacterias antagonicas sobre *M. pernicioso*.**

##### **6.4.1. Incidencia**

En el primer experimento al evaluar el efecto antagonista *in vivo* de las rizobacterias solas y en mezcla contra *M. pernicioso*, la variable incidencia en el primer día fue contrastante entre los tratamientos, en algunas repeticiones se observó nula incidencia mientras que en otros la incidencia fue muy alta, encontrando éste mismo fenómeno en los días evaluados. En las primeras 2 evaluaciones hubo diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre los diferentes tratamientos y el testigo sano, el primer día se observa que la cepa chapingo presentó una mayor incidencia, mientras que la combinación de las 3 cepas mostró nula incidencia de la enfermedad al igual que el testigo sano y el testigo comercial, en esta evaluación la mezcla Col bII+Col 3 y la cepa Col 3 presentaron menor incidencia en comparación con las demás rizobacterias aplicadas solas o en mezcla; en la segunda evaluación no se encontró diferencia significativa en la incidencia de la enfermedad lo que indica que la incidencia aumentó sustancialmente en el testigo comercial y el testigo sano; en la tercera evaluación los tratamientos con rizobacterias solas o en mezcla presentaron diferencia significativa con el testigo enfermo, el cuál mostró la incidencia más alta. En la cuarta evaluación se observó un incremento muy importante en el porcentaje de incidencia en todos los tratamientos, la incidencia en las cepas Chapingo, Col 3 y Col bII al aplicarse solas no presentaron un comportamiento diferente al de la mezcla, aunque tampoco hubo diferencia estadística significativa en la incidencia ocasionada por Chapingo, Col 3, Col bII y el testigo enfermo llegando en la cuarta evaluación al 100% a lo largo del cultivo.

En general, las mezclas conformadas por las bacterias no mostraron diferencia significativa con los testigos (Cuadro 8), asimismo, las cepas aplicadas solas y la

mezcla de las tres rizobacterias fueron los tratamientos en los que se observó porcentaje más alto de incidencia en experimento al igual que en el testigo enfermo.

Cuadro 8. Comparación de medias del porcentaje de incidencia de la mole del champiñón en Las Vigas de Ramírez, Veracruz, 2017.

Tratamiento	% de Incidencia			
	25-Enero	26-Enero	27-Enero	30-Enero
Col BII	54.33 BAC	63.00 A	72.33 AB	100 A
Chapingo	84.33 A	80.33 A	66.33 AB	100 A
Col 3	25 BAC	81.67 A	73.00 AB	100 A
Col BII + Chapingo	83.33 BA	59.00 A	63.67 AB	100 A
Chapingo + Col 3	80.66 BA	78.33 A	75.33 AB	100 A
Col BII + Col 3	24 BAC	25.67 A	37.67 AB	100 A
Mezcla de 3	0 C	79.00 A	82.00 AB	100 A
Tes comercial	12.66 BC	43.33 A	54.00 AB	100 A
Tes sano	0 C	66.67 A	52.33 AB	100 A
Tes enfermo	100 A	74.33 A	79.33 A	100 A

\*medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tuckey,  $p = 0.05$ ), CV: coeficiente de variación, DMS: diferencia mínima significativa.

En el segundo experimento al realizar la evaluación del efecto antagonista in vivo de las rizobacterias solas y en mezcla contra *M. pernicioso*, los datos obtenidos sugieren que en las primeras evaluaciones hubo diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre los diferentes tratamientos y el testigo comercial, en la segunda evaluación el testigo comercial tuvo un aumento del 50% en la incidencia de la enfermedad, en la tercera evaluación la mole húmeda aumentó su incidencia en el testigo comercial como en el testigo sano, siendo más significativa en el testigo sano. En la cuarta evaluación se observó un 100% en el porcentaje de incidencia en todos los tratamientos (Cuadro 9). La incidencia en las cepas Chapingo, Col 3 y Col bII al aplicarse solas no presentaron un comportamiento diferente al de la mezcla, se observó que no hubo diferencia estadística significativa en la incidencia ocasionada por Chapingo, Col 3, Col bII y el testigo enfermo durante el ciclo del cultivo al tener un 100% de incidencia.

En resumen, las mezclas conformadas por las bacterias no mostraron diferencia significativa con el testigo enfermo, los tratamientos de las cepas bacterianas aplicadas solas y la mezcla de las tres rizobacterias mantuvieron un porcentaje del 100% de incidencia al final de experimento, mientras que en el testigo comercial y el testigo sano la incidencia fue aumentando paulatinamente a lo largo del tiempo.

Cuadro 9. Comparación de medias del porcentaje de incidencia de la mole del champiñón en Chapingo, Texcoco, 2017.

Tratamiento	% de Incidencia			
	08-Mayo	09-Mayo	10-Mayo	12-Mayo
Col BII	100.00 A	100.00 A	100.00 A	100.00 A
Chapingo		100.00 A	100.00 A	100.00 A
Col 3	100.00 A	100.00 A	100.00 A	100.00 A
Col BII + Chapingo	100.00 A	100.00 A	100.00 A	100.00 A
Chapingo+Col 3	100.00 A	100.00 A	100.00 A	100.00 A
Col BII + Col 3	100.00 A	100.00 A	100.00 A	100.00 A
Mezcla de 3	100.00 A	100.00 A	100.00 A	100.00 A
Tes comercial	0 B	43.667 B	57.333 B	100.00 A
Tes sano	0 B	0 C	38.333 C	100.00 A
Tes enfermo	100.00 A	100.00 A	100.00 A	100.00 A

\*medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tuckey,  $p = 0.05$ ), CV: coeficiente de variación, DMS: diferencia mínima significativa

#### 6.4.2 Severidad

En el primer experimento los resultados obtenidos en la aplicación de bacterias antagónicas para el control in vivo de *M. pernicioso* muestran que no hubo diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) del porcentaje de severidad en todas las evaluaciones con respecto al testigo enfermo; sin embargo, se observaron variaciones de la severidad a lo largo del tiempo en todos los tratamientos; en la segunda evaluación, las 3 cepas solas y la mezcla de las tres cepas no mostraron

diferencias en la severidad de la enfermedad, la combinación Col BII+Col 3 mantuvo un porcentaje más bajo de severidad en la enfermedad, aunque estadísticamente no fueron significativas. En la cuarta evaluación se observaron incrementos en los porcentajes de severidad en todos los tratamientos. La mezcla de las 3 rizobacterias, y cada una de las bacterias aplicadas solas no tuvieron diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) con el testigo enfermo, los cuales presentaron mayor porcentaje de severidad, a excepción de la mezcla Col BII+Col 3; el testigo comercial, Col BII+Col 3 y el testigo sin inocular fueron los tratamientos con menor porcentaje de severidad, aunque estadísticamente no hubo diferencia significativa.

En la última evaluación hubo incremento en el porcentaje de severidad en los tratamientos y el porcentaje de severidad fue el mismo para todos los tratamientos (Cuadro 10).

Cuadro 10. Comparación de medias del porcentaje de severidad de la mole húmeda del Champiñón en Las Vigas de Ramírez, Veracruz, 2017.

Tratamiento	% de Severidad			
	25-Enero	26-Enero	27-Enero	30-Enero
Col BII	72,67 A	57,67 A	78,33 AB	100 A
Chapingo	85,67 A	88,33 A	75 AB	100 A
Col 3	86,33 A	35,67 A	82,66 AB	100 A
Col BII + Chapingo	69,33 A	87,67 A	72,66 AB	100 A
Chapingo+Col 3	84 A	85,67 A	81,66 AB	100 A
Col BII + Col 3	44,33 A	35 A	53,3 B	100 A
Mezcla de 3	84,67 A	25 A	86,66 A	100 A
Tes comercial	58 A	34,67 A	65,66 AB	100 A
Tes sano	75,67 A	25 A	64,33 AB	100 A
Tes enfermo	81 A	100 A	84,667 A	100 A

\*medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tuckey,  $p = 0.05$ ), CV: coeficiente de variación, DMS: diferencia mínima significativa

En el segundo experimento, los datos obtenidos en los tratamientos con bacterias antagonicas para el control in vivo de *M. pernicioso* se observa que no hubo diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) del porcentaje de severidad en todas las evaluaciones con respecto al testigo enfermo; por otro lado, se observaron incrementos a lo largo del tiempo en la severidad en el tratamiento comercial y el testigo sin inocular, en la evaluación del 9 de mayo el testigo enfermo, las 3 cepas solas y la mezcla de las tres cepas mostraron 100% de severidad, mientras que el testigo comercial mostró un aumento en la severidad (63%). En la cuarta evaluación se observaron incrementos en los porcentajes de severidad en todos los tratamientos. La mezcla de las 3 rizobacterias, y cada una de las bacterias aplicadas solas no tuvieron diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) con el testigo enfermo, los cuales presentaron mayor porcentaje de severidad (100%), el testigo comercial y el testigo sin inocular fueron los tratamientos con menor porcentaje de severidad al inicio del experimento.

En la última evaluación hubo incremento en el porcentaje de severidad en los tratamientos y al igual que en la evaluación anterior los tratamientos que presentaron mayor porcentaje de severidad fueron los tratamientos de bacterias solas y la mezcla de las bacterias (Cuadro 11).

Cuadro 11. Comparación de medias del porcentaje de severidad de la mole húmeda del Champiñón en Chapingo, Texcoco, 2017.

Tratamiento	% de Severidad							
	08-Mayo		09-Mayo		10-Mayo		12-Mayo	
Col BII	100	A	100	A	100	A	100	A
Chapingo	100	A	100	A	100	A	100	A
Col 3	100	A	100	A	100	A	100	A
Col BII + Chapingo	100	A	100	A	100	A	100	A
Chapingo+Col 3	100	A	100	A	100	A	100	A
Col BII + Col 3	100	A	100	A	100	A	100	A

Mezcla de 3	100	A	100	A	100	A	100	A
Tes comercial	25	B	63	B	70	B	100	A
Tes sano	25	B	25	C	52	C	100	A
Tes enfermo	100	A	100	A	100	A	100	A
<b>DMS</b>	17.37		35.57		45.17		46.61	
<b>CV</b>	94.13		77.24		72.23		58.55	

\*medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tuckey,  $p = 0.05$ ), CV: coeficiente de variación, DMS: diferencia mínima significativa.

Aunque el análisis estadístico no muestra diferencias significativas en la incidencia y severidad entre los tratamientos, el rendimiento obtenido fue significativo entre el testigo comercial, testigo sano y los tratamientos con rizobacterias durante el experimento, teniendo el mejor rendimiento el testigo comercial.

## 7. DISCUSIÓN

En la producción comercial del champiñón se presenta un gran problema de sanidad, el cual puede llegar a afectar hasta el 100% de la producción, 12 camas de 3 naves presentaron mayor incidencia de la enfermedad, las cuales presentaron un 40% en la reducción del número de champiñones comercializables y un porcentaje de incidencia del 30% al 45%, lo cual coincide con lo reportado sobre la enfermedad conocida como la mole como una de las principales enfermedades.

Lo que concuerda con Umar *et al.* (2000) quienes mencionan que esta enfermedad es muy contagiosa y provoca grandes pérdidas de rendimiento y ha sido reportada alrededor del mundo (Fletcher *et al.*, 1995). A lo largo de los muestreos *M. pernicioso* mantuvo su frecuencia de aislamiento, coincidiendo con Fletcher (1981), quien menciona a este micoparásito como uno de los contaminantes más frecuentes en las camas de producción de champiñones; al avanzar el desarrollo del cultivo de champiñón aumenta su susceptibilidad, esto es probablemente causado por el agotamiento de los nutrientes necesarios para el desarrollo del cultivo que provoca una disminución en su defensas contra organismos competentes o micopatógenos. La frecuencia de aislamiento de *M. pernicioso* se mantuvo a lo largo de los muestreos, debido a que la dispersión del patógeno puede ser ocasionada a lo largo del tiempo por el movimiento del aire, puede ser dispersada por ácaros y moscas (Garcha, 1978), o por el salpique del agua con esporas a zonas no infectadas (Hsu y Han, 1981), Bech *et al.* (1982), aunado a esto las prácticas agrícolas propias del cultivo también pueden favorecer su dispersión por el contacto frecuente de los trabajadores al momento de la cosecha y quienes se mueven entre camas y entre naves. Éste patógeno se encuentra a lo largo del tiempo sobreviviendo en restos de cultivos, recipientes infectados, etc. Por lo que la tierra de cobertura es responsable de la dispersión principal, al no tener cuidado de almacenarlos en un área segura, sin riesgo de ser infestado con esporas dispersadas por aire, procedentes de otras naves de cultivo o de restos de cultivos infectados (Fletcher y Ganney, 1968).

Durante la evaluación de su control biológico se logró determinar que este hongo causo pérdidas del rendimiento entre 85-100%, aun cuando fueron aplicados a bajas concentraciones de esporas en el primero y del 100% en el segundo experimento en comparación con el control no infectado. El rendimiento obtenido después de la aplicación de *M. pernicioso* fue altamente correlacionado con la severidad de los síntomas de la enfermedad.

Una alta severidad de la enfermedad en nuestros resultados concuerda con los encontrados por Sharma y Kumar (2000), Bhatt y Singh (2002), Singh y Sharma (2002), Szumigaj-Tarnowska (2015), quienes reportaron que las pérdidas de rendimiento variaron de 65.6-80.1 y 100% después de la inoculación de la capa de cobertura con *M. pernicioso*. Otros estudios, como el realizado por Gea *et al.* (2010) reportaron que la incidencia de la enfermedad en el tratamiento inoculado con *M. pernicioso* fue del 30.6% en la primer florada, en las pruebas conteniendo  $10^6$  esporas por  $m^2$ . Este contraste demuestra que las cepas utilizadas de *M. pernicioso* en este trabajo fue altamente patogénicos a la cepa de *A. bisporus*.

En los dos experimentos un comportamiento similar en la incidencia y severidad de la enfermedad hacia *A. bisporus* fue observada, en el primer experimento la cepa mostró menor virulencia contra el champiñón que en la segunda. Este resultado puede ser explicado por las posibles diferencias en las propiedades físico-químicas de la capa de cobertura y la reacción altamente sensible del champiñón en condiciones de crecimiento los cuales afectan la resistencia a los patógenos.

En este trabajo las bacterias utilizadas tuvieron nula efectividad para el control de la mole húmeda, una causa posible puede ser una muy baja capacidad de colonizar el sustrato debido a que las bacterias fueron aisladas de la rizósfera de plantas, por lo que probablemente tuvieron poca sobrevivencia al no estar adaptadas a las condiciones imperantes en la capa de cobertura.

Ninguna de las cepas aplicadas sobre la capa de cobertura redujo la severidad e incidencia de la enfermedad de la mole húmeda, a pesar de haber mostrado un

efectivo antagonismo *in vitro*. Encontramos que *M. pernicioso* es sensible *In vitro* a sideróforos y antibióticos producidos por cepas de *Pseudomonas*.

Para el control de patógenos de plantas usando *Pseudomonas* y *Bacillus*, la producción de sideróforos y antibióticos puede ser explicado por su habilidad de suprimir enfermedades con las cepas seleccionadas, pero la falta de control de la mole húmeda observada en este trabajo puede ser debido a la posibilidad de que las cepas antagonistas seleccionadas no produzcan compuestos inhibitorios *in vivo*.

Las probabilidades de una infección exitosa de un propágulo del patógeno disminuye con el incremento en la zona de colonización de su hospedero. En plantas, los propágulos se sobreponen en la rizósfera y la mayoría de las veces la exceden y es limitada por las capacidades saprofiticas de un patógeno en el suelo. Agregando la bacteria antagonista se puede reducir la zona en el que un patógeno puede crecer y reducir la patozona. Al respecto, se ha observado que *A. bisporus* coloniza la totalidad de la capa de cobertura muy densamente. Contrastando con la interacción de las plantas y los patógenos del suelo, no existen grandes zonas de la capa de cobertura sin colonizar por el micelio del hongo y la consecuente patozona cubre toda la capa de cobertura. Por lo cual se puede argumentar que, a pesar de que la bacteria antagónica en nuestro ensayo puede reducir la distancia entre patógeno-hospedero, *M. pernicioso* puede crecer saprofitamente, el hospedero siempre se encuentra cerca por lo que la eficacia de la infección no es afectada significativamente. Por otro lado, reduciendo las capacidades del crecimiento saprofitico de un patógeno, los agentes de biocontrol de patógenos en las plantas pueden también interferir con el proceso de infección provocando resistencia sistémica inducida. Las respuestas de defensa sistémica inducida son comúnmente encontradas tanto en plantas como en animales, pero no han sido reportados en hongos. La inhabilidad de las bacterias antagonistas para inducir resistencia en hongos puede explicar la inefectividad contra la enfermedad mole húmeda.

Cepas de *Pseudomonas* han sido efectivas para en el control de enfermedades de plantas, que pueden inhibir a *M. perniciososa in vitro*, pero en este estudio fueron incapaces de tener un control efectivo de la mole húmeda. Yo le atribuyo esta inefectividad a las características de *M. perniciososa* y creo que el control biológico de la mole húmeda con bacterias antagonistas es muy difícil. Los trabajos futuros en busca de métodos para el control de la mole húmeda deberían enfocarse en otras alternativas de control de esta enfermedad.

## 8. CONCLUSIONES

1. El cultivo del champiñón en Las Vigas de Ramírez, Veracruz, es afectado por *Mycogone perniciosa* causando la mole húmeda del Champiñón.
2. Existe un efecto antagónico de cepas bacterianas sobre el patógeno causante de la mole húmeda en el cultivo del champiñón.
3. Durante las pruebas de antagonismo *in vitro* se determinaron las 3 mejores bacterias antagónicas: Col BII, Chapingo, Col 3. La cepa Chapingo presentó inhibición del 40-60%, la cepa Col bII mostró inhibición del 38-66% y la cepa Col 3 una inhibición del 38-51%, en comparación al testigo inoculado con *M. perniciosa*.
4. Ninguno de los tratamientos inoculados al sustrato inhibió la incidencia y severidad de la mole húmeda *in vivo*.
5. Las cepas utilizadas con actividad antagónica *in vitro*, no son una alternativa para su uso *in vivo* para el control de *Mycogone perniciosa*.

## 9. LITERATURA CITADA

- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Ablawat, O. P., & Rai, R. D. (1997). Effect of Azotobacter and Phosphotika biofertilizers on the spawnrun, pinning and yield of the white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Mushroom Res.* 6(2): 69- 74.
- Abercrombie, J. (1817). *Abercrombie's Practical Gardener, or improved System of Horticulture*, 2nd ed. Cadell y Davies, London.
- Abou-Heilah, A.N., Kasionalsim, M.Y., & Khaliel, A.S. (1987). Chemical composition of the fruiting bodies of *Agaricus bisporus*. *Int. J. Expt. Bot.*, 47: 64-68
- Ancona, L., G. Cetz, E. López & N. Pacheco, (2003). *Cocinando Hongos Comestibles*. Yucatán, México. Universidad Autónoma de Yucatán.
- Ancona, P., Ancona, M., Méndez, L., Flores, N., & Pech-Martínez, A. (2005). Estimación de la demanda de *Pleurotus ostreatus* en el estado de Yucatan. *Revista Mexicana de Agronegocios*.
- Anderson, E. E., & Fellers, C. R. (1942). The food value of mushrooms (*A. Campestris*). *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 41: 301.
- Bano, Z., Bhagya, S., Srinivasan, K. S. (1981). Essential amino acid composition and proximate analysis of Mushroom, *Pleurotus florida*. *Mushrooms News Lett. Trop.* 1:6-10.
- Bano, Z., & Rajarathanam, S. (1982). *Pleurotus* mushrooms as a nutritious food. *Tropical mushrooms –Biological Nature and cultivation methods*, (Chang ST, Quimio, TH, eds.) The Chinese University press, Hongkong, pp. 363-382.
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1972). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 3rd Edition, Burgess Publishing Co., Minneapolis, 241 p.
- Bhatt, N., & Singh, R. P., (2000). Chemical and biological management of major fungal pathogens *Agaricus bisporus* Lange Imbach. *Mushroom Sci.* 15:587-593
- Bhatt, N., & Singh, R. P. (2002). Chemical control of mycoparasites of button mushroom. *J. Mycol. Pl. Pathol.*, 32(1): 38-45.
- Bhat, M., Simon, S. & A Munshi, N & A Bhat, Z. (2010). Science and cultivation of edible fungi. *Proceedings of the 15th International Congress on the science*

- and cultivation of Edible fungi, Maastricht, Netherlands 15–19 May, 17: 689–693.
- Bech, K., & Kovacs, G. (1981). Differences in germination ability and reaction to external conditions in *Mycogone pernicioso* and *Verticillium fungicola*. *Mushroom Sci.*, 11(1): 381-391.
- Bech, K., & Andersen, A., Lykke, S. E., Lange, M. (1982). Trace elements in edible mushrooms. *Publ. 68, Stat. Levnedsmiddelinst., Denmark*, 29 pp.
- Berendsen, R. L., Kalkhove, S. I. C., Lugones, L. G., Baars, J. J. P., Wösten, H.A.B, & Bakker, P.A. (2012). Effects of fluorescent *Pseudomonas* spp. isolated from mushroom cultures on *Lecanicillium fungicola*. *Biol Control* 63:210–221.
- Bitner, C. W. (1972). Pathogens of mushroom spawn (*Agaricus bisporus*). *Mushroom Sci.* 8: 601- 609
- Bonnen, A. M., & Hopkins, C. (1997). Fungicide resistance and population variation in *Verticillium fungicola*, a pathogen of the button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Mycolog. Res.*, 101: 89-96.
- Bonet, J. M. (1986). El cultivo de champiñón. *El campo*, 102:48-54.
- Bora, T., Ozaktan, H., & Van-Griensven, L. J. L. D. (2000). Biological control of some important mushroom diseases in Turkey by Fluorescent pseudomonads.
- Brady, B. L. K., & Gibson, I. A. S. (1976). *Mycogone pernicioso*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria no. 499. Commonwealth Agricultural Bureaux, London, UK.
- Byer, J. S. & Sikora, L. J. (1990). Rhizosphere interactions and siderophores. *Plant and Soil* 129: 101-107.
- Chang, S. T. (1982). Prospects for mushroom protein in developing countries. *Tropical Mushroom – Biological Nature and Cultivation Methods* (Chang ST, Quimio TH. eds.), Chinese University Press, Hong Kong, pp. 463-473.
- Chang, S.T., & Buswell, J. A. (1996). Mushroom nutraceuticals. *World J. Microbiol. Biotech.* 12: 473-476.
- Crisan, E.V., & Sands, A. (1978). Nutritional value. The biology and cultivation of edible mushrooms. Chang, S.T. y Hayes, W.A. (Eds.). Academic Press. New York, 137-168 pp.

- Trogoff, H., & Ricard, J. L. (1976). Biological control of *Verticillium malthousei* by *Trichoderma viridae* spray on casing soil in commercial mushroom production. *Plant Dis. Repr.* 60:677-680.
- Eger, G. (1972). Experiments and comments on the action of bacteria on sporophore initiation in *Agaricus bisporus*. *Mushr. Sci.* 8:719-725.
- Eicker, A. (1984). A report on the use of thiabendazole for the control of fungal pathogen of cultivated mushrooms. *South African Journal of Botany* 3(3): 179-183.
- Eicker, A. (1987). A report on the use of Prochloraz-Manganese complex for controlling of major fungal pathogens of the cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) in South Africa. *South African Journal of Botany* 53(5): 345-348.
- Elliot, T. J. (1985). Spawn – making and Spawns. In: *The Biology and Technology of the Cultivated Mushrooms*, P.B. Flegg, D.M. Spencer and D.A. Wood (Eds.), John Wiley & Sons Ltd. Pp. 131– 139.
- Expert Interviews and MarketsandMarkets Analysis. 2015. Mushroom Market by Type (Button, Shiitake, and Oyster), by Application (Fresh Mushrooms and Processed Mushrooms (Dried, Frozen, and Canned)), & by Region - Global Trends & Forecast to 2019. EE.UU. Recuperado de: <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/mushroom-market-733.html>
- Ezziyyani, M. (2004). Biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento, con combinación de bioantagonistas. Tesis Doctoral en Biología Vegetal. Facultad de Biología. Universidad de Murcia. Murcia, España. 107 p.
- FAO. (2014). Mushroom and truffles. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- Fermor, T. R., Randle, P. E., Smith J. F. (1985). Compost as a substrate and its preparation. *The biology and technology of the cultivated mushroom*. Jhon Wiley & Sons Ltd. Chichester. 81-109. pp.
- Fermor, R. T., B. Henry, M., Fenlon, J., Glenister, J.M., Lincoln, S., & Lynch, J. (1991). Development and application of a biocontrol system for bacterial blotch of cultivated mushroom. *Crop Protection*. 10. 271-278.
- Ferri, F. (1985). *I funghi micologia, isolamento, coltivazione*. Edagricole. Bologna. 398 pp.
- Figueiredo, M. B. & Mucci, E. S. F. (1985). Disease and pests of edible mushroom (*Agaricus campestris* L.). *Biologico* 51(4): 93-111
- Fletcher, J. T. (1975). Experiments on the control of bubble disease (*Mycogone pemiciosa*). *Mushroom Journal* 25: 4-5

- Fletcher, J. T., & Ganney, G. W. (1968). Experiments on the biology and control of *Mycogone perniciosus* Magnus. *Mushroom Sci.*, 7(1): 221-237.
- Fletcher, J.T. & Yarham, D.J., 1976. The incidence of benomyl tolerance in *Verticillium fungicola*, *Mycogone perniciosus* and *Hypomyces rosellus* in mushroom crops. *Ann. appl. Biol.* 84: 343–353.
- Fletcher J. T., White P. F., & Gaze R. H. (1986) 'Mushrooms: pests and disease control.
- Fletcher J. (2001) 15th International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi, Maastricht, The Netherlands: 15 – 19 May, 2000. BSPP News Spring 2001 – Online Edition. Disponible en: <http://www.bspp.org.uk/publications/bsppnews/bsppnews38/bsppnews38-13.htm>
- Forer L. B., Wuest P. J., & Wagner, V. R. (1974). Occurrence and economic impact of fungal diseases of mushrooms in Pennsylvania. *Pl. Dis. Repr.* 58: 987- 991.
- Gandy, D. G. (1972). Observations on the development of *Verticillium malthousei* in mushroom crops and the role of cultural practices in its control. *Mushroom Science* Vm:171-181
- Garcha, H. S., (1978). Diseases of mushroom and their control. *Indian mush. Sci.*, 1:185:191
- Gea, F. J., & Tello, J. C. (1997). *Micosis del Cultivo del Champiñón*. Madrid, España. Mundiprensa.
- Gea, F. J., Tello, J. C., & Navarro, M. J. (2003). Occurrence of *Verticillium fungicola* var. *fungicola* on *Agaricus bitorquis* Mushroom Crops in Spain. *J. of Phytopathol.*, 151: 98-100,
- Gea, F. J., Tello, J. C., & Navarro, M. J. (2010). Efficacy and effects on yield of different Fungicides for control of wet bubble disease of mushroom caused by the mycoparasite *Mycogone perniciosus*. *Crop Protection*. 29: 1021-1025.
- Geijn, J. Van de. (1977). The control of bubble (*Verticillium fungicola* and *Mycogone pemiciosus*). *Champignoncultuur*: 197, 199,201
- Gerrits, J. P. G. (1988). Nutrition and compost. VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. (Ed.). *The cultivation of mushrooms*. Horst: Springer Netherlands,. p.29-72.

- Gerrits, J. P. G., Bels-Koning, H. & Muller, F. M. (1967). Changes in compost constituents during composting, pasteurisation and cropping. *Mushroom Science* 6, 225-243.
- Glamoclija, J., Sokovic, M., Vukojevic, J., Milencovic, I., Brkic, D., van Griensven, L. J. L. D. Antifungal activity of essential oil *Hyssopus officinalis* L. against mycopathogen *Mycogone pernicioso* (MANG). *Matica Srpska J Nat Sci.* 2005;109:123-128.
- Glamoclija, J., Sokovic, M., Grubisic, D., Vukojevic, J., Milinekovic, I., Ristic, M., 2009. Antifungal activity of *Critmum maritimum* essential oil and its components against mushroom pathogen *Mycogone pernicioso*. *Chem. Nat. Comp.* 45, 96–97.
- Grewal, P. S., & Grewal, S. K. (1988). Selective fungicidal properties of some plant extracts to mushroom weed moulds. *PhytopnthoU Medit.* 27:112-114
- Grogan, H. M., Keeling, C., & Jukes, A. A. (2000). In vivo response of the mushroom pathogen *Verticillium fungicola* (dry bubble) to prochloraz-manganese. In: *Proceedings of Brighton Crop Protection Conference: Pests & Diseases* (1, pp 273-278). Farnham, Surrey, UK: BCPC.
- Guzmán, G. (1993). 8. Hongos y Líquenes. In: Guevara, S., P. Moreno–Casasola, J. Rzedowski, (eds.), *Logros y perspectivas del conocimiento de los recursos vegetales de México en vísperas del siglo XXI*. Instituto de Ecología y Sociedad Botánica de México. México, D.F.
- Hayes W. A., & Haddad N. (1976). The food value of the cultivated mushroom and its importance in the mushroom industry. *Mushroom J* 4: 104-110.
- Heinemann, P. (1977). *Les Naturalistes Belges*. Bruxelles. 26 pp.
- Henry, M .B., Lynch, Jim, & Fermor, T. R. (1991). Role of siderophores in the biocontrol of *Pseudomonas tolaasii* by fluorescent pseudomonad antagonists. 70. 104-108.
- Hermans, C. (1988). Climate and cultivation technique. In: *The cultivation of mushrooms*. Van Griensven, L.J.L.D. (Ed.). Interlingua. Sussex. 213-248 pp.
- Hsu, K. K., & Han, Y. H. (1981). Physiological and ecological properties and chemical control of *Mycogone pernicioso* Magn. Causing wet bubble in cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Mushroom Sci.*, 11:403-425.
- Jhune, C. S., Cha, A. Y., & You, C. H. (1990). The antifungal microorganisms to *Mycogone pemicioso* Magn. in cultivated mushroom, *Agaricus bisporus* (lange) Imbach. *Korean Journal of Mycology* 18(2): 96-101

- Kees B. J. (2015). Netherlands losing ground in fresh mushroom trade; Fruti and Vegetables facts. Tornado de: <http://www.freshplaza.com/article/143650/Netherlands-losing-ground-in-fresh-mushroom-trade>
- Kim, G. P. (1975). The toxicity of Benomyl and BCM to some edible fungi and pathogenic organisms causing major disease of *Agaricus bisporus*. Research reports of the office of Rural Development, Soil Science, Fertilizer, Plant Protection and Mycology, Korea 17: 137-147
- Kim, G. P., Seok, Y. S., Shin, G. C., & Paic, Y. H. (1978). Studies on the control of *Mycogone pernicioso* Magn. in cultivated mushroom (*Agaricus bisporus* (Lange) Sing.). Korean Journal of Mycology 6(1): 9-14
- Kloepper, J. W. (1992). Plant growth promoting rhizobacteria as biological control agents. 'Soil Microbial Ecology' Applications in Agricultural and Environmental Management (Ed.) Melling F.B. Jr. Marcel Dekker, New York. pp. 225-274.
- Kumar, S., Sharma, S. R. (1998). Transmission of parasitic and competitor moulds of button mushroom through flies. Mush.Res. 7(1):25-28.
- Labarere, J., (1994). Métodos de la genética aplicados a la obtención y mejora de variedades comerciales de los hongos comestibles cultivados. I jornadas Técnicas del Champiñón y Otros hongos Comestibles en Castilla - La Mancha. Patronato de promoción Económica. Cuenca. 9-36 pp.
- Lahmann, O., (2007). Evolución de la industria del champiñón *Agaricus bisporus* en Latinoamérica. Sánchez V., J.E., D. J. Royse, H.
- Lambert, E. B. (1930). Studies on the relation of temperature of the growth, parasitism, thermal death points and control of *Mycogone pernicioso*. Phytopathology 20: 75-83.
- Li, G.S.F., & Chang, S. T. (1982). Nutritive value of *Volvariella volvacea*. Tropical mushrooms –Biological nature and cultivation methods (Chang ST, Quimio TH (eds)) Chinese university press Hong Kong, pp. 199-219.
- Li, Y. (2012). Present development situation and tendency of edible mushroom industry in China. Zhang, J., H. Wang, M. Chen, (eds.), Mushroom Science 18, China Agriculture Press, pp. 3-9.
- Liao, Y. M. (1981). The chlamydospore germination of *Mycogone pernicioso* and its effect on the occurrence of wet bubble of mushroom on the bed. Journal of Agricultural Research of China 30(3): 332-339.

- Maggioni, A., Passera, C., Renosto, F., Benneti, E. (1968). Composition of cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*) during the growing cycle as affected by the nitrogen source in composting. *J. Agric Chem* 16: 517-519.
- Marcel, D. (2004). Fungal biotechnology in agricultural, food & environmental Production of Edible Fungi. In: Rai, R.D. ed. Production of edible fungi. Solan, National Research Centre for Mushroom. 1-14.
- Martínez-Carrera, D., Leben, R., Morales, Porf., Sobal, M., & Larqué-Saavedra, A. (1991). Historia del cultivo comercial de los hongos comestibles en México. *Ciencia y Desarrollo*. 16. 33-43.
- Martínez-Carrera, D., A. Aguilar, W. Martínez, P. Morales, M. Sobal, M. Bonilla, & A. LarquÉ- Saavedra. (1998). A sustainable model for rural production of edible mushrooms in Mexico. *Micol. Neotrop. Apl.* 11: 77-96.
- Martínez-Carrera, D., M. Bonilla, W. Martínez, M. Sobal, A. Aguilar, & E. Pellicer-González, (2001). Characterisation and cultivation of wild *Agaricus* species from México. *Micología Aplicada Internacional* 13 (1): 9-24.
- Martínez-Carrera, D., P. Morales, M. Sobal, M. Bonilla, & W. Martínez, (2007). La cadena de valor de los hongos comestibles de México. In: Zulueta R., R., D. Trejo A., A. Trigos L. (eds.), *El maravilloso mundo de los hongos*. Universidad Veracruzana. Xalapa, pp. 71- 90.
- Mata, G., & J. M. Savoie, (2007). Producción de semilla y conservación de cepas de *Agaricus bisporus*. In: Sánchez, J.E., D.J. Royse, H. Leal Lara (eds.), *Cultivo, mercadotecnia e inocuidad alimenticia de Agaricus bisporus*. El Colegio de la Frontera Sur. pp. 37-48.
- Mattila, P., Könkö, K., Eurola, M., Pihlava, J.-M., Astola, J., Vahteristo, L., Hietaniemi, V., Kumpulainen, J., Valtonen, M., Piironen, V. (2001). Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2343-2348.
- Miller, R. E., (1971). Evidence of sexuality in the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 63: 630–634.
- Mishra, S. K., Singh, R. P. (2003). Effect of biocides against *Mycogone pernicioso* a mycoparasite of *Agaricus bisporus*. *Mushroom Research*, 12: 105–112.
- Mushroom Research, 12: 105–112j.
- Munns, P. (1975). The pot technique for the control of *Verticillium* and *Mycogone*. *Mushroom Journal* 29: 154-156

- Nair, N. G. (1977). Observations on three important diseases of the cultivated mushroom in New South Wales. Plant disease survey 1975/76, New South Wales Department of Agriculture. 30 p.
- Nanagulyan, S. G., & Yesayan, A. G. (2002). Fungal Diseases of Cultivated Mushrooms in Armenia. 7th International Mycological Congress. Oslo, Norway, pp. 259.
- Nielsen O. (1932). Mushroom diseases. Gartnertidende, 2p.
- Pardo, A. (1990). El cultivo del champiñón: cobertura. C.I.E.S. 23 pp.
- Raper, C. A. (1975). The biology and breeding potential of *Agaricus bitorquis*. Mushroom Science 9.
- Raper, C. A., Raper, J. R. & Miller, R. E. (1972). Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*. Mycologia 64, 1088-1117.
- Renard, Y., Cailleux, R. (1973). Contribution a l'étude des microorganismes du compost destiné à la culture du champignon de couche. Revue de mycologie 37, 36-47.
- Royce, D. J., Schisler L. C. (1980) Mushrooms: Consumption, production and cultivation. Interdiscip Sci Rev 5:324-31.
- Salmones, D., Ballesteros, H. D., Zulueta, R., Mata, G. (2012). Determinación de las características productivas de cepas mexicanas silvestres de *Agaricus bisporus*, para su potencial uso comercial . Revista mexicana de micología 36:9-16.
- Sánchez, J. E., Royse D. J., Leal L. H. (2007). Cultivo, mercadotecnia e inocuidad alimenticia de *Agaricus bisporus*. Ecosur. Tapachula, Chiapas. 167 p.
- Sapers, G. M., Miller R, L., Choi, S. W., Cooke, P. H. (1999). Structure and composition of mushrooms as affected by hydrogen peroxide wash. J. Food Sci., 64: 889-892.
- Schisler, L. C. (1982). Biochemical and mycological aspects of mushroom composting. Penn state handbook for comercial mushroom growers. Wuest, P.J. y Benstson, G.D. The Pennsylvania State University. 3-10 pp.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2016). Los hongos y setas, tradición de buena alimentación. Consultado en: <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/los-hongos-y-setas-tradicion-de-buena-alimentacion?idiom=es>
- Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Consultado el 16-02-16: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>

- Sharma, S. R., & Kumar, S. (2000) Studies on wet bubble disease of white button mushrooms (*Agaricus bisporus*) caused by *Mycogone pernicioso*. Mushroom Science XV. Science and cultivation of Edible Fungi. Balkema, Rotterdam. pp. 569–575.
- Sharma, V. P., Sharma, S. R., & Kumar, S. (1999). Adverse effect of formaldehyde on mycelial growth of some edible fungi and their mycoparasites. 'Mush. Res. 8(2):23-26.
- Sharma V. P., & Singh, C. H. (2003). Biology and control of *Mycogone pernicioso* Magn. causing wet bubble disease of white button mushroom. J. Mycol. Plant Pathol. 33 (2): 257–264.
- Sinden, J. (1932). Mushroom spawn and method of making same. USA Paten INS. 1.839.517.
- Sinden, J. W. 1936. Mushroom spawn and method of making it. U. S. patent 2,044,861.
- Singh, P.K., Schaefer, A. L, Parsek, M. R., Moninger, T. O., Welsh, M. J., Greenberg, E. P. (2000). Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. Nature. 407:762–764.
- Sisto, D., Faggiano, S., & Rana, G.L. (1997). *Mycogone pernicioso* a potential threat for cultivated mushroom in Southern Italy. Petrial{3): 159-164
- Smith F. E. V. (1924). Three diseases of cultivated mushrooms. Transactions of the British Mycological Soci-ety 10: 81-97. DOI: 10.1016/S0007-1536(24)80007-4.
- Sonnenberg, A. S. M., Fritsche, G. (1988). The cultivation of mushrooms, Mushroom strains, ed. Van Griensven L.J.L.D. (Interlingua T.T.I. Ltd., East Grinstead, Sussex, UK), pp 101–123.
- Sonnenberg, A. S. M., J. J. P. Baars, P.M. Hendrickx, B. Lavrijssen, W. Gao, A. & Weijn, J.J.(2011). Breeding and strains protection in the button mushroom *Agaricus bisporus*, In: Savoie, J.M., M. Foulongme-Oriol, M. Largeteau, G, Barroso (eds.) Proceeding of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushrooms Products, Arcachon. pp 7-15.
- Stoller, B. B. (1962). Some practical aspects of making mushroom spawn. Mushroom Sci 5: 170-184.
- Stoller, B. B. (1981). An odorless, non - volatile compound to control *Verticillium* and *Mycogone* in mushroom beds. Mushroom Journal 107: 387, 389,391.

- Szumigaj-Tarnowska, J., Ślusarski, C., Uliński, Z. (2015). Pathogenicity of *Mycogone pernicioso* isolates collected on polish mushroom farms. *Journal of Horticultural Research*. 23(1): 87-92. DOI:10.2478/johr-2015-0011.
- Tanović, B., Potocnik, I., Stanisavljević, B., Đorđević, & Marija, R. E. (2006). Response of *Verticillium fungicola* var. *fungicola*, *Mycogone pernicioso* and *Cladobotrym* sp. Mushroom Pathogens to Some Essential Oils. 95 *Pestic. fitomed.* (Beograd). 214577. 631632-231.
- Townsend, G. R., & Heuberger J. W. (1943). Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Rep.* 27: 340-343.
- Tu C. C., & Liao Y. M. (1989). Major diseases of cultivated mushroom and their control in Taiwan. *Proc 12th Int Cong Science and cultivation of edible fungi*. *Mush Sci* 12: 615-26, Braunschweig, Germany.
- Umar, M. H., Geels, F. P., & Van Griensven, L. J. (1997). Morphogenic cell death in developing primordium of *Agaricus bisporus*. *Mycological research* 101, 1025-1032.
- Umar, M. H., Geels, F. P., & Van Griensven, L. J. (2000). Pathology and pathogenesis of *Mycogone pernicioso* infection of *Agaricus bisporus*. *Mushroom Sci.* 15:561-567.
- United States Department of Agriculture (USDA) (2006) Mushrooms. National Agricultural Statistics Service, Agricultural Statistics Board. Washington, D.C.
- Varo, P., Lahelman, O., Nuurtamo, M., Saari, E., & Koivistoinen, P. (1980). Mineral element composition of Finish Food. VII Postal, Vegetables, fruits, berries, nuts and mushrooms. *Acta Agric. Scandinavica Supplement*, 22: 107-113.
- Vedder, P. J. C. (1978). *Modern Mushroom Growing*. Grower Books. 50 Doughty Street, London, England WC1N 2LP 420 pp.
- Villaseñor I. L., Arias G. A., & Rodríguez A. O. (1997). Hongos comestibles que podemos cultivar. Sección Universitaria, internet. México.
- Waksman, S. A., & Nissen, W. (1932). On the nutrition of the cultivated mushroom, *Agaricus campestris*, and the chemical changes brought about by this organism in the manure compost. *American J. Bot.* 19, pp.514-537.
- Waksman S. A., 1932, *Humus*, Williams & Wilkins, Baltimore. Flaig W., Beutelspacher H. Rietz E., 1975, *Chemical composition and physical properties of humic substances*, Soil components: Organic components, vol. 1, Gieseking J.E., Springer Verlag, New York, 1.

- Wuest, P. J., & Moore, R. K. (1972). Additional data on the thermal sensitivity of selected fungi associated with *Agaricus bisporus*. *Phytopathology* 62(12): 1470-1472.
- Zaayen, A. Van. (1983). Prochloraz (Sporgon), a new fungicide in mushroom culture. *Champignoncultuur* 27(4): 163-167.
- Zaayen, A. Van, & Adrichem, J. C. J. Van. (1982). Prochloraz for control of fungal pathogens of cultivated mushrooms. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 88(5): 203-213.
- Zaayen, A. Van, & Rutjens, A. J. 1981. Thermal death points for two *Agaricus* species and for the spores of some major pathogens. *Mushroom Science* XI:393-402.
- Zamora-Martínez, M. C. 1994. Guía tecnológica para la recolecta y propagación del hongo blanco de ocote (*Tricholoma magnivelare* (Peck) Redhead. Guía Tecnológica No. 3. CENID-COMEF INWWAP. México, D.F. 28 pp.
- Zhang, D. H. 1990. Study on the prevention of wet bubble in *Agaricus bisporus*. *Zhongguo Shiyongjun* 9(5): 22-23.
- Zion market research. (2017). Global Industry Perspective, Comprehensive Analysis and Forecast, 2015 – 2021. Disponible en: <https://globenewswire.com/news-release/2017/05/16/985506/0/en/Global-Mushroom-Market-Size-Share-Expected-to-Reach-59-48-Billion-by-2021-Zion-Market-Research.html>.