



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

**MANEJO QUÍMICO, BIOLÓGICO Y ORGÁNICO DEL MOHO
VERDE (*Trichoderma longibrachiatum*) EN SUSTRATO DE
COBERTURA PARA CHAMPIÑÓN (*Agaricus bisporus*)**

T E S I S

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

PRESENTA:

DAVID JHONATAN SÁNCHEZ BAUTISTA

BAJO LA SUPERVISIÓN DEL DR. MARCELO ACOSTA RAMOS

CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO. JULIO 2023



APROBADA



Manejo químico, biológico y orgánico del moho verde (*Trichoderma longibrachiatum*) en sustrato de cobertura para champiñón (*Agaricus bisporus*).

Tesis realizada por **David Jhonatan Sánchez Bautista**, bajo la supervisión del comité asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCION VEGETAL

DIRECTOR: _____

DR. MARCELO ACOSTA RAMOS

ASESOR: _____

MC. ÁNGEL REBOLLAR ALVITER

ASESOR: _____

M.C. EDUARDO SANTIAGO ELENA

Contenido

INDICE DE CUADROS.....	iv
INDICE DE FIGURAS.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
DATOS BIOGRÁFICOS.....	viii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
I. JUSTIFICACIÓN	6
III OBJETIVOS	7
3.1 Objetivo General.....	7
3.2 Objetivos específicos.....	7
IV HIPOTESIS	8
V. REVISIÓN DE LITERATURA.....	9
5.1 Antecedentes de la producción de champiñón en México.	9
5.2 Sistemas de producción del champiñón	11
5.2.1 Sistema Americano	12
5.2.2 Sistema holandés	13
5.2.3 Sistema francés	14
5.3 Composición nutricional y porcentual de los hongos comestibles.	16
5.4 Moho verde (<i>Trichoderma</i> spp.)	17
5.4.1 Descripción e importancia del patógeno en el cultivo de champiñón.	17
5.4.2 Clasificación taxonómica.	19
5.4.3. Descripción morfológica y ciclo biológico.	19
5.4.4 Epidemiología.	21
5.4.5 Manejo cultural de <i>Trichoderma</i> spp. en el sustrato de cobertura.....	23
VI. MATERIALES Y METODOS	24
6.1 Ubicación del experimento.....	24
6.2 Aislamiento del patógeno (<i>Trichoderma</i> spp.).....	25
6.3 Pruebas de patogenicidad.	25
6.3 Análisis Molecular de <i>Trichoderma</i> spp.....	27
6.4 Extracción de ADN	28
6.5 Obtención de PCR.	29
6.6 Tratamientos contra <i>Trichoderma</i> spp en in vitro.....	30

6.7 Evaluación de tratamientos <i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> contra <i>Trichoderma</i> spp.....	31
6.8 Análisis de datos.	31
VII. RESULTADOS Y DISCUSION.	32
7.1 Pruebas de patogenicidad.....	32
7.2 Análisis de secuencias.	32
7.3 Evaluación de la eficacia de tratamientos contra <i>Trichoderma longibrachiatum</i> en <i>in vitro</i>	33
7.4 Evaluación de tratamientos contra <i>Trichoderma longibrachiatum</i> en sustrato de cobertura.	41
7.5 Metodología de 30 días para la preparación rústica de 1ton de composta para el cultivo de champiñón.	46
VIII. CONCLUSIÓN.	55
IX. LITERATURA CONSULTADA	56
X. ANEXOS.....	60
ANEXO 1. CALCULO DE DOSIS COMERCIALES DE PRODUCTOS	60
ANEXO 2. PREPARACIONES DE MEDIOS ENVENENADOS.....	71

INDICE DE CUADROS

Figura	Nombre de Cuadro	Pág.
Cuadro 1.	Comportamiento del diámetro de la colonia de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> para determinar la efectividad biológica de productos químicos, orgánicos y biológicos en condiciones <i>in vitro</i> a los 10 días después de su aplicación.	37
Cuadro 2:	Determinación del porcentaje de eficacia de <i>Laminaria digitata</i> contra <i>T. longibrachiatum</i> .	43
Cuadro 3:	Determinación del porcentaje de eficacia de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa D474 contra <i>T. longibrachiatum</i> .	44
Cuadro 4:	Determinación del porcentaje de eficacia de Procloraz contra <i>T. longibrachiatum</i> .	45
Cuadro 5:	Materiales para la elaboración de una tonelada de composta para champiñón.	47
Cuadro 6:	Fungicidas y extractos vegetales a evaluar.	60

INDICE DE FIGURAS

Figura	Nombre de Figura	Pág.
Figura 1.	Sistema americano de producción de champiñón en tres y dos niveles	12
Figura 2.	Sistema Holandés de producción de champiñón en cuatro niveles	14
Figura 3.	Sistema Francés de producción de champiñón en tres niveles	16
Figura 4.	Vista estructural bajo microscopio de <i>Trichoderma</i> spp.	21
Figura 5.	Ciclo de <i>Trichoderma</i> spp.	22
Figura 6.	Mezcla de peat most más agua	26
Figura 7.	Riego sobre sustrato de cobertura	26
Figura 8.	Esporulación de <i>Trichoderma</i> spp.	26
Figura 9.	Observación bajo microscopio estereoscópico	27
Figura 10.	Esporulación de <i>Trichoderma</i> spp. en sustrato	27
Figura 11.	Preparación de <i>Trichoderma</i> spp. sobre portaobjetos con lactofenol	27
Figura 12.	Observación de <i>Trichoderma</i> spp. en microscopio óptico	27
Figura 13.	Observación de fialides y conidios	27
Figura 14.	Aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp. en caja Petri	27
Figura 15.	Desarrollo de <i>Trichoderma</i> pp. en caja Petri	27
Figura 16.	Incubación de cajas Petri a 25°C	27
Figura 17.	Comparación de crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp.	27
Figura 18.	Formación de discos de <i>Trichoderma</i> spp. con sacabocados	31
Figura 19.	Colocación de disco de <i>Trichoderma</i> spp. para re-aislamiento	31
Figura 20.	Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. en caja Petri para su análisis molecular	31
Figura 21.	Árbol filogenético de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	33
Figura 22.	Comportamiento del diámetro de la colonia de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> en condiciones <i>in vitro</i> para los 10 fungicidas evaluados a los 10 días después de su aplicación	39
Figura 23.	Eficacia de los 10 fungicidas evaluados para el manejo de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> en condiciones <i>in vitro</i> a los 10 días después de su aplicación	39
Figura 24.	Cuadrantes del cordón para toma de temperatura	48
Figura 25.	Relación de temperatura para velocidades de crecimiento de un psicrofílo típico, un termófilo típico y dos diferentes hiper termófilos	49

DEDICATORIA.

Quiero dedicar esta obra a todos los estudiantes que desean aprender y emprender en el cultivo de champiñón.

A mi amigo y asesor el maestro Eduardo Santiago Elena por su acompañamiento durante la realización de este trabajo y por todo su gran apoyo.

A mis padres por darme los ejemplos que necesito para ser cada día mejor.

A mi futura esposa Ernestina Alanís Méndez por su apoyo y comprensión durante todo el proceso de la realización de esta tesis.

A los alumnos que me ayudaron en las diferentes etapas de este trabajo como parte de su servicio social.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar un agradecimiento muy especial al M.C. Antonio Segura Miranda, coordinador del posgrado en Protección Vegetal (Q.E.P.D), sin él nada de esto hubiera sido posible, así como a muchos otros profesionistas, le dio un voto de confianza a este proyecto, mi trayectoria profesional y a mi persona.

Quiero agradecer al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que me otorgó para mis estudios de maestría y gastos de manutención y a la Universidad Autónoma Chapingo por la oportunidad brindada para llevar a cabo mi especialización en materia de sanidad vegetal en sus instalaciones.

Al posgrado de la Maestría en Ciencias en Protección Vegetal y al Departamento de Parasitología Agrícola que, con sus valiosos profesores, contribuyeron a mi crecimiento profesional.

A los miembros de mi comité asesor: Dr. Marcelo Acosta Ramos por las lecciones de vida, asesorarme y ayudarme a terminar este trabajo, al M.C. Eduardo Santiago Elena por su gran amistad, seguimiento y alentarme a continuar durante el desarrollo de esta investigación y al Dr. Ángel Rebollar Alviter por su atención brindada.

Gracias al Dr. Dimas Mejía Sánchez coordinador del posgrado quien en la etapa final de este trabajo me ayudo con sus recomendaciones y consejos, gracias Dr.

A Maribel Espejel Cervantes por todas sus atenciones, las facilidades otorgadas, la disposición de ayudar a los estudiantes, el apoyo, la orientación en cuestiones administrativas y sobre todo por su gran calidad humana llena de alegría.

A mis compañeras de maestría Ana María Aguilera Blanco, Beatriz Hernández Medina y Erika Evelin Ramírez Ramírez por su amistad sincera, por su ayuda y compañerismo durante y después de la maestría, simplemente son geniales.

DATOS BIOGRÁFICOS

DAVID JHONATAN SÁNCHEZ BAUTISTA

Nació el 30 de junio del año 1989, en el Municipio de Huautla de Jiménez en el estado de Oaxaca, realizó sus estudios de nivel bachillerato en la Preparatoria Agrícola en la Universidad Autónoma Chapingo en el periodo 2006-2009. Encaminó sus estudios profesionales en el Departamento de Fitotecnia durante el período 2009-2013, obteniendo el título de Agrónomo en Horticultura Protegida. Realizó sus estudios de posgrado durante 2021-2022 en el programa Maestría en Ciencias en Protección Vegetal de la Universidad Autónoma Chapingo. Profesionalmente ha ejercido como extensionista en proyectos de desarrollo rural de la SAGARPA ahora SADER, ha prestado sus servicios como asesor-técnico en la producción de hongos comestibles champiñón y ostras en varios estados de la república a grupos de productores, docentes y estudiantes de los planteles educativos CBTA'S, tiene experiencia en el manejo de los cultivos de jitomate, pimiento, pepino, hongos bajo invernadero, en la capacitación a grupos y se ha desempeñado como docente frente a grupo en el nivel medio superior.



MANEJO QUÍMICO, BIOLÓGICO Y ORGÁNICO DEL MOHO VERDE (*Trichoderma longibrachiatum*) EN SUSTRATO DE COBERTURA PARA CHAMPIÑÓN (*Agaricus bisporus*)

David Jhonatan Sánchez Bautista¹, Marcelo Acosta Ramos^{1*}, Eduardo Santiago Elena¹ y Ángel Rebollar Alviter².

RESUMEN

En el Laboratorio de hongos comestibles de la Universidad Autónoma Chapingo, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* e *in vivo* con fungicidas biológicos, orgánicos o químicos para evaluar su efecto sobre el desarrollo de *Trichoderma longibrachiatum* agente causal del moho verde del sustrato de cobertura en el cultivo de champiñón, en este trabajo se identificó a este hongo presente en la zona de Texcoco mediante su observación bajo microscopio óptico e identificación molecular y en un ensayo *in vitro* usando agar, papa y dextrosa (PDA) envenenado con *Spathodea campanulata* 80%, *Argemone munita* 80%, *Bougainvillea spectabilis* 80%, *Melaleuca alternifolia* 23.8 %, *Bacillus amyloliquefaciens* Hgo10 5%, *Reynoutria sachalinensis* 20%, *Laminaria digitata* 4.27%, *B. amyloliquefaciens* D747 98.85%, Procloraz 42.10% y Azoxystrobin 50%, se colocó un disco de 5 mm de *T. longibrachiatum* para después incubar los tratamientos durante 10 días a 23°C, evaluando el efecto de cuatro dosis de cada producto (0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 μL) con cuatro repeticiones en un diseño completamente al azar, repitiendo cuatro veces este ensayo para confirmar los resultados obtenidos determinando con esto que *Laminaria digitata* 4.27% a 45 ppm inhibió el crecimiento de *T. longibrachiatum* con una eficacia del 98.6 %, seguido de *B. amyloliquefaciens* D747 98.85%, a 497 ppm con 96.1 % de eficacia, seguido de Procloraz 42.10% a 900 ppm con 95.1 % de eficacia y finalmente Azoxystrobin 50% a 125 ppm con 93.7 % de eficacia, enseguida en una fase *in vivo* usando el sustrato de cobertura "Peat moss" previamente inoculado con 2.5 ml de solución de esporas de *T. longibrachiatum* (10^6 conidios / ml), se determinó que *Laminaria digitata* 4.27%, tuvo la eficacia del 95% (45 ppm) en contra del desarrollo de *Trichoderma longibrachiatum*, seguido de *B. amyloliquefaciens* D474 98.85%, con 90% de eficacia (497 ppm), y finalmente Procloraz 42.10% también con 90% de eficacia (900 ppm).

Palabras clave: Moho verde, *Trichoderma longibrachiatum*, champiñón, *Agaricus bisporus*, sustrato, peat most.

CHEMICAL, BIOLOGICAL AND ORGANIC MANAGEMENT OF GREEN MOLD (*Trichoderma longibrachiatum*) IN COVERING SUBSTRATE FOR MUSHROOMS (*Agaricus bisporus*)

David Jhonatan Sánchez Bautista¹, Marcelo Acosta Ramos^{1*}, Eduardo Santiago Elena¹ y Ángel Rebollar Alviter².

ABSTRACT

In the edible fungi laboratory of the Universidad Autónoma Chapingo, in vitro and in vivo trials were carried out with biological, organic or chemical fungicides to evaluate their effect on the development of *Trichoderma longibrachiatum*, the causal agent of green mold of the cover substrate in the mushroom crop, in this work this fungus present in the Texcoco area was identified by means of its observation under optical microscope and molecular identification and in an in vitro assay using agar, potato and dextrose (PDA) poisoned with *Spathodea campanulata* 80%, *Argemone munita* 80%, *Bougainvillea spectabilis* 80%, *Melaleuca alternifolia* 23.8%, *Bacillus amyloliquefaciens* Hgo10 5%, *Reynoutria sachalinensis* 20%, *Laminaria digitata* 4.27%, *B. amyloliquefaciens* D747 98.85%, Prochloraz 42.10% and Azoxystrobin 50%, a 5 mm disc of *T. longibrachiatum* was placed to then incubate the treatments for 10 days at 23°C, evaluating the effect of four doses of each product (0.025, 0.05, 0.1 and 0.2 µL) with four replicates in a completely randomized design, repeating this test four times to confirm the results obtained, determining that *Laminaria digitata* 4.27% at 45 ppm inhibited the growth of *T. longibrachiatum* with an efficiency of 98.6%, followed by *B. amyloliquefaciens* D747 98.85%, at 497 ppm with 96.1% of efficacy, followed by Prochloraz 42.10% at 900 ppm with 95.1% of efficacy and finally Azoxystrobin 50% at 125 ppm with 93.7% of efficacy, then in an in vivo phase using the covering substrate "Peat moss" previously inoculated with 2.5 ml of solution of spores of *T. longibrachiatum* spore solution (106 conidia / ml), it was determined that *Laminaria digitata* 4.27%, had 95% efficacy (45 ppm) against the development of *Trichoderma longibrachiatum*, followed by *B. amyloliquefaciens* D474 98.85%, with 90% efficacy (497 ppm), and finally Prochloraz 42.10% also with 90% efficacy (900 ppm).

Key words: Green mold, *Trichoderma longibrachiatum*, mushroom, *Agaricus bisporus*, substrate, peat most.

INTRODUCCIÓN

La fungicultura es una actividad que data de hace más de 2 mil años, se desarrolló en el continente asiático y fue en china en el año 600 antes de nuestra era que se cultivó por primera vez un hongo comestible (*Auricularia auricula judae*) conocido como oreja de judas (CONACyT, 2021), por otra parte en México no existe evidencia de la práctica de la fungicultura durante el período prehispánico, sin embargo, si existe evidencia de la importancia de los hongos recolectados dentro de la cultura de nuestros antepasados, pues se han encontrado vestigios arqueológicos como los hongos de piedra de Mesoamérica y prevalecen actualmente algunos nombres de lugares como Nanacatepec (cerro de los hongos) y Nanacamilpa (lugar donde crecen los hongos) con el vocablo “*nanacatl*” que significa carne que a su vez en la lengua Náhuatl hace referencia a los hongos (CONACyT, 2021), ya en la época moderna en México y en muchos otros países, la producción de hongos comestibles ha adquirido una gran importancia tanto como la producción de hortalizas, debido a la creciente demografía, a la investigación, confirmación y difusión de sus propiedades alimenticias, medicinales y nutraceuticas, se estima que la producción mundial de hongos de 69 países excluyendo a nuestro país es de 82, 797,467 toneladas (FAOSTAT, 2021).

Nuestro país, es el mayor productor de hongos comestibles de Latinoamérica, al generar el 80.8% de la producción, seguido por Brasil (7.7%) y Colombia (5.2%), entre las principales entidades productoras de hongos comestibles de México se

encuentran Coahuila, Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala y Veracruz (Romero *et al.*, 2018).

En cuanto a los champiñones (*Agaricus bisporus*) tanto en México como el resto del mundo son los hongos comestibles más cultivados por sus propiedades organolépticas y en segundo lugar podemos encontrar a los hongos ostras; conocidos como hongos “setas” (*Pleurotus ostreatus*). La producción nacional de hongos cultivados en el 2021 se estimó en poco más de 55 mil toneladas, donde más del 85% de la producción corresponde Champiñón (*A. bisporus*), 10% a hongos ostra (*P. ostreatus*) y 0.1% a el hongo japonés shiitake (*Lentinula edodes*) (INECOL, 2021).

Martínez (2002) menciona, la producción de hongos comestibles sigue incrementándose; pero como en cualquier otro sistema de un monocultivo se presentan diversos problemas fitosanitarios causados por agentes como insectos, virus, bacterias y otros hongos inferiores denominados oportunistas como es el caso particular de *Trichoderma* spp. Mejor conocido por los fungicultores como el “moho verde”. La incidencia y severidad de este patógeno en la producción particular de *A. bisporus*, se debe una mala higiene de la unidad, un mal proceso de elaboración de composta, la falta de tratamiento al sustrato de cobertura, un mal control de plagas que fungen como vectores, un incorrecto control de los factores abióticos como la temperatura, humedad, oxigenación, corrientes de aire y saturación de dióxido de carbono en el ambiente.

En la elaboración de composta, puede aparecer por primera vez *Trichoderma* spp. si la materia orgánica no se procesa adecuadamente bajo los rangos de temperatura recomendados (65-70°C), en el sustrato de cobertura es el segundo posible y más crítico punto de incidencia de este patógeno, de no hacerse un tratamiento a base de agua caliente (100°C) y cal (300 g./kg de sustrato) la esporulación de *Trichoderma* spp. se desarrolla rápidamente, además *Trichoderma* spp. se puede encontrar alojado desde el principio sobre la semilla vehículo que se utilice para las esporas de champiñón y puede desarrollarse sobre el micelio del mismo champiñón si se almacena el micelio contaminado y no se utiliza en la siembra, por lo que es necesario tener la certeza y garantía de la inocuidad y origen del micelio a utilizar. Finalmente durante la etapa de producción de los cuerpos fructíferos de champiñón *Trichoderma* spp. es capaz de parasitar sobre los carpóforos convirtiéndose en un micoparásito si no se realiza un manejo adecuado de la enfermedad y de su principal vector que es la mosca del champiñón *Megaselia halterata* (Gary, 2002).

El moho verde es un hongo cosmopolita, saprofita, oportunista con múltiples especies, se pueden presentar biotipos altamente agresivos de *Trichoderma* spp. en Europa y Norte América, se ha reportado Como T1, T2., T3 y T4. Pero la patogenicidad de *Trichoderma* en el cultivo de champiñón se comprobó hasta el año de 1995 en norte América; donde causó pérdidas de un 30 a 100% en las plantas champiñoneras de Chester, Pennsylvania (Samuels *et al.*, 2002). En México, solo existe un reporte en el año de 2004, en donde se identificó a

Trichoderma spp., y se mencionó su frecuente aparición en la producción de champiñón (*A. bisporus*), hongo ostra (*P. ostreatus*) y el hongo japonés shiitake (*L. edodes*); donde se detectaron cepas altamente agresivas de *T. aggressivum* con técnicas clásicas y moleculares, en la composta para champiñón de la planta Grupo monte blanco S.A. de C.V. (Romero y Huerta, 2009). Sin embargo, ya para 2022 se desconoce la distribución de *Trichoderma* spp., en las unidades de producción del país y las pérdidas que ocasiona.

I. JUSTIFICACIÓN

El moho verde, es el principal problema que interviene en la producción de Champiñón, causando pérdidas totales si no se implementan estrategias preventivas donde se incluyan fungicidas de bajo riesgo, para la salud humana y el medio ambiente. Se ha identificado a la etapa de “colocación de sustrato de cobertura”, como el momento crucial para el uso de fungicidas; es en esta fase del proceso de producción de champiñón donde con un correcto tratamiento al sustrato más la adición de un fungicida se garantiza la baja o nula aparición del patógeno *Trichoderma* spp. en el cultivo de champiñón. En base en lo anterior, es necesario explorar el efecto de otros fungicidas químicos comerciales, biofungicidas y extractos vegetales a diferentes dosis para ampliar el abanico de opciones para el manejo de *Trichoderma* spp. así como reevaluar el uso de Procloraz para corroborar su eficacia, tanto *in vitro* como *in vivo* en el sustrato de cobertura. Por tanto, en la presente investigación sobre el manejo químico, biológico y orgánico del moho verde identificado en la región de Texcoco en

sustrato de cobertura para champiñón (*Agaricus bisporus*) se establecieron los siguientes:

III OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

- Identificar al agente causal del moho verde que incide en la etapa de sustrato de cobertura para el cultivo de champiñón encontrado en la zona de Texcoco mediante su observación bajo microscopio óptico e identificación molecular y evaluar la eficacia de extractos vegetales, biofungicidas y fungicidas químicos sobre su desarrollo.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar el agente causal del moho verde del champiñón encontrado en la zona de Texcoco.
- Determinar la eficacia de diez productos en contra del desarrollo de *Trichoderma longibrachiatum* en tres ensayos *in vitro*.
- Evaluar la eficacia de diez productos en contra del desarrollo de *Trichoderma longibrachiatum* en una fase *in vivo* sobre el sustrato de cobertura.
- Establecer una metodología de 30 días para la preparación rústica de composta libre para el cultivo de champiñón.

IV HIPOTESIS

H0: Todos los tratamientos contra *Trichoderma* spp. Son iguales entre sí.

Ha: Al menos un tratamiento contra *Trichoderma* spp. Es diferente a los demás.

V. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1 Antecedentes de la producción de champiñón en México.

En México, los hongos se consumían desde tiempos prehispánicos por parte de los diferentes grupos indígenas que habitaron la América precolombina, quienes reconocían sus propiedades nutricionales y curativas. Sin embargo, no existen evidencias del cultivo de hongos como tal; y solo se realizaba su recolección en las temporadas de lluvia; entre los aztecas, se les conocía como “nanacatl”, vocablo náhuatl que significa “carne” que a su vez hace alusión a los hongos y debido a la abundancia de estos en ciertos lugares, los aztecas, nombraron lugares como Nanacatepec (el cerro de los hongos) en Puebla y Nanacamilpa (lugar donde crecen los hongos) en Tlaxcala, mostrando así la importancia de estos organismos en la vida cotidiana de la vida prehispánica (CONACyT, 2021).

Es importante aclarar que el término “setas” no es un término exclusivo de una sola especie de hongos comestibles. Este término, se aplica a todos los hongos superiores basidiomicetos que constan de un sombrero, himenio y estípite. En México, es común usar el término de hongos setas para referirse a los hongos del género, *Pleurotus ostreatus* spp. “Hongos ostra”; pero muchos otros hongos están en el grupo de las setas como el champiñón (*A. bisporus*).

Nuestro país, fue pionero en el cultivo de setas en América Latina y en la actualidad es el principal productor de hongos comestibles, esto ha sido posible a partir de un largo proceso de estudios mediante ensayos productivos con acciones de prueba y error, que han generado el conocimiento de la fungicultura.

En México, la producción de hongos tuvo su inicio en 1933, con el cultivo de champiñón con la llegada del Italiano José Leben Zdravie, pero es hasta 1941 que se logró la primera cosecha verdadera, que desgraciadamente terminó en un completo desastre a causa de las plagas y enfermedades del cultivo, ya que en su momento se desconocía de su manejo y prevención (INECOL, 2021). Ya para 1945 se logra la primera producción estable y constante de champiñón; en el Estado de México, cerca del municipio de Texcoco con un rendimiento diario de entre 10 y 15 kg. (Izak & Franko, 2019).

En 1947 se crea una asociación de la cual nace la empresa Hongos de México, lo que hoy se conoce como grupo Monte Blanco, pero es en esta década de los noventa que se consolidan varias empresas enfocadas a la producción de champiñón como PROVEMEX S.A. de C.V. Hoy Champiñones de los Altos, del grupo Monte Blanco y Champiñones de Occidente en el estado de Jalisco, Gigante verde hoy Champiñones San Miguel ubicada en San Miguel de Allende Gto. Champiñones de Camargo en el estado de Chihuahua, Champiñones Las Capillas en el estado de San Luis Potosí, Agroindustrias Marvel, hoy Hongos del Bosque en Toluca, Estado de México, Michoacana de Champiñones ubicada en el estado de Michoacán, Alimentos Selectos de Tlaxcala en el estado de Tlaxcala (Fernández, 2005).

5.2 Sistemas de producción del champiñón

De manera general los hongos se distribuyen ampliamente por todo el mundo. Se sabe que existen aproximadamente 1 500 000 de especies. De las cuales el 10% son comestibles, encontrándose en climas húmedos, subhúmedos, templados y templados fríos; siendo estos dos últimos los más adecuados climas para la fructificación de los hongos (Guzmán, 1995).

Actualmente los hongos comestibles se producen en espacios acondicionados para su producción comercial constante y se conocen de manera comercial gracias al proceso de múltiples selecciones que se fueron realizando para su domesticación, como se ha hecho con otras especies de interés para el ser humano. En la actualidad se han identificado más de 220 especies comestibles que crecen de manera natural en el ambiente con cientos de nombres vernáculos (Guzmán, 2008) que también se pueden producir bajo un sistema de producción.

En el caso del champiñón blanco o champiñón de París, la variedad *hortensis* es la más explotada por su tamaño, que va de los 5 a 12 cm de diámetro, con una forma achatada y carnosa del carpóforo, los tonos rosas tenues que están en su interior al cortarlo y el tono blanco claro que presenta en el exterior, éste tiene un sistema biológico cuidadosamente controlado que se puede clasificar dentro de un sistema rústico, semi-industrial e industrial, que se determina por el grado de tecnificación para su producción; pero al mismo tiempo, en específico para producir champiñón existen tres tipos de sistemas conocidos en el mundo.

a) Sistema americano, b) Sistema holandés y c) Sistema francés (Galindo, 1991). Que se diferencian entre sí, por los materiales que se emplean para contener la composta y el acomodo del sustrato, existiendo notables diferencias entre cada sistema.

5.2.1 Sistema Americano

También conocido como sistema de camas, el cual se caracteriza por emplear un tipo de bases de camas invertidas hechas comúnmente de madera sujetas lateralmente por medio de fuertes soportes verticales, en estas camas es colocada la composta ya pasteurizada, donde el peso promedio de cada cama es de 250 Kg a 280 Kg, lo que hace necesario la utilización de montacargas para su traslado y rotación a lo largo del ciclo del cultivo.

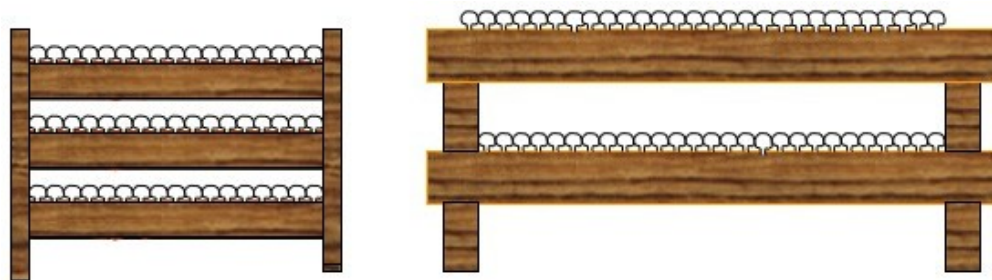


Fig.1 Sistema Americano de producción de champiñón en tres y dos niveles

El ancho de estas camas sigue el principio de las camas para hortalizas teniendo de 60 cm a 1.20 m, de tal forma que dos personas pueden manipular el cultivo a lo largo de la cama, el largo de las camas varía según la longitud de la habitación o estructura que protege a las camas de la intemperie, tienen una profundidad de 20 a 40 cm y se colocan una sobre otra dejando una distancia de 45 cm a 60 cm de espacio formando una estantería que puede tener de 2 a 4 niveles según la

capacidad de carga de los soportes, los carpoforos se deben proteger de las corrientes de aire directas que pueden deshidratarlos en la etapa de brotación, los pasillos entre cada estante son comúnmente de 45 cm a 60 cm, finalmente en las instalaciones se tienen sistemas de calefacción y de nebulización para controlar la temperatura y humedad, con este sistema se han obtenido rendimientos promedio de 10-13.5 kg/m² de cultivo (Galindo , 1991).

Se recomienda tratar la madera con algún fungicida, esmalte o barniz para prolongar la vida útil de la madera además esta medida reduce el riesgo del alojamiento de hongos oportunistas como *Trichoderma* en los espacios porosos de la madera.

5.2.2 Sistema holandés

También conocido como sistema de bandejas, fue creado en Holanda y es el sistema que tiene la mayor tecnología para la producción de champiñón, las bandejas son de acero inoxidable cuyas dimensiones aproximadas son de 0.9 x 0.6 x 0.15 m. y son llenadas con composta, estas se colocan apiladas en la sala de pasteurización, donde la composta alcanza una temperatura de 55-60 ° C. La sala está dotada de sistemas de calefacción, riego y ventilación que permiten uniformizar la atmósfera de la sala y por tanto una mejor desinfección del sustrato de cultivo, la pasteurización se realiza durante dos o tres días, hasta que el sustrato alcanza una temperatura continua de 40 ° C. Después las bandejas se trasladan a la sala de incubación, en donde se realiza la siembra del champiñón

a una temperatura de 15-20 ° C y cuando el micelio ha invadido del 70% al 75% de las bandejas, éstas se trasladan a la sala de cultivo, con una temperatura de 13-16 ° C, una humedad relativa del 90% y una ventilación de 3-5 renovaciones/hora y a las 2 o 3 semanas dependiendo de la variedad “sembrada” en el sustrato de cobertura se inicia la fructificación, los rendimientos medios obtenidos con este sistema se sitúan entre 5 y 8 kg/m² por bandeja, por ciclo, llegando hasta 30 kg/m² de emplearse una estantería de cuatro niveles (Galindo, 1991).

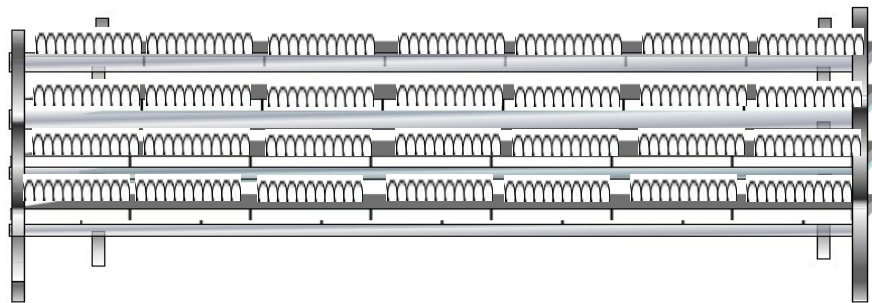


Fig. 2 Sistema Holandés de producción de champiñón en cuatro niveles

5.2.3 Sistema francés

Conocido también como sistema de bolsa plástica o sacos, es el más usado por ser un sistema práctico que se ajusta a diferentes espacios mediante estantería o solo piso firme, las medidas de las bolsas de polietileno que más se usan son de 60 cm x 70 cm, de un calibre 400 o 600 teniendo bolsas ya con sustrato de un peso que va de los 10 a 12 kg. Se pueden emplear bolsas de dimensiones más pequeñas lo cual no se recomienda por los bajos rendimientos que se obtienen o se pueden emplear bolsas de dimensiones más grandes incrementando el peso de las bolsas de los 10, 12 a 15 o 20 kg, sin embargo, se debe considerar que

con el incremento de las dimensiones y el peso de las bolsas se complica su manipulación y mantenimiento, además del incremento de desperdicio de material por bolsa en caso de tener que retirarla por algún aspecto de contaminación.

Dentro de las bolsas, se coloca la composta previamente pasteurizada en combinación con el micelio, después en cada bolsa se coloca la capa de sustrato de cobertura de apenas 3 cm para que en 2 o 3 semanas inicie la fructificación, en cuanto la habitación donde se encuentren las bolsas debe tener un sistema de riego por nebulización, para mantener la hidratación de los hongos y una humedad relativa entre el 60 y 80 %, un sistema de calefacción que permita tener una temperatura promedio de entre 20 a 25 °C. Y un sistema de aireación que evite la acumulación de CO² y que renueve de 3-5 veces por hora el volumen de aire.

Las ventajas de utilizar este sistema son el fácil movimiento de las bolsas para su limpieza y mantenimiento, se tiene un buen control y monitoreo de la producción y se puede evitar la propagación de plagas y enfermedades rápidamente, retirando las bolsas enfermas o dañadas de la unidad (Galindo, 1991), este sistema tiene un rendimiento de 10 a 12 kg/m² de champiñón en un solo nivel; pero se pueden colocar las bolsas una sobre otra con un espacio de 15 a 20 cm hasta llegar a 4 niveles según el tipo de estantería que se emplea, en contraste a los otros dos tipos de sistemas en el sistema de producción francés se requiere un mayor número de horas de trabajo.

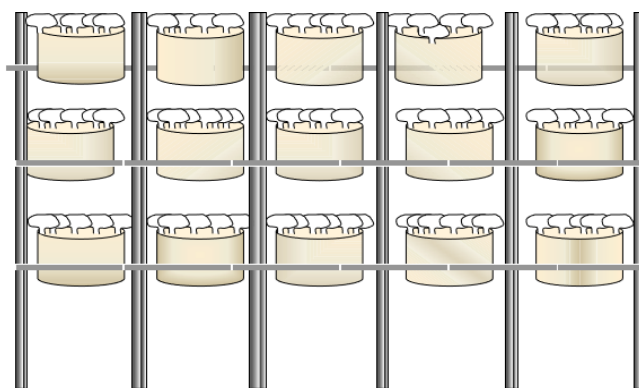


Fig. 3 Sistema Francés de producción de champiñón en tres niveles

5.3 Composición nutricional y porcentual de los hongos comestibles.

Los hongos, están catalogados dentro del grupo de las hortalizas y sus principales características nutraceuticas en general, son su bajo aporte calórico que va de 20 a 30 calorías por cada 100 gramos, tienen un gran contenido en agua que va del 80% al 90% en base a su peso fresco, su porcentaje de hidratos de carbono es del 8% y la mayor parte son monosacáridos y disacáridos, contienen un 5% de proteína con la peculiaridad de presentar un elevado contenido de aminoácidos esenciales que son los que no puede producir el ser humano, tienen un contenido considerado de ácidos grasos polisaturados (ácido linoleico y linoleico), bajos niveles en grasas saturadas, aportan las vitaminas B2, B3 y D, finalmente tienen un alto contenido de fibra que va del 1% al 2% por lo que los hongos se convierten en un alimento altamente nutritivo.

En el caso específico de los champiñones contienen selenio y vitamina D por lo que son una fuente de antioxidantes y por tanto ayudan a la reparación del ADN y evitan que este sufra mutaciones, reduciendo además las posibilidades de células malignas que acaben derivando en cáncer y/o tumores, también

contienen vitamina B1 o Tiamina que favorece el sistema nervioso, son ricos en fibra y tienen bajos niveles calóricos (Roncero, 2015).

5.4 Moho verde (*Trichoderma* spp.)

5.4.1 Descripción e importancia del patógeno en el cultivo de champiñón.

Fue en 1974 que el género *Trichoderma* fue descrito por primera vez por Persoon y Rifai hizo el primer agrupamiento en especies agregadas (Martínez, 2013). En cuanto a la producción de hortalizas ya sea a campo abierto o bien bajo las condiciones de invernadero trabajando directamente en suelo, este hongo tiene un papel antagónico con otros hongos que dañan a los cultivos y a la par desempeña un papel simbiótico con las plantas, generando compuestos promotores del crecimiento vegetal mejorando los rendimientos de los vegetales, por lo que es común usar a *Trichoderma* spp. como un controlador biológico en aplicaciones mediante el sistema de fertirriego y aspersiones foliares o en el tratamiento a la semilla (Hernández, 2019).

En contraste, a lo anterior dentro de la fungicultura la mínima presencia de *Trichoderma* spp. en una unidad de producción de setas comestibles, es sinónimo de contaminación y reducción en el rendimiento y de proliferar su colonización se reduce en cuestión de semanas significativamente los rendimientos de las setas de un 30% a 70% y de no controlarse puede acabar con el cultivo en su totalidad, ya que el micelio de este ascomiceto es capaz de crecer encima del micelio del champiñón, incluso encima de los cuerpos fructíferos convirtiéndose en un mico parásito (Samuels *et al.*, 2002), de

Trichoderma spp. actualmente se conocen 27 especies, pero en lo general es un hongo cosmopolita, anaeróbico que habita de forma natural en el suelo, caracterizado por su comportamiento saprófito o parásito, sin embargo, las especies más destacadas dadas sus características de rápido crecimiento micelar, adaptabilidad, eficiencia en el uso de nutrientes y su alta capacidad reproductiva que presentan son; *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koninigii*, *T. aureoviride* y *T. pseudokoningii* (Reyes-Quintanar *et al.*, 2014).

La incidencia de este patógeno tiene una infección inicial con el desarrollo de un micelio blanquecino muy difícil de diferir del micelio de champiñón, por lo que en esta etapa es prácticamente imposible diferenciarlos, con forme pasan las horas, va madurando y cambia rápidamente a un moho verdoso oscuro “verde bandera” y en su etapa de esporulación tiene el color más intenso, pero el tono verde varia por deshidratación y la intensidad de la luz incidente (Rodríguez, 2008). En su etapa de esporulación, coloniza rápidamente la superficie del sustrato de cobertura y puede crecer en los carpóforos del champiñón debido a que sus esporas tienen sustancias pegajosas que les permite adherirse, los conidios crecen y maduran rápidamente a los cinco días de incubación a una temperatura de 25° C. Generalmente estas especies prosperan en un pH ácido de 4.5 a 5, este hongo prefiere el contenido excesivo de humedad y un estancamiento de dióxido de carbono en la atmosfera por lo que es importante una constante y correcta ventilación (4 a 5 renovaciones/hora), se le considera un hongo mutable de rápida adaptación, es por eso que se puede encontrar una amplia variedad de fenotipos y genotipos de cepas silvestres (Pinzón, 2009).

5.4.2 Clasificación taxonómica.

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Hypocreomycetidae

Orden: Hypocreales

Familia: Hypocreaceae

Género: *Trichoderma*

Especie: *Trichoderma* spp.

Fuente: CABI (2022)

5.4.3. Descripción morfológica y ciclo biológico.

Trichoderma spp. se encuentra dentro de los hongos Ascomycetes, donde se incluyen organismos de gran importancia económica, algunos a manera de patógenos y otros como controladores biológicos productores de antibióticos y micotoxinas (Romero *et al.*, 2009), a su vez, dentro de este orden se incluye el género Hypocrea donde *Thichoderma* spp. Generalmente se ha caracterizado como un agente de control biológico, que actúa sobre hongos patógenos de plantas e insectos (Hidalgo, 1989), se han descrito cerca de 40 taxones de *Trichoderma* spp., hasta la fecha, sin embargo, basados en su morfología anamorfo del orden de los Hypocreales, el número real podría ser más de 200 taxones (Romero *et al.*, 2009) y es que faltan por reconocerse nuevas especies

de otras áreas geográficas diferentes al Norte América y Europa que son las zonas que más estudios han realizado sobre este hongo.

La temperatura óptima para su crecimiento micelar en agar y producción de micelio está entre 20 y 28 ° C, aunque crece bien en los rangos de 6 a 32 ° C y el contenido mínimo de humedad para su crecimiento es del 92% y para su esporulación es de 93 al 95%, en base a la intensidad y calidad de la luz es como forma sus esporas y su desarrollo en general responde a tonalidades de luz azul y violeta (Rodríguez, 2008).

Varios factores genéticos asexuales como la recombinación parasexual, mutación y otros procesos contribuyen a la variación entre los núcleos en un solo organismo (talo), es así como los hongos son altamente adaptables y evolucionan rápidamente, a *Trichoderma* spp. se le puede encontrar en diferentes materiales orgánicos como sustratos y los suelos, en regiones secas y templadas y otras templadas y frías, algunas especies son poco severas y otras muy agresivas dentro de la fungicultura, en cuanto a el ciclo de vida de *Trichoderma* spp. este inicia cuando el organismo crece y se ramifica como una hifa fúngica típica que mide de 5-10 μ de diámetro, la esporulación asexual ocurre cuando las esporas de 3-5 μ de diámetro son liberadas en un gran número; pero también se forman clamidosporas intercaladas, de forma individual, aunque a veces dos o más clamidosporas se pueden fusionar, el tamaño de los conidióforos es de 62,5- 69 x 3-4,7 μ m. son de color verde, presentan diversas ramificaciones perpendiculares, en algunos casos se observa la formación de

ramas laterales en grupos de dos a tres, el sistema de ramificación tiene una apariencia piramidal, las fiálides son largas y delgadas, solitarias a lo largo del eje, asimétricas, con un tamaño de 6,3-15,6 x 2,7-3,4 μm ., con verticilos terminales de hasta 4 conidios de un tamaño aproximado de 3,8-4 x 3,1-3,7 μm , con forma citriforme y subglobosa, sus Clamidosporas son intercalares y formadas por el micelio sumergido, subglobosa, de pared dentada, color verde suave y un tamaño de 12,5-10 μm . (Romero et al., 2009).

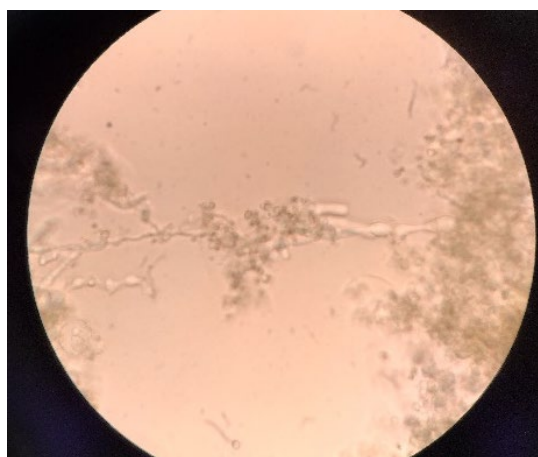


Fig. 4 Vista estructural bajo microscopio a 100X de *Trichoderma* spp.

5.4.4 Epidemiología.

Trichoderma spp. Invade rápidamente el sustrato y obstaculiza el crecimiento del micelio de champiñón, mediante la producción de toxinas y antibióticos que ocasiona un descenso del nivel de pH hasta valores de 4-5, que son más favorables para su desarrollo. Inicialmente se puede observar en el sustrato un moho de color blanco que cambia a verde, adquiriendo posteriormente su color verdeazulado debido a la abundante producción de conidios, los propágulos (conidios, clamidosporas o fragmentos de micelio) pueden ser esparcidos por

corrientes de aire, insectos, ácaros, herramientas, ropas y el personal de unidad de producción (Seaby, 1996).

La infección del sustrato tiene lugar en la siembra y embolsado, cuando no se tiene la higiene adecuada y los daños son proporcionales al número de bolsas afectadas y a la precocidad de la infección, si la infección es temprana, el patógeno se multiplica rápidamente y coloniza una mayor cantidad de sustrato, lo que supone una severa reducción de la cosecha (Fletcher, 1986). Por el contrario, con infecciones más tardías y ante un micelio de *A. bisporus*, vigoroso, el moho verde se manifiesta durante la primera cosecha. Se debe tener en cuenta que la infección se presenta por una mala pasteurización de la composta, un mal tratamiento del sustrato de cobertura, presencia de plagas vectores y malas prácticas de higiene por parte del personal.

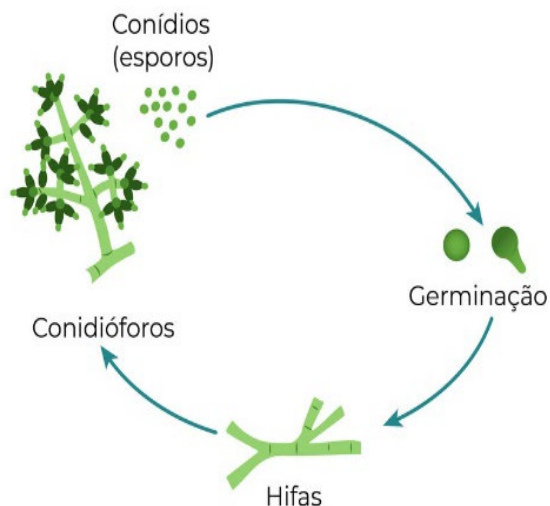


Fig. 5 Ciclo de *Trichoderma* spp. Adaptado de Kruger y Bacchi (1995).

De todas las especies de *Trichoderma* La especie *aggressivum f. aggressivum* es la que se ha reportado como la más importante hasta el momento por los daños que ocasiona y la disminución de los rendimientos en la cosecha de Champiñón que ocasiona, en 2004, un grupo de investigación del Colegio de Potsgraduados detectó la presencia de cepas agresivas micoparásitas de *T. aggressivum f. aggressivum* (Samuels et al., 2002), identificada con técnicas clásicas y moleculares, usando la técnica ITS 1 y ITS 4 en muestras de sustrato (composta) contaminada, proporcionada por la principal planta de Hongos de México, monte blanco S.A. esta empresa, cuyos volúmenes de producción ascienden a 55 toneladas de champiñones por día, ha llegado a tener disminuciones de hasta el 50% en su producción y pérdidas económicas millonarias anuales debido al ataque de *T. aggressivum f. aggressivum*. (Bonilla-Quintero, 2016; Sobal, 2017).

5.4.5 Manejo cultural de *Trichoderma* spp. en el sustrato de cobertura.

La etapa de colocación de sustrato de cobertura se ha identificado como el momento crucial para el uso de fungicidas, pues es en esta etapa que ocurre la incidencia de *Trichoderma* spp. debido a que el sustrato comúnmente empleado “peat most” no se encuentra totalmente libre patógenos y está hecho a partir de materia orgánica, sin embargo con un correcto tratamiento al sustrato a base de agua caliente (100°C) y cal (300 g/kg de sustrato) y el uso de un fungicida a manera de uso preventivo se garantiza la baja o nula incidencia de *Trichoderma* spp. en el sustrato de cobertura y en la brotación de primordios de champiñón.

Ante la constante presencia de *Trichoderma* spp. en la producción de setas comestibles se han integrado medidas preventivas y curativas en contra del moho verde, con la aplicación de los fungicidas benomilo y Procloraz (10 mg l^{-1}), este último se ha recomendado por la eficacia que ha mostrado en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Gea *et al.*, 2003).

VI. MATERIALES Y METODOS

6.1 Ubicación del experimento.

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en la Universidad Autónoma Chapingo, con coordenadas ($19^{\circ}29'23''$ LN y $98^{\circ}53'37''$ LO a 2261 msnm) donde se rehabilitaron los espacios del sótano del Departamento de Agroecología de la Universidad Autónoma Chapingo, que anteriormente se habían acondicionado para establecer una unidad de producción de champiñón que solo estuvo funcionando por un corto tiempo en el año de 1998 a cargo del subprograma de hongos comestibles conformado en 1995 y dirigido por el maestro Edmundo Arturo Pérez Godínez. (Recopilado del acervo histórico del departamento de agroecología). En este lugar se realizó la preparación de tres toneladas de composta para champiñón desarrollando una metodología de “elaboración rustica de composta para champiñón de 30 días”, cada tonelada se realizó en periodos diferentes y justo arriba de este sótano se encuentra el laboratorio de hongos comestibles de la Universidad Autónoma Chapingo donde se realizaron un ensayo *in vitro* para determinar la eficacia de fungicidas a partir de extractos vegetales, biológicos y fungicidas químicos en contra del desarrollo de

Trichoderma spp. y un ensayo *in vivo* donde sobre el sustrato de cobertura para champiñón, se evaluaron los mejores tratamientos obtenidos en la fase *in vitro*.

6.2 Aislamiento del patógeno (*Trichoderma* spp.)

En las instalaciones del laboratorio de hongos comestibles de la Universidad Autónoma Chapingo se colocó una muestra de 300 gr de sustrato “peat most” (Hawita profesional ®) que se saturó a su capacidad de campo solo con agua potable (pH 7) en una relación de 3:1, esta muestra se colocó en una charola de plástico de 12 cm x 12 cm que se dejó descubierta por 24 horas, al cabo de este tiempo la charola se cerró y en las próximas 24 horas se desarrolló dentro de esta una esporulación verde y a las 48 horas cumplidas en base a los postulados de Koch (1990), se inició con el aislamiento del patógeno, tomando una muestra de la esporulación de color “verde bandera” y colocándola dentro de una caja Petri de 80 mm por 10 mm con 12 mL de medio de cultivo PDA, BD Bioxon ® (agar dextrosa y papa), la cual se incubó a 23 °C en una cámara de incubación B.G. ® modelo ECF-41 para su desarrollo, siguiendo con los postulados al cabo de 24 horas mediante la técnica punta de hifa se re aisló el patógeno para garantizar su purificación en otro medio de PDA.

6.3 Pruebas de patogenicidad.

De este cultivo purificado se preparó una solución de esporas a una concentración de 10^6 conidios por ml, para el conteo de esporas se utilizó una cámara Neubauer y un microscopio Olympus CX31 con aumento de 40X, la suspensión de esporas se hizo por la técnica de arrastre, se homogenizó en tubos de ensayo de 16 x 150 mm con 10 ml de agua destilada esterilizada y se agitó durante 15 segundos en Vórtex a 150 rpm, con micropipetas se midieron 20 μ L para realizar el conteo (Efremenko et al., 2006).

De la solución de esporas se rociaron 2.5 ml sobre 10 bolsas inoculadas de *A. bisporus* de 10 kg de peso cada una, la solución se aplicó en la parte apical de cada bolsa, donde se tenían 300 gr de sustrato de cobertura peat most (Hawita profesional ®) y al no realizar ningún tratamiento preventivo en contra de la incidencia del moho verde en el sustrato de cobertura para champiñón se desarrolló nuevamente la esporulación color “verde bandera” típica de *Trichoderma* spp. a temperatura ambiente de 22 ° C.



Fig. 6 Mezcla de peat most más agua



Fig. 7 Riego sobre sustrato de cobertura



Fig. 8 Esporulación de *Trichoderma*.

Mediante espátulas metálicas se extrajeron cinco muestras de 5 g cada una de las zonas que presentaban una esporulación “verde bandera”, las muestras contenían sustrato y posible *Trichoderma* spp., se almacenaron juntas en una bolsa de polietileno a una temperatura de 23 °C en una cámara de incubación B.G. ® modelo ECF-41. Pasadas 24 horas, de las muestras se tomó con ayuda de un bisturí y agujas de disección solo la esporulación “verde bandera”, esta se observó bajo un microscopio estereoscópico y un microscopio óptico binocular y una vez que se determinaron las características generales de *Trichoderma* spp. como esporulación de color verde oscuro fig. 10 y estructuras celulares como fiálides, conidióforos y conidios fig. 13, continuando con los postulados de Koch se aisló para su cultivo en 10 cajas Petri de 80 mm por 10 mm con 12 mL de medio de cultivo PDA, BD Bioxon ® (agar dextrosa y papa).



Fig. 9 Observación bajo microscopio estereoscópico



Fig. 10 Esporulaci3n de *Trichoderma* spp. en sustrato



Fig. 11 Preparaci3n *Trichoderma* spp. con lactofenol

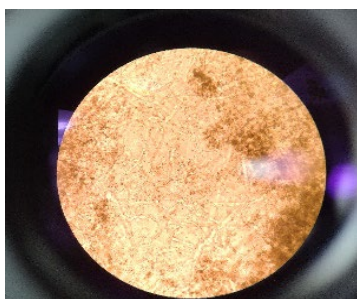


Fig. 12 Observaci3n de *Trichoderma* spp. con microscopio 3ptico (100 X).

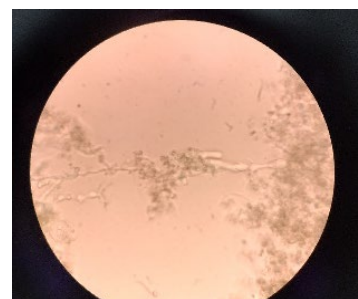


Fig. 13 Observaci3n de fialide conidi3foros (100 X).

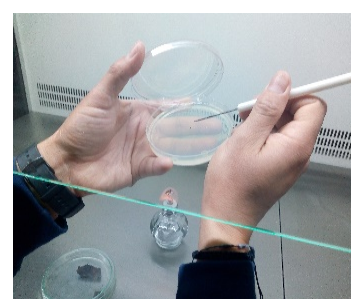


Fig. 14 Aislamiento de *Trichoderma* spp.

Todas las cajas se sellaron con pl3stico playo para evitar su contaminaci3n y se guardaron en la c3mara de incubaci3n B.G.® modelo ECF-41 a una temperatura de 23°C por 24 horas, al cabo de este tiempo las cajas Petri ya presentaban un crecimiento micelar y se emple3 la t3cnica de punta de hifa para el re aislamiento y la purificaci3n del pat3geno en otras 10 cajas Petri (80 mm por 15 mm con 12 mL) con medio de cultivo PDA (agar dextrosa y papa), BD Bioxon® de las cuales a los 10 d3as se obtuvieron discos de esporulaci3n de *Trichoderma* spp.

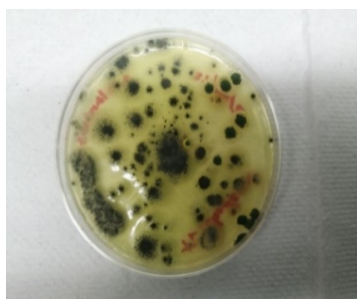


Fig. 15 Desarrollo de *Trichoderma* spp. en caja Petri



Fig. 16 Incubaci3n de cajas Petri a 25 ° C

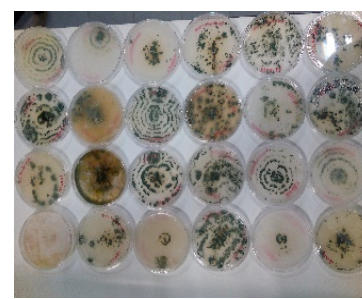


Fig. 17 Comparaci3n de crecimiento de *Trichoderma* spp. a 10 d

Dentro de la cámara de flujo laminar TELSTAR® AV-100 en cuatro cajas Petri con PDA se colocaron cerca del centro tres círculos de 5 mm de diámetro de papel filtro previamente esterilizados y mediante la técnica de punta de hifa se colocó en el centro a *Trichoderma* spp., la caja se selló con plástico playo para evitar su contaminación y se dejaron reposar en una cámara de incubación B.G.® modelo ECF-41 a una temperatura de 23°C, por 10 días, al cabo de este tiempo *Trichoderma* spp. colonizo por completo el medio PDA y se desarrolló sobre los círculos de papel filtro como se observa en la figura 20, se seleccionó la caja que presento el mejor desarrollo considerando la uniformidad y color de la esporulación para desarrollar la extracción de ADN.

6.4 Extracción de ADN

Se hizo la extracción de ADN mediante el protocolo del kit Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research Corp®) el cual consistió primero en colocar 10 mg del hongo aislado en un tubo de lisis ZR BashingBead™ Buffer donde se agregaron 750 µL de BashingBead™ Buffer, las muestras se maceraron en el disruptor por 15 minutos a una velocidad de 30 agitaciones/segundo, después, los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm durante 1 minuto y se transfirieron 400 µL del sobrenadante a un Zymo-Spin III-F Filter colocado sobre un tubo colector y se centrifugó a 11,000 rpm por 1 minuto, en seguida se agregaron 1,200 µL de Genomic Lysis Buffer al filtrado con tenido en el tubo colector y se homogenizó (a Genomic Lysis Buffer previamente se le agregó betamercaptoetanol, a razón de 500 µL de beta-mercaptoetanol por cada 100 mL de Genomic Lysis Buffer), se transfirieron 800 µL de la mezcla del paso anterior al Zymo-Spin™ IICR Column colocado sobre un nuevo tubo colector y se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto, se deshecho el filtrado del tubo colector y se repitió este mismo paso con la mezcla restante, se agregaron 200 µL de

DNA Pre-Wash Buffer al Zymo-Spin™ IICR Column colocado sobre un nuevo tubo colector y se centrifugó a 12,000 rpm por 1 minuto, se agregaron 500 µL de g-DNA Wash Buffer al Zymo-Spin™ IICR Column y se centrifugó a 12,000rpm por 1 minuto, en Zymo-Spin™ IICR Column se colocó sobre un tubo ependorf de 1.5mL esterilizado y se le agregaron 50 µL de DNA Elution Buffer y Finalmente se centrifugó a 12,000 rpm por 1 minuto, obteniendo el ADN Para la prueba PCR.

6.5 Obtención de PCR.

Todas las muestras se procesaron con el siguiente Master Mix (par de primers ITS 4 y ITS 5)

Reactivo	para 1x (µL)
Agua libre de nucleasas	29.5
Buffer [10x]	12.5
dNTP [10 µM]	2.5
Primer F [10 µM]	1
Primer R [10 µM]	1
Taq polimerasa [5 U/ µL]	0.5
ADN de cada muestra	3

El volumen total del mix fue de 50 µL y el programa para la PCR fue: 1) 95°C. Por 5 minutos, 2) 94°C por 1.5 minutos, 3) 55°C por 2 minutos, 4) 72°C por 3 minutos, 5) 72°C por 5 minutos y 6) 12°C por un tiempo indefinido.

Para visualizar la amplificación del ADN se preparó el gel al 1.5% de agarosa y se disolvió en Buffer TAE 1X. Se utilizó el marcador molecular de 100 bp. Las condiciones para la corrida fueron de 80Volts, 300mA, 300w, durante 45 minutos, después se observó en un fotodocumentador para posteriormente mandar a secuenciar a Macrogen Inc.

6.6 Tratamientos contra *Trichoderma* spp en in vitro.

Para poder realizar esta etapa se prepararon 2 L de medio de cultivo a base de Agar de Papa y Dextrosa BD Bioxon ® para obtener 164 cajas Petri (80 mm por 10 mm) para la evaluación de 10 productos con cuatro dosificaciones cada uno de: 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 μL (**anexo 2**) con cuatro repeticiones por dosis y teniendo cuatro testigos.

Las 164 cajas petri se sellaron con plástico playo para evitar que se contaminaran, se dejaron reposar en una cámara de incubación B.G. ® modelo ECF-41 a una temperatura de 23°C, por 24 horas en total oscuridad, al cabo de este tiempo, las cajas Petri se llevaron a la cámara de flujo laminar TELSTAR® AV-100 para destaparlas y envenenar los medios (**anexo 3**).

Por otro lado, una vez desarrolladas las colonias en los medios de PDA de las 10 cajas Petri sin tratamiento al cabo de 10 días, mediante un sacabocados de 5mm se hicieron discos de *Trichoderma* spp. fig. 18 y con ayuda de agujas de disección y un mechero de alcohol se realizó la inoculación en las cajas Petri con los medios envenenados, la cual consistió en colocar en el centro de cada caja uno de los discos de 5 mm para determinar el efecto de los fungicidas en la inhibición del crecimiento de *Trichoderma* spp. fig. 19.

Una vez colocado el disco se taparon de nuevo las cajas Petri y se sellaron con plástico playo en el contorno, para evitar su contaminación, este proceso se realizó dentro de la cámara de flujo laminar TELSTAR® AV-100.



Fig. 18 Formación De discos de *Trichoderma* spp.



Fig. 19 Colocación de disco de *T.* para re-aislamiento

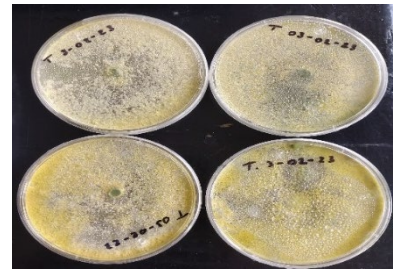


Fig. 20 Crecimiento de *T.* en caja Petri para su análisis molecular

6.7 Evaluación de tratamientos *In vitro* e *in vivo* contra *Trichoderma* spp.

Cada 24 horas se midió en milímetros el crecimiento radial de las colonias, tomando en cuenta el promedio de la medida de dos diámetros perpendiculares, la medición se realizó mediante el uso de un vernier y esta evaluación se realizó durante 10 días, este tiempo fue el requerido para que el testigo colonizara en su totalidad el medio PDA de la caja Petri, este ensayo se repitió cuatro veces confirmando los resultados para seleccionar los tres productos más eficaces y aplicarlos en un ensayo *in vivo* sobre el sustrato de cobertura peat most que se emplea para la etapa de fructificación de los primordios del cultivo de champiñón en un sistema francés.

6.8 Análisis de datos.

Los datos obtenidos de las mediciones del diámetro de crecimiento de las colonias de *Trichoderma* spp. se estandarizaron y el análisis se realizó con el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis Software 2010). Posteriormente con las variables significativas se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y finalmente la prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$).

VII. RESULTADOS Y DISCUSION.

7.1 Pruebas de patogenicidad.

Los aislamientos realizados y probados mediante la solución de esporas de 10×10^6 en las diez bolsas inoculadas con *Agaricus bisporus* confirmaron con la incidencia del patógeno que puede colonizar sobre el sustrato de cobertura dejando sin oportunidad la brotación de los primordios de champiñón.

7.2 Análisis de secuencias.

Se realizó el análisis con la herramienta BLAST de la página National Center for Biotechnology information, para identificar las secuencias reportadas en el GenBank, utilizando los cebadores ITS 4 y ITS 5, que codifica la región 5.8S, determinando que el porcentaje de similitud con otras secuencias de *Trichoderma longibrachiatum* fue de 99.84%, las secuencias que se seleccionaron para separar por grupos fueron de las especies de *Trichoderma viridae*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma harzianum*, como grupo externo se utilizó a *Penicillium chrysogenum*, finalmente para el análisis filogenético se utilizó el Método de máxima verosimilitud y el Modelo de Kimura-2, la probabilidad logarítmica fue -3929.63 en donde involucró 13 secuencias de nucleótidos con un total de 653 posiciones, el análisis se realizó con el programa MEGA 11(Tamura, 2021) y un análisis Bootstrap de 500 repeticiones Figura (23). Se obtuvo la región 5.8S, en la alineación con el programa ClustalW, Para separar las especies con este fragmento las secuencias del estudio se agruparon en la especie *T. longibrachiatum*.

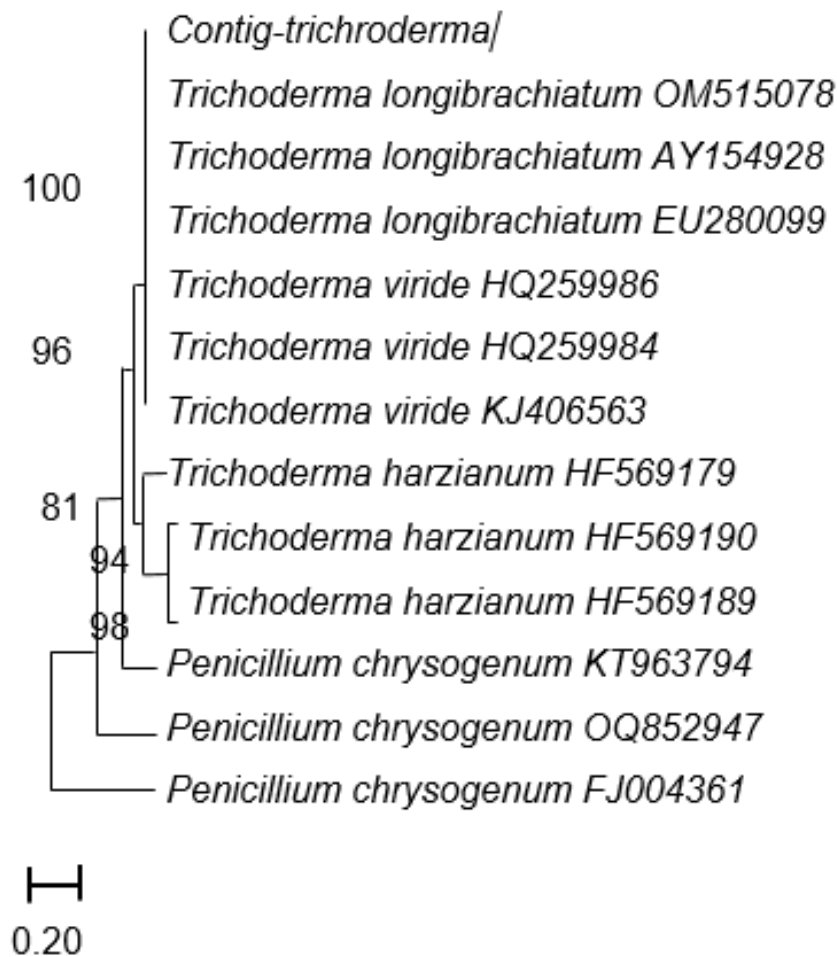


Fig 21. Árbol filogenético de *Trichoderma longibrachiatum*

7.3 Evaluación de la eficacia de tratamientos contra *Trichoderma longibrachiatum* en *in vitro*.

Durante la evaluación a 10 días después de la siembra *in vitro*, se observó que el diámetro de la colonia de *Trichoderma longibrachiatum* fue de 79 mm en el T11 (cuadro 1). Testigo absoluto, así mismo, se observó que los T1. Tulipán A (*Spathodea campanulata*), T2. Chicalote (*Argemone munita*) y T3. Baganvilia (*Bougainvillea spectabilis*) en las dosis de 200, 400, 800 y 1600 ppm registraron

un diámetro de 79 mm respectivamente, por lo que dichos tratamientos no tuvieron control en el crecimiento de la colonia, a su vez, T4. Árbol del té (*Melaleuca alternifolia*) a dosis de 56 ppm presentó un diámetro de 25.13 mm, teniendo un control del patógeno de 68.2 %, sin embargo, las dosis de 112, 223 y 246 ppm del mismo producto tuvieron correspondientemente un crecimiento de 76.5, 77.88 y 77.81 mm, así como un control nulo del hongo (3.2, 1.4 y 1.5 %); en tanto, las dosis de 25, 50, 100 y 200 ppm de T5. *Bacillus amyloliquefaciens* Hgo10 mostraron una ligera disminución del crecimiento de *Trichoderma longibrachiatum*, al observarse un diámetro de 63.25, 59.13, 54.69 y 58.13 mm con eficacias de control de 19.9, 25.2, 30.8 y 26.4 % respectivamente (Figura 22 y 23).

En la misma evaluación, T6. *Reynoutria sachalinensis* (57 y 114 ppm) correspondientemente tuvieron un diámetro de la colonia de 34.75 y 38.94 mm, así como un control de 56.0 y 50.7 %, mientras que, el mismo ingrediente activo a dosis de 228 y 546 ppm registraron un crecimiento de 64.44 y 73.94 mm, así como un control más bajo (18.4 y 6.4 %) que las dosis antes mencionadas. Para el caso de los tratamientos de ingrediente activo T7. *Laminaria digitata* en dosis de 11, 22, 45 y 90 ppm, el diámetro de la colonia de *Trichoderma longibrachiatum* fue de apenas un 2.0, 1.5, 1.13 y 1.88 mm, por lo que fueron los tratamientos que inhibieron mejor el crecimiento del patógeno, al controlarlo con eficacias de 97.5, 98.1, 98.6 y 97.6 % respectivamente; de igual forma, T8. *Bacillus amyloliquefaciens* D747 a 249, 497, 994 y 1989 ppm tuvieron buenos efectos de

control del hongo, ya que registraron un crecimiento de 5.38, 3.06, 4.44 y 4.31 mm con eficacias de control de 93.2, 96.1, 94.4 y 94.5 % (Figura 22 y 23).

Por su parte, las dosis de 113, 225, 445 y 900 ppm del T9. Procloraz permitieron un crecimiento del patógeno de 7.19, 6.25, 5.75 y 3.88 mm, por lo que ejercieron un control de 90.9, 92.1, 92.7 y 95.1 % respectivamente; finalmente, el T10. Azoxistrobin a 63, 125, 250 y 500 ppm tuvieron una buena inhibición del crecimiento de *Trichoderma longibrachiatum* al observarse un diámetro de 7.31, 5.0, 5.38 y 8.56 mm, así como eficacias de control de 90.7, 93.7, 93.2 y 89.2 % (Figura 22 y 23).

El hecho de que el tratamiento 8 a base de *B. amyloliquefaciens* cepa D747 haya mostrado eficacias del 93.2 – 96.1% en la inhibición del agente causal del moho verde de *T. longibrachiatum* del Champiñón se debe a que *Bacillus amyloliquefaciens* ha demostrado notables efectos contra hongos y bacterias, tal y como lo indica Grife *et al.*, (2021) quienes señalaron que dicha bacteria tiene una gran capacidad de biocontrol derivada de la producción de lipopéptidos (fengicinas, surfactinas e iturinas), Estos microorganismos tienen mecanismos de acción que se pueden dividir en la: producción de compuestos antimicrobianos, como son péptidos de síntesis no ribosomal (NRPs) y policétidos (PKs); producción de hormonas, capacidad de colonización, formación de biopelículas y competencia por espacio y nutrientes; síntesis de enzimas líticas como quitinasas, glucanasas, proteasas y acil homoserin lactonasas (AHSL) y la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs).

Además Sánchez (2007), describe la capacidad antagonista de la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* contra algunos mohos fitopatógenos, como un posible agente de biocontrol frente a *Monilinia laxa*, *M. fructicola* y *Botrytis cinérea* y ahora se confirma en este ensayo el efecto de *amyloliquefaciens* cepa D747 sobre el moho verde *Trichoderma longibrachiatum*.

En este trabajo los tratamientos a base de Procloraz (113, 225, 445 y 900 ppm) aplicados y evaluados in vitro y en el sustrato de cobertura mostraron eficacias entre 90 y 95% en el manejo de *Trichoderma longibrachiatum*, estos resultados son similares a los reportados por Gea y Navarro, 2003 donde la eficacia de Procloraz ($.10 \text{ mg}^{-1}$) están en el mismo rango, ya que actúa inhibiendo la síntesis de triglicéridos con lo que se impide la germinación de las esporas y se bloquea el crecimiento micelial.

En cuanto al efecto nulo de los extractos vegetales evaluados de Tulipán Africano *Spathodea campanulata*, el árbol del té *Melaleuca alternifolia* y *buganvilia* *Bougainvillea spectabilis* se sugiere desarrollar nuevos extractos a base de otras especies vegetales u otras partes vegetales pues Quinatar (2000) en su trabajo "Efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) sobre el crecimiento micelial de *Trichoderma* spp.". Encontró que los extractos vegetales pueden reducir la incidencia de *T.* hasta un 80% pues en este trabajo en específico los metabolitos

secundarios de la ruda como son cumarinas, furanocumarinas y alcaloides tienen una gran actividad fungicida.

Cuadro 1. Comportamiento del diámetro de la colonia de *Trichoderma longibrachiatum* para determinar la efectividad biológica de productos químicos, orgánicos y biológicos en condiciones *in vitro* a los 10 días después de su aplicación.

Num	TRATAMIENTOS	Evaluación a 10 días de la siembra <i>in vitro</i>	
		Diámetro (mm) / Tukey($\alpha=0.05$)**	Eficacia (%)
1	1 Tulipán A. (<i>Spathodea campanulata</i>) 200 ppm	79 a	0
2	1 Tulipán A. (<i>Spathodea campanulata</i>) 400 ppm	79 a	0
3	1 Tulipán A. (<i>Spathodea campanulata</i>) 800 ppm	79 a	0
4	1 Tulipán A. (<i>Spathodea campanulata</i>) 1600 ppm	79 a	0
5	2 Chicalote (<i>Argemone munita</i>) 200 ppm	79 a	0
6	2 Chicalote (<i>Argemone munita</i>) 400 ppm	79 a	0
7	2 Chicalote (<i>Argemone munita</i>) 800 ppm	79 a	0
8	2 Chicalote (<i>Argemone munita</i>) 1600 ppm	79 a	0
9	3 Bугanvillea (<i>Bougainvillea spectabilis</i>) 200 ppm	79 a	0
10	3 Bугanvillea (<i>Bougainvillea spectabilis</i>) 400 ppm	79 a	0
11	3 Bугanvillea (<i>Bougainvillea spectabilis</i>) 800 ppm	79 a	0
12	3 Bугanvillea (<i>Bougainvillea spectabilis</i>) 1600 ppm	79 a	0
13	4 Árbol del té (<i>Melaleuca alternifolia</i>) 56 ppm	25.13 f	68.2
14	4 Árbol del té (<i>Melaleuca alternifolia</i>) 112 ppm	76.5 ba	3.2
15	4 Árbol del té (<i>Melaleuca alternifolia</i>) 223 ppm	77.88 a	1.4
16	4 Árbol del té (<i>Melaleuca alternifolia</i>) 246 ppm	77.81 a	1.5
17	5 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Hgo 25 ppm	63.25 dc	19.9
18	5 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Hgo 50 ppm	59.13 d	25.2

19	5 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Hgo 100 ppm	54.69 d	30.8
20	5 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Hgo 200 ppm	58.13 d	26.4
21	6 <i>Reynoutria sachalinensis</i> 57 ppm	34.75 fe	56.0
22	6 <i>Reynoutria sachalinensis</i> 114 ppm	38.94 e	50.7
23	6 <i>Reynoutria sachalinensis</i> 228 ppm	64.44 bdc	18.4
24	6 <i>Reynoutria sachalinensis</i> 546 ppm	73.94 bac	6.4
25	7 <i>Laminaria digitata</i> 11 ppm	2 g	97.5
26	7 <i>Laminaria digitata</i> 22 ppm	1.5 g	98.1
27	7 <i>Laminaria digitata</i> 45 ppm	1.13 g	98.6
27	7 <i>Laminaria digitata</i> 45 ppm	1.13 g	98.6
28	7 <i>Laminaria digitata</i> 90 ppm	1.88 g	97.6
29	8 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> D747 249 ppm	5.38 g	93.2
30	8 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> D747 497 ppm	3.06 g	96.1
31	8 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> D747 994 ppm	4.44 g	94.4
32	8 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> D747 1989 ppm	4.31 g	94.5
33	9 Procloraz 113 ppm	7.19 g	90.9
34	9 Procloraz 225 ppm	6.25 g	92.1
35	9 Procloraz 445 ppm	5.75 g	92.7
36	9 Procloraz 900 ppm	3.88 g	95.1
37	10 Azoxistrobin 63 ppm	7.31 g	90.7
38	10 Azoxistrobin 125 ppm	5 g	93.7
39	10 Azoxistrobin 250 ppm	5.38 g	93.2
40	10 Azoxistrobin 500 ppm	8.56 g	89.2
41	11 Testigo	79 a	0

**Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

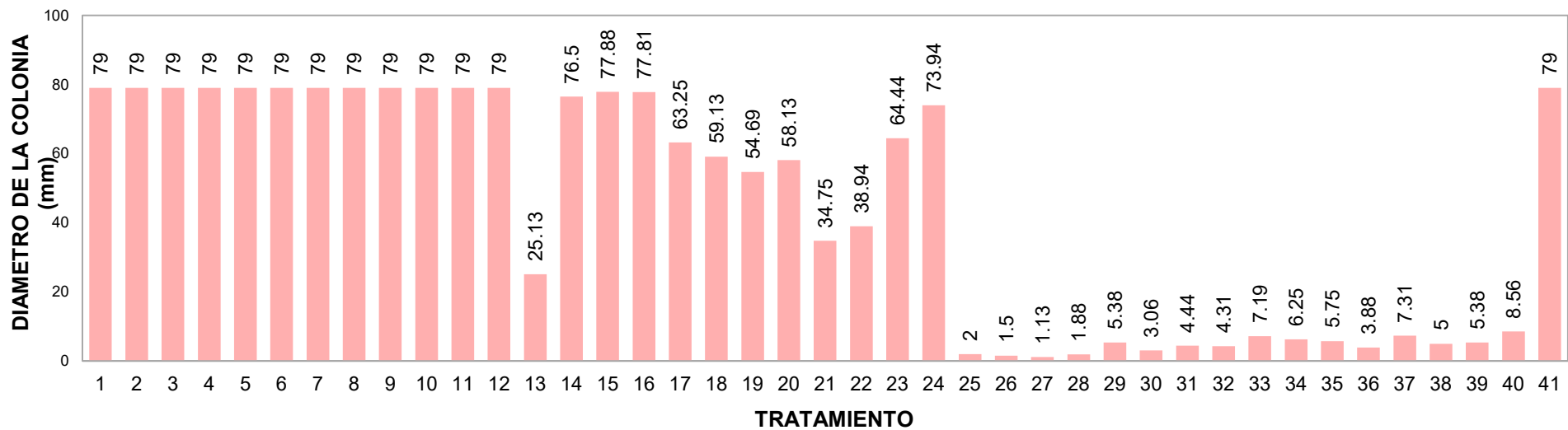


Figura 22. Comportamiento del diámetro de la colonia de *Trichoderma longibrachiatum* en condiciones *in vitro* para los 10 fungicidas evaluados a los 10 días después de su aplicación.

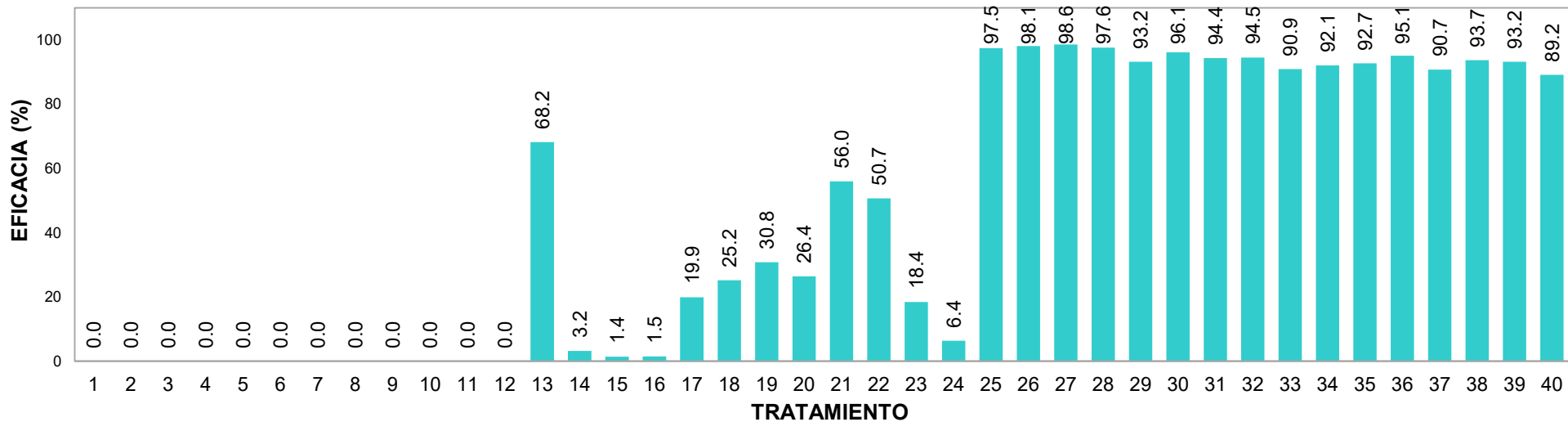


Figura 23. Eficacia de los 10 fungicidas evaluados para el manejo de *Trichoderma longibrachiatum* en condiciones *in vitro* a los 10 días después de su aplicación.

El crecimiento de *T. longibrachiatum* en el testigo absoluto tuvo un promedio de 79 mm diámetro, por tanto, al realizar el análisis de varianza y prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$), se observó que, estadísticamente los tratamientos se distribuyeron en cinco grupos (literales de Tukey), siendo los mejores tratamientos T7. *Laminarina digitata* en las dosis de 11, 22, 45 y 90 ppm, los cuales registraron un diámetro de la colonia de *Trichoderma longibrachiatum* de 2.0, 1.5, 1.13 y 1.88 mm, por lo que ejercieron una eficacia de control del hongo de 97.5, 98.1, 98.6 y 97.6 % respectivamente; dichos tratamientos fueron estadísticamente iguales a las dosis de 249, 497, 994 y 1989 ppm del grupo de T8. *Bacillus amyloliquefaciens* D747 (cuadro 1); en los que correspondientemente se registraron controles de 93.2, 96.1, 94.4 y 94.5 %; a su vez, los tratamientos a base de T9. Procloraz (113, 225, 445 y 900 ppm), así como del T10. Azoxistrobin (63, 125, 250 y 500 ppm) inhibieron el crecimiento del patógeno con eficacias de 90.9, 92.1, 92.7, 95.1, 90.7, 93.7, 93.2 y 89.2 % respectivamente (cuadro 1). Por otro lado, T4. *Melaleuca alternifolia* a 56 y 114 ppm, junto a T6. *Reynoutria sachalinensis* (57 ppm) fueron estadísticamente diferentes al resto de los tratamientos evaluados y registraron un crecimiento de *Trichoderma longibrachiatum* de 25.13, 34.75 y 38.94 mm, con eficacias de control de 68.2, 56.0 y 50.7 %; cabe mencionar que todos los tratamientos antes mencionados fueron los que ejercieron el mayor control del patógeno (Cuadro 1).

T5. *Bacillus amyloliquefaciens* Hgo a 25, 50, 100 y 200 ppm formaron otro grupo estadístico, sin embargo, el control fue bajo, al registrar un diámetro de la colonia de 63.25, 59.13, 54.69 y 58.13 mm, mostrando controles de 19.9, 25.2, 30.8 y

26.4 %, en este sentido, dicho comportamiento se observó en T4. Árbol del té *Melaleuca alternifolia* (112 ppm), así como T6. *Reynoutria sachalinensis* (228 y 546 ppm), en los que el control del patógeno fue mínimo (3.2, 6.4 y 18.4 % respectivamente); finalmente, T1 Tulipán A (*Spathodea campanulata*), T2. Chicalote (*Argemone munita*), T3, Baganvilia (*Bougainvillea spectabilis*), todos a dosis de 200, 400, 800 y 1600 ppm, así como, T4. Árbol del té *Melaleuca alternifolia* a 223 y 246 ppm no ejercieron control de *Trichoderma longibrachiatum*, debido a que tuvieron un crecimiento de la colonia igual al testigo absoluto esto se puede deber al método de extracción del extracto o las partes vegetales empleadas (Cuadro 1).

7.4 Evaluación de tratamientos contra *Trichoderma longibrachiatum* en sustrato de cobertura.

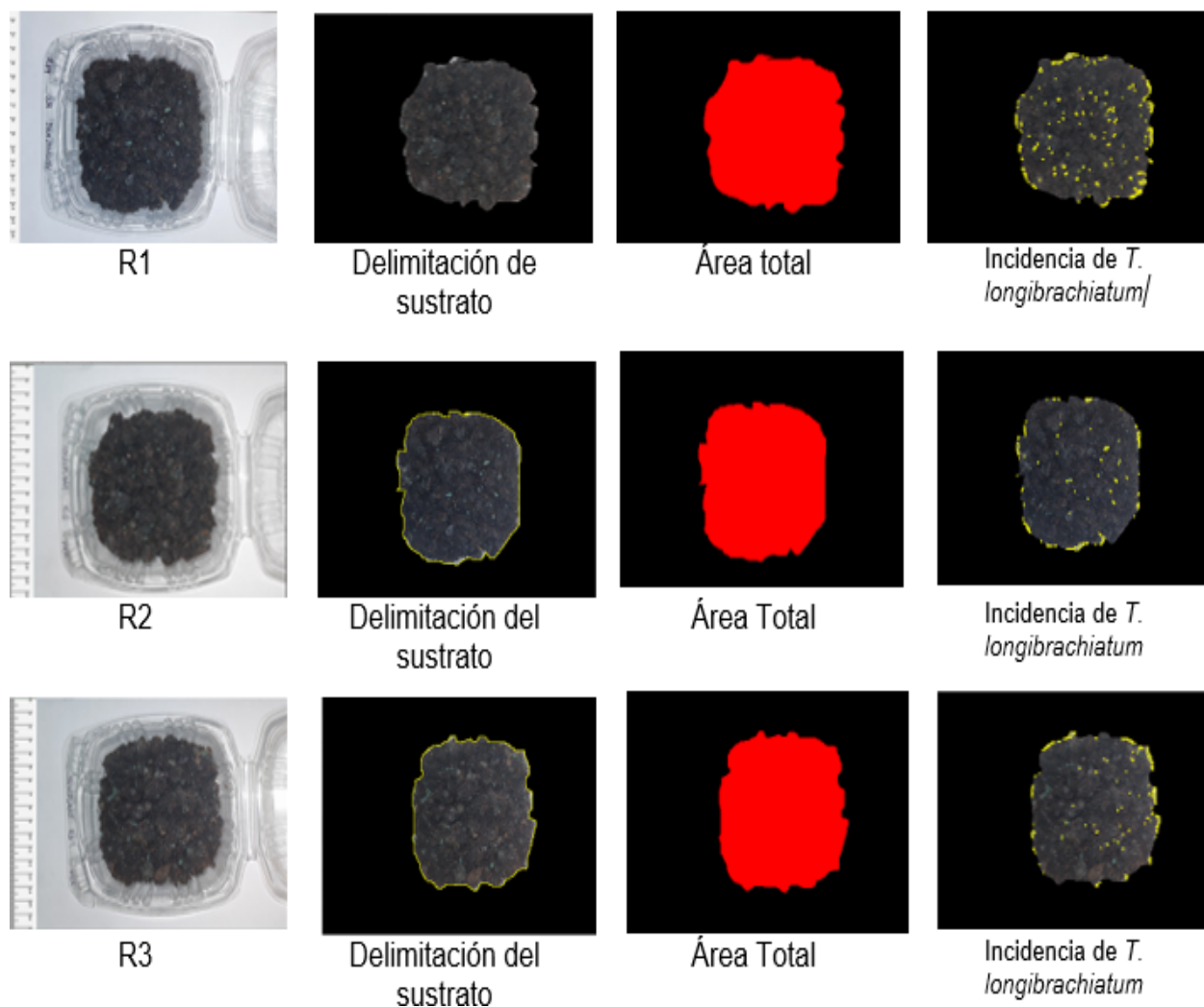
Se realizó un ensayo *in vivo* preventivo contra *T. longibrachiatum* trabajando sobre el sustrato de cobertura (peat most Hawita ®) previamente hidratado en una relación de 3 a 1 y tratado con agua caliente (100°C) y cal (300 g.kg⁻¹), después de enfriado el sustrato (10 °C), se depositaron 150 g Peso húmedo de sustrato en charolas de plástico de 12cm x 12 cm y sobre cada muestra se aplicaron sobre el sustrato las tres dosificaciones de los tres productos con los mejores efectos de eficacia sobre el crecimiento de *T. longibrachiatum* del ensayo *In vitro*: T7 *Laminaria digitata* (45 ppm), T8 *B. amyloliquefaciens* D747 (497 ppm) y T9 Procloraz (900 ppm) pasadas 24 horas con ayuda de un atomizador mediante una aspersión de 2.5 mL se inoculó con *T. longibrachiatum* a una concentración de 10⁶ conidios por ml, Para el conteo de esporas se utilizó

una cámara Neubauer y microscopio Olympus CX31 con aumento de 40X. La suspensión de esporas se hizo por la técnica de arrastre, se homogenizó en tubos de ensayo de 16 x 150 mm con 10 ml de agua destilada estéril y se agitó durante 15 segundos en Vórtex a 150 rpm, con micropipetas se midieron 20 uL para realizar el conteo (Efremenko et al., 2006) y finalmente al cabo de 10 días se evaluó la incidencia de *T. longibrachiatum* mediante el uso de la aplicación ImageJ 1.53 e (NIH, USA) 2023 y el cálculo de porcentaje de severidad con la fórmula.

$$\text{Severidad} = \frac{\text{area afectada}}{\text{area total}} \quad (\text{Nutter et al., 2006}).$$

Confirmando de nuevo que el T7 *Laminaria digitata* tuvo la eficacia más alta con 95% (45 ppm) en contra del desarrollo de *T. longibrachiatum*, seguido de T8 *B. amyloliquefaciens* D474 con 90% de eficacia (497 ppm), y finalmente T9 Procloraz también con 90% de eficacia (900 ppm).

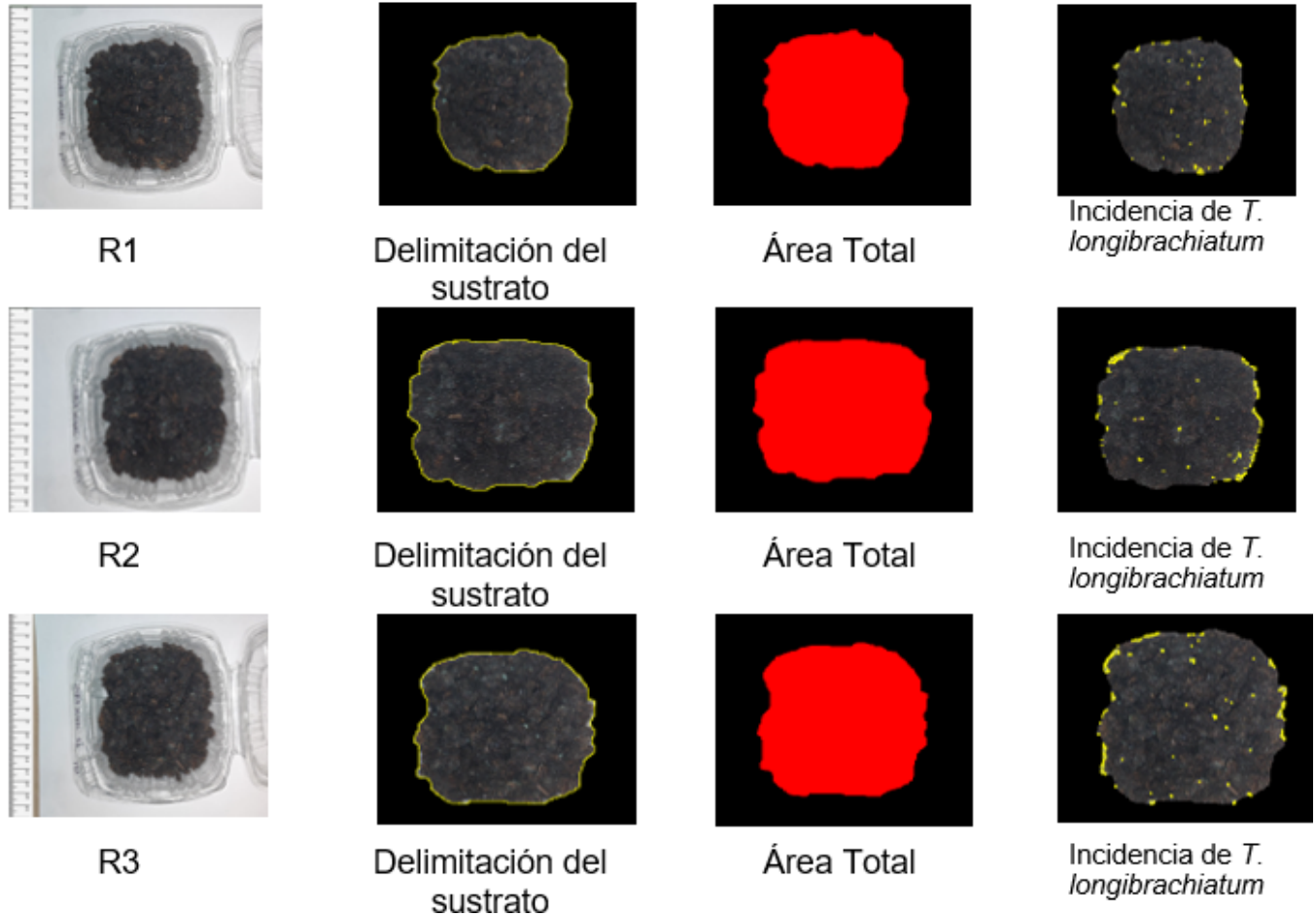
Cuadro 2: Determinación del porcentaje de eficacia de *Laminaria digitata* contra *T. longibrachiatum*. T7: *Laminaria Digitata* (45 ppm).



**Porcentaje de la severidad de *T. longibrachiatum* promedio 5% software ImageJ versión 2023.
Eficacia 95%

Cuadro 3: Determinación del porcentaje de eficacia de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa D474 contra *T. longibrachiatum*.

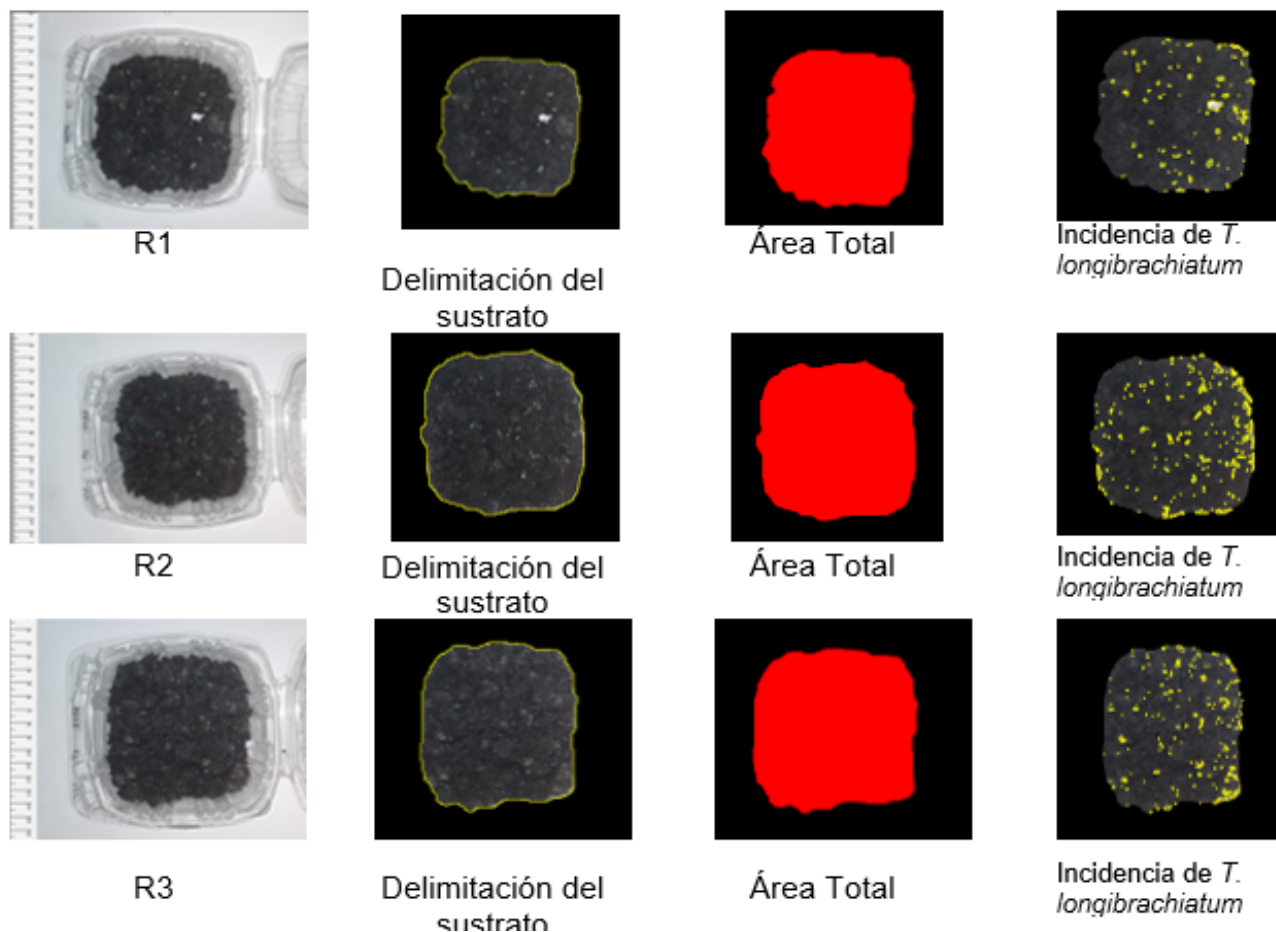
T8: *B. amyloliquefaciens* D474 (497 ppm).



**Porcentaje de la severidad de *T. longibrachiatum* promedio 10% software ImageJ versión 2023. Eficacia 90%

Cuadro 4: Determinación del porcentaje de eficacia de Procloraz contra *T.longibrachiatum*.

T9: Procloraz (900 ppm).



**Porcentaje de la severidad de *T. longibrachiatum* promedio 10% software ImageJ versión 2023. Eficacia 90%

Sánchez *et al.*, (2021) determinó que *T. longibrachiatum* es un micoparásito de *thielaviopsis paradoxa* y otros autores como Martínez-Carrera (2000) lo mencionan como una de las especies presentes en las granjas de champiñón de

México por lo que las aportaciones del presente trabajo en cuanto a la evaluación de diferentes sustancias fungicidas con esta especie pueden ser de utilidad.

7.5 Metodología de 30 días para la preparación rústica de 1ton de composta para el cultivo de champiñón.

El presente procedimiento de elaboración de composta para champiñón es el resultado de tres evaluaciones al método de elaboración de Hongos N° Dexi.

En cualquiera de los sistemas de producción, sistema francés, americano u holandés el uso de la composta como sustrato para el desarrollo del cultivo del champiñón es necesario, la base de esta composta en nuestro país es el rastrojo de maíz, pero dependiendo de la zona se pueden usar otros esquilmos como trigo, cebada y avena, algunos componentes de esta composta no se pueden sustituir ya que el Champiñón requiere de un sustrato parcialmente degradado y enriquecido con fuentes nitrogenadas.

La elaboración de esta composta tiene una duración de 30 a 35 días dependiendo de la época del año, zona geográfica y la calidad de los materiales que se necesitan y se divide en las siguientes dos fases: fermentación (fase I o compostaje libre) y fermentación controlada (fase II o pasteurización), pasadas estas dos fases la composta estará lista para usarse en la siembra de micelio de champiñón.

Cuadro 5: Materiales para la elaboración de una T. de composta para champiñón

Materia prima	Peso húmedo (kg)	Peso seco (kg)	% N	N total (kg)
Paja de trigo o maíz	720 (20 pacas)	400.0	0.5	1.6875
Estiércol de caballo seco	100	62.5	1	0.625
Urea	3	3	46	1.38
Alfalfa achicalada	25	25	2	0.5
Salvado de trigo	25	25		3.5
Yeso	50	25		
Total	478	253		7.0675

**Agua total promedio requerida para todo el proceso 1900 L.

Fase I: Composteo libre

Procedimiento:

En un espacio abierto o más recomendable un espacio cerrado a manera de cuarto o cámara es necesario tener una base de concreto ya que de trabar este proceso sobre suelo los hongos naturales de este invadirán la composta contaminándolo y aprovechando los nutrimentos destinados al champiñón.

Día 1: Es necesario contar con una plancha de concreto para evitar el contacto directo de los ingredientes con el suelo se debe lavar muy bien con agua y jabón la plancha de concreto (se recomienda el uso de sales cuaternarias de amonio cuarta generación), a continuación, se extiende el rastrojo de maíz y se comienza a lavar con abundante agua, se deben de retirar mazorcas y malezas extrañas.

El rastrojo se humedece a capacidad de campo y se debe acomodar en forma de cordón (pila de rastrojo húmedo). Las medidas optimas de este deben ser 1.5 m de ancho x 1.5 m alto, con el largo que resulte, tanto el ancho como la altura son

importante pues de esta forma alcanzaremos la temperatura deseada ($> 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $< 75^{\circ}\text{C}$), en este primer día se tiene un gasto promedio de 550 L de agua en el rastrojo.



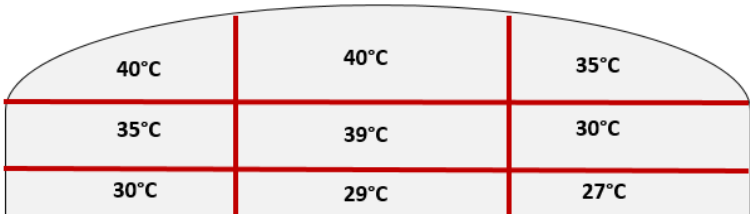
Revisión y extensión de zacate de maíz



Hidratación del sustrato

de estas temperaturas se recomienda usar un termómetro de varilla tomando la lectura de la temperatura de 9 cuadrantes.

Figura 24. Cuadrantes del cordón para toma de temperatura.



Formación de cordón



Elevación de temperatura

Es importante que el rango de temperatura se encuentre siempre por debajo de 80°C. Ya que de ocurrir lo contrario la composta se carbonizará y ya no se podrá usar, además en este día se remueve el cordón para ventilarlo y poder rehidratar el interior de la composta nuevamente el gasto de agua es en promedio de 400 L.

Día 3. Para este día debe haber presencia de otros hongos termófilos y sicrófilos que son buenos indicadores del proceso, el cordón se voltea tal forma que la parte de abajo quede en la parte de arriba en el nuevo cordón, con esta acción se le da aireación al sustrato y se mantiene la temperatura dentro del rango de 65°C. Se vuelve a hidratar con 250 L promedio de agua.

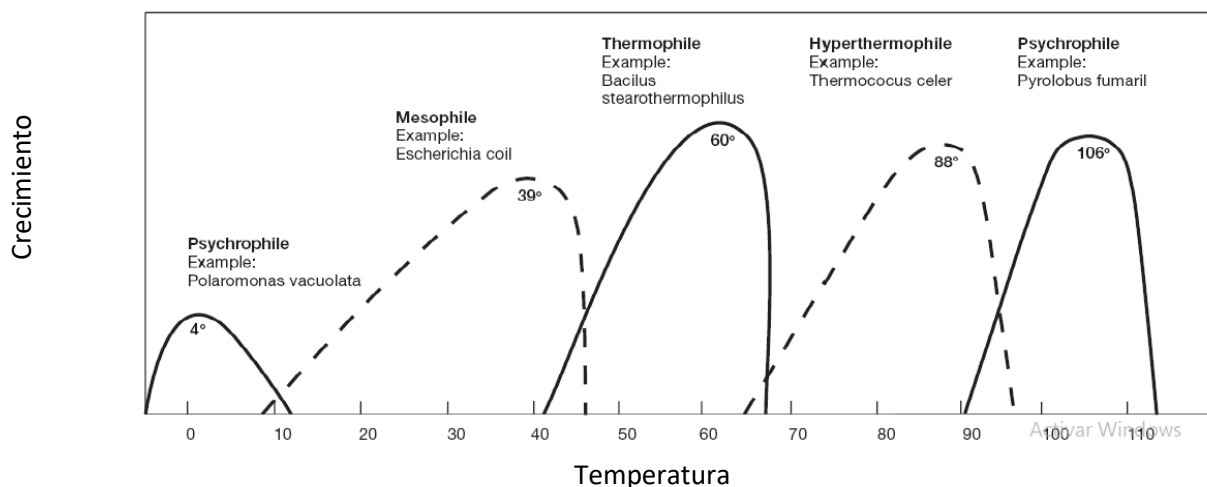


Fig. 25. Relación de temperatura para velocidades de crecimiento de un sicrófilo típico, un termófilo típico y dos diferentes híper termófilos

Día 4. Se voltea el cordón de tal forma que la parte de abajo quede en la parte de arriba formando un nuevo cordón, con esta acción se le da aireación al sustrato y se mantiene la temperatura dentro del rango de 65°C. Aquí se

disuelven los 3 kg de urea en 20 litros de agua y se integran al cordón de forma uniforme, es importante evitar un exceso de urea para que no se dispare la



Preparación de rastrojo



Hidratación de rastrojo

Día 6. Para este día se debe voltear el cordón de tal forma que la parte de abajo quede en la parte de arriba en el nuevo cordón, con esta acción se le da aireación



Preparación de estiércol



Cordón de compost

Día 7. Continuar con el remojo tanto de rastrojo de maíz (50 L promedio) como del estiércol de caballo (5 L promedio de agua) hasta que contenga un 70 % de humedad (hacer prueba del puño).

Día 8. Mezclar el estiércol de caballo y alfalfa achicalada y la mitad de yeso con el rastrojo, haciendo una pila o cordón, si se observan partes secas, se tienen



Integración de alfalfa



Integración de yeso



Medidas del cordón

Día 9, 10. Durante estos dos días el cordón se deja reposar y solamente se agrega agua 150 L promedio, es importante mantener el rango de temperatura de 65°C. De tener una temperatura cercana a los 75°C se requiere voltear el cordón.

Día 11. Deshacer el cordón, airear, mezclar el salvado de trigo y volver a formar un nuevo cordón donde la parte de abajo quede en la parte de arriba del nuevo cordón gasto promedio de agua 50L.



Integración de salvado de trigo



Hidratación del cordón

Día 12, 13. Dejar reposar y remojar el cordón evitando escurrimientos gasto promedio de agua 50 L diario.

Día 14. Deshacer el cordón, airear, mezclar el yeso de manera uniforme, volver a formar el cordón de tal forma que la parte de abajo se coloque en la parte de arriba del nuevo cordón y la parte de arriba quede ahora en la parte baja, remojar con 50L promedio de agua.



Integración de yeso en capas



Formación del cordón

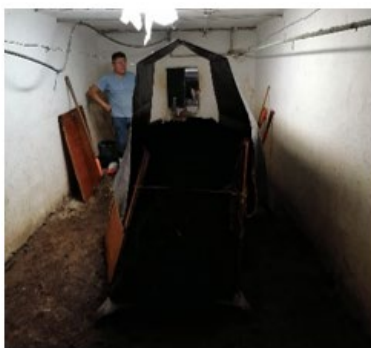
Día 15, 16. Dejar reposar y remojar el cordón evitando escurrimientos (gasto promedio de agua 50 L).

Día 17. Deshacer el cordón, airear, revisar que no exista olor excesivo a amoníaco, que tenga un 70 % de humedad, que la paja esta suelta y no apelmazada, ni olorosa, retirar si es necesario piedras y material extraño, el color de la composta debe ser de color marrón uniforme.



Cordón en forma de bloque con color uniforme

Día 18. Colocar el túnel de pasteurización cubriendo la composta para llevar acaba la pasteurización y fermentación controlada. Se debe permitir dentro del túnel de pasteurización la circulación del aire para eliminar los gases.



Diseño de túnel de pasteurización



Túnel de pasteurización terminado



Interior del túnel de pasteurización

SEGUNDA FASE: PASTEURIZACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO (FERMENTACIÓN CONTROLADA).

Día 1. Calentar la composta inyectando vapor de aire hasta 45 °C subir hasta 65°C. Mantener esta temperatura por un tiempo de 72 horas.

Día 2. Enfriar hasta 48 °C y mantener durante 7 días en reposo.

Día 10. Enfriar la composta hasta temperatura ambiente (22-24 °C).

Al cabo de 30 días de trabajo la composta está listo para ser utilizado en la siembre del micelio de champiñón.

El correcto manejo de *Trichoderma longibrachiatum* está conformado por acciones preventivas como la selección del sustrato para la composta, su adecuado compostaje (fase I), un correcto manejo de las temperaturas de la fase de pasteurización (fase II) como menciona el departamento de agricultura del estado de Pennsylvania y la universidad de Pennsylvania en su trabajo “manejo integral de plagas del champiñón” que considera estas actividades como “controles del cultivo”, por lo que se ha agregado al presente trabajo una metodología rustica de elaboración de composta que reduce significativamente la incidencia de *Trichoderma longibrachiatum* en la composta.

Sánchez *et al.*, (2021) confirman que los trabajos de investigación de *Trichoderma* spp. se deben enfocar en las etapas de siembra y colocación de sustrato de cobertura por lo que se pueden plantear las evaluaciones de otras sustancias a partir de los resultados obtenidos en el presente ensayo.

VIII. CONCLUSIÓN.

- Con base a las características culturales, morfológicas y la caracterización molecular de PCR hechas en los aislamientos obtenidos se determinó que el agente causal del moho verde del sustrato de cobertura para champiñón identificado en Texcoco Edo. De México se trata de *Trichoderma longibrachiatum* con un porcentaje de identificación del 99.84 %, comparándolo en la base de datos de Genbank.
- En la evaluación *in vitro* se determinó que los tratamientos T27 *Laminaria digitata* (45 ppm), T8 *Bacillus amyloliquefaciens* cepa D474 (497 ppm) y T9 Procloraz (900 ppm) fueron los más eficaces en inhibir el desarrollo de *Trichoderma longibrachiatum* con una eficacia del 98.6 %, 96.1 % y 95.1 % respectivamente.
- En la evaluación *in vivo* se determinó que *Laminaria digitata* fue el fungicida más efectivo en inhibir el crecimiento de *T. longibrachiatum* con una eficacia del 95 % (45 ppm). Seguido de *B. amyloliquefaciens* D747 con 90 % de eficacia (497 ppm), quedando Procloraz en tercer lugar con 90 % de eficacia (900 ppm).
- Se realizó una metodología para la elaboración rustica de 1 t de composta para champiñón *A. bisporus* lográndose una producción de 43.3 kg.

IX. LITERATURA CONSULTADA

- Bonilla-Quintero, M. (2006). Innovación tecnológica para controlar el Moho verde (*Trichoderma* spp.) durante el cultivo de hongos comestibles en la región central de México. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Campus-Puebla.
- CABI (2022). Centre for Agricultural Bioscience International. *Trichoderma* spp. Consultado en <https://www.cabi.org/isc/datasheet/40970>, Fecha de consulta: 13/10/2022.
- CONACyT (2021). Consejo, nacional de ciencia e investigación. Consultado en: <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/484-cultiva-hongos-comestibles>, fecha de consulta 03/03/2022.
- EFSA (2022). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Consultado en: https://european-union.europa.eu/institutions-law-budget/institutions-and-bodies/institutions-and-bodies-profiles/efsa_es.
- FAOSTAT (2021). Base de datos estadísticos corporativos de la Organización para la Agricultura y la Alimentación. Consultado en: <https://www.fao.org/in-action/oyster-mushroom-cultivation-spurs-income-for-laos-farmers/es/13/03/2021>.
- Fernández, M. (2005). Manual práctico de producción de champiñón, apuntes recopilación de datos y experiencias adquiridas en el cultivo comercial de champiñones pag. 4-13. <http://www.grupofungitech.com/manual2.pdf>.
- Fletcher, J. T., White, P. F., & Gaze, R. H. (1986). Champiñones: control de las enfermedades y plagas. Acribia SA Zaragoza, España.
- Galindo, J. M. (1991). Cultivo moderno de champiñón, versión española, ediciones mundi prensa Madrid. pag. 111-142.
- Gary J. Samuels, Sarah L. Dodd, Walter Gams, Lisa A. Castlebury & Orlando Petrini (2002) *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*, Mycologia, 94:1, 146-170, DOI: 10.1080/15572536.2003.11833257
- Gea, F. J., Lainez, C., & Navarro, M. J. (2003). Caracterización y sensibilidad in vitro a los fungicidas benomilo y procloraz de aislados de *Trichoderma* procedentes del cultivo de champiñón. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid (España), 29:143-148.

- Guzmán, G. (1995). La diversidad de hongos en México. Ciencias, pp. 52-57. <https://www.revistacienciasunam.com/es/144-revistas/revista-ciencias-39/1162-la-diversidad-de-los-hongos-en-m%C3%A9xico.html>.
- Guzmán G., (2008) Hongos de parques y jardines y sus relaciones con la gente. Secretaria de educación de Veracruz, km 4.5 carretera federal Xalapa-Veracruz.
- Grifé, M., Vela-Corcía, D., Hierrezuelo, J., Perez-Garcia, A., De-Vicente-Moreno, A., & Romero-Hinojosa, D. F. (2021). *Bacillus amyloliquefaciens* UMAF6639 como agente de biocontrol.
- Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2019). Trichoderma: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. Chilean journal of agricultural & animal sciences, 35(1), 98-112. <https://doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>.
- INECOL. (2021). Instituto de Ecología A.C. consultado en: <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/484-cultiva-hongos-comestibles> Fecha de consulta: 23/02/2022.
- Kosanovit D., I Potocnik., B Duduk., J. Vukojevic., M Stajic., E. Rekanovic & S. Milijasevic (2013) trichoderma especies en Agárico bisporo granjas en Serbiay su control biológico. 218–230, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/aab.12048>.
- Martins Machado D. Franco, Requia Parzianello F., Ferreira da Silva A. C. & Zaida I. A. (2012) Revista de Ciências Agrárias – Vol. 35, 1, 26: 274-288.
- Nutter, F. W., Esker, P. D., & Netto, R. A. C. (2006). Disease assessment concepts and the advancements made in improving the accuracy and precision of plant disease data. European Journal of Plant Pathology, 115, 95-103.
- Pennsylvania Department of Agriculture & The Pennsylvania State University (2002) Manejo integral de plagas del champiñón p81.
- Pinzón Gutiérrez, Y. A., Bustamante, S. L., & Buitrago, G. (2009). Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp). Revista Colombiana de Biotecnología, 11(2), 8-18.
- Reyes-Quintanar, C. K., Martínez-Carrera, D., Morales Almora, P., Sobal Cruz, M., Escudero-Urbe, A. H., & Ávila-Acevedo, J. G. (2014). Effect of the extract of rue (*Ruta graveolens*) on the mycelial growth of Trichoderma. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 5(8), 1433-1446.

- Reyes-Quintanar, C. K., Martínez-Carrera, D., Morales Almora, P., Sobal Cruz, M., Escudero-Urbe, A. H., & Ávila-Acevedo, J. G. (2018). Efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) en el crecimiento micelial de *Trichoderma*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(8), 1433-1446. <https://doi.org/10.29312/remexca.v5i8.821>.
- Romero-Arenas, O., Ita, V. D., Ángeles, M., Rivera-Tapia, J. A., Tello-Salgado, I., Villarreal Espino-Barros, O. A., & Damián-Huato, M. Á. (2018). Capacidad productiva de *Pleurotus ostreatus* utilizando alfalfa deshidratada como suplemento en diferentes sustratos agrícolas. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 15(2), 145-160.
- Romero-Arenas, O., Huerta Lara, M., Damián Huato, M. A., Domínguez Hernández, F., & Arellano Victoria, D. A. (2009). Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Revista colombiana de Biotecnología*, 11(2), 143-151.
- Roncero I. (2015) propiedades nutricionales y saludables de los hongos pag. 12-25. <https://issuu.com/horticulturaposcosecha/docs/informesobrepiedadesnutricion>.
- Samuels G. J., Dodd S. L., Gamas W, Castlebury L. A. & Petrini O. (2002). Especies de *trichoderma* asociadas con la epidemia de moho verde de *Agaricus bisporus* cultivado comercialmente. *Rev Micología*. Vol 94 no 1.
- Sánchez J., Almudi R., Venturini E. (2015). Potencial de una nueva cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* Buz14 como agente de biocontrol frente a mohos fitopatógenos en poscosecha. Tesis Universidad de Zaragoza facultad de veterinaria.
- Sánchez J. & Valle J., (2017). Producción de *Agaricus bisporus* Sobre sustratos pasteurizados por autocalentamiento. 7:135 DOI 10.1186/s13568-017-0438-6.
- Sánchez V., Gonzalez O., Cordova J. & Samuels G. (2021). *Trichoderma longibrachiatum*: un micoparásito de *Thielaviopsis paradoxa* memorias del XII Congreso Nacional de biotecnología y Bioingeniería. Universidad de Guadalajara. Depto de Ing. Química.
- Seaby, D. A. (1996). Investigation of the epidemiology of green mould of mushroom (*Agaricus bisporus*) compost caused by *Trichoderma harzianum*. *Plant Pathology*, 45(5), 913-923. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1996.tb02902.x>.
- Sobal, M., Morales, P., Bonilla, M., Huerta, G., & Martínez-Carrera, D. (2007). El Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados. *El Cultivo de Setas*, 14.

Tamura K., Stecher G. y Kumar S. (2021). MEGA 11: Análisis de Genética Evolutiva Molecular Versión 11. *Biología Molecular y Evolución*
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & Santos-Villalobos, S. D. L. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), 95-130.

X. ANEXOS.

ANEXO 1. CALCULO DE DOSIS COMERCIALES DE PRODUCTOS

Para determinar las dosificaciones a evaluar se tomó la concentración comercial del producto como referencia y así se obtuvieron dos dosis por debajo de la concentración del producto, una con un decremento del 50 % y otra con un decremento del 75% y finalmente para la cuarta dosificaciones se consideró con un incremento del 50% en base a la concentración comercial del producto.

Cuadro 6: Fungicidas y extractos vegetales a evaluar.

i.a.	Presentación	Tipo de sustancia
Tulipán A. <i>Spathodea campanulata</i>	Suspensión concentrada	Orgánico
Chicalote <i>Argemone munita</i>	Suspensión concentrada	Orgánico
Buganvilla <i>Bougainvillea spectabilis</i>	Suspensión concentrada	Orgánico
Chicalote <i>Melaleuca alternifolia</i>	Suspensión concentrada	Orgánico
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Hgo 10	Suspensión concentrada	Biológico
<i>Reynoutria sachalinensis</i>	Suspensión concentrada	IR
<i>Laminaria digitata</i>	Concentrado soluble	IR
<i>Bacillus amyloliquefaciens cepa D747</i>	Suspensión concentrada	Biológico
Procloraz	Concentrado emulsionable	Triazol
Azoxistrobina	Concentrado emulsionable	Estrobilurina

1. Extracto de tulipán africano (*Spathodea campanulata*).

Producto: Extracto de **Tulipán africano** (*Spathodea campanulata*) 80% (800 g/L)
de concentración

800 g i. a. *Tulipán africano* por cada L de producto comercial

800 000 mg i. a. por cada L de extracto orgánico

800 mg i. a. por cada mL de extracto orgánico

Por tanto: 1ml de producto comercial tiene 800 ppm

Preparación de solución madre y dosificación de soluciones

1 mL de extracto orgánico ----- 1L de agua destilada, esterilizada (1000 mL)

X ----- 100 mL

X = 0.1 mL de Extracto de tulipán africano por 100 mL de agua destilada, esterilizada.

Dosis comercial (800 ppm 100 %)

0.1 mL de Extracto de Tulipán africano / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (1600 ppm 200 %)

0.2 mL de Extracto de Tulipán africano / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (400 ppm 50 %)

.05 mL de Extracto de Tulipán africano / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (200 ppm 25 %)

.025 mL de Extracto de Tulipán africano / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri.

2. Extracto de Chicalote (*Argemone munita*)

Producto: **Extracto de chicalote** (*Argemone munita*) 80% (800 g/L) de concentración

800 g i. a. Por cada L de extracto orgánico

800 000 mg i. a. por cada L de extracto orgánico

800 mg i. a. por cada mL de extracto orgánico

Por tanto: 1 mL de extracto orgánico tiene 800 ppm

Preparación de solución madre y dosificación de soluciones

1 mL de producto comercial ----- 1L de agua destilada, esterilizada (1000 ml)

X ----- 100 mL

X = 0.1 mL de Extracto de Chicalote por 100 mL de agua destilada, esterilizada

Dosis comercial (800 ppm 100 %)

0.1 mL de Extracto de Chicalote / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (1600 ppm 200 %)

0.2 mL de Extracto de Chicalote / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (400 ppm 50 %)

.05 mL de Extracto de Chicalote / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (200 ppm 25 %)

.025 mL de Extracto de Chicalote / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

3. Extracto de Buganvilia (*Bougainvillea spectabilis*)

Producto: **Extracto de Buganvilia** (*Bougainvillea*) 80% (800 g/L) de concentración

800 g i. a. por cada L de extracto orgánico

800 000 mg i. a. Por cada L de extracto orgánico

800 mg i. a. por cada mL de extracto orgánico

Por tanto: 1 mL de extracto orgánico tiene 800 ppm

Preparación de solución madre y dosificación de soluciones

1ml de producto comercial ----- 1L de agua destilada, esterilizada (1000 mL)

X ----- 100 mL

X = 0.1 mL de Extracto de Buganvilia por 100 mL de agua
destilada, esterilizada

Dosis comercial (800 ppm 100 %)

0.1 mL de Extracto de Buganvilia / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 ml de solución por cada caja Petri

Dosificación a (1600 ppm 200 %)

0.2 mL de Extracto de Buganvilia / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 ml de solución por cada caja Petri

Dosificación a (400 ppm 50 %)

.05 mL de Extracto de Buganvilia / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (200 ppm 25 %)

.025 mL de Extracto de Buganvilia / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

4. Extracto del árbol del Té (*Melaleuca alternifolia*).

Producto: Extracto del árbol del té (*Melaleuca alternifolia*) al 23,8% (223 g/L) de concentración

223 g i. a. por cada L de producto comercial

223 000 mg i. a. por cada L de producto comercial

223 mg i. a. por cada ml de producto comercial

Por tanto: 1 mL de producto comercial tiene 223 ppm

Preparación de solución madre y solución

1 mL de producto comercial ----- 1L de agua destilada, esterilizada (1000 mL)

X ----- 100 mL

X = 0.1 mL de árbol del té por 100 mL de agua
destilada, esterilizada

Dosis comercial (223 ppm 100 %)

0.1 mL de árbol del té / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (446 ppm 200 %)

0.2 mL de árbol del té / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (111.5 ppm 50 %)

.05 mL de árbol del té / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (55.75 ppm 25 %)

.025 mL de árbol del té / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

5. Producto: *Bacillus amyloliquefaciens* Hgo 010

50 g i. a. *Bacillus amyloliquefaciens* cepa Hgo 010 por cada L de producto comercial

50 g i. a. por cada L de producto comercial

Cada gramo contiene no menos de 1×10^{12} de esporas

1 g i. a. es a 100,000,000,000 de esporas

100 g i. a. es a 10,000,000,000,000 (1×10^{14}) de esporas

100 g i. a. por cada L de producto comercial

100,000 mg i. a. por cada L de producto comercial

100 mg i. a. por cada ml de producto comercial

Por tanto: 1ml de producto comercial tiene 100 ppm (1×10^{12})

Preparación de solución madre y dosificación de soluciones

1ml de producto comercial ----- 1L de agua destilada, esterilizada (1000 ml)

X ----- 100 mL

X = 0.1 mL de *Bacillus amyloliquefaciens* por 100 ml de

agua destilada, esterilizada

Dosis comercial (100 ppm 1×10^{12})

0.1 mL de *Bacillus amyloliquefaciens* / 100 ml de agua destilada esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (200 ppm 2×10^{12})

0.2 mL *Bacillus amyloliquefaciens* / 100 ml de agua destilada, esterilizada

1 ml de solución por cada caja Petri

Dosificación a (50 ppm $.5 \times 10^{12}$)

.05 mL de *Bacillus amyloliquefaciens* / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (25 ppm $.25 \times 10^{12}$)

.025 mL de *Bacillus amyloliquefaciens* / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

6. Producto: *Reynoutria sachalinensis*

228.2 g i. a. por cada L de producto comercial

228,200 mg i. a. por cada L de producto comercial

228.2 mg i. a. por cada ml de producto comercial

Por tanto: 1ml de producto comercial tiene 228.2 ppm

Preparación de solución madre y dosificación de soluciones

1 mL de producto comercial ----- 1L de agua destilada, esterilizada (1000 mL)

X ----- 100 mL

X = 0.1 mL de *Reynoutria sachalinensis* por 100 mL de
agua destilada, esterilizada

Dosis comercial (228.2 ppm)

0.1 ml de *Reynoutria sachalinensis* / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (546.4 ppm)

0.2 mL de *Reynoutria sachalinensis* / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (114.1 ppm)

.05 mL de *Reynoutria sachalinensis* / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (57.05 ppm)

.025 mL de *Reynoutria sachalinensis* / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

7. Producto: extracto de algas marinas *Laminaria digitata*

45 g i. a. por cada L de producto comercial
45, 000 mg i. a. por cada L de producto comercial
45 mg i. a. por cada ml de producto comercial
Por tanto: 1ml de producto comercial tiene 45 ppm

Preparación de solución madre

1ml de producto comercial ----- 1L de agua destilada, esterilizada (1000 mL)

X ----- 100 ml

X = 0.1 mL de *laminaria digitata* por 100 mL de agua
destilada, esterilizada.

Dosis comercial (45 ppm)

0.1 mL de *laminaria digitata* / 100 mL de agua destilada esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (90 ppm)

0.2 mL de *laminaria digitata* / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (22.5 ppm)

.05 mL de *laminaria digitata* / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (11.25 ppm)

.025 mL de *Laminaria digitata* / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri.

8. Producto: *Bacillus amyloliquefaciens* D747

994.43 g i. a. *Bacillus* s. var. *Amyloliquefaciens* cepa D747 por cada L de producto comercial

994430 mg i. a. por cada L de producto comercial

994.43 mg i. a. por cada mL de producto comercial

Por tanto: 1 mL de producto comercial tiene 994.43 ppm

Preparación de solución madre y dosificación de soluciones

1 mL de producto comercial ----- 1L de agua destilada, esterilizada (1000 mL)

X ----- 100 mL

X = 0.1 mL de *Bacillus amyloliquefaciens* D747 por 100
mL de agua destilada, esterilizada

Dosis comercial (994.43 ppm)

0.1 mL de *Bacillus amyloliquefaciens* D747 / 100 mL de agua destilada,
esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (1988.86 ppm)

0.2 mL de *Bacillus amyloliquefaciens* D747 / 100 mL de agua destilada,
esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (497.215 ppm)

.05 mL de *Bacillus amyloliquefaciens* D747 / 100 mL de agua destilada,
esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (248.6 ppm)

.025 mL de *Bacillus amyloliquefaciens* D747 / 100 mL de agua destilada,
esterilizada 1 mL de solución por cada caja Petri

9. Producto: Procloraz

450 g i. a. por cada L de producto comercial
450,000 mg i. a. por cada L de producto comercial
450 mg i. a. por cada ml de producto comercial
Por tanto: 1ml de producto comercial tiene 450 ppm

Preparación de solución madre y dosificación de soluciones

1 mL de producto comercial ----- 1L de agua destilada, esterilizada (1000 mL)

X ----- 100 mL

X = 0.1 mL de Procloraz por 100 mL de agua destilada,
esterilizada

Dosis comercial (450 ppm)

0.1 mL de Procloraz / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (900 ppm)

0.2 mL de Procloraz / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (225 ppm)

.05 mL de Procloraz / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (112.5 ppm)

.025 mL de Procloraz / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

10.- Producto: Azoxistrobin

250 g i. a. por cada L de producto comercial

250,000 mg i. a. por cada L de producto comercial

250 mg i. a. por cada ml de producto comercial

Por tanto: 1 mL de producto comercial tiene 250 ppm

Preparación de solución madre y dosificación de soluciones

1ml de producto comercial ----- 1L de agua destilada, esterilizada (1000 mL)

X ----- 100 ml

X = 0.1 mL de Azoxistrobin por 100 mL de agua destilada,
esterilizada

Dosis comercial (250 ppm)

0.1 mL de Azoxistrobin / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (500 ppm)

0.2 mL de Azoxistrobin / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (125 ppm)

.05 mL de Azoxistrobin / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

Dosificación a (75 ppm)

.025 mL de Azoxistrobin / 100 mL de agua destilada, esterilizada

1 mL de solución por cada caja Petri

ANEXO 2. PREPARACIONES DE MEDIOS ENVENENADOS.

Materiales y equipo

- ✓ 10 Matraces Erlenmeyer de 125 mL.
- ✓ Vasos de precipitados 125 mL.
- ✓ 1 Bolsa de Algodón plisado.
- ✓ 10 Cuadros de papel Aluminio de 5cm x 5cm.
- ✓ Bolsas de poli papel.
- ✓ 1 Micro pipeta para dosificar (0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 μL).
- ✓ 100 puntillas para micro pipeta.
- ✓ 1 Pliego de papel estraza.
- ✓ 1 paquete de Sanitas.
- ✓ 1 Triángulo de vidrio.
- ✓ L De Medio PDA.
- ✓ 10 jeringas de 5 ml.
- ✓ 1 Campana de flujo laminar TELSTAR® AV-100.
- ✓ 10 Soluciones de productos.
- ✓ 1 Mechero de alcohol.
- ✓ 1L de agua destilada esterilizada.

Procedimiento.

1.- Se colocó un tapón hecho de algodón a cada matraz Erlenmeyer que después se cubrió con aluminio, es importante que el tapón quede bien sujeto a presión en la boca del matraz.

2.- Los matraces se guardaron en una bolsa doble de poli papel, junto con un triángulo de vidrio, los vasos de precipitados, una caja de micropipetas envuelta en papel estraza, sanitas y se esterilizaron en auto clave durante 15 minutos a 1.1 kg/cm².

3.- Dentro de camp de flujo laminar TELSTAR® AV-100 se comenzaron a extraer de la bolsa de poli-papel los instrumentos esterilizados y se colocó al centro un mechero de alcohol por el cual se flameo el triángulo de vidrio cada vez que se utilizó.

- 4.-** Se vertieron 100 ml de agua destilada esterilizada en uno de los matraces y se agregó del primer producto mediante la micro pipeta una primera alícuota de 0.025 μL , de esta nueva solución se tomó con una jeringa solo 1 ml y se colocó en el medio sólido PDA de una caja Petri preparado previamente 24 horas antes.
- 5.-** Una vez colocada la solución sobre el medio PDA con ayuda de un triángulo de vidrio se esparció una película delgada por encima del PDA, se tapó la caja Petri, etiquetó con marcador permanente y se selló con plástico playo en todo su contorno, obteniendo el primer medio envenenado para la primera dosificación.
- 6.-** Este proceso se repitió tres veces más con la misma dosificación para obtener cuatro medios envenenados con la misma dosis.
- 7.-** Este proceso se repitió de la misma forma para las dosificaciones de 0.05, 0.1 y 0.2 μL obteniendo 16 medios envenenados en cajas Petri del mismo producto con cuatro dosificaciones y cuatro repeticiones de cada dosis.
- 8.-** Este proceso se repitió de la misma forma para el resto de los extractos vegetales y fungicidas comerciales obteniendo al final 160 medios envenenados.
- 9.-** Se dejaron 4 medios PDA sin tratamiento que sirvieran como testigos.
- 10.-** Finalmente cada producto se dejó absorber y reposar por 24 h dentro de la cámara de incubación B.G. ® modelo ECF-41 a una temperatura de 23°C.
- 11.-** Pasadas 24 h de la preparación de los medios envenenados se le colocó a cada caja Petri un disco de *Trichoderma ongibrachiatum* para evaluar su crecimiento y determinar los productos más eficaces en la inhibición de su desarrollo.