

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

MANEJO BIO-RACIONAL DE PLAGAS Y ENFERMEDADES EN CRISANTEMO *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. 'Harman'

Jessica Berenice Valencia Luna

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

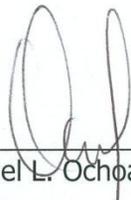
2011

La presente tesis titulada: MANEJO BIO-RACIONAL DE PLAGAS Y ENFERMEDADES EN CRISANTEMO (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. 'Harman', realizada por la alumna: Jessica Berenice Valencia Luna, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



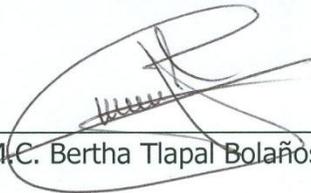
Dr. Daniel L. Ochoa Martínez

ASESORA



M.C. Elda Araceli Gaytán Acuña

ASESORA



M.C. Bertha Tlapal Bolaños

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Febrero de 2011

AGRADECIMIENTOS

No es fácil llegar, se necesita perseverancia, lucha y deseo, pero sobre todo apoyo como el que he recibido durante este tiempo.

Al pueblo de México que mediante el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología hizo posible la realización de mis estudios.

Al Dr. Daniel L. Ochoa Martínez, M. C. Elda Araceli Gaytán Acuña y M. C. Bertha Tlapal Bolaños, por su amistad, consejos y motivación, ahora más que nunca quiero expresar mi cariño, admiración y respeto. Gracias por lo que hemos logrado.

Al apoyo otorgado a través de fideicomiso revocable de administración e inversión no. 167304 de 2010 para la realización de tesis de maestría.

Al Sr. Alejandro y Sr. Alejandra Valdez productores que permitieron compartir sus conocimientos y trabajar en conjunto para la realización de esta investigación.

Al Dr. Roberto Johansen Naime por su apoyo para la identificación de trips y su amable atención.

Al Dr. Gabriel Otero Colina por su ayuda para la identificación de ácaros.

A la M. C. Amalia Hernández por su asistencia para la identificación de ninfas de mosca blanca.

DEDICATORIA

A ti DIOS que me diste la oportunidad de vivir esta experiencia.

Con cariño para mis padres Marcela Luna y Pedro A. Valencia, aun que hemos pasado momentos difíciles, les agradezco de todo corazón el que estén conmigo a mi lado.

A mis hermanos Marcos y Hugo, cómplices de mis travesuras y mis mejores amigos de toda la vida, que los quiero y admiro.

A mi cuñada Roxana y mis sobrinos Dany, Erick y Jimena, mis pequeños, son el motor de mi existencia. Gracias por ser parte de mi vida llenándola de más felicidad.

A todos mis amigos, gracias por permitirme formar parte de su vida ya que ustedes forman parte, ahora de la mía.

Bere

INDICE

INDICE DE CUADROS.....	VII
INDICE DE FIGURAS.....	VIII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN GENERAL	3
LITERATURA CITADA.....	7
CAPÍTULO 1. PLAGAS Y ENFERMEDADES DEL CULTIVO DE CRISANTEMO <i>Dendranthema grandiflorum</i> (RAMAT.) KITAM. 'HARMAN' EN TEQUEXQUINAHUAC, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO.....	10
1.1 RESUMEN.....	10
1.2 ABSTRACT	12
1.3 INTRODUCCIÓN	13
1.4 OBJETIVOS	14
1.5 REVISIÓN DE LITERATURA.....	15
1.5.1 Generalidades del cultivo	15
1.5.2 Plagas del crisantemo	17
1.5.3. El suelo y su relación con el manejo del cultivo de crisantemo	26
1.6. MATERIALES Y MÉTODOS	28
1.6.1. Localización del área de estudio	28
1.6.2. Muestreo de suelo	28
1.6.3. Análisis de hongos y oomycetos	29
1.6.4. Colecta de trips y minador	30
1.6.5. Colecta e identificación de mosca blanca.....	31
1.6.6. Colecta e identificación de ácaros	31
1.6.7. Etiología de la marchitez del crisantemo cv. 'Harman'.....	32
1.6.8. Agente asociado a la mancha foliar	36
1.6.9. Virus asociados al crisantemo.....	38
1.7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
1.7.1. Análisis fisicoquímico del suelo	40
1.7.2. Análisis de hongos y oomycetos	42
1.7.3. Identificación de trips	45
1.7.4. Identificación de minador.....	47
1.7.5. Identificación de mosca blanca.....	48
1.7.6. Identificación de ácaros	49
1.7.7. Etiología de la marchitez.....	50
1.7.8. Agente asociado a la mancha foliar	56
1.7.9. Virus asociados al crisantemo.....	59
1.8. CONCLUSIONES	61

1.9. LITERATURA CITADA	62
CAPÍTULO 2. MANEJO BIORRACIONAL DEL CULTIVO DE CRISANTEMO.....	71
2.1 RESUMEN.....	71
2.2 ABSTRACT	73
2.3 INTRODUCCIÓN	75
2.4 OBJETIVOS	77
2.5 REVISIÓN DE LITERATURA.....	78
2.5.1. Manejo convencional.....	78
2.5.2. Manejo integrado de plagas (MIP)	78
2.5.3. Manejo integrado del cultivo (MIC).....	79
2.5.4. Manejo bioracional	79
2.6 MATERIALES Y MÉTODOS	86
2.6.1. Localización del experimento	86
2.6.2. Diseño experimental.....	86
2.6.3. Tratamientos.....	86
2.6.4. Condiciones del cultivo	87
2.6.5. Variables respuesta.....	89
2.7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	93
2.7.1. Análisis de hongos y oomycetos.....	93
2.7.2. Incidencia de marchitez e índice de dispersión.....	97
2.7.3. Incidencia de plantas con síntomas de virosis e índice de dispersión	98
2.7.4. Conteo poblacional de trips, minador y mosca blanca	100
2.7.5. Relación beneficio/costo	104
2.8. CONCLUSIONES	108
2.9. LITERATURA CITADA	109
CAPITULO 3. PRODUCTOS BIORACIONALES EN LA CALIDAD COMERCIAL DE FLOR DE CRISANTEMO 'HARMAN'	117
3.1. RESUMEN.....	117
3.2. ABSTRACT	119
3.3. INTRODUCCIÓN	120
3.4. OBJETIVO	121
3.5. REVISION DE LITERATURA.....	122
3.5.1. Calidad comercial.....	122
3.5.2. Acumulación de biomasa fresca y seca	122
3.6. MATERIALES Y MÉTODOS	124
3.6.1. Localización del experimento	124
3.6.2. Diseño experimental.....	124
3.6.3. Tratamientos y forma de aplicación	124
3.6.4. Variables respuesta.....	126
3.6.5. Análisis de datos.....	127
3.7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	128
3.7.1. Diámetro y color de inflorescencia	128

3.7.2. Altura y diámetro de tallo.....	129
3.7.3. Peso de biomasa seca por planta	131
3.7.4. Contenido de macro y micronutrientos	133
3.7.5. Determinación indirecta del contenido de clorofila con el SPAD en hojas	135
3.8. CONCLUSIONES	138
3.9. LITERATURA CITADA	140
ANEXO I. MEDIOS DE CULTIVO	143
ANEXO II. CLAVES TAXONÓMICAS.....	147
ANEXO III. EXTRACCIÓN DE DNA POR EL MÉTODO AP.....	155
ANEXO IV. TÉCNICA SEROLÓGICA DAS- ELISA	157
ANEXO V. DISEÑO EXPERIMENTAL	161
ANEXO VI. DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y FECHAS DE EVALUACIÓN DE PLANTAS CON SÍNTOMAS DE MARCHITEZ Y VIROSIS EN EL CULTIVO DE CRISANTEMO 'HARMAN'	162

INDICE DE CUADROS

CAPÍTULO 1.

Cuadro 1. Características fisicoquímicas del suelo de Tequexquahuac, Texcoco, Estado de México, donde se estableció crisantemo *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. 'Harman' 40

CAPÍTULO 2.

Cuadro 1. Prácticas de manejo convencional del crisantemo 'Harman' 88

Cuadro 2. Análisis de agua de riego del cultivo de crisantemo 'Harman', Tequexquahuac, Texcoco, estado de México 93

Cuadro 3. Número promedio de trips, mosca blanca y minador registrados en trampas amarillas pegajosas en plantas de crisantemo 'Harman' sometidas a tratamientos, Tequexquahuac, Texcoco, Estado de México, 2010 101

Cuadro 4. Costos por tratamiento del cultivo de crisantemo 'Harman', Tequexquahuac, Texcoco, estado de México. Ciclo abril- julio 2010. **M:** miel de abeja al 2%; **N+AH:** nitrógeno + ácidos húmicos; **SC:** *Saccharomyces cerevisiae*; **T:** Testigo regional..... 105

Cuadro 5. Relación beneficio/costo de los tratamiento del cultivo de crisantemo 'Harman', Tequexquahuac, Texcoco, estado de México. Ciclo abril- julio 2010. **M:** miel de abeja al 2%; **N+AH:** nitrógeno + ácidos húmicos; **SC:** *Saccharomyces cerevisiae*; **T:** Testigo regional 106

CAPITULO 3.

Cuadro 1. Diámetro de inflorescencia, altura y diámetro de tallo de plantas de crisantemo 'Harman' cultivadas en invernadero con diferentes tratamientos foliares..... 128

Cuadro 2. Contenido de macro y micronutrientes en tejido vegetal de plantas de *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. 'Harman' cultivadas en invernadero con diferentes tratamientos foliares, Tequexquahuac, Texcoco, Estado de México, 2010..... 134

INDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1.

- Figura 1.** . Disposición espacial de los puntos de toma de submuestras en camas de siembra 28
- Figura 2.** Hongos encontrados en el suelo donde se estableció crisantemo *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. 'Harman', Tequexquinahuac, Texcoco, estado de México 43
- Figura 3.** Características morfológicas del género *Frankliniella* sp. citadas por Huerta y Chavarín (2002). A; seda ocelar I presente, B; ctenidia en el tergito VIII, C; alas anteriores con dos hileras de sedas completas 45
- Figura 4.** Especies de trips identificadas asociadas al crisantemo 'Harman' cultivado en invernadero. Tequexquinahuac, Texcoco, estado de México, 2010 46
- Figura 5.** Ninfa de *Trialeurodes vaporariorum* colectada en crisantemo 'Harman' Tequexquinahuac, Texcoco, estado de México. **A**; orificio vasiforme cordado, **B**; vista del área marginal 48
- Figura 6.** Adultos de *Tetranychus urticae* colectados en crisantemo 'Harman' Tequexquinahuac, Texcoco, estado de México. **A**: macho, **A1**: edeago, **B**: hembra..... 49
- Figura 7.** Hongos aislados de plantas de crisantemo 'Harman' de un mes de edad con síntomas de marchitez. **A**: colonia color blanco cremoso y **B**: colonia color violeta en medio PDA obtenidas a partir de cultivos monospóricos 51
- Figura 8.** Producto de PCR obtenido a partir del DNA de hongos aislados de plantas de crisantemo 'Harman' con síntomas de marchitez, utilizando los iniciadores ITS4/ITS5 universales para hongos. Carril 1; marcador de peso molecular de 100 pb; Carril 2: colonia color violeta (*Fusarium oxysporum*); Carril 3: colonia color blanco cremoso (*Fusarium* sp.)..... 53

Figura 9. Incidencia de plantas de crisantemo 'Harman' con síntomas de marchitez inoculadas con *Fusarium* sp. y *Fusarium oxysporum* mantenidas en cámara de ambiente controlado a 30°C y HR 55 %, con suelo saturado de agua 55

Figura 10. A: manchas necróticas rodeadas por un halo clorótico en hoja de planta adulta de crisantemo 'Harman' muestreada en invernadero de donde se aisló una bacteria; **B:** necrosis observada en hoja de planta joven de crisantemo 'Harman' inoculada con la bacteria aislada; **C:** manchas necróticas en hoja de tabaco inoculada con la bacteria aislada 56

Figura 11. A: Colonias de la bacteria aislada y purificada de tejido foliar de crisantemo 'Harman' que mostraba manchas necróticas rodeadas por un halo clorótico, Tequexquinahuac, Texcoco, estado de México; **B:** prueba de KOH 10 % positiva; **C:** prueba de pudrición de papa positiva. (-): lesión en la se colocó agua destilada estéril; (+) lesión en la que se colocó una asada de la colonia bacteriana 57

Figura 12. Síntomas de infección por TSWV en plantas de crisantemo 'Harman' en Tequexquinahuac, Texcoco, estado de México. **A:** clorosis de nervaduras; **B:** necrosis en nervaduras, peciolo y tallo 59

CAPÍTULO 2.

Figura 1. Hongos presentes en muestreo de suelo al final del ciclo del cultivo de crisantemo 'Harman', en diferentes tratamientos. Tequexquinahuac, Texcoco, estado de México. **M:** miel de abeja al 2%; **N+AH:** nitrógeno + ácidos húmicos; **SC:** *Saccharomyces cerevisiae*; **T:** Testigo regional 94

Figura 2. Oomycetos pertenecientes a la familia Pythiaceae presentes en muestreo de suelo al final del ciclo del cultivo de crisantemo 'Harman', en diferentes tratamientos. Tequexquinahuac, Texcoco, estado de México. **M:** miel de abeja al 2%; **N+AH:** nitrógeno + ácidos húmicos; **SC:** *Saccharomyces cerevisiae*; **T:** Testigo regional 96

Figura 3. Fluctuación poblacional promedio de trips, minador, mosca blanca de los diferentes tratamientos y temperatura media diaria registradas en el ciclo de cultivo de crisantemo *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. 'Harman' en los meses abril-julio 2010. **TR:** trips, **MN:** minador, **MB:** mosca blanca, **T MED:** temperatura media semanal, **CV:** crecimiento vegetativo, **PF:** prefloración, **FL:** floración y **C:** cosecha. **Aplicaciones:** se refiere a las fechas en las que se aplicó algún insecticida o acaricida por parte del productor 102

CAPITULO 3.

Figura 1. Coloración de inflorescencia de crisantemo *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. 'Harman' de acuerdo con las cartas de color Fan 1 y Fan 4 de la Royal Horticultural Society (2007) London in association with the Flowers Council of Holland . **P:** flores liguladas de la periferia con un color White group NN 155 B; **M:** flores liguladas de la parte media con un color Yelow group 4B; **C:** flores liguladas del centro con un color Yelow group 1A 131

Figura 2. Contribución de cada órgano al total de peso de biomasa seca (g) por planta de crisantemo *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. 'Harman' cultivadas en invernadero con diferentes tratamientos foliares. **M:** miel de abeja al 2%; **N+AH:** nitrógeno + ácidos húmicos; **SC:** *Saccharomyces cerevisiae*; **T:** Testigo regional..... 132

Figura 3. Determinación indirecta de clorofila (Unidades SPAD 502 Minolta®) durante el llenado de botón, floración y cosecha en plantas de crisantemo *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. 'Harman' cultivadas en invernadero con diferentes tratamientos foliares, Tequexquinahuac, Texcoco, Estado de México, 2010. **M:** miel de abeja al 2%; **N+AH:** nitrógeno + ácidos húmicos; **SC:** *Saccharomyces cerevisiae*; **T:** Testigo regional. **CV:** crecimiento vegetativo, **PF:** prefloración, **FL:** floración y **C:** cosecha..... 135

RESUMEN

El cultivo de crisantemo 'Harman' en la región de Texcoco se ve afectado por diversas plagas y enfermedades que demeritan su producción. En la zona, el uso indiscriminado de agroquímicos sintéticos ha ocasionado la aparición de plagas y enfermedades resistentes, fractura del control biológico natural y generado problemas ambientales y de salud humana. Con el objetivo de proporcionar alternativas para el control de plagas y enfermedades, que además contribuyan a la calidad de flor de corte, se evaluaron los tratamientos: miel de abeja al 2 % (M), nitrógeno + ácidos húmicos (N+AH), *S. cerevisiae* (SC) y testigo regional (T), bajo un diseño experimental de bloques completos al azar con tres repeticiones. Además, en los tratamientos M, N+AH y SC se aplicaron extractos vegetales al follaje, *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum* al suelo. El tratamiento T consistió en el manejo convencional del cultivo como lo hace el productor de la zona con aplicaciones calendarizadas de agroquímicos. Todos los tratamientos fueron similares estadísticamente para el control de plagas y enfermedades, sin embargo, la relación beneficio/costo en el tratamiento N+AH fue de \$ 0.84 de ganancia neta, mientras que los tratamientos M, SC y T tuvieron \$ 0.56, 0.66 y 0.14, respectivamente. Aunado a esto, los tratamientos propuestos mejoraron la calidad de la flor, son de bajo impacto ambiental, inocuos para el productor y de fácil adquisición.

Palabras clave: *Dendranthema grandiflorum*, control bioracional, relación beneficio/costo, calidad comercial.

ABSTRACT

Chrysanthemum 'Harman' in Texcoco is affected by several pests and diseases that diminish its production. In the area, the irrational use of agrochemicals has led to the emergence of resistant pests and diseases as well as loss of the natural biological control and created environmental problems and human health. In order to provide alternatives for controlling pests and diseases, and improve the quality of cut flower, the follow treatments were evaluated: honey 2% (H), nitrogen + humic acids (N + HA), *S. cerevisiae* (SC) and control (C) under a randomized complete block experimental design with three replications. Additionally, in treatments H, N + HA and SC was applied plant extracts (on the foliage), *Beauveria bassiana* and *Trichoderma harzianum* (on the soil). Control treatment consisted of conventional crop management in which the pesticide application is done weekly. Treatments H, N + HA, SC and C were similar for the control of pests and diseases, however, the benefit/charge relationship in treatment N + HA was \$ 0.84 of net profit, while treatments H, SC and C were \$ 0.56, 0.66 and 0.14, respectively. Added to this, the proposed treatments enhanced the quality of cut flowers, are of low environmental impact, harmless to the producer and easily accessible.

Keywords: *Dendranthema grandiflorum*, biorational control, benefit/charge relationship, commercial quality.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las regiones oriente y sur del Estado de México son las más importantes en la producción de ornamentales, el municipio de Texcoco ocupa el segundo lugar de importancia como productor de ornamentales después de Villa Guerrero en el Estado de México. La floricultura es una actividad importante para la obtención de recursos económicos de numerosas familias (Cárdenas, 1994).

El crisantemo *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. es una especie ornamental para maceta y flor de corte con alta demanda en el mercado (Enríquez *et al.*, 2005). Sin embargo, una limitante en su producción son los problemas fitosanitarios ocasionados por diversos artrópodos plaga y microorganismos fitopatógenos, reportados a nivel mundial en las diferentes etapas fenológicas del cultivo, afectando botones florales, meristemo apical, hojas, botones, base de tallos y raíces (Albouy, 2000; Aranda, 2002; Huerta y Chavarín, 2002; Martínez *et al.*, 2004; Ortega, 2002; Romero, 1996; Tlapal y Mendoza, 2002). En investigaciones realizadas en la zona de Texcoco, se han encontrado como problemas importantes en crisantemo a los áfidos (Homoptera: Aphididae), mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae), minadores (Diptera: Agromycidae) y trips (Thysanoptera: Thripidae), siendo esta última la de mayor importancia debido a los daños directos que ocasiona debido a su alimentación así como por ser vector de los virus *Tomato spotted wilt virus* e *Impatiens necrotic spot virus* (Ochoa *et al.*, 1999). En cuanto a enfermedades, la marchitez por *Verticillium albo-atrum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia* sp. y *Phytophthora* sp. causa daños y pérdidas económicas considerables (Tlapal y Mendoza, 2002). El estudio de la diversidad de microorganismos en suelos ha adquirido importancia debido a que contribuye al

éxito de cultivos agrícolas en forma orgánica y sustentable, así como el manejo de algunas enfermedades de plantas causadas por hongos que habitan el suelo (Mazzola, 2004).

Recientemente, en algunos invernaderos de Tequexquihuac, Texcoco, Estado de México, se ha observado una mancha foliar que en casos extremos cubre más del 70% de la superficie de la hoja, demeritando la calidad de la flor cortada sin que se conozca el agente causal.

El manejo integrado, desde un punto de vista ecológico, acentúa como primer fundamento, un diagnóstico correcto del problema fitosanitario, así como conocer las condiciones de suelo, el material vegetal y el ambiente, como herramienta para que el agricultor o asistente técnico pueda seleccionar las estrategias y tácticas de manejo apropiadas (Bustamante y Rivas, 1999). El combate de plagas y enfermedades exitoso debe incluir un esquema integrado, en el cual se utilicen productos de bajo impacto ambiental que además sean inocuos para el productor. Huerta (2000) reporta que en la región de Texcoco el uso de plaguicidas sintéticos es generalizado y los conocimientos técnicos del floricultor sobre estos insumos son insuficientes lo que acarrea un problema de uso irracional y no hay interés por buscar alternativas al control químico. Desafortunadamente, cada vez la resistencia de los patógenos y los insectos hacia los plaguicidas inorgánicos que se utilizan para su control es más evidente por lo que se requiere generar estrategias y tácticas de manejo que sustituyan o complementen el uso de agroquímicos convencionales (Van Emdem, 1977). En la búsqueda de alternativas para el manejo de plagas agrícolas se ha propiciado la consideración de compuestos de origen vegetal, por ser un recurso renovable, disponible y de fácil

procesamiento (Gioanetto y Cerna, 2000). Además de protección al cultivo, disminuyen los riesgos de contaminación e intoxicaciones (Lagunes, 1994).

Otro factor importante en un manejo integrado, es la nutrición del cultivo, que influye no sólo en el crecimiento y desarrollo de la planta, sino que además afecta la predisposición o severidad de plagas y enfermedades. La fertilización influye en la resistencia, antibiosis y tolerancia (Painter, 1951).

El manejo convencional del cultivo de crisantemo en la región florícola de Texcoco hace un uso indiscriminado de agroquímicos sintéticos ocasionando la aparición de plagas y enfermedades resistentes, además de que se ha roto el control biológico natural y generado problemas ambientales y de salud humana (Huerta, 2000). Por esta razón, existe una clara necesidad de desarrollar nuevas alternativas bioracionales que contribuyan a mejorar la calidad del cultivo. Díaz *et al.* (2005) propusieron el uso de insecticidas bioracionales y mezclas de hongos a base de *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii* y *Metarhizium anisopliae*, debido a que fueron tan efectivos como los agroquímicos sobre *Bactericera cockerelli*. Ramírez *et al.* (2006) encontraron que la aplicación de miel no afecta el movimiento del *Tomato spotted wilt virus* en plantas infectadas de jitomate pero sí disminuye su concentración. Gouvea *et al.* (2009) reportaron que las aplicaciones de *Saccharomyces cerevisiae* obtenida de levadura comercial redujo la incidencia de *Botrytis cinerea* en la postcosecha de frutos de fresa.

Se conocen ejemplos exitosos del uso de productos bioracionales en el manejo de plagas y enfermedades, sin embargo, un factor importante es la calidad comercial, un punto importante sería conocer el efecto de dichos productos en el cultivo de crisantemo para flor de corte. Por ejemplo, mediante un análisis de tejido vegetal

es posible determinar la concentración mineral de las plantas como un indicador de su situación nutricional, la cual está asociada al rendimiento y mejores características del producto cosechado (Sánchez *et al.*, 2009).

En la búsqueda de alternativas de manejo del crisantemo en la región florícola de Texcoco donde además de identificar y controlar los principales problemas parasitológicos se considere disminuir los daños al medio ambiente y mejorar la calidad de producción se planteó el presente trabajo con el objetivo de evaluar el efecto de microorganismos de control biológico, extractos vegetales y productos bioracionales en la incidencia de las principales plagas y enfermedades; el diámetro y color de inflorescencia, altura y diámetro de tallo, el contenido de macro y micronutrientes, peso de biomasa seca por planta y determinación indirecta del contenido de clorofila del crisantemo *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. 'Harman'.

LITERATURA CITADA

- Albouy, J. 2000. Enfermedades producidas por virus de las plantas ornamentales. Mundi-Prensa. México. 479 p.
- Aranda O., S. 2002. Enfermedades bacterianas en ornamentales. *In*: Manejo Fitosanitario en Ornamentales. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México, 156 p.
- Bustamante, E. y Rivas, P.G. 1999. Elementos e importancia del diagnóstico de problemas fitosanitarios. *Revista Manejo Integrado de Plagas*. (52): 1-15.
- Cárdenas A, M.R.1994. Las enfermedades causadas por virus en ornamentales en México y alternativas de solución. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 1:124-129.
- Díaz G., O., Tejeda M., E. I. y Avalos A., L. 2005. Efecto de insecticidas biorracionales y mezclas de hongos sobre *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Homoptera: Psyllidae). *Entomología México* 5: 539–541.
- Enríquez V., J. R., Velásquez, T.B., Vallejo, F.A. R. y Velasco, V.V.A. 2005. Nutrición de plantas de *Dendranthema grandiflora* obtenidas *in vitro* durante su aclimatación en invernadero. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 28(4): 377-383.
- Gioanetto, F. y Cerna, E. 2000. Desarrollo actual de las investigaciones alelopáticas y de la producción de insecticidas botánicos en Michoacán (México). En: Memorias de VI simposio nacional sobre sustancias vegetales y minerales en el combate de plagas. Rodríguez H., C. (ed.). Acapulco, Gro. México.

- Gouvea, A., Kuhn O., J., Mazaro, S. M., Mio L., L. M., Deschamps, C., Biasi, L. A. and Fonseca, V. C. 2009. Control of leaf and flower diseases and postharvest quality of strawberry plants treated with *Saccharomyces cerevisiae*. *Horticultura Brasileira* 27:527-533
- Huerta P., R. A. 2000. Diagnóstico agroecológico del cultivo de crisantemo en Texcoco, México y propuesta de manejo para el control de plagas. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México. 170 p.
- Huerta P., R.A. y Chavarín P., J.C. 2002. Trips y minadores: identificación, biología y control. *In: Manejo fitosanitario de ornamentales*. Colegio de Postgraduados. México. pp.55-64.
- Lagunes T., A y Villanueva J., J. A. 1999. Toxicología y manejo de insecticidas. Colegio de Postgraduados. México. pp.103-113.
- Martínez F., R.T., Jacas M., J.A. y Ripollés J., L. 2004 La araña roja, *Tetranychus urticae*: métodos de muestreo y umbrales económicos de tratamiento en clementinos. *Phytoma España: Revista Profesional de Sanidad Vegetal*, 164: 53-58.
- Mazzola, M. 2004. Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. *Annual Review of Phytopathology* 42:35–59.
- Ochoa M., D.L., Zavaleta M., E., Mora A., G. and Johansen N., R.M. 1999. Implications of weed composition and thrips species for the epidemiology of tomato spotted wilt in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*). *Plant Pathology* 48:707-717.

- Ortega A., L.D. 2002. Moscas blancas en ornamentales. *In*: Manejo fitosanitario de ornamentales. Colegio de Postgraduados. México. pp. 41-52.
- Painter, R. H. 1951. Insect resistance in crop plants. Lawrence, KS: University of Kansas Press. 520 p.
- Ramírez F., J., Ochoa M., D. L., Rodríguez M., M. N. y Mora A., G. 2006. Efecto del ácido acetil salicílico, miel y melaza en la movilidad y concentración de TSWV. Revista Chapingo. Serie Horticultura 12 (2): 239-243.
- Romero M., A. 1996. Plagas y enfermedades de ornamentales. Universidad Autónoma. Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural. Chapingo, México. pp. 75-94.
- Sánchez G., P., Molinos S., C., Alcántar G., G. y Sandoval V., M. 2009. Diagnóstico nutrimental en plantas. En: Nutrición de cultivos. Mundi-Prensa. México. pp. 201-247
- Tlapal B., B. y Mendoza Z., C. 2002. Enfermedades de origen fungoso en ornamentales. En: Manejo fitosanitario de ornamentales. Colegio de Postgraduados. México. pp. 97-116.
- Van Emden, H. F. 1977. Control de plagas y su ecología. Ed. Omega, S.A. Barcelona, España. 65 p.

CAPÍTULO 1. PLAGAS Y ENFERMEDADES DEL CULTIVO DE CRISANTEMO *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. 'Harman' EN TEQUEXQUINAHUAC, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

1.1 RESUMEN

El cultivo de crisantemo 'Harman' en la región de Texcoco se ve afectado por diversas plagas que demeritan su producción, con el objetivo de conocer cuales están asociadas al cultivo, se analizaron las condiciones físico químico y biológicas del suelo tomando una muestra en las camas de transplante; los insectos plaga y ácaros se colectaron para su identificación, trips y minadores mediante trampas amarillas cilíndricas que contenían agua más detergente, moscas blancas y ácaros del envés de las hojas de plantas infestadas con la ayuda de un pincel; para los patógenos asociados con marchitez y mancha foliar se aplicaron los postulados de Koch, y la técnica serológica DAS- ELISA para los virus asociados en plantas sintomáticas. El suelo presentó características aceptables para el crecimiento y desarrollo del cultivo; los hongos presentes en el mismo fueron: *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium oxysporum* y *Fusarium* sp. y oomycetos pertenecientes a la familia Pythiaceae. Se tuvo la presencia de las especies de trips *Frankliniella occidentalis*, *F. dubia* y *F. brunnenses*; de minador *Liriomyza huidobrensis*; de mosquita blanca *Trialeurodes vaporariorum* y del ácaro *Tetranychus urticae*. Se determinó que *Fusarium* sp. y *Fusarium oxysporum* son los patógenos causales de la marchitez del crisantemo. La mancha foliar es causada por una bacteria fitopatógena Gram negativa de color

blanco cremoso, elevada con bordes enteros. El virus asociado al crisantemo 'Harman' fue TSWV.

Palabras clave: trips, minador, mosca blanca, ácaros, TSWV.

1.2 ABSTRACT

Chrysanthemum 'Harman' in Texcoco is affected by several pests and diseases that diminish its production. In order to know which are present in the crop, the physical, chemical and biological conditions of the soil were determined by taking a sample in transplant plots; thrips and leafminers were collected for identification in yellow water traps plus detergent, whiteflies and mites were taken from the underside of the infested leaves with a fine brush; for pathogens associated with wilt and leaf spot were applied Koch's postulates, and serological technique DAS-ELISA on plants showing symptoms in order to know the virus associated. The soil had characteristics acceptable for crop growth and development and the fungi present in it were: *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium oxysporum* and *Fusarium* sp. and oomycetes belonging to the family Pythiaceae. Identified thrips species were *Frankliniella occidentalis*, *F. dubia* and *F. brunnenses*; leafminer *Liriomyza huidobrensis*; whitefly *Trialeurodes vaporariorum* and mite *Tetranychus urticae*. It was determined that *Fusarium* sp. and *Fusarium oxysporum* are the causal agents of chrysanthemum wilt. Leaf spot is caused by a plant pathogenic bacteria, gram negative, forming colonies of creamy white color, high with entire margins. The virus associated with chrysanthemum 'Harman' was TSWV.

Keywords: thrips, leafminer, whitefly, mites, TSWV.

1.3 INTRODUCCIÓN

El crisantemo *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. es una especie ornamental para maceta y flor de corte con alta demanda en el mercado (Enríquez *et al.*, 2005). Sin embargo, una limitante en su producción son los problemas fitosanitarios ocasionados por diversas plagas reportadas a nivel mundial en las diferentes etapas fenológicas del cultivo, afectando botones florales, meristemo apical, hojas, botones, base de tallos y raíces (Albouy, 2000; Aranda, 2002; Huerta y Chavarín, 2002; Martínez *et al.*, 2004; Ortega, 2002; Romero, 1996; Tlapal y Mendoza, 2002). En investigaciones realizadas en la zona de Texcoco, se reportaron como problemas importantes en crisantemo a los áfidos (Homoptera: Aphididae), mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae), minadores (Diptera: Agromycidae) y trips (Thysanoptera: Thripidae), siendo esta última la de mayor importancia debido a los daños directos que ocasiona por su alimentación e indirectamente por ser vector de los virus *Tomato spotted wilt virus* e *Impatiens necrotic spot virus* (Ochoa *et al.*, 1999). Respecto a enfermedades, la marchitez por *Verticillium albo-atrum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia* sp. y *Phytium* sp. causan daños y pérdidas económicas considerables (Tlapal y Mendoza, 2002). El estudio de la diversidad de microorganismos en suelos ha adquirido importancia debido a que contribuye al éxito de cultivos agrícolas en forma orgánica y sustentable, así como el manejo de algunas enfermedades de plantas causadas por hongos que habitan el suelo (Mazzola, 2004).

Recientemente, en algunos invernaderos de Tequexquahuac, Texcoco, Estado de México, se observó una mancha foliar que en casos extremos cubre más del 70% de la superficie de la hoja, demeritando la calidad de la flor cortada sin que se conozca el agente causal.

El manejo integrado, acentúa como primer fundamento, un diagnóstico correcto del problema fitosanitario, así como conocer las condiciones de suelo, el material vegetal y el ambiente, como herramienta para que el agricultor o asistente técnico pueda seleccionar las estrategias y tácticas de manejo apropiadas (Bustamante y Rivas, 1999). Con base en lo anterior, se planteó la presente investigación con los siguientes

1.4 OBJETIVOS

1. Conocer las características fisicoquímicas del suelo e identificar a los hongos y oomicetos presentes.
2. Identificar las especies de trips, mosquita blanca, minador y ácaros asociados al cultivo de crisantemo.
3. Determinar la etiología de la marchitez del crisantemo.
4. Conocer al agente asociado a la mancha foliar del crisantemo.
5. Conocer los virus asociados al crisantemo y su distribución espacial en invernadero.

1.5 REVISIÓN DE LITERATURA

1.5.1 Generalidades del cultivo

1.5.1.1. Origen e importancia

El crisantemo es una planta originaria de Asia oriental cuyo valor ornamental es apreciado por la diversidad de formas y colores de sus flores (Dole y Wilkins, 2005). Se cultiva como ornamental desde hace más de dos mil años. Su nombre deriva del griego y significa “flor dorada”. Fue introducido en Europa a través de Francia en el último tercio del siglo XVIII. Los primeros cultivos en España se establecieron a inicio del siglo XIX. El crisantemo que actualmente cultivan los floricultores es un híbrido complejo y la mayoría de las especies de donde se han generado los cultivares actuales son originarias de China como: *Chrysanthemum indicum*, *Chrysanthemum morifolium* y *Chrysanthemum x hortorum*. En la actualidad, aparece bajo la denominación *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam (Dole y Wilkins, 2005; IAPT, 2010). En México, el cultivo de crisantemo reviste gran importancia dentro de la floricultura como flor de corte, al ocupar el tercer lugar de las especies más demandadas después de las rosas y los claveles. En nuestro país durante 2009 se reportaron 2,376.75 ha sembradas, con una producción de 10,910,425.00 t que alcanzaron un valor de 1,426,395.12 de miles de pesos siendo el principal productor el estado de México (Anuario Estadístico de la Producción Agrícola, 2010).

1.5.1.2. Taxonomía y morfología

De acuerdo con el IAPT (2010), la clasificación taxonómica del crisantemo es la siguiente: phylum Magnoliophyta; clase Magnoliopsida; orden Asterales; familia Asteraceae; género *Dendranthema* y especie *D. grandiflorum* (Ramat.) Kitam.

Las flores de crisantemo se agrupan en inflorescencias distintivas de la familia *Asteraceae* llamadas capítulos. Se caracterizan por que el eje floral es corto, ensanchado y dilatado que recibe el nombre de receptáculo, cuya periferia está cubierta de bráctaceas de color verde llamadas en conjunto involucro, la parte superior puede ser plana, cóncava, cónica y sobre ella están las flores sésiles o subsésiles, muy próximas entre sí (González *et al.*, 2007). Estos capítulos son considerados vulgarmente como flores sencillas, aunque en realidad están compuestos por numerosas florecillas. Sobre el receptáculo puede haber un solo tipo o dos de flores: flores liguladas en la periferia y tubulares en el centro. Las flores en el interior del capítulo también se llaman flosculares y son las estructuras fértiles de la planta envueltas por pétalos soldados a la base que forman una corola tubular (González *et al.*, 2007).

La forma de la inflorescencia que comprende los crisantemos polares, son similares a los pompones pues se componen principalmente de flores radiales, las hileras exteriores son más largas que las centrales, dando a la inflorescencia una forma plana e irregular, siendo de tamaño intermedio y grande (González *et al.*, 2007).

1.5.2 Plagas del crisantemo

Los problemas fitosanitarios ocurren cada año en las diversas etapas fenológicas del crisantemo siendo las más comunes: minadores de hoja (*Liriomyza trifolii*, *L. huidobrensis*, *L. brassicae*, *L. languei*), gusano soldado (*Spodoptera exigua*, *S. littoralis*), pulgones (*Macrosiphoniella chrysantemi*, *M. sanborni*, *Macrosiphum rosae*, *Rhopalosiphon rufomaculatus*, *Aphis fabae*, *A. gossypii*, *Myzus persicae*, *Brachycaudus hilichrysi*), trips (*Thrips tabaci* y *Frankliniella occidentalis*), mosquita blanca (*Trialeurodes vaporariorum* y *Bemisia tabaci*), araña roja (*Tetranychus urticae*) (García, 1981; Parrella, 1987; Arbos, 1992; Cortés *et al.*, 1996; Romero, 1996; Alcántara, 1998).

El cultivo también es afectado por enfermedades destacan: moho gris (*Botrytis cinerea*), pudrición de las lígulas (*Ascochyta chrysanthemi*), ahogamiento (*Pythium spp*, *Rhizoctonia spp*, *Verticillium albo-atrum* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*), mancha foliar (*Alternaria sp.*), roya café (*Puccinia tanacetii*), tizón foliar (*Septoria chrysantemella*) y roya blanca (*Puccinia horiana*) (Romero, 1996; Tlapal y Mendoza, 2002). Esta última es de mayor impacto ya que los daños que causa en el follaje reducen la producción y calidad comercial (Agrios, 2005). En el caso de las bacterias, Aranda (2002) reportó *Erwinia chysanthemi*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Pseudomonas cichorii* como importantes en este cultivo.

1.5.2.1. Trips

García (1981) reportó para México a *Frankliniella fortissima* como plaga principal del crisantemo y posteriormente se ha determinado la presencia de más de 15 especies asociadas a este cultivo (Huerta y Chavarín, 2002).

En Villa Guerrero, estado de México, se encontraron las siguientes 16 especies de trips asociadas al crisantemo 'Polaris': *Frankliniella adusta*, *F. aurea*, *F. borinquen*, *F. helianthi*, *F. inutilis*, *F. minuta*, *F. simplex*, *F. celata*, *F. brunnescens*, *F. dubia*, *F. occidentalis* y *Thrips tabaci*. De éstas, las dos últimas de particular importancia por ser vectoras de los tospovirus *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) y *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (Ochoa, 1994).

1.5.2.1.1. Descripción y biología

Los trips pertenecen al orden *Thysanoptera* y se caracterizan por ser de tamaño pequeño, cuerpo cilíndrico con una longitud de 0.1 a 0.2 cm, aunque hay especies que llegan a medir de 0.4 a 0.5 cm, de color café amarillento pálido a negro. Los adultos se caracterizan por poseer dos pares de alas membranosas, delgadas y con un fleco de sedas en los márgenes. Tienen antenas cortas de seis a nueve segmentos y tarsos de uno o dos segmentos. El aparato bucal es succionador, asimétrico y de forma cónica (Borrór *et al.*, 1989; Huerta y Chavarín, 2002).

Son insectos de metamorfosis incompleta o paurometábola, es decir, pasa por los estados de huevo, ninfa y adulto. El estado ninfal consta de cuatro instares, cada uno recibe el nombre de 1^{er} instar ninfal o primera larva; 2^o instar ninfal o segunda larva; 3^{er} instar ninfal o prepupa y 4^o instar ninfal o pupa. Algunas especies presentan cinco instares ninfales, denominando pupa uno y pupa dos, respectivamente (Huerta y Chavarín, 2002).

1.5.2.1.2. Daños

Los trips provocan daños a hojas y flores cuando empiezan a abrir los capullos florales. Los sitios atacados presentan manchas blanquecinas decoloradas de

forma irregular. La presencia de trips en los cultivos, al igual que la de los ácaros, se favorece por condiciones de humedad baja y temperaturas altas (Alcántara, 1998).

1.5.2.2. Mosquita blanca

La importancia de esta plaga radica en sus dos maneras de afectar los cultivos: directa, al succionar la savia, e indirecta, al ser vector de virus, además la excreción de sustancias azucaradas sobre las cuales se desarrollan hongos (Ortega, 2002). Las mosquitas blancas son plagas polífagas que además de especies ornamentales, atacan hortalizas, cultivos básicos y frutales.

1.5.2.2.1. Descripción y biología

Las mosquitas blancas son insectos chupadores, presentan metamorfosis incompleta, es decir, su ciclo biológico incluye: huevecillo, cuatro estadios ninfales y adulto. El ciclo de vida de huevecillo a adulto puede completarse en dos a tres semanas en climas calientes, puede requerir hasta dos meses en climas fríos. Presentan de 11 a 15 generaciones por año, con reproducción sexual, aunque puede presentar reproducción asexual (partenogénesis) (Ortega, 2002).

1.5.2.2.2. Daños

Causan daño directo por la succión de nutrimentos de la planta, principalmente aminoácidos y azúcares. Ocasionan generalmente un amarillamiento de las plantas, las cuales detienen su crecimiento e incluso pueden llegar a morir cuando la población del insecto es alta (Ortega, 2002). Un daño adicional es la secreción de mielecilla, la cual es producto del metabolismo de éste, que permite la

proliferación de hongos conocidos como fumagina u hollín. Estos hongos interfieren con la fotosíntesis en consecuencia se reduce el vigor de la planta El daño más importante es cuando actúan como vectores de virus, del cual se sabe son capaces de transmitir más de 30 especies (Ortega, 2002).

1.5.2.3. Minadores

Spencer (1987) reporta que alrededor de 150 cultivos vegetales son afectados por minadores de la hoja y que en Norteamérica las especies más dañinas son *Liriomyza huidobrensis*, *L. sativae* y *L. trifolii*. Estas especies son polífagas y entre las plantas hortícolas más atacadas están el tomate, calabaza, lechuga, frijol y apio; mientras que entre las ornamentales se encuentran el áster, crisantemo y gipsofila.

1.5.2.3.1. Descripción y biología

La larva del minador es vermiforme, más o menos cilíndrica con la región cefálica adelgazada, en la cual presenta un par de ganchos bucales esclerosados con dos a cuatro dientes; es de color blanco cremoso o amarillento, completamente desarrollada mide de 4 a 5 mm y no tienen apéndices locomotores; los espiráculos protorácicos son distintivos y se localizan en la parte dorsal del protórax (Borrór *et al.*, 1989; Huerta y Chavarín, 2002).

Los minadores son insectos de metamorfosis completa u holometábola y por tanto pasa por los estados de huevo, larva, pupa y adulto (Borrór *et al.*, 1989).

1.5.2.3.2. Daño

El agromizido *L.huidobrensis* se reportó por primera vez en Brasil por Blanchard en 1926. Se considera como una especie cosmopolita, importante en la producción ornamental en varias partes del mundo. Los minadores son difíciles de controlar una vez que se establecieron dentro de los invernaderos.

Las galerías que las larvas producen en las hojas afectan la capacidad fotosintética de la planta y reduce el valor comercial del cultivo (He *et al.*, 2002; Reitz y Trumble, 2002).

1.5.2.4. Araña roja

Los floricultores de la zona de Texcoco señalan que la araña roja es de las plagas principales que afectan al cultivo de crisantemo (Martínez *et al.*, 2004). *T. urticae* es una especie polífaga, tiene una lista larga de plantas hospederas que incluyen hortalizas, frutales y ornamentales como crisantemo, clavel y rosal. Su naturaleza fitófaga con potencial reproductivo alto y ciclo de vida corto facilita el desarrollo rápido de resistencia a los acaricidas muchas veces después de pocas aplicaciones. Se reporta resistencia de *T. urticae* a diversos acaricidas como los organofosforados, compuestos orgánicos de estaño, hexitiazol, clofentezina, fenpiroximato y abamectina (Sato *et al.*, 2005)

1.5.2.4.1. Descripción y biología

A *T. urticae* se le denomina comúnmente ácaro de dos manchas porque presenta dos zonas oscurecidas en ambos lados del cuerpo, la hembra de forma redondeada y el macho es de menor tamaño de forma alargada. El huevo es esférico e incoloro, aunque poco a poco adquiere un color blancuzco. Las ninfas

son semejantes al adulto en forma y color. Su ciclo de vida tiene una duración de 15 días a una temperatura de 25 °C y a medida que aumenta la temperatura disminuye su duración. El crecimiento de sus poblaciones se favorece por la temperatura alta y humedad relativa baja (Otero, 2002).

1.5.2.3.2. Daño

Elabora una espesa telaraña que sirve de protección a los huevos y estadios jóvenes del ataque de depredadores, además de retener la humedad que transpira la hoja con lo que la temperatura se mantiene constante, creando un ambiente especial que favorece su desarrollo (Otero, 2002). Este ácaro vive en colonias, el ataque se da mediante la punción de las células vegetales del envés de las hojas principalmente en el estrato inferior de la planta, la sintomatología inicial se manifiesta por puntos amarillos en la base de las hojas a los lados de la nervadura central, al incrementarse la infestación las áreas amarillas aparecen en toda la hoja y posteriormente cambian a un color rojizo en el haz (Anaya *et al.*, 1992).

1.5.2.5. Tomato spotted wilt virus (TSWV) e Impatiens necrotic spot virus (INSV)

El TSWV es el agente causal de la enfermedad denominada “bronceado del tomate”, descrita por primera vez en Australia en 1915 (Smith, 1975). Es un virus cuya gama de hospedantes es extensa ya que es capaz de infectar a unas 500 especies diferentes pertenecen a más de 50 familias (Albouy, 2000).

El INSV durante cierto tiempo fue considerado como una variante del TSWV (denominada TSWV I). El INSV infecta a un gran número de especies florales

mientras que el TSWV se encuentra principalmente en hortalizas y ornamentales (Albouy, 2000).

El TSWV es la especie tipo del género *Tospovirus*, tiene partículas esféricas con diámetro de 80-110 nm y presenta envoltura, forma inclusiones citoplasmáticas y su genoma es multipartita constituido de tres moléculas de RNA de cadena simple. La cápside está integrada por varias proteínas. El TSWV y el INSV son transmisibles mecánicamente y pueden ser detectados por indexación biológica en plantas indicadoras así como por técnicas serológicas utilizando anticuerpos específicos para cada virus (Albouy, 2000).

Las infecciones causadas por el TSWV son un problema grave en Estados Unidos, Canadá y Europa a consecuencia del desarrollo explosivo, tanto en campo como en el invernadero, de *Frankliniella occidentalis*, principal vector del virus (Albouy, 2000; Alford, 1995). Cárdenas (1994) reportó la presencia del TSWV atacando cultivos de crisantemo, principalmente en las variedades Polaris e Indianápolis ocasionado pérdidas de hasta un 80% en un ciclo de cultivo.

La forma de reducir las infecciones causadas por este virus es la utilización de tratamientos específicos con insecticidas, el uso de trampas pegajosas de impacto y la protección del invernadero con mallas finas. Otra medida de manejo es la producción de plantas libres de virus (Cárdenas, 1994; Albouy, 2000).

Rosello *et al.*, (1994) indican que la planta infectada con TSWV presenta manchas cloróticas y necrosis foliar, bronceado, anillos, patrón de líneas y necrosis en tallos, además se desarrolla menos de lo normal y manifiesta una precoz desecación de las hojas.

1.5.2.6. Tomato aspermy virus (TAV)

El TAV pertenece al género *Cucumovirus*, posee una partícula isométrica de 25-30 nm de diámetro, de una sola cadena de RNA (Hollings y Stone, 1971; Albouy, 2000). Puede infectar gravemente al crisantemo, ocasionando cambios de coloración de la flor, enanismo y distorsión; sin embargo, los síntomas pueden no presentarse en el mismo año de la infección (Pinto, 1983; Albouy, 2000).

El TAV infecta a más de 100 especies de 24 familias de dicotiledóneas y a tres familias de monocotiledóneas. Albouy (2000), reportó a las ornamentales como susceptibles al TAV, al crisantemo, ciclamen y petunia. Sin embargo, la mayoría de los cultivares establecidos actualmente de manera comercial no muestran síntomas en las hojas, ni pérdidas de vigor (Hollings y Stone, 1971).

El TAV se transmite por 10 especies de áfidos, pero existen diferencias entre variantes. El virus puede ser adquirido en 15 segundos e inoculado en menos de un minuto, no hay periodo de latencia y es retenido por el vector de 30 minutos hasta una hora (Hollings y Stone, 1971).

1.5.2.7. Marchitez del crisantemo

La marchitez en crisantemo, no por estrés hídrico, puede ocurrir por deficiencia de nutrimentos y por daño ocasionado por bacterias, hongos y TSWV. Entre los hongos que pueden inducir marchitamiento en crisantemo se encuentran *Verticillium albo-atrum*, el cual produce dos tipos de síntomas: en casos severos, ocurre un marchitamiento general de las plantas infectadas y llegan a morir antes de que las yemas florales abran; en otros casos, la marchitez se manifiesta sólo en áreas intervenales de las hojas inferiores las cuales por lo común cambian se tornan color verde amarillento y después a café.

Diversas especies del género *Pythium* pueden estar involucradas en la marchitez; en este caso, los primeros síntomas se manifiestan como una pudrición café obscura húmeda de la base del tallo. Las plantas infectadas se marchitan y colapsan durante el día y se recuperan por la noche. Además, las raíces infectadas se pudren rápidamente y, en el tallo, a nivel del suelo, se forman lesiones de color café rojizo. *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* ocasiona síntomas que pueden confundirse con los provocados por *Pythium* sp., deficiencias nutricionales o exceso de agua. Sin embargo, los primeros síntomas ocasionados por fusarium consisten en una clorosis o amarillamiento de una o más hojas de un solo lado del tallo acompañada de cierta flacidez. Con el tiempo, la clorosis foliar se generaliza y finalmente la planta se marchita y muere. *Phytophthora cryptogea*, por su parte, penetra en la base del tallo y causa lesiones color café oscuro que se extienden en forma horizontal y vertical que afectan una

gran parte del tallo y raíz, ocasionando que la planta se marchite y muera en casos extremos (Tlapal y Mendoza, 2002)

1.5.2.8. Bacterias

Las bacterias causan importantes pérdidas a la agricultura mundial al ocasionar enfermedades devastadoras, cuando se presentan las condiciones ambientales adecuadas. Entre los géneros de bacterias de importancia agrícola se encuentran *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* (Aranda, 2002).

Pseudomonas cichorii causa lesiones de color café a negro, en crisantemo afecta las hojas bajas y viejas, sin embargo, también puede afectar hojas altas y flores en plantas maduras. Las manchas pueden ser circulares a elípticas al principio y después incrementar su tamaño formando aéreas necróticas irregulares; bajo ciertas condiciones de humedad, los síntomas pueden desarrollarse a lo largo del margen del limbo. Las condiciones de humedad son más importantes que la temperatura (Aranda, 2002).

1.5.3. El suelo y su relación con el manejo del cultivo de crisantemo

Las prácticas de manejo del suelo en crisantemo alteran parámetros fisicoquímicos del mismo como la temperatura, la humedad, la aireación, el estado de óxido-reducción, el contenido y composición de los gases del espacio poroso y el pH. Estos cambios pueden afectar negativamente el crecimiento de las plantas e indirectamente la microflora, la cual contribuye a mejorar ciertos factores del suelo tales como la estructura, disponibilidad y reciclamiento de nutrimentos, degradación de residuos orgánicos frescos, formación y degradación de humus y

actividad supresiva de propágulos de patógenos o plagas (Ramírez, 1996). Por ello, es importante un diagnóstico de la fertilidad del suelo, permitiendo identificar problemas de carácter nutrimental y no nutrimental, que pudiesen afectar el crecimiento y desarrollo de un cultivo (Etchevers y Padilla, 2009).

El diagnóstico correcto de los problemas fitosanitarios es una etapa importante en el manejo integrado de plagas; esto requiere de la identificación del agente causal. En la actualidad existen diversas metodologías que permiten agilizar la identificación y reconocimiento de un patógeno en el área de campo o laboratorio (Putnam, 1995; Shurtleff y Averre, 1997). No todos los patógenos producen síntomas definidos en sus hospedantes, por lo cual en muchas circunstancias, las enfermedades pasan inadvertidas o son difíciles de evidenciar. En consecuencia, es posible que el daño económico o las pérdidas originadas por el patógeno, no sean percibidas, y en muchos casos éstas sean atribuidas a factores culturales o ambientales, especialmente, si no se disponen de técnicas de diagnóstico que vayan más allá de un simple reconocimiento en el campo o en muchos casos de una observación al microscopio (None, 1991; Putnam, 1995).

En el caso de artrópodos y ácaros, el estudio comparativo de las estructuras que presentan en diferentes estadios, es importante para la correcta identificación de una plaga. En este caso, las claves taxonómicas son de uso rutinario para el estudio completo de estos organismos (Coto, 1998).

1.6. MATERIALES Y MÉTODOS

1.6.1. Localización del área de estudio

La presente investigación se realizó en una sección de invernadero en producción comercial de crisantemo (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. 'Harman' ubicado en Tequexquihuac, municipio de Texcoco, Estado de México ubicado a 19° 28' 37.65" de latitud norte y 98 ° 49' 36.45 " de longitud oeste a 2480 m de altitud.

1.6.2. Muestreo de suelo

Con el propósito de conocer las características físicoquímicas del suelo y los hongos y oomicetos donde se estableció el experimento, se tomó una muestra compuesta de tres camas de siembra consistente en una mezcla de porciones de suelo (submuestras) tomadas al azar a una profundidad de 25 cm realizando un recorrido en zig-zag (Figura 1).

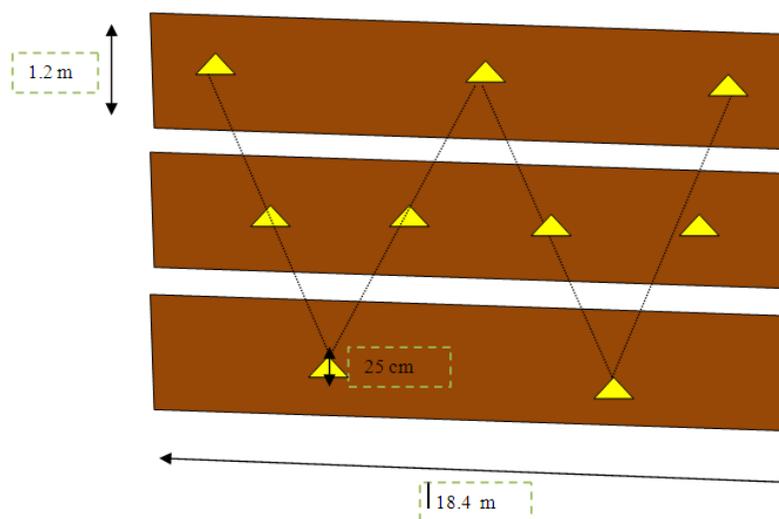


Figura 1. . Disposición espacial de los puntos de toma de submuestras en camas

de siembra. ▲ Puntos de muestreo Recorrido

La muestra compuesta obtenida de 1.5 kg fue dividida en dos porciones, la primera fue enviada al Laboratorio Central Universitario de la Universidad Autónoma Chapingo para realizar el análisis físico químico del suelo y la parte restante se utilizó para conocer las poblaciones de hongos y oomicetos y la cantidad de unidades formadoras de colonia de éstos.

1.6.3. Análisis de hongos y oomicetos

Previo al establecimiento del cultivo de crisantemo se realizó un análisis para conocer a los hongos y oomicetos presentes en el suelo. Para el crecimiento de hongos se utilizó el medio de Steiner y Watson (1965) hecho a base de papa-dextrosa-agar (PDA) y surfactante (Penetrex-F®) (Anexo I). Las cajas se mantuvieron a una temperatura de 25 a 30 °C. La evaluación de unidades formadoras de colonias (ufc) se realizó mediante la técnica de dilución seriada (1×10^{-3}) y conteo en 10 cajas de Petri con medio de cultivo respectivo (Klement *et al.*, 1990). El número de colonias se registró a los 10 días y para su identificación se utilizó la clave para la clasificación de hongos mitospóricos, anamórficos o imperfectos de Barnett y Hunter (1998) y las claves de Snyder y Hansen (1940).

Para el crecimiento de oomicetos presentes se utilizó el medio de cultivo selectivo PARPH (Erwin y Ribeiro, 1996) (Anexo I). Las cajas se mantuvieron en obscuridad a una temperatura de 25 a 30 °C. El número de colonias se registró a las 72 h en 10 cajas de Petri.

1.6.4. Colecta de trips y minador

Para conocer las especies de trips y minador asociados al crisantemo 'Harman', de abril a mayo de 2010 se colocaron tres trampas amarillas cilíndricas que contenían agua con detergente líquido, en el centro de cada una de las camas de siembra durante el primer mes del ciclo del cultivo. Semanalmente se colectaron los insectos de la trampa con la ayuda de un pincel y se introducían en frascos de vidrio con alcohol al 70 % para su traslado al laboratorio.

1.6.4.1. Identificación de trips

Los trips colectados se deshidrataron en alcohol al 80 % por 10 min., alcohol al 96 % por 10 min. y xileno por 5 min. (este último ayuda a aclarar el insecto). Al término de la deshidratación, en un porta objetos se colocó al insecto en posición ventral en una gota de aceite de clavo y se acomodó de manera que las alas, patas y antenas quedaran extendidas con ayuda de agujas entomológicas. Una vez acomodado el insecto, se cubrió con un cubreobjetos y se observó en el microscopio compuesto (se observaron un total de 60 especímenes). La identificación de los trips fue realizada por el Dr. Roberto Miguel Johansen Naime, investigador del Instituto de Biología de la UNAM.

1.6.4.2. Identificación de minador

En este caso se realizó la observación directa al microscopio estereoscópico de los insectos adultos colectados en las trampas de agua sin un proceso de deshidratación o montaje. Se utilizaron las características morfológicas reportadas por Bautista (2006).

1.6.5. Colecta e identificación de mosca blanca

Para conocer las moscas blancas asociadas al crisantemo 'Harman', de abril a mayo de 2010, se colectaron pupas sin emerger o ninfas del 4º instar del envés de las hojas de plantas infestadas con la ayuda de un pincel y se colocaron en una ampollita de vidrio que contenía KOH 10 % durante 24 h para disolver su interior. Para facilitar la salida del contenido disuelto de las pupas y ninfas, al término de este tiempo se realizó una pequeña incisión lateral en cada uno de los ejemplares. Se decantó el KOH y se agregaron unas gotas de ácido acético glacial a la ampollita incubando durante 15 min. para eliminar los residuos del interior de los insectos así como los cristales de KOH. Una vez transcurrido este tiempo, se decantó el ácido acético glacial y se adicionaron unas gotas de xilol. La ampollita se calentó en baño María a 60 °C por 10 min. Después se decantó el líquido y se lavaron los ejemplares agregando gotas de ácido acético glacial. Se colocaron unas gotas de fucsina ácida sobre los insectos en la cual permanecieron por 10 min. Nuevamente se lavaron los ejemplares con ácido acético glacial y se decantó el sobrenadante. A continuación se adicionaron unas gotas de aceite de clavo para deshidratar y aclarar los ejemplares.

Finalmente, se montaron los ejemplares en bálsamo de Canadá y se identificaron siguiendo las claves para ninfas de 4º instar (Ortega *et al.*, 2002) (Anexo II).

1.6.6. Colecta e identificación de ácaros

Para conocer los ácaros asociadas al crisantemo 'Harman', de abril a mayo de 2010, se colectaron del envés de las hojas inferiores con un pincel de cerdas finas y se depositaron en una ampollita de vidrio que contenía ácido láctico al 70 %

para su traslado al laboratorio. Los ácaros permanecieron por 48 h en el ácido láctico para aclarar su cuerpo. Después de este tiempo, en un portaobjetos se colocó una gota de medio de montaje Hoyer y en ella se sumergió un ácaro procurando que las hembras quedaran de manera dorsal y los machos de manera lateral y enseguida se colocó un cubreobjetos de 5.5 X 5.5 mm. Se calentó la preparación sobre una plancha con la finalidad de eliminar las burbujas de aire y algunos deshechos internos del ácaro. Una vez lista la preparación, se dejó secar el medio de montaje en una estufa a 40 °C por 8 días. Al término de este tiempo, se selló la preparación con barniz de uñas transparente, se ubicó al ejemplar y se indicó su posición con un círculo de tinta indeleble marcado sobre el cubreobjetos. Finalmente, del lado izquierdo de la preparación se escribió el orden, familia, género y especie, mientras que del lado derecho se anotó el lugar, cultivo, fecha y nombre del colector. Los ácaros fueron identificados por el Dr. Gabriel Otero Colina, Profesor Investigador Titular del Colegio de Postgraduados utilizando la clave taxonómica de Tuttle *et al.* (1976) (Anexo II).

1.6.7. Etiología de la marchitez del crisantemo cv. 'Harman'

Se colectaron plantas de crisantemo de un mes de edad que mostraban flacidez en las hojas y necrosis en la base del tallo que avanzaba hasta la mitad del mismo ocasionando su muerte. Las plantas con síntomas se colocaron en bolsas de polietileno y se trasladaron al laboratorio donde se hicieron cortes transversales del tallo en el sitio de avance de la necrosis. El tejido se desinfectó por inmersión en hipoclorito de sodio al 3% durante cinco minutos, después se lavaron dos veces con agua destilada estéril por cinco minutos y finalmente se colocaron sobre

un papel absorbente estéril para su secado y posterior colocación en cajas de Petri conteniendo medio de cultivo papa-dextrosa-agar (Booth, 1988). Las cajas se mantuvieron a temperatura ambiente y luz natural para obtener colonias puras mediante cultivos monospóricos. Una vez separadas las colonias de hongos, se procedió a su identificación de acuerdo a sus características morfológicas con las claves de Snyder y Hansen (1940) (Anexo II) y PCR con los iniciadores universales ITS's.

1.6.7.1. Identificación de hongos por PCR

1.6.7.1.1. Extracción de DNA

Se extrajo DNA de las colonias puras de hongos cultivadas en las cajas de Petri con PDA siguiendo el método de AP (Sambrook y Russell, 2001)(Anexo III).

1.6.7.1.2. Amplificación de las secuencias intergénicas ribosomales (ITS)

Se realizó PCR amplificando las regiones internas ubicadas en los genes ribosomales (rDNA) de los hongos localizadas entre la subunidad pequeña 18S-5.8S y la subunidad larga 5.8S-28S, utilizando los iniciadores ITS 4 (5'TCCTCCGCTTATTTGATATGC3')/ITS5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3') (White *et al.*, 1990) sintetizados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT-UNAM). La mezcla de reacción utilizada fue la siguiente: 2.5 µL de amortiguador de reacción 10X, 1.0 µL MgCl₂ 50 mM, 0.5 µL de dNTP's 10 mM, 2.0 µL de iniciador ITS4 y 2.0 µL de iniciador ITS5 ambos a 10 pmoles/ µL, 0.5 µL de Taq DNApol (5U/µL), 5 µL de DNA y 11.5 µL de agua inyectable para tener un volumen final de 25 µL.

Para la amplificación se utilizó un termociclador Techne®, modelo TC-512 con una temperatura de desnaturalización inicial de 94 °C por 4 minutos, seguido por 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto para la desnaturalización, 55 °C por 1 minuto para la hibridación y 72 °C por 1 min para la extensión y un último ciclo de 72 °C por 7 minutos para la extensión final.

1.6.7.1.3. Electroforesis de los productos de PCR

El fraccionamiento de los productos derivados de la PCR se llevó a cabo en un gel de agarosa (ultrapure Agarosa, Invitrogen ®) al 1 %. Se pesaron 0.3 g de agarosa y se agregaron a 30 mL de buffer TBE 1X, la mezcla se calentó en horno de microondas para disolverla y, una vez fría, se adicionó 1 µL de bromuro de etidio. El gel solidificado se colocó en una cámara de electroforesis que contenía amortiguador de corrida TBE 1X. Se mezclaron 3 µL de buffer de carga naranja G (colorante 0.25 % + glicerol 30 %) con 5 µL de producto de PCR y se colocaron en los pozos del gel. Como referencia se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder Promega®). La electroforesis se realizó a 30 V por 10 min. y posteriormente a 90 V por 30 min.

Una vez observado el producto de amplificación esperado, se procedió a su limpieza con el producto Wizard® SV Gel and PCR Clean- Up System, después de lo cual para su secuenciación en el IBT-UNAM.

1.6.7.3. Pruebas de patogenicidad

De colonias puras de hongos cultivados en PDA que tenían 10 días de edad, se preparó una suspensión con una concentración de 1×10^7 conidios/ mL de agua con la cual se inocularon plantas de crisantemo 'Harman' de 8 días después del

trasplante. Se establecieron cuatro tratamientos con cinco repeticiones: T1) *Fusarium* sp., T2) *Fusarium oxysporum*, T3) *Fusarium* sp.+ *Fusarium oxysporum* y T4) testigo (agua estéril). En todos los tratamientos, se realizaron cortes transversales en la raíz y heridas longitudinales en la base del tallo de las plantas con una navaja estéril y después fueron sumergidas en un vaso de precipitado estéril de 250 mL de capacidad que contenía 100 mL de la suspensión de conidios en la cual permanecieron durante 24 h. En el caso del testigo, las plantas fueron heridas de la manera antes indicada y sumergidas en agua destilada estéril. Después de la inoculación, las plantas se colocaron en recipientes de unicel de 250 mL de capacidad que contenían suelo estéril.

Las plantas de todos los tratamientos se mantuvieron en una cámara de ambiente controlado a una temperatura de 30 °C y humedad relativa de 55 %, manteniendo el suelo saturado permanentemente con agua corriente durante 30 días. Diario se registró la manifestación y desarrollo de síntomas de marchitez en las plantas.

Para el cálculo del porcentaje de incidencia se utilizó la fórmula siguiente:

$$\% \text{ de } I = n/N (100)$$

Donde:

I: Incidencia de la enfermedad expresada en porcentaje

n :número de plantas enfermas al momento de la evaluación

N: número total de plantas evaluadas al momento de la evaluación

1.6.8. Agente asociado a la mancha foliar

Se colectaron hojas de plantas de crisantemo 'Harman' de tres meses de edad que mostraban manchas necróticas rodeadas de un halo clorótico. El tejido foliar se colocó en bolsas de polietileno para su traslado al laboratorio.

Se cortaron secciones de la lámina foliar que mostraban necrosis y se colocaron en hipoclorito de sodio al 3% durante cinco minutos y después se lavaron dos veces con agua destilada estéril por cinco minutos. Los trozos de lámina foliar se colocaron sobre un papel absorbente estéril para su secado y posterior maceración en un mortero estéril. El extracto resultante se tomó con un asa bacteriológica y se procedió al rayado del medio de cultivo PDA contenido en cajas de Petri. Las cajas se mantuvieron a temperatura ambiente y a luz natural. A las 24 h se observó el crecimiento de bacterias por lo que se procedió a purificar las dos colonias obtenidas para continuar con las pruebas de patogenicidad.

1.6.8.1. Pruebas de patogenicidad

Con la colonia de bacteria aislada de hojas de crisantemo con mancha foliar se realizaron las pruebas de reacción a KOH, pudrición en papa, hipersensibilidad en tabaco e inoculación en el hospedante, como se indica a continuación:

En un portaobjetos limpio se colocó una gota de KOH 10 % y con ayuda de un asa bacteriológica se tomó una porción de la colonia pura de 48 h de edad y se mezcló con el KOH para observar la posible formación de un fluido viscoso entre la gota del portaobjetos y el asa al ser levantada de dicha gota.

Para la prueba de pudrición de papa se colocó una rodaja de papa sobre papel absorbente estéril dentro de una caja de Petri también estéril y se realizaron dos cortes transversales con una navaja estéril. En una de las heridas se colocaron tres asadas tomadas de las cajas de Petri de cada una de las dos colonias de bacterias aisladas y en la otra lesión se puso agua destilada estéril como testigo.

Para la prueba de hipersensibilidad en tabaco se preparó una suspensión bacteriana a una concentración de 1×10^7 ufc mL^{-1} de agua. Para realizar esta prueba se utilizaron hojas de una planta de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Se dividió la lámina foliar en dos partes, en un lado se inyectaron 0.5 mL de la suspensión bacteriana de manera subepidermal con una jeringa estéril para insulina de 1 mL, mientras que en el otro se inyectó agua destilada estéril como testigo. Una vez realizadas las inyecciones, se procedió a señalar con un marcador de tinta indeleble la zona que había sido infiltrada para facilitar las observaciones. Las hojas inyectadas se revisaron cada tercer día durante 15 días para observar alguna necrosis en la zona infiltrada.

Para realizar la inoculación en el hospedante se utilizaron plantas de crisantemo 'Harman' de 20 días de edad. Se preparó una suspensión bacteriana a una concentración de 1×10^7 ufc mL^{-1} de agua para inocular a las plantas considerando los siguientes tratamientos: 1) plantas inoculadas con bacteria sin cubrir con bolsa de polietileno (SC), 2) plantas inyectadas con agua sin cubrir con bolsa de polietileno (TS), 3) plantas inoculadas con bacteria cubiertas con bolsa de polietileno (CC) y 4) plantas inyectadas con agua cubiertas con bolsa de

polietileno (TC). La inoculación de las plantas se hizo de la misma forma que en el caso de la prueba de hipersensibilidad en tabaco. En todos los tratamientos se tuvo una planta inoculada en cuatro hojas (repeticiones) y se mantuvieron en una cámara de ambiente controlado a una temperatura promedio de 28 °C y una humedad relativa del 50 %. Las plantas fueron revisadas cada tercer día durante un mes para registrar la aparición de necrosis en las hojas inoculadas con bacteria. Una vez que se observaron zonas necróticas en las hojas inoculadas, se aisló e incrementó la bacteria en cajas de Petri con medio B de King (KB) (King *et al.*, 1954) para repetir las pruebas de KOH 10%, hipersensibilidad en tabaco y pudrición de papa. En todos los casos las cajas se incubaron a temperatura de 25 a 30 °C y se utilizaron colonias de 48 h de edad.

1.6.9. Virus asociados al crisantemo

Se colectaron hojas de plantas con síntomas putativos a virus consistentes en clorosis, patrones en líneas, manchas cloróticas y necrosis longitudinal en tallo. El tejido colectado se colocó de manera individual en bolsas de plástico para su traslado al laboratorio.

Las muestras se sometieron a la prueba de DAS-ELISA (Clark y Adams (1977) modificado por Sutula (1993) para el *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) y *Tomato aspermy virus* (TAV) (Anexo IV). Las lecturas de las placas se realizaron en un lector Thermo scientific® modelo Multiskan FC.

Las muestras que se consideraron como positivas cuando los valores de densidad óptica a 405 nm, fue mayor o igual a tres veces la media del testigo negativo.

1.7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.7.1. Análisis fisicoquímico del suelo

Con base en los resultados del análisis fisicoquímico del suelo (Cuadro 1) y el manual de interpretación elaborado por Castellanos *et al.* (2000) los elementos P, Fe, Cu, Zn, Mn y B se encontraron en un nivel alto o muy alto, mientras que el K, Ca y Mg se encuentran en un nivel medio a moderadamente alto. El N, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-021-RECNAT-2000) (SEMARNAT, 2000), se encuentra en un nivel bajo.

Cuadro 1. Características fisicoquímicas del suelo de Tequexquihuac, Texcoco, Estado de México, donde se estableció crisantemo *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. 'Harman'

pH	CE dSm mg ⁻¹	MO %	Dap tm ⁻³	Arena	Limo	Arcilla	Textura	CC %	PMP %
6.45	0.64	5.78	1.19	54.2	31.9	13.9	Franco arenoso	29.60	17.55
N mgKg ⁻¹	P mg Kg ⁻¹	K mg Kg ⁻¹	Ca mg Kg ⁻¹	Mg mg Kg ⁻¹	Fe mg Kg ⁻¹	Cu mg Kg ⁻¹	Zn mg Kg ⁻¹	Mn mg Kg ⁻¹	B mg Kg ⁻¹
16.7	434.4	430	3496	598	48.88	2.51	9.64	6.23	1.91

CE= conductividad eléctrica, MO= materia orgánica, CC= capacidad de campo, PMP=punto de marchitez permanente, Dap= densidad aparente.

Arbos (1992) señala que el crisantemo requiere de un suelo con buen drenaje y pH ligeramente ácido (6.5 aproximadamente). La conductividad eléctrica (CE) del suelo indica la cantidad de sales presentes. Los iones generalmente asociados

con salinidad son Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , H^+ (cationes) y NO_3^- , SO_4^{2-} , Cl^- , HCO_3^- , CO_3^{2-} , H_2PO_4^- y OH^- (aniones).

De acuerdo a la guía para la evaluación de la calidad y salud del suelo del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 1998), los valores de CE menores de 0.8 dS m^{-1} son aceptables para el crecimiento de los cultivos en general. El valor de la muestra de suelo en estudio fue de 0.64 dS m^{-1} , lo que indica un suelo no salino.

Los requerimientos de nitrógeno y potasio del crisantemo son altos. El mantenimiento de estos niveles de nitrógeno durante las siete semanas de crecimiento es de importancia para lograr una adecuada calidad de flor (Kofranek, 1988). El productor de crisantemo complementa la fertilización del suelo con fertilizantes foliares para proveer los nutrimentos que requiere el cultivo y con ello la posibilidad de incrementar la productividad y calidad de las cosechas.

Con base en el manual de interpretación de Castellanos *et al.* (2000) la materia orgánica (5.78 %) se ubicó en un nivel rico o muy rico para un suelo franco arenoso. La concentración y disponibilidad de nutrimentos (carbohidratos en sustancias de lignocelulosa, quitina, lípidos, etc.) en la materia orgánica es importante para la actividad supresora de los suelos (Cohen, *et al.* 1998).

1.7.2. Análisis de hongos y oomycetos

Se encontraron cuatro hongos (Figura 2) en la muestra de suelo y con base en los cálculos realizados, se estableció que se encontraban 30,000 ufc g⁻¹ de suelo de *Penicillium* sp., 5,000 ufc g⁻¹ de suelo de *Fusarium oxysporum*, 3,000 ufc g⁻¹ de suelo de *Fusarium* sp. y 1,000 ufc g⁻¹ de suelo de *Aspergillus* sp.

Burgues (1960) determinó las especies de hongos aisladas del suelo, cifrándolas en un total de 617, de las cuales más del 50 % estaban encuadradas en los siguientes géneros (ordenados según su contenido de mayor a menor número de especies): *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Achlya*, *Mortierella*, *Pythium*, *Saprolegnia*, *Monosporium* y *Chaetomiun*. Los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con los de Burgues (1960) ya que el género *Penicillium* se encontró en mayor proporción (77 %), seguido de *Fusarium* con sus dos especies (21 %) y *Aspergillus* (2%).

Las poblaciones de hongos que se encuentran en el suelo pueden ser benéficas o deletéreas afectando el desarrollo de las plantas. *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp., viven como saprófitos en el suelo y agua donde contribuyen a la descomposición y reciclado de la materia orgánica (Ulacio *et al.* 2002). *Fusarium oxysporum* está reportada como patógeno del suelo causante de marchitez en diversas especies ornamentales (Tlapal y Mendoza, 2002).

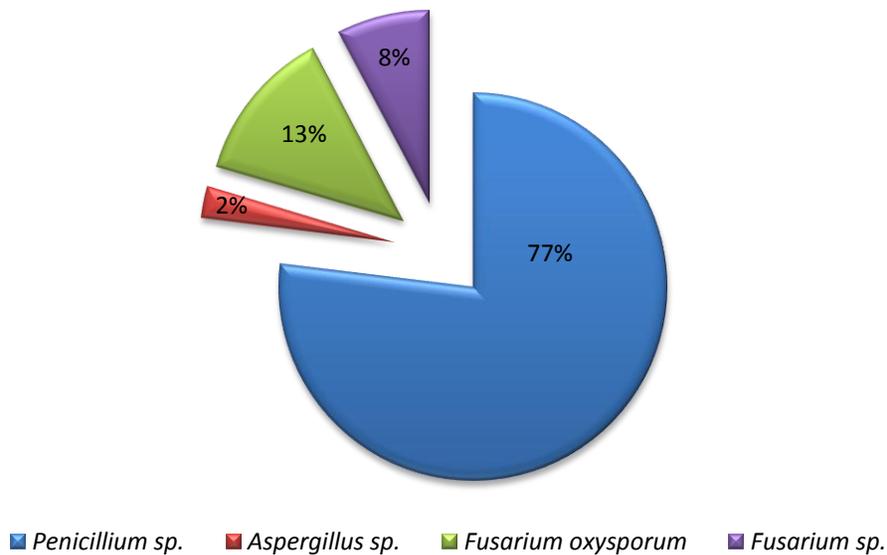


Figura 2. Hongos encontrados en el suelo donde se estableció crisantemo *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. 'Harman', Tequexquinahuac, Texcoco, estado de México.

Martyn (2004) indica que en campo, las poblaciones de *F. oxysporum* f. sp. *niveum* pueden alcanzar niveles de 400 a 1,800 ufc g⁻¹ de suelo, lo cual puede causar el 100 % de plantas marchitas en cultivares susceptibles de sandía 'Sugar baby' establecidas en suelos con bajo contenido de humedad, alto contenido en nitrógeno y ligeramente ácidos (pH 5.0 - 5.5).

Oddino *et al.* (2004), evaluaron el potencial de inóculo de *Fusarium solani* y su incidencia de la podredumbre parda de la raíz de cacahuate, encontrando que con un inóculo de 168 ufc g⁻¹ de suelo se presenta una incidencia del 5 % de la enfermedad en la población, mientras que un inóculo de 456 ufc g⁻¹ puede

ocasionar una incidencia de 94.7 %, con lo que aparentemente existe una relación directa entre estas dos variables. Los niveles de inóculo encontrados en el presente estudio son altos comparados con lo reportado por Oddino *et al.* (2004) y Martyn (2004) para *Fusarium solani* y *F. oxysporum* f. sp. niveum, respectivamente, por lo cual podría esperarse una alta incidencia de marchitez asociada a *F. oxysporum* en crisantemo. Sin embargo, es posible que el pH del suelo donde se estableció el presente estudio (6.45) así como su bajo contenido de nitrógeno (Cuadro 1) no sean los requeridos para el desarrollo de la enfermedad de acuerdo con lo señalado por Martyn (2004).

En el análisis realizado en medio selectivo para oomicetos pertenecientes a la familia Pythiaceae, se encontraron 79 ufc g⁻¹ de suelo. Rodríguez *et al.* (1998) reportaron densidades de población de *Pythium* spp. entre 0.9 y 14.1 ufc g⁻¹ de suelo, en catorce suelos agrícolas y cuatro forestales. Molina *et al.* (2007) observaron hasta 200 ufc g⁻¹ de una especie del género *Pythium* de la zona de chinampas de Xochimilco. Sin embargo, no hubo evidencia de que este aislamiento fuese causante de alguna enfermedad.

Burgues (1960) indica que para considerar a determinado organismo habitante del suelo como un patógeno, es necesario considerar aspectos ecológicos de la microbiota fúngica del suelo y la influencia de algunas prácticas agrícolas en el equilibrio microbiano edáfico, por lo que no puede establecerse un nivel de unidades formadoras de colonias como indicador de incidencia de enfermedad.

1.7.3. Identificación de trips

Las especies de trips encontradas en el presente trabajo pertenecen al género *Frankliniella*, el cual se caracteriza por la presencia de alas anteriores con dos hileras de sedas completas, antenas de ocho segmentos, seda ocelar I presente y ctenidia en el tergito VIII situada anterolateralmente al espiráculo (Figura 3).

Dentro de los primeros registros de la especie *Frankliniella occidentalis* Pergande, en 1966 en Estado Unidos en el cultivo de *Chrysanthemum x moriflorum* Ramat. (crisantemo), en 1971 en *Cannabis sativa* L. (marihuana) y en *Saintpaulia ionantha* Wendl. (violetas africanas) en 1973 (Kirk y Terry, 2003). Johansen y Guzmán (1999) señalan que la especie se encuentra en ecosistemas naturales así como en agroecosistemas en América del Norte incluyendo México.

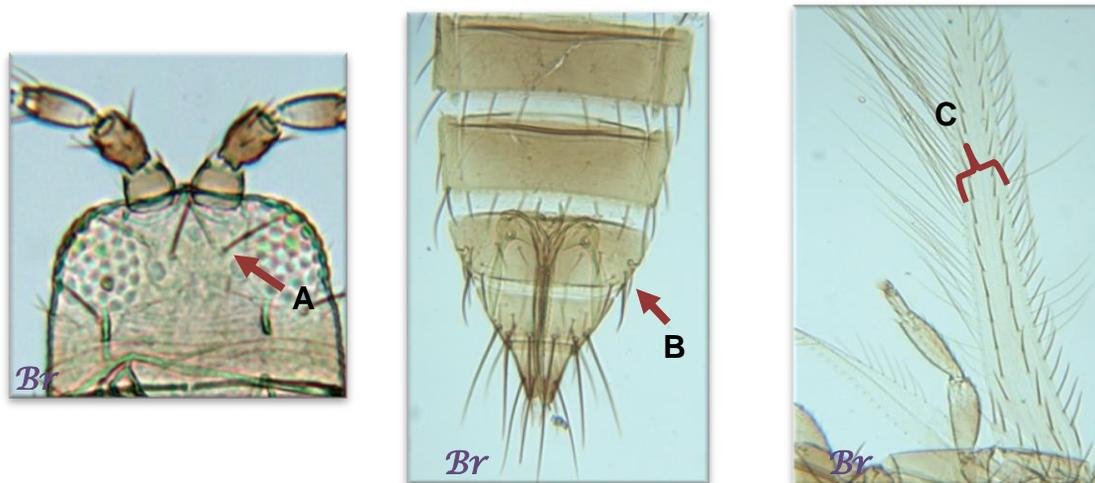


Figura 3. Características morfológicas del género *Frankliniella* sp. citadas por Huerta y Chavarín (2002). A; seda ocelar I presente, B; ctenidia en el tergito VIII, C; alas anteriores con dos hileras de sedas completas.

Se encontraron tres especies de trips asociadas al crisantemo 'Harman' cultivado en invernadero en Tequexquinahuac: *Frankliniella brunnescens* Priesner , *F. dubia* Moulten y *F. occidentalis* Pergande (Figura 4). Esta última, es la especie con mayor número de ejemplares y la más eficiente vectora del TSWV. Las cantidades de especies contrastan con los reportados por Ochoa *et al.* (1996), los cuales encontraron a las especies *Frankliniella adadusta*, *F. aurea*, *F. helianthi*, *F. inutilis*, *F. minuta*, *F. simplex celata*, *F. brunnescens*, *F. dubia*, *F. occidentalis* y *Thrips tabaci*, y cinco que describen como nuevas, asociadas al crisantemo 'Polar' en el municipio de Villa Guerrero y 26 malezas, de las cuales 16 fueron positivas para el TSWV. Esta diferencia puede deberse a que los sitios de colecta, el hospedante, las condiciones ambientales, las plantas silvestres y época de colecta fueron diferentes. No obstante, los datos obtenidos en la presente investigación sirven de indicativo de las especies asociadas en crisantemo 'Harman' en la zona.

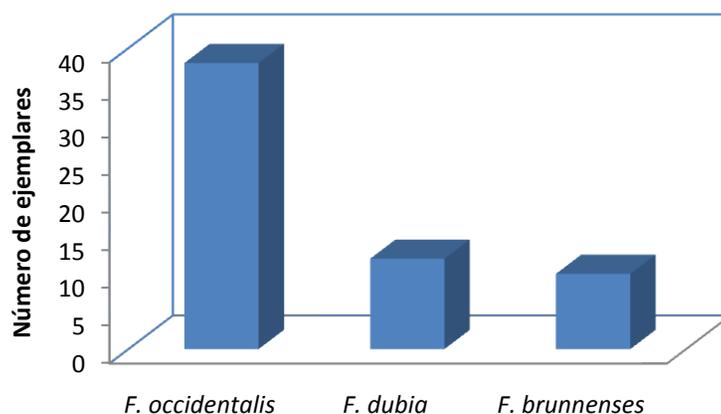


Figura 4. Especies de trips identificadas asociadas al crisantemo 'Harman' cultivado en invernadero. Tequexquinahuac, Texcoco, estado de México, 2010.

Groves *et al.* (2002) señalan que la presencia de vectores cerca de los cultivos ocasionan una alta incidencia de virosis que las arvenses albergan, como es el caso de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), en el que estas plantas sirven como reservorio y fuente de alimento de sus vectores, que son los trips, especialmente *Frankliniella occidentalis*. En el presente estudio, las camas de siembra donde se colectaron los ejemplares y de los cuales la especie más frecuente es vectora de TSWV, se mantuvieron libres de malezas, sin embargo, no se descarta la entrada de trips de zonas adyacentes, a través de las corrientes de aire cuando se levanta el plástico del invernadero para su ventilación.

1.7.4. Identificación de minador

Se identificó a la especie *Liriomyza huidobrensis* Blanchard. Bautista (2006) señala que los adultos generalmente presentan cinco bandas transversales oscuras en el dorso del abdomen, vibrisas orales presentes y cerdas postverticales divergentes. Asimismo, señala a esta especie atacando ornamentales y hortalizas en el Valle de México.

Echevarría *et al.* (1994) mencionan que *L. huidobrensis* fue detectada por vez primera en Europa, específicamente en el Reino Unido sobre chiles importados de Estados Unidos en 1980, después en crisantemos de Perú y Colombia en 1981 y 1986, respectivamente, y en Francia fue detectada sobre cultivos florales importados de Holanda en 1989.

1.7.5. Identificación de mosca blanca

Se identificó a *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Figura 5) asociada al cultivo de crisantemo 'Harman', coincidiendo con lo reportado por Carapia (2004) y Ortega (2002) como plaga de crisantemo en México.



Figura 5. Ninfa de *Trialeurodes vaporariorum* colectada en crisantemo 'Harman' Tequexquinahuac, Texcoco, estado de México. **A**; orificio vasiforme cordado, **B**; vista del área marginal.

T. vaporariorum se caracteriza por presentar orificio vasiforme cordado y papilas submarginales de forma cónica; área entre las papilas submarginales y el margen con una distancia aproximada menos de una vez el ancho de las papilas, sin líneas irregulares estrechas (Carapia, 2004) (Figura 8).

1.7.6. Identificación de ácaros

Se identificó a la especie *Tetranychus urticae* Koch (Figura 6) comúnmente conocida como el ácaro de dos manchas perteneciente a la familia Tetranychidae. Las descripciones taxonómicas, basadas en especímenes adultos (hembras y machos) de la especie en estudio, la cual Otero (2002) reporta como la especie más importante en ornamentales, particularmente en crisantemo.

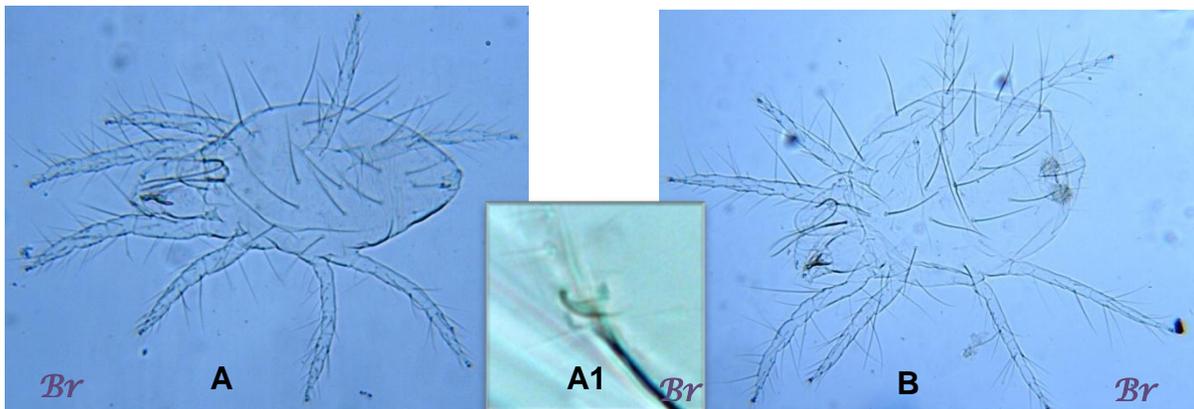


Figura 6. Adultos de *Tetranychus urticae* colectados en crisantemo 'Harman' Tequexquinahuac, Texcoco, estado de México. **A:** macho, **A1:** edeago, **B:** hembra.

Las características más distintivas de la especie son: la hembra presenta ornamentación del dorso del histerosoma con aspecto de un diamante entre las sedas dorsocentrales 3 y 4; el macho posee un edeago con una curvatura hacia el dorso (Otero, 2002) (Figura 9 A1).

En campo, ambos sexos se observaron de color verde claro a verde amarillento, con dos manchas dorsolaterales en el histerosoma, de color verde intenso a negruzcas. Estos artrópodos se localizan preferiblemente en el envés de hojas maduras y jóvenes así como en los brotes foliares, formando con frecuencia telaraña.

1.7.7. Etiología de la marchitez

De las plantas de crisantemo 'Harman' de un mes de edad con síntomas de marchitez colectadas en invernadero, se aislaron dos hongos, las cuales formaron colonias redondas, la primera de color violeta con abundante presencia de microconidios, macroconidios alargados y clamidosporas, la segunda de color blanco cremoso con presencia de microconidios y macroconidios alargados (Figura 7).

Booth (1988) indica que las colonias de *Fusarium oxysporum* presentan un color violeta a púrpura con abundantes microconidios y menor cantidad de macroconidios, clamidosporas laterales e intercalares, características que coinciden con las observadas en la colonia color violeta del presente estudio.

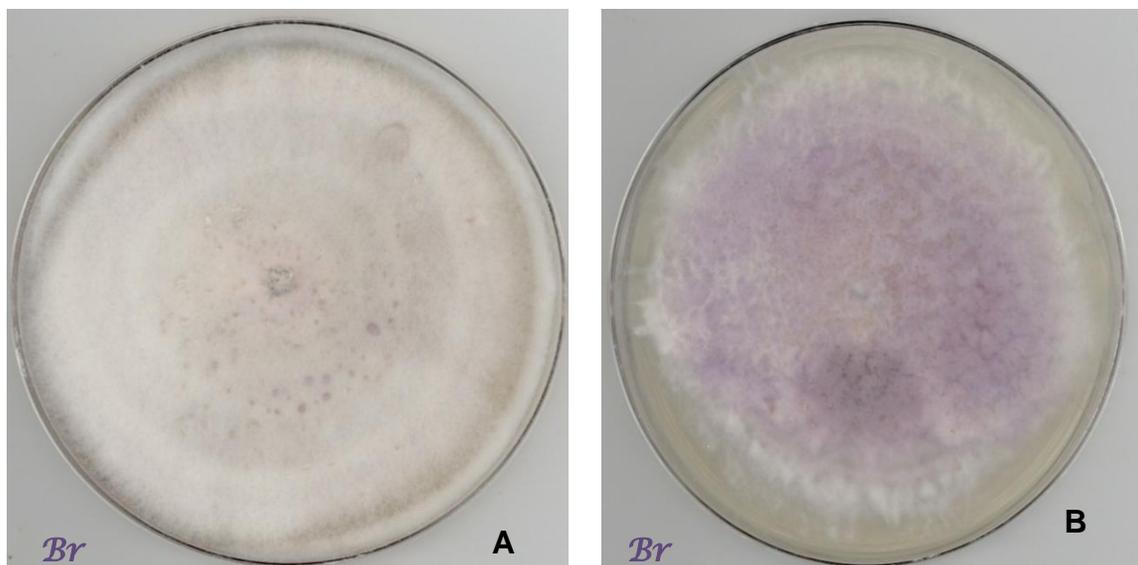


Figura 7. Hongos aislados de plantas de crisantemo 'Harman' de un mes de edad con síntomas de marchitez. **A:** colonia color blanco cremoso y **B:** colonia color violeta en medio PDA obtenidas a partir de cultivos monospóricos.

Smith *et al.* (1992) mencionan que *F. oxysporum* es en primer lugar y predominantemente, un saprófito abundante y activo en el suelo y materia orgánica. Además, algunas cepas tienen una actividad patogénica específica, las cuales constituyen sólo una porción pequeña de la población total del suelo a pesar de lo cual causan enfermedades importantes en los cultivos. Ciertas cepas están poco especializadas y causan muerte de plántulas, necrosis o podredumbres; sin embargo, las especies causantes de marchitez son las más importantes.

La colonia color blanco cremoso corresponde al género *Fusarium* de acuerdo a las claves de Snyder y Hansen (1940), misma que durante su crecimiento en PDA no formó clamidosporas.

Horst y Nelson (1997) señalan que los síntomas causados por *Fusarium oxysporum* consisten en un severo achaparramiento, seguido por la muerte de la planta, síntomas que no coinciden con los observados en plantas de crisantemo 'Harman' en invernadero. En este último caso, los síntomas iniciales consistieron en una marchitez de la planta, necrosis alrededor de la base del tallo y raíz, además las hojas permanecieron adheridas al tallo hasta la muerte de la planta. Estas alteraciones son debidas a que el micelio y los conidios invaden los tejidos vasculares, llegando a bloquear físicamente la translocación de agua produciendo marchitez, aunado a la presencia de toxinas que afectan la permeabilidad de las membranas celulares que a su vez afectan el metabolismo de la planta (Romero, 1996; Herrera y Ulloa, 1998).

1.7.7.1. Identificación de hongos por PCR

De ambas colonias se obtuvo un producto de amplificación de 500 pb con los iniciadores universales para hongos de las regiones internas ubicadas en los genes ribosomales localizadas entre la subunidad pequeña 18S-5.8S y la subunidad larga 5.8S-28S (Figura 8). Las secuencias amplificadas obtenidas del DNA de los dos cultivos monospóricos de los hongos aislados de crisantemo 'Harman' fueron depositados en el GenBank® del NCBI. Estas secuencias fueron comparadas con las existentes dando como resultado *Fusarium* sp. (colonia color

blanco cremoso) y *Fusarium oxysporum* (colonia color violeta) con números de acceso JF300167 Y JF300166, con un porcentaje de identidad de 98 y 97 %, respectivamente.

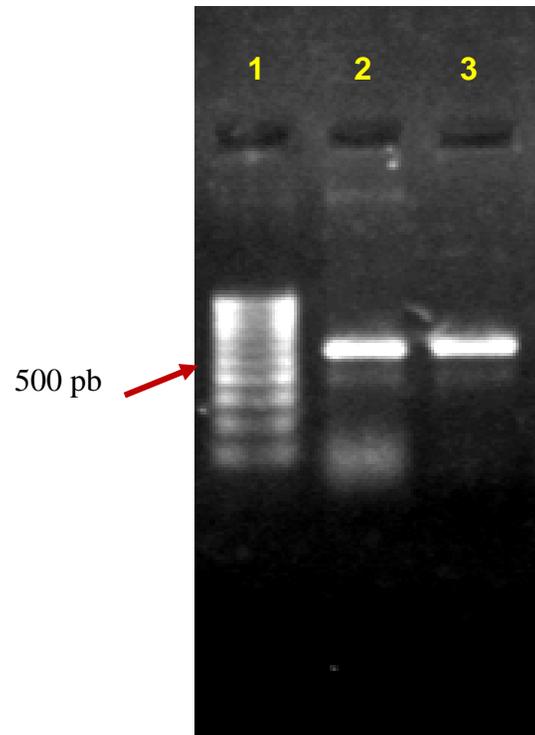


Figura 8. Producto de PCR obtenido a partir del DNA de hongos aislados de plantas de crisantemo ‘Harman’ con síntomas de marchitez, utilizando los iniciadores ITS4/ITS5 universales para hongos. Carril 1; marcador de peso molecular de 100 pb; Carril 2: colonia color violeta (*Fusarium oxysporum*); Carril 3: colonia color blanco cremoso (*Fusarium* sp.).

Tlapal y Mendoza (2002) mencionan a *Verticillium* sp., *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora drechsleri* y *P. cryptogea* en plantas ornamentales como patógenos causantes de marchitez

y pudrición de la raíz. Rodríguez *et al.* (2000) determinaron que los hongos asociados con la pudrición de raíz y corona de gerbera (*Gerbera jamesonii*) fueron *P. drechsleri*, *Fusarium oxysporium* y *Rhizoctonia solani*. Por su parte, García *et al.* (2003) reportaron a *Fusarium* sp. y *Mucor* sp. como los hongos asociados con la marchitez del crisantemo 'Polaris' en Villa Guerrero, Estado de México, siendo este último diferente de los identificados en esta investigación.

1.7.7.2. Pruebas de patogenicidad

Se observaron síntomas de marchitez, necrosamiento de tallo y de raíz a los ocho días después de la inoculación (ddi) en los tratamientos *Fusarium oxysporum* (T2) y *Fusarium* sp. + *Fusarium oxysporum* (T3). La incidencia fue mayor en el tratamiento T3 (40 %) que en el tratamiento T2 (20 %). En el tratamiento *Fusarium* sp. (T1) se presentaron síntomas de marchitez y necrosamiento hasta los 13 ddi (Figura 12), mientras que en el tratamiento testigo (T4) no se observaron síntomas de marchitez durante el período de evaluación (Figura 9).

Arbos (1992) señala a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* como el patógeno causante de la marchitez en crisantemo y manifiesta que la enfermedad puede presentarse ocho días después de la plantación con daños irreversibles, período de incubación que coincide con el registrado en los tratamientos T2 y T3.

Por su parte, Horst y Nelson (1997) indican que cultivares susceptibles como 'Polaris' inoculados con *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* muestran síntomas severos a los 10 días. García *et al.* (2003) encontraron un período de

incubación de 10 ddi con *Fusarium* sp. y de 19 ddi con *Mucor* sp. en crisantemo 'Polaris', período de incubación similar al observado en el caso del tratamiento T1 (*Fusarium* sp.).

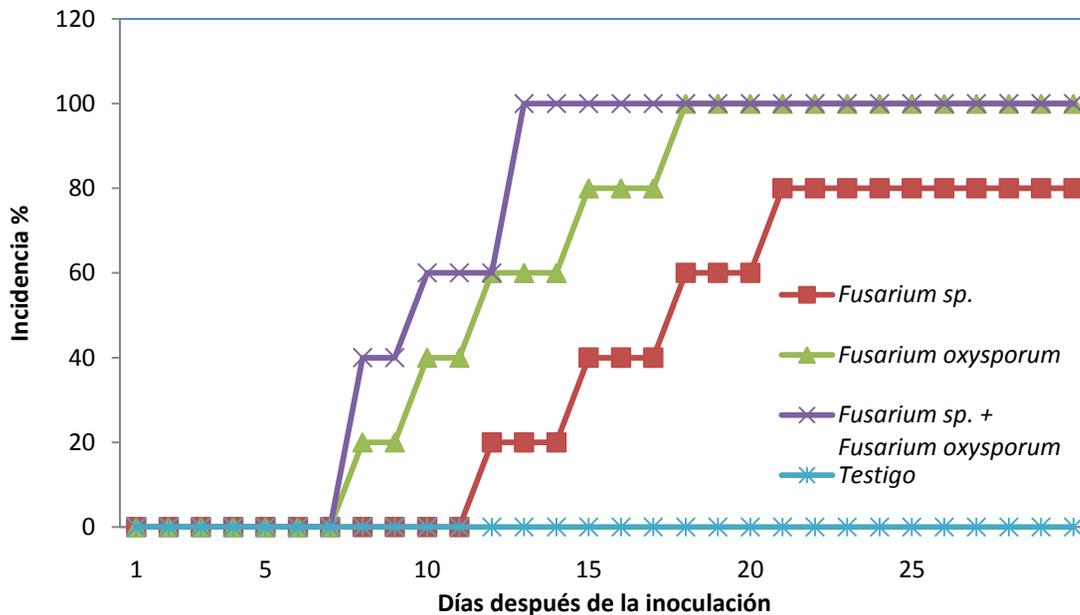


Figura 9. Incidencia de plantas de crisantemo 'Harman' con síntomas de marchitez inoculadas con *Fusarium* sp. y *Fusarium oxysporum* mantenidas en cámara de ambiente controlado a 30°C y HR 55 %, con suelo saturado de agua.

García *et al.* (2003) señalan que el 66.6% de las plantas de crisantemo 'Polaris' inoculadas con *Fusarium* sp. mostraron síntomas de marchitez, resultados diferentes de los encontrados la presente investigación en plantas de crisantemo 'Harman' donde la incidencia final fue del 80 % y del 100 % para los tratamientos

Fusarium sp. (T1) y *Fusarium oxysporum* (T2)/*Fusarium* sp. + *Fusarium oxysporum* (T3), respectivamente.

1.7.8. Agente asociado a la mancha foliar

De las hojas que mostraban manchas necróticas rodeadas por un halo clorótico (Figura 10A), se aisló una bacteria que en medio PDA formó colonias color blanco cremoso, elevadas, con bordes enteros, constituida por bacilos cortos (Figura 11). En el invernadero, los síntomas se observan a partir de los 30 días después del trasplante (ddt) y la severidad se incrementa a los 66 ddt, etapa que coincide con el desbotonado de las plantas.

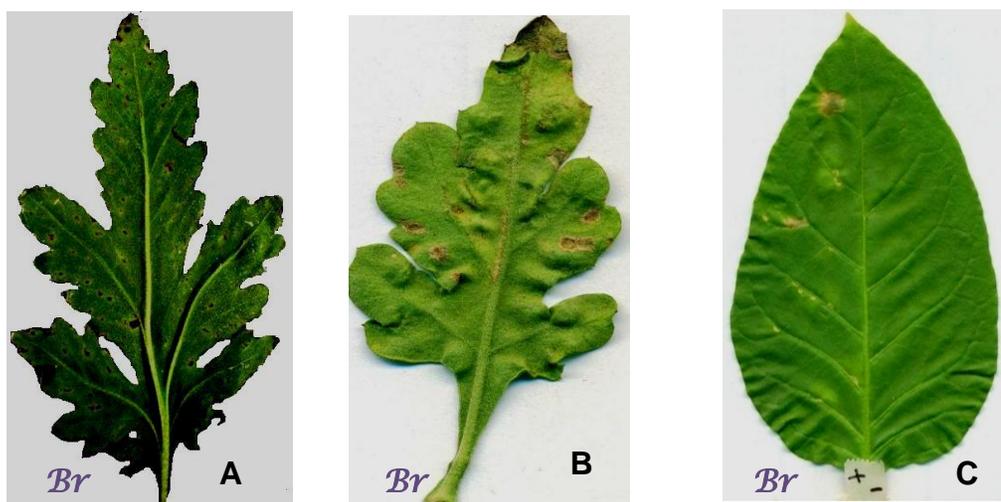


Figura 10. A: manchas necróticas rodeadas por un halo clorótico en hoja de planta adulta de crisantemo 'Harman' muestreada en invernadero de donde se aisló una bacteria; **B:** necrosis observada en hoja de planta joven de crisantemo

'Harman' inoculada con la bacteria aislada; **C**: manchas necróticas en hoja de tabaco inoculada con la bacteria aislada.

Los síntomas observados en plantas de crisantemo 'Harman' cultivadas en invernadero se lograron reproducir en plantas sanas de dicho hospedante (Figura 10B). La prueba de KOH 10 % fue positiva (Figura 11A), por lo que la bacteria es Gram negativa; hubo reacción de hipersensibilidad en hoja tabaco (Figura 10C), la prueba de pudrición en papa fue positiva (Figura 11C), la colonia bacteriana no fluoresce en medio B de King.

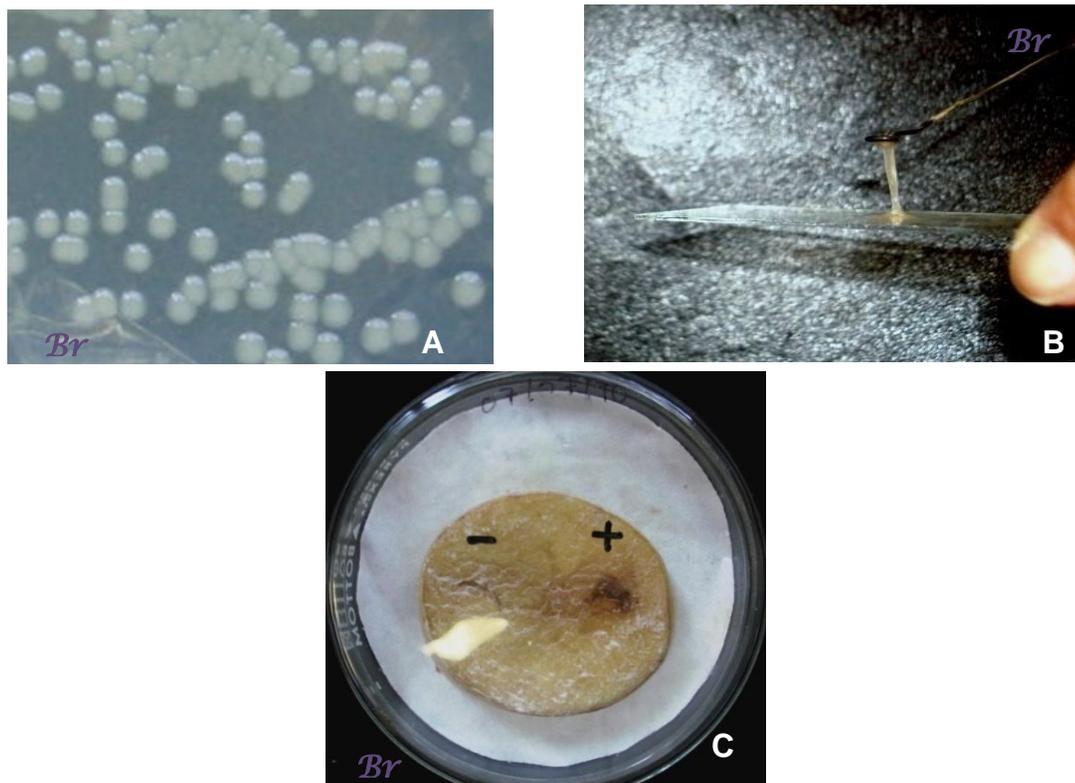


Figura 11. **A:** Colonias de la bacteria aislada y purificada de tejido foliar de crisantemo 'Harman' que mostraba manchas necróticas rodeadas por un halo clorótico, Tequexquihuac, Texcoco, estado de México; **B:** prueba de KOH 10 %

positiva; **C**: prueba de pudrición de papa positiva. (-): lesión en la se colocó agua destilada estéril; (+) lesión en la que se colocó una asada de la colonia bacteriana.

Por otro lado, las plantas inoculadas con la bacteria y que no fueron cubiertas con bolsa de plástico (SC) no presentaron síntomas, mientras que las plantas inoculadas y cubiertas con bolsa de plástico (CC), mostraron síntomas similares a los observados en invernadero.

En las plantas inoculadas y cubiertas con una bolsa de plástico, se registró una temperatura de 30°C y una humedad relativa del 61%. Las enfermedades foliares pueden actuar de diferente manera al reducir la cantidad de radiación interceptada y, por tanto, una disminución en la tasa fotosintética. Carretero *et al.* (2006) encontraron efectos significativos, originada principalmente por patógenos biotróficos (roya de la hoja), sobre la fotosíntesis del tejido foliar verde remanente de hojas enfermas de trigo.

Aranda (2002) menciona que *Erwinia chrysanthemi* es una bacteria de gran importancia en crisantemo cuyos síntomas inicialmente consisten en áreas de apariencia acuosa en la lámina foliar que posteriormente se pudren, alteraciones diferentes a las observadas en el presente trabajo. Otra bacteria reportada en crisantemo es *Pseudomonas cichorii*, la cual ocasiona lesiones de color café oscuro de forma circular a elíptica en hojas, que con el tiempo pueden aumentar de tamaño. Esta última bacteria es fluorescente en medio B de King y si bien los síntomas que produce pueden ser similares a los observados en crisantemo

'Harman', la bacteria aislada en este trabajo no fue fluorescente en medio B de King.

1.7.9. Virus asociados al crisantemo

En el tejido foliar analizado con la prueba DAS-ELISA que mostraban síntomas putativos a virus, se detectó al virus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV).

Las plantas de crisantemo 'Harman' positivas al TSWV en hojas mostraban clorosis y posterior necrosis de nervaduras (las cuales se apreciaban mejor por el envés), necrosis de peciolo y líneas necróticas a lo largo del tallo que en plantas adultas tienden a extenderse (Figura 12). Asimismo, en plantas infectadas la apertura de la inflorescencia ocurre antes que en las sanas. Algunos de los síntomas antes mencionados son similares a los reportados por Cárdenas (1994) en las variedades 'Polaris' e 'Indianapolis' donde el síntoma característico es una necrosis sistemática en el tallo, lo cual impide el paso de nutrimentos que resulta en una clorosis generalizada en hojas, marchitamiento de la planta y muerte de la misma.

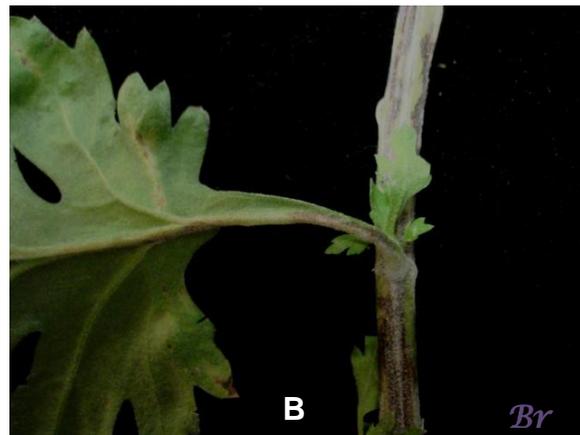


Figura 12. Síntomas de infección por TSWV en plantas de crisantemo 'Harman' en Tequexquahuac, Texcoco, estado de México. **A:** clorosis de nervaduras; **B:** necrosis en nervaduras, peciolo y tallo.

Cárdenas (1994) reportó la presencia del TSWV en cultivos de crisantemo 'Polaris' e 'Indiánapolis' en la zona de Villa Guerrero, Estado de México. Ochoa *et al.* (1999) señalan que en esta región la enfermedad ocasionada por el TSWV ha provocado pérdidas de hasta el 90 %, y aunque se presenta durante todo el año, es más severa en las plantaciones de mayo a julio. German *et al.* (1992) señala que el TSWV ha desplazado en importancia al TAV y que se ha detectado en más del 60% de plantas de crisantemo 'Polaris' y en casi todas las variedades sembradas en México.

El éxito de TSWV radica en la interacción con su vector, quien al alimentarse de una planta infectada, adquiere a la partícula viral en minutos u horas y las retiene durante toda su vida, siendo los adultos los principales diseminadores, entre otras cosas, por su amplio rango de hospedantes (Albouy, 2000).

En Estados Unidos el binomio *F. occidentalis*/TSWV está considerado el problema número uno en la horticultura, particularmente en las regiones cálidas. Así, por ejemplo, en California provoca considerables daños en tomate, lechuga y pimiento; también produce daños en Hawai. En Brasil las pérdidas de producción se cifran entre el 49 y el 69% (Boiteux *et al.*, 1993).

1.8. CONCLUSIONES

Con base en el manual de interpretación de Castellanos *et al.* (2000), el suelo donde se realizó el presente estudio presenta características aceptables para el crecimiento y desarrollo del cultivo de crisantemo en general.

En el suelo se encontraron hongos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium* así como a *Fusarium oxysporum* y oomicetos pertenecientes a la familia Pythiaceae.

Las especies de trips identificadas fueron *Frankliniella occidentalis* Pergande, *F. dubia* Moulten y *F. brunnenses* Priesner; de minador *Liriomyza huidobrensis* Blanchard; de mosquita blanca *Trialeurodes vaporariorum* Westwood y de ácaros *Tetranychus urticae* Koch.

Las especies *Fusarium* sp. y *Fusarium oxysporum* son los agentes causales de la marchitez del crisantemo 'Harman'.

El agente causal de la mancha foliar en crisantemo 'Harman' es una bacteria fitopatógena Gram negativa que forma colonias de color blanco cremoso, elevada con bordes enteros.

El virus asociado al crisantemo 'Harman' fue el *Tomato spotted wilt virus*.

1.9. LITERATURA CITADA

- Agrios, G.N. 2005. Plant pathology. 5th edition. Elsevier Academic Press. San Diego California. The United States of America. 922 p.
- Albouy, J. 2000. Enfermedades producidas por virus de las plantas ornamentales. Mundi-Prensa. México. 479 p.
- Alford, D.V.1995. Pests of ornamental trees, shrubs and flowers. Manson Publishing. New York. 448 p.
- Alcántara, H.F. 1998. Las plagas del crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.): una base para su manejo en el área florícola de Texcoco, México. Tesis profesional Especialidad de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 108 p.
- Anaya, R. S., Bautista, M. N., Domínguez, R. B. 1992. Manejo fitosanitario de las hortalizas en México. Centro de Entomología y Acarología. UACH. México. pp. 139-141.
- Aranda, O.S. 2002. Enfermedades bacterianas en ornamentales. *In*: Manejo Fitosanitario en Ornamentales. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México, 156 p.
- Arbos, L.A.M. 1992. El crisantemo, cultivo, multiplicación y enfermedades. Mundi-Prensa. Madrid, España. 170 p.
- Bautista, M.N. 2006. Insectos plaga. Una guía ilustrada para su identificación. Colegio de Postgraduados. México. 113 p.
- Barnett, H. T. and Hunter, B. B. 1998. Illustrated genera of Imperfect fungi. Fourth Edition. APS Press. 218 p.

- Boiteux, L.S., Nagata, T., Dutra, W.P. and Fonseca, M.E.N. 1993. Sources for resistance to Tomato spotted wilt virus (TSVW) in cultivated and wild species of *Capsicum*. *Euphytica* 67: 89-94.
- Booth, C. 1988. *Fusarium*. Laboratory guide to the identification of the major species. Commonwealth Mycological Institute. Slough, England. 156 p.
- Bustamante, E. y Rivas, P.G. 1999. Elementos e importancia del diagnóstico de problemas fitosanitarios. *Revista Manejo Integrado de Plagas*. (52): 1-15.
- Borror, D.J., DeLong, D.M. and Triplehorn, C.A. 1989. An Introduction to the study of insects. Sunders College Publishing. The United States of America. 875 p.
- Burgues, A. 1960. Introducción a la microbiología del suelo. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 199 p.
- Cárdenas, A.M.R. 1994. Las enfermedades causadas por virus en ornamentales en México y alternativas de solución. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 1:124-129.
- Carretero, R., Serrago, R. A. y Miralles, D. J. 2006. Relación entre las enfermedades foliares y el crecimiento, interceptación de luz y EUR en trigo. XXVI Reunión de la Asociación Argentina de Fisiología Vegetal. Chascomús. Bs. As. Argentina. 101 p.
- Castellanos, J.Z., Uvalle, B.J. y Aguilar, S.A. 2000. Manual de interpretación de análisis de suelos y aguas. 2ª. Ed. INCAPA. México. 226 p.
- Cohen, R., Chefetz, B. and Hadar, Y. 1998. Suppression of soil-borne pathogens by composted municipal solid waste. *In: Beneficial Co-Utilization of Agricultural, Municipal and Industrial By-Products*. Kluwer Academic Publishers. United States of America. pp: 113-130.

- Cortés, L.J.J., Solís, A.J.F., Pérez, V.A. y Peña, M.R. 1996. Identificación de pulgones (Homoptera: Aphididae) que atacan los cultivos florícolas de la región de Villa Guerrero, Estado de México. Revista Chapingo. Serie Protección Vegetal 3 (1): 55-58.
- Coto, D. 1998. Estados inmaduros de insectos de los órdenes Coleoptera, Diptera y Lepidoptera: Manual de reconocimiento. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 163 p.
- Dole, J.M. and Wilkins, H.F. 2005. Floriculture: principles and species. 2nd edition. Pearson Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey, The United States of America. 1023 p.
- Echevarría, A., Gimeno, C. y Jiménez, R. 1994. *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard, 1926) (Diptera: *Agromizyidae*) una nueva plaga en cultivos valencianos. Boletín Sanidad Vegetal Plagas. 20: 103-109.
- Enríquez, V.J. R., Velásquez, T.B., Vallejo, F.A. R. y Velasco, V.V.A. 2005. Nutrición de plantas de *Dendranthema grandiflora* obtenidas *in vitro* durante su aclimatación en invernadero. Revista Fitotecnia Mexicana. 28(4): 377-383.
- Etchevers, B.J.D. y Padilla, C.J. 2009. Diagnóstico de la fertilidad del suelo. *In*: Nutrición de cultivos. Mundi-Prensa. México. pp. 250-272.
- Erwin, D.C. and Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press. Minnesota, the United States of America. 562 p.
- García, M.C. 1981. Lista de insectos y ácaros perjudiciales a los cultivos en México. Fitófilo. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Dirección General de Sanidad Vegetal. México, D.F. Año XXV, No. 86. 196 p.

- García, V.R., Ochoa, M.D.L., Zavaleta, M.E. y Mora, A.G. 2003. Etiología de la marchitez del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) cv. Polaris. Revista Mexicana de Fitopatología. 21 (1): 75-78.
- German, T.L., Ullman, D.F. and Moyer, J.W. 1992. Tospoviruses: diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. Annual Review of Phytopathology 30: 315-334.
- González, E.A., Cedillo, P.E. y Díaz G.L. 2007. Morfología y anatomía de las plantas con flores. Universidad Autónoma Chapingo. México. 276 p.
- Groves, R.L., Walgenbach, J.J.F., Moyer, J.W. and Kennedy, G.G. 2002. The role of weed hosts and tobacco thrips, *Frankliniella fusca*, in the epidemiology of *Tomato spotted wilt virus*. Plant Disease. 86: 573-582.
- He L., Zhang, Y., Xiao, N., Wei, J. and Kuang, R. 2002. *Liriomyza huidobrensis* in Yunnan, China: current distribution and genetic structure of a recently established population. Entomologia Experimentalis et Applicata. 102:213-219.
- Herrera, T. y Ulloa, M. 1998. El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. 2da edición. Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo de Cultura Económica. México. 551 p.
- Hollings, M. and Stone, O.M. 1971. Tomato aspermy virus. Descriptions of plant viruses. N° 79. C.M.I./ A.A.B. 4 p.
- Horst, K. R. y Nelson, E. P. 1997. Compendium of Chrysanthemum Diseases. APS Press St. Paul, Minnesota. 88 p.

- Huerta, P.R.A. y Chavarín P.J.C. 2002. Trips y minadores: identificación, biología y control. *In*: Manejo fitosanitario de ornamentales. Colegio de Postgraduados. México. pp.55-64.
- IAPT (International Association for Plant Taxonomy). 2010. Catalogue of life: 2010 Annual Checklist. Indexing the world's known species. (consultado el 20 de octubre del 2010 en <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2010v1/search.php>)
- Johansen, N.R.M. y Guzmán, M.A. 1999. Thysanoptera. Catálogo de insectos y ácaros plaga de los cultivos agrícolas de México. Sociedad Mexicana de Entomología, Publicaciones especiales. 1: 27-42.
- Kirk, W.D.J. and Terry, L.I. 2003. The spread of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Agricultural and Forest Entomology*. 5(4): 301-310.
- Klement, Z., Rudolph, K. and Sands, D.C.1990. *Methods in phytobacteriology*. Académiai Kiadó - Nyomda Vállalat. Budapest, Hungary. pp. 99-100.
- Kofranek, A. M. 1988. Crisantemos de corte. *In*: Introducción a la floricultura. R. A. Larson Ed. AGT Editor. México. pp.3-29.
- Martínez, F.R.T., Jacas, M.J.A. y Ripollés, J.L. 2004 La araña roja, *Tetranychus urticae*: métodos de muestreo y umbrales económicos de tratamiento en clementinos. *Phytoma España: Revista Profesional de Sanidad Vegetal*, 164: 53-58.
- Mazzola, M. 2004. Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. *Annual Review of Phytopathology* 42:35–59.

- Martyn, R. D. 2004. Fusariosis de la sandía. *In*: Plagas y enfermedades de las cucurbitáceas. The American Phytopathological Society-Mundi Prensa. España. pp: 13-14.
- Molina, G.E., García, E.R., Zavaleta, M.E., Rojas, M.R.I. y Pérez, M.J. 2007. *Pythium* spp. ¿Potencia las posibilidades de control biológico asociado a la complejidad microbiana? *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 10 (2): 74-77.
- None, S. 1991. Pruebas de detección de virus, viroides y organismos fitopatógenos sistémicos aplicados al cultivo de tejidos. *In*: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones Roca, W.M.; Mroginski, L.A. eds. Cali. Colombia, CIAT. pp. 633-693.
- SEMARNAT (2000). Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Secretaria De Medio Ambiente Y Recursos Naturales. Segunda edición. Diario Oficial de la Federación. 31 de diciembre de 2002.
- Ochoa, M.D.L. 1994. Detección y factores epidemiológicos de la virosis del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* cv. Polaris) y prácticas de manejo para la marchitez del clavel (*Dianthus caryophyllus*) y pudrición del tallo del gladiolo (*Gladiolus grandiflorus*). Tesis de maestría en ciencias. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México. 94 p.
- Ochoa, M.D.L., Zavaleta, M.E., Johansen, N.R.M., Herrera, G.A. and Cárdenas, S.E. 1996. Tospoviruses, weeds and thrips associated with chrysanthemum

- (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev cv. Polaris). International Journal of Pest Management. 42: 157-159.
- Ochoa, M.D.L., Zavaleta, M.E., Mora, A.G. and Johansen, N.R.M. 1999. Implications of weed composition and thrips species for the epidemiology of tomato spotted wilt in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*). Plant Pathology 48:707-717.
- Oddino, C., Zuza, M., March, G. y Marinelli, A. 2004. Potencial inóculo de *Fusarium solani* e incidencia de la “podredumbre parda de la raíz” del maní. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. XIX Jornada Nacional de Maní. pp. 29-30.
- Ortega, A.L.D. 2002. Moscas blancas en ornamentales. *In*: Manejo fitosanitario de ornamentales. Colegio de Postgraduados. México. pp. 41-52.
- Otero, C.G. 2002. Ácaros plaga de plantas ornamentales. *In*: Manejo fitosanitario de ornamentales. Colegio de Postgraduados. México. pp. 8-21.
- Putnam, M. 1995. Evaluation of selected methods of plant disease diagnosis. Crop Protection 14(6):517-525.
- Ramírez, C. 1996. Efecto de las prácticas agrícolas sobre la microflora del suelo: oportunidades en la fitoprotección. *In*: Bertsch, F.; Badilla, W.; Bornemisza, E. eds. X Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales. EUNED. San José, Costa Rica. 81 p.
- Reitz, S. R. and Trumble, J. T. 2002. Interspecific and intraspecific differences in two *Liriomyza* leafminer species in California. Entomologia Experimentalis et Applicata. 102:101-113.

- Rodríguez, M.M. C., Tello, L.J.C., Torres, V.L.M. y Bielza, P. 1998. Aspectos de la microflora de los suelos de Cáceres: densidad de población, composición específica y patogenicidad de *Pythium* Pringsheim. Boletín Sanidad Vegetal Plagas. 24: 541-550.
- Rodríguez, N.J.A., Zavaleta, M.E., Sánchez, G.P. y González, R.H. 2000. Efecto de la vermicomposta en la nutrición, rendimiento y pudrición radical y de la corona en gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus). Fitopatología. 35(1): 66-77.
- Romero, M.A. 1996. Plagas y enfermedades de ornamentales. Universidad Autónoma. Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural. Chapingo, México. pp. 75-94.
- Rosello, S., Jorda, C. y Nuez, F., 1994. El virus del bronceado del tomate (TSWV). I. Enfermedades y epidemiología. *Phytoma España*, 62: 21 -34.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Molecular cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. 1:1.32-1.34. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sato, M.E., Da Silva, M., Raga, A. and De Souza, M.F. 2005. Abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): selection, cross-resistance and stability of resistance. Neotropical Entomology, 34 (6): 991-998.
- Shurtleff, M.C. and Averre, C.W. 1997. The plant disease clinic and field diagnosis of abiotic diseases. St. Paul, Minnesota, APS Press. 256 p.
- Smith, I. M., Dunez, J., Lelliott, R. A., Phillips, D.H. and Archer, S.A. 1992. Manual de enfermedades de las plantas. Mundi-Prensa. España. 675 p.
- Snyder, W.C. and Hanssen, H.N. 1940. The species concept in *Fusarium*. American Journal Botanical. 27: 64-67.

- Spencer, K.A. 1987. Agromyzidae. *In*: Mc. Alpine (Ed.).1987. Manual of nearctic diptera. Research branch Agriculture Canada. Minister of Supply and Service Canada. Ottawa, Canada. Vol.2. Monograph 28. pp. 869-879.
- Steiner, G. W., Watson, R .D. 1965. Use of surfactants in the soil dilution and plate count method. *Phytopathology*. 55: 728-730.
- Parrella, M. P. 1987. Biology of *Liriomyza*. *Annual Review of Entomology* 32:201-224.
- Tlapal B., B. y Mendoza Z., C. 2002. Enfermedades de origen fungoso en ornamentales. *En: Manejo fitosanitario de ornamentales. Colegio de Postgraduados. México. pp. 97-116.*
- Tuttle, D. M., Baker, E. W. and Abbatiello, M. J. 1976. Spider mites of México (Acari: Tetranychidae). *International Journal of Acarology* 2(2):1-108.
- Ulacio D., Salas J., Querales P. y Sanabria M. E. 2002. Micobiota del suelo de zonas productoras de papa del estado Mérida y su relación con *Rhizoctonia solani*. *Bioagro* 14 (1):11-16.
- USDA. 1998. Guía para la evaluación y calidad del suelo. Traducción al español por Lutens, A. y Salazar, J. C. Instituto de suelo, Argentina. 85 p.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego. pp. 315–322.

CAPÍTULO 2. MANEJO BIORRACIONAL DEL CULTIVO DE CRISANTEMO

2.1 RESUMEN

Se estudió el efecto de *Trichoderma harzianum* en la presencia de hongos y oomicetos, la incidencia y el patrón espacial de dispersión de plantas con síntomas de marchitez; asimismo, se evaluó el efecto de la miel, *Saccharomyces cerevisiae* y nitrógeno + ácidos húmicos en la incidencia y distribución espacial de plantas con síntomas de virosis, el número de trips, minador y mosca blanca en plantas crisantemo 'Harman' y la relación beneficio/costo entre tratamientos. El ensayo se instaló bajo un diseño experimental de bloques completos al azar con cuatro tratamientos y tres repeticiones. Los tratamientos evaluados fueron: miel de abeja al 2 % (M), nitrógeno + ácidos húmicos (N+AH), *S. cerevisiae* (SC) y testigo regional (T). En los tratamientos M, N+AH y SC se aplicó extractos vegetales contra insectos y ácaros, *Beauveria bassiana* para control de trips y mosca blanca, se incorporó paja de trigo a una razón de 1.5 ton ha⁻¹ con un motocultor para después inocular a *Trichoderma harzianum* a una dosis de 12,000 ufc mL⁻¹ al suelo. El tratamiento T consistió en el manejo convencional del cultivo como lo hace el productor con aplicaciones calendarizadas de agroquímicos. Se realizó un muestreo de hongos y oomicetos en cada tratamiento, y se registraron plantas que mostraban síntomas de flacidez y putativos a virus, respectivamente, para conocer la incidencia de marchitez y virosis. Para determinar el patrón espacial de dispersión se utilizó el índice de Morisita ($I\delta$). Se utilizaron trampas circulares amarillas pegajosas de 415 cm² para el monitoreo de trips, minador y mosca blanca, dichos datos fueron sometidos a un análisis de

varianza y posterior comparación de medias a través de la prueba de diferencia mínima significativa ($\alpha=0.05$) utilizando el programa estadístico SAS System for Windows 9.0®. Se encontró que suelos tratados con *Trichoderma harzianum* muestran una menor presencia de hongos fitopatógenos y oomicetos. Se tuvo una incidencia de plantas marchitas de 0.78, 0.78, 0.0 y 3.56 % en los tratamientos M, N+AH, SC y T respectivamente con un patrón de distribución en agregados, excepto el tratamiento SC con un patrón aleatorio, y una incidencia de plantas con síntomas putativos a virus de 0.35, 0.52, 0.7 y 0.96 % en los tratamientos M, N+AH, SC y T, respectivamente con un patrón de distribución aleatorio. El número de trips, minador y mosca blanca resultaron similares entre tratamientos. La relación beneficio/costo fue de \$ 0.84 en el tratamiento N+AH, mientras que en los tratamientos M, SC y T fue de \$ 0.56, 0.66 y 0.14, respectivamente.

Palabras clave: *Trichoderma harzianum*, *Saccharomyces cerevisiae*, ácidos húmicos, miel de abeja, extractos vegetales.

2.2 ABSTRACT

The effect of *Trichoderma harzianum* on the presence of fungi and oomycetes, the incidence and spatial pattern of chrysanthemum wilt was studied; also, the effect of honey, *Saccharomyces cerevisiae* and nitrogen + humic acids on the incidence and spatial pattern of plants showing putative symptoms of virus infection, number of thrips, leaf miner and whitefly in chrysanthemum plants 'Harman'. The relationship benefit/cost among treatments was estimated. The experiment was established under a random block design with four treatments and three replications. The treatments were: honey 2% (H), nitrogen + humic acids (N + HA), *S. cerevisiae* (SC) and control (C). In treatments M, N + HA and CS, additionally plant extracts against insects and mites was applied and *Beauveria bassiana* for control of thrips and whiteflies. Wheat straw was incorporated (1.5 ton ha⁻¹) with a rototiller and soil was inoculated with *Trichoderma harzianum* (12,000 cfu mL⁻¹). Control consisted of conventional crop management in which the pesticide application is done weekly. Sampling of fungi and oomycetes was performed for each treatment, and plants showing wilt or symptoms putative of viral infection were recorded. In order to determine the spatial pattern of dispersion of wilt and virosis, the Morisita dispersal index ($I\bar{d}$) was used. Yellow sticky traps of 415 cm² were used for monitoring the population of thrips, leaf miner and whitefly. The analysis of variance of collected data were analyzed with the statistical program SAS ® System for Windows 9.0. The least significant difference test ($\alpha = 0.05$) was employed if differences among treatments were observed. Soils treated with *Trichoderma harzianum* showed a reduced number of pathogenic fungi and

oomycetes. The incidence of wilt plants were 0.78, 0.78, 0.0 and 3.56% for treatments H, N + HA, SC and C, respectively with an aggregated distribution pattern, except the SC treatment with a random pattern. The incidence of plant showing putative symptoms of virus infection were 0.35, 0.52, 0.7 and 0.96% in treatments H, N + HA, SC and T, respectively with a random distribution pattern. The number of thrips, leaf miner and whitefly were similar among treatments. The benefit/cost relationship was \$ 0.84 for treatment N + HA, while in the treatments H, SC and C were \$ 0.56, 0.66 and 0.14, respectively.

Keywords: *Trichoderma harzianum*, *Saccharomyces cerevisiae*, humic acids, honey, plant extracts.

2.3 INTRODUCCIÓN

El combate de plagas exitoso debe incluir un esquema de manejo integrado, en el cual se utilicen productos de bajo impacto ambiental que además sean inocuos para el productor. Existen alternativas para el manejo integrado de cultivos en invernaderos como el establecimiento de variedades resistentes, el control biológico, cultural, físico, bioracional, químico, modificación del ambiente de los invernaderos, de los residuos de cosechas, de los hospederos y las buenas prácticas agrícolas de producción. Huerta (2000) encontró que en la región de Texcoco el uso de plaguicidas sintéticos es generalizado y los conocimientos técnicos del floricultor sobre estos insumos son insuficientes lo que acarrea un problema de uso irracional y no hay interés por buscar alternativas al control químico. Desafortunadamente, cada vez la resistencia de los patógenos y los insectos hacia los plaguicidas inorgánicos que se utilizan para su control es más evidente por lo que se requiere generar estrategias y tácticas de manejo que sustituyan o complementen el uso de agroquímicos convencionales (Van Emdem, 1977). En la búsqueda de alternativas para el manejo de plagas agrícolas se ha propiciado la consideración de compuestos de origen vegetal, por ser un recurso renovable, disponible y de fácil procesamiento (Gioanetto y Cerna, 2000). Además de protección al cultivo, disminuyen los riesgos de contaminación e intoxicaciones (Lagunes, 1994). La actividad de los productos vegetales en insectos generalmente se manifiesta como repelencia, inhibición de la alimentación, de crecimiento y fecundidad; así mismo funcionan como estimulantes o inhibidores de la oviposición y reguladores del desarrollo (Rodríguez, 2000).

Otro factor importante en un manejo integrado, es la nutrición del cultivo, que influye no sólo en el crecimiento y desarrollo de la planta, sino que además afecta la predisposición o severidad de plagas. La fertilización influye en la resistencia, antibiosis y tolerancia (Painter, 1951). Las respuestas morfológicas de los cultivos a los fertilizantes, tales como cambios en las tasas de desarrollo, aceleración o retraso de la maduración, tamaño de los órganos de las plantas, grosor y dureza de la epicutícula, también determinan el éxito de muchas especies plaga en utilizarla como hospedante. Por ejemplo, Bentz y Larew (1992) al relacionar la tasa de fertilización en plantas de crisantemo *Dendranthema grandiflora* y su susceptibilidad a la infestación por *Trialeurodes vaporariorum* encontraron que la densidad de huevos y adultos fue mayor a medida que se incrementó la concentración de fertilizantes, específicamente el contenido de nitrógeno en hojas. El manejo convencional del cultivo de crisantemo en la región florícola de Texcoco hace uso indiscriminado de agroquímicos sintéticos ocasionando la aparición de plagas resistentes, fractura del control biológico natural y generado problemas ambientales y de salud humana (Huerta, 2000). Por esta razón, existe una clara necesidad de desarrollar alternativas bioracionales nuevas que contribuyan a mejorar la calidad del cultivo.

2.4 OBJETIVOS

El presente estudio se realizó el propósito de

1. Determinar el efecto de *Trichoderma harzianum* en hongos y oomicetos presentes en el suelo donde se estableció el cultivo de crisantemo 'Harman'
2. Conocer el efecto de miel de abeja, nitrógeno + ácidos húmicos y *Saccharomyces cerevisiae* en la incidencia y distribución espacial de plantas con síntomas de marchitez y de virosis, número de trips, mosca blanca y minador.
3. Establecer la relación beneficio/costo de los diferentes tratamientos.

2.5 REVISIÓN DE LITERATURA

El uso inadecuado de plaguicidas ha desencadenado problemas de contaminación ambiental y la generación de resistencia en las poblaciones de artrópodos debido a una presión de selección. Otros efectos del uso inadecuado de plaguicidas son el resurgimiento de plagas y el incremento de poblaciones de plagas secundarias (Van Emden 1977). Cuando las plagas primarias son eliminadas por acción de los plaguicidas, dejan un espacio ecológico que ocupan las plagas secundarias que muchas veces son los ácaros (Carrero, 1977).

2.5.1. Manejo convencional

La mayoría de los sistemas actuales de producción se caracterizan por el cultivo continuo de una sola especie vegetal. Los monocultivos se han ido posesionando de la agricultura, lo que ha arrojado una disminución considerable de la biodiversidad. El equilibrio existente ha dejado de apoyarse en la naturaleza, para encontrar sostén en variables externas como los agroquímicos, encargados de controlar y regular el sistema (Venegas, 1996). Sin embargo, el uso excesivo e inadecuado de los plaguicidas ha afectado la salud humana y dañado en mayor o menor grado a los ecosistemas.

2.5.2. Manejo integrado de plagas (MIP)

De acuerdo a la FAO (2002), el MIP debe considerar el desarrollo sano del cultivo teniendo como base la identificación correcta y la observación permanente de la plaga a fin de determinar su población real, la conservación de enemigos

naturales, el registro permanente de temperatura y humedad así como la selección y aplicación de las medidas adecuadas de control de las plagas. El MIP soporta las decisiones para la selección y uso de tácticas de control de plagas, de manera individual o armoniosamente coordinados dentro de una estrategia de manejo, basándose en el análisis costo/beneficio tomando en cuenta los intereses de productores, sociedad y medio ambiente (Kogan, 1998)

2.5.3. Manejo integrado del cultivo (MIC)

El MIP es parte integrante del MIC y se refiere a la realización de un conjunto de actividades para reducir la incidencia de plagas que involucra las prácticas culturales, fitosanitarias, genéticas y biológicas a fin de conseguir un cultivo sano e incrementar la productividad, utilizando una tecnología adecuada que sea rentable y sostenible en términos de costos/beneficio (IICA, 2006). Para el MIC es clara la necesidad de trabajos interdisciplinarios (Téliz, 2000) donde el grupo interdisciplinario, analiza el problema, se distribuyen responsabilidades y se trabaja de manera coordinada para integrar, por último, los resultados obtenidos.

2.5.4. Manejo bioracional

El manejo bioracional se refiere al empleo de las diferentes prácticas existentes en la agricultura, que sean amigables con el medio ambiente y ayuden a la conservación de los distintos recursos naturales propios de cada región para las futuras generaciones. Algunas de estas prácticas comprenden el uso de organismos antagónicos, el empleo de compostas y productos orgánicos como supresores de plagas y enfermedades (Lira, 2003).

El manejo bioracional de plagas se basa en conocimientos biológicos y económicos para lograr una agricultura sostenible (King, 1996). El fin nunca debe ser eliminar totalmente una plaga, sino regular el crecimiento de sus poblaciones. Por lo mismo es benéfico contar con una cantidad de estos organismos considerados plagas, ya que así se permite la supervivencia y reproducción de sus biorreguladores (Lomelí *et al.*, 2002).

En cuanto al manejo de enfermedades, el control biológico, también ha pasado a transformarse con el tiempo en una alternativa viable, especialmente en hongos fitopatógenos. El control biológico considera el uso de enemigos naturales, plantas resistentes y agentes microbiológicos como bacterias, hongos, virus y nematodos patógenos (Sandoval, 1997).

2.5.4.1. Alternativas bioracionales en sistemas agrícolas

2.5.4.1.1. *Trichoderma harzianum*

Una estrategia de biocontrol es el uso de microorganismos antagonistas que compitan directamente con el patógeno. Varias especies de hongos del género *Trichoderma* (como *T. harzianum*, *T. virens* y *T. hamatum*) son utilizadas para el control de un rango amplio de hongos fitopatógenos responsables de las principales enfermedades en los cultivos de importancia económica. La actividad micoparasítica de *Trichoderma spp.* se debe a sus tres mecanismos antagonistas que operan solos o combinados para el control; la competencia, la antibiosis y la producción de enzimas (Khetan, 2001). Además puede favorecer la promoción del

crecimiento, desarrollo y calidad de los cultivos donde se ha inoculado (Mukerji y Garg, 1988).

Ibarra (2008) obtuvo 71 aislamientos de *Trichoderma spp.*, a partir de muestras de suelo con diferente uso agropecuario y forestal, para evaluarlos contra *Sclerotinia sclerotiorum* y *S. minor*. Las cepas IBA-3, IBA-4, IBA23, IBA-46, IBA-54 e IBA-56 parasitaron agresivamente, lo cual muestra el potencial que tiene *Trichoderma spp.* como micoparásito y antagonista.

2. 5.4.1.2. *Beauveria bassiana*

Es el hongo causante de la muscardia blanca, primera enfermedad descrita para insectos. El cultivo puro de este hongo presenta un micelio de aspecto algodonoso, de color blanco con una esporulación abundante color crema. Microscópicamente, su conidióforo muestra conidios hialinos dispuestos individualmente en zigzag en un raquis o esterigma (Tanada y Kaya, 1993). Las condiciones óptimas para su desarrollo son temperaturas templadas y bajas (20 y 15 °C) (Dobersky, 1981) y un pH entre 5.5 y 7.0. Es una especie cosmopolita, así como una de las más generalistas; sus hospederos abarcan insectos de los órdenes Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera, Hemiptera, Diptera e Hymenoptera (Tanada y Kaya, 1993).

Beauveria bassiana es comúnmente utilizada en la agricultura orgánica para el control de moscas blancas, trips, pulgones, psílidos y gorgojos. Es compatible con los insectos benéficos, es seguro para los productores y el medio ambiente, no

tiene intervalo de seguridad, no produce resistencia y es una herramienta útil para el manejo integrado de plagas (Santamaría *et al.*, 1998). Carvallo *et al.* (2001) utilizaron aislamientos virulentos de *B. bassiana*, para el control del picudo del chile *Anthonomus eugenii*.

2.5.4.1.3. *Saccharomyces cerevisiae*

Ruvalcaba (2008) evaluó el efecto *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, ácido acético y miel como agentes inductores de resistencia sistémica sobre la infección causada por *Cucumber mosaic virus* (CMV) en calabacita var. Zucchini grey. Entre los resultados obtenidos, las plantas tratadas con *Saccharomyces cerevisiae* tuvieron valores de absorbancia negativos al CMV de acuerdo a la prueba DAS-ELISA, así como los valores más altos de peso de biomasa de follaje y raíz, lo cual sugiere que puede evaluarse en campo como una estrategia más para el manejo de virosis causadas por esta especie en otros cultivos.

2.5.4.1.4. Extractos vegetales

Uno de los métodos alternativos en el control de insectos plaga es la utilización de productos de origen vegetal. Según Rodríguez (1998), existen alrededor de 40 especies de plantas que causan inhibición de la oviposición, repelencia y toxicidad, entre las cuales se mencionan a la cebolla *Allium cepa*, ajo *Allium sativum* y el neem *Azadirachta indica*. Rodríguez (2000), encontró que la aplicación de ajo no provoca mortalidad en huevecillos y ninfas de mosca blanca, sí la repelencia en adultos. La actividad tóxica de imidacloprid sobre mosca blanca

B. argentifolii en plantas de nochebuena *Euphorbia pulcherrima* provocó una disminución significativa de ninfas y adultos por un periodo de 30 días después de la aplicación (Van iersel *et al.*, 2000)

La nicotina es el principio activo de los extractos del tabaco, que se utilizan en aspersiones para controlar áfidos, psílidos, minadores, palomilla de la manzana y trips actúa como insecticida de contacto no persistente. La nicotina mimetiza a la acetilcolina, ocasionando el incremento de impulsos nerviosos, que a su vez provocan contracciones espasmódicas, convulsiones y finalmente la muerte de los insectos (Lagunes y Villanueva, 1999).

El triperpenoide con más actividad insecticida extraído del árbol de neem es la azadiractina que tiene efecto antialimentario, regulador del crecimiento, inhibidor de la oviposición y esterilizante (Lagunes y Villanueva, 1999).

2.5.4.1.5. Miel

Aparte de usarse para consumo humano, la miel también ha sido una alternativa como complemento a los nutrientes clásicos en las plantas (Reyes, 2008). Enríquez (2000) comparó plantas de jitomate asperjadas y no asperjadas con miel, encontrando que el contenido de clorofila y área foliar de las plantas tratadas fue mayor al de las no tratadas.

La miel de abeja se utilizó en aplicaciones foliares al 2% para mejorar la nutrición en tomate de cáscara, desde el estado de plántula, hasta inicio de floración, mejorando notablemente el desarrollo y crecimiento del cultivo. Trabajos

realizados con la miel concluyen que reducen el efecto en la planta de algunos factores climáticos adversos y la incidencia y severidad para el control de *Fusarium oxysporum* (Gómez, 2003).

Ramírez (2006) evaluó el efecto de miel de abeja, ácido acetil salicílico y melaza en la movilidad y concentración del TSWV en plantas de jitomate, los productos no afectan el movimiento del virus dentro de la planta y sí disminuyen su concentración. Además, encontró un mayor contenido de clorofila y amarre de frutos en el tratamiento asperjado con miel.

2.5.4.1.6. Nutrición vegetal

Velasco (1999) señala que el desbalance nutrimental influye en el crecimiento y la supervivencia de los patógenos, en la predisposición, tolerancia y resistencia de las plantas a enfermedades, y los virus fitopatógenos alteran la absorción, concentración y translocación de los nutrimentos en la planta.

Chau y Heinz (2006) proponen la manipulación de la fertilización de nitrógeno como una táctica útil para el manejo de *Frankliniella occidentalis* en el cultivo de *Dendranthema grandiflora*. Ellos evaluaron niveles altos y bajos de una fórmula recomendada (375 mg L^{-1} de N), con una dosis del 50 % se disminuye notablemente el 44 % de la población de estos insectos sin afectar la vida de anaquel ni el tamaño de flor.

2.5.4.1.7. Métodos físicos y mecánicos de control de plagas

Vélez (1974) consideró que el método de control mecánico de plagas es de los más antiguos e incluye todas las formas directas de destrucción de insectos, como el uso de trampas. Para el autor, los métodos físicos son todos aquellos en los que intervienen fenómenos como el calor y el frío.

Los métodos físicos y mecánicos son medidas directas o indirectas para destruir plagas de insectos, perturbar su actividad fisiológica normal o modificar el ambiente de tal manera que lo hagan inaceptable o insoportable al insecto (NAS, 1978). Buitenhuis *et al.* (2007) mencionan que el uso de trampas es una estrategia útil para un manejo integrado de *Frankliniella occidentalis* en invernadero. Howell y Andrews (1989) colocan trampas de papel pegajoso como parte de los métodos de control mecánico.

Estay (1996) señaló que existe también como alternativa viable el control cultural, el cual provoca un ambiente desfavorable para la plaga, apoyándose en prácticas como: cambios en las fechas de siembra, rotación de cultivos y mantención de ciertas malezas que incrementen las poblaciones de enemigos naturales como ácaros, depredadores y parasitoides.

2.6 MATERIALES Y MÉTODOS

2.6.1. Localización del experimento

El experimento se estableció durante los meses de abril a julio del 2010 en una sección de invernadero en producción comercial de crisantemo (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. 'Harman' ubicado en Tequexquihuac, municipio de Texcoco, Estado de México ubicado a 19° 28' 37.65" de latitud norte y 98 ° 49' 36.45 " de longitud oeste a 2480 m de altitud.

2.6.2. Diseño experimental

El ensayo se instaló bajo un diseño experimental en bloques completos al azar con cuatro tratamientos y tres repeticiones (Anexo V). Se tuvieron tres camas de siembra con una longitud de 18.4 m por 1.2 m de ancho cada una, donde se efectuó el trasplante de esqueje de crisantemo 'Harman' sobre mallas metálicas formadas por cuadrículas de 11 x 12 cm (4600 plantas en total). Cada unidad experimental consistió en una superficie de 4.6 m de largo x 1.2 m de ancho.

2.6.3. Tratamientos

Los tratamientos evaluados fueron: T1: miel de abeja 2 % (M), T2: nitrógeno + ácidos húmicos (N+AH), T3: *Saccharomyces cerevisiae* (SC), T4: Testigo. Se utilizó miel de la marca Great Value®; para la aplicación de nitrógeno + ácidos húmicos se utilizó el producto comercial Kendal® mientras que en el caso de *S. cerevisiae* se empleó levadura comercial para panadería de la marca Tradipan®.

El sustrato de las camas de los tratamientos M, N+AH y SC se mezcló con paja de trigo a una razón de 1.5 ton ha⁻¹ con un motocultor. Una semana antes del

trasplante (y posteriormente en intervalos de 15 días durante un mes), se aplicó en drench *Trichoderma harzianum* a una dosis de 12, 000 ufc mL⁻¹.

Los tratamientos M, N+AH y SC fueron aplicados al follaje semanalmente a partir de los siete días después del trasplante (ddt) hasta punto de goteo. La miel de abeja se disolvió en agua a una concentración del 2 %, utilizando el volumen necesario para cubrir las plantas durante cada etapa de desarrollo. El producto comercial Tradi-Pan® se aplicó a una dosis de 5 g L⁻¹ de agua y el Kendal® a una dosis de 1 mL L⁻¹ de agua. En todos los casos se agregó el adherente comercial Inex® a una dosis de 1.5 mL L⁻¹ de agua. Asimismo, de manera preventiva se realizaron aplicaciones semanales (14 en total en todo el ciclo de cultivo) de extractos vegetales contra insectos y ácaros hecho a base de manzanilla, ajo y ruda (Bug balancer®), así como *Beauveria bassiana* (PHC® BEA TRON®) a una dosis de 2.5 g L⁻¹ para el control de trips y mosca blanca.

El tratamiento testigo consistió en el manejo convencional del cultivo tal como lo hace el productor, el cual básicamente consiste en la aplicación calendarizada (generalmente semanal) de insecticidas, acaricidas, fungicidas y fertilizantes o, de manera excepcional, cada 4 ó 5 días si se presenta una alta incidencia de marchitez de plantas, manchas foliares, trips o ácaros (Cuadro 1).

2.6.4. Condiciones del cultivo

El sistema la fertilización y abonado la realizó el productor cooperante en todos los tratamientos de acuerdo con el programa establecido que repite cada ciclo de cultivo (Cuadro 1). La aplicación de fertilizantes sólidos se realizó con la fórmula 46-00-00 y 18-46-00 de N-P₂O₅-K₂O a dosis de 54 g m², al voleo. Se aplicaron

fertilizantes foliares Biozyme® y Bayfolan® a una dosis de 1.5 mL L⁻¹ y 1 mL L⁻¹, respectivamente.

Cuadro 1. Prácticas de manejo convencional del crisantemo 'Harman'.

Práctica	Descripción	Período
Iluminación	Focos de 100 watts	Desde el trasplante hasta la 3 ^a semana
Riegos	A baja presión con manguera a punto de saturación	Cada tercer día desde el trasplante hasta la cosecha
Control de trips, minador y araña roja	Folimat®, Lannate®, Neomectin®, agrimec® y Trigard® adherente Inex®	2 ^a cada semana hasta la semana 14 ^a
Control hongos	Manzate®, Benomilo®, Tecto®	2 ^a cada semana hasta 4 ^a
Control roya	Stroby®	4 ^a y 8 ^a
Fertilización foliar	Bayfolan® y Biozyme®	2 ^a semana hasta la semana 14 ^a
Abonado	46-00-00 y 18-46-00 de N-P ₂ O ₅ -K ₂ O	4 ^a
Aplicación de cal	Composta de borrego Cal hidratada	5 ^a
Desbotone	Eliminación de botones secundarios	9 ^a
Preventivo contra botrytis	Benlate®	13 ^a y 14 ^a
Cosecha		15 ^a

En las camas de siembra se aplicaron riegos con manguera a baja presión, cada tercer día a punto de saturación, desde el trasplante hasta la cosecha.

El registro de la temperatura y humedad relativa se realizó cada dos horas con un higrotermógrafo digital que se colocó en el centro de las tres camas de siembra

donde se realizó el experimento a la altura del dosel de las plantas desde el momento del trasplante y hasta la cosecha.

2.6.5. Variables respuesta

2.6.5.1. Análisis de hongos y oomycetos

Al final de la cosecha, se realizó un análisis de hongos y oomycetos para conocer la población de estos en el suelo, después de un ciclo del cultivo, en los diferentes tratamientos evaluados. Para el crecimiento de hongos se utilizó el medio propuesto por Steiner y Watson (1965) a base de papa dextrosa agar (PDA) y surfactante (Penetrex-F®) (Anexo I). Las cajas se mantuvieron a temperatura ambiente (25-30 °C). La evaluación de unidades formadoras de colonias se realizó mediante la técnica de dilución seriada (1×10^{-3}) y conteo en 10 cajas de Petri (Klement *et al.*, 1990). El número de colonias se registró a los 10 días después de la siembra. Para su identificación se utilizó la clave para la clasificación de hongos mitóspóricos, anamórficos o imperfectos de Barnett y Hunter (1998), así como las claves de Snyder y Hansen (1940).

Para el crecimiento de oomycetos presentes se utilizó el medio de cultivo selectivo PARPH (Erwin y Ribeiro, 1996) (Anexo I). Las cajas se mantuvieron en obscuridad a temperatura ambiente (25-30 °C). El número de colonias se registró a las 72 hrs en 10 cajas de Petri.

2.6.5.2. Incidencia de marchitez e índice de dispersión

Esta variable se evaluó semanalmente en cada unidad experimental, registrando plantas que mostraban síntomas de flacidez o amarillamiento a los 15 y 30 días

después del trasplante (ddt) por ser el período crítico de esta enfermedad en la zona.

En este caso se ubicó la posición relativa de cada planta enferma dentro de la unidad experimental para elaborar un mapa de distribución espacial con base en el índice de Morisita ($I\delta$) el cual ha utilizado para determinar patrones espaciales en muchos patosistemas (Campbell y Madden, 1990). El $I\delta$ desarrollado por Morisita en 1959 indica que los diferentes niveles de agregación de los individuos sobre un área depende del tamaño de cuadrante. Se puede usar el tamaño de grupos cuya ecuación es:

$$I\delta = n [\Sigma x^2 - \Sigma] / (\Sigma x^2) - \Sigma x$$

Donde x representa la cuenta en cada muestra (cuadrante) y n es el número de cuadrantes en que se dividió el área. En este índice la interpretación es: $I\delta < 1$ para un patrón uniforme, $I\delta = 1$ para un patrón al azar o aleatorio y $I\delta > 1$ para un patrón agregado o de contagio.

2.6.5.4. Incidencia de plantas con TSWV e índice de dispersión

La incidencia se evaluó cada semana a partir de los 30 ddt hasta los 60 ddt en cada unidad experimental, observando síntomas putativos a virus como aclaración de nervaduras, necrosis en tallos, hojas o peciolo, clorosis, marchitez, mosaico, deformaciones foliares, anillos concéntricos, patrón en líneas y enanismo. Las plantas que mostraban alguno de los síntomas antes indicados se marcaban colocándoles una cinta de plástico color blanco y se anotaba su posición relativa en la unidad experimental para realizar un mapa de distribución espacial y

determinar el patrón de dispersión mediante el índice de Morisita ($I\delta$), descrito en el apartado anterior.

2.6.5.6. Cuento poblacional de trips, minador y mosca blanca

Se colocó una trampa amarilla pegajosa por unidad experimental (González *et al.*, 1999) consistente en platos amarillos circulares de 415 cm² cubiertos con bolsas de plástico transparente untadas con pegamento agrícola Adhequim® por ambos lados colocados a la altura del dosel de las plantas. Semanalmente se colectaron las bolsas de cada trampa y se colocó una bolsa nueva. Las bolsas que se quitaron de las trampas fueron cubiertas individualmente con una bolsa más grande para su traslado al laboratorio, donde se realizó el conteo de insectos en toda la trampa. La colocación de trampas se realizó semanalmente desde 7 días después del trasplante y hasta 7 días antes de la cosecha.

2.6.5.7. Relación beneficio/costo

El rendimiento de cada una de los tratamientos se multiplicó por el precio real en ese momento en el mercado nacional, y la suma proporcionó el beneficio económico de la producción. Por otro lado, la suma de los gastos de la adquisición de insecticidas, fungicidas, fertilizantes, aplicaciones, mano de obra, labores culturales, etc, corresponde al costo total de la producción. Al beneficio económico de la producción se le restó el costo de producción y se obtuvo la rentabilidad del cultivo por tratamiento.

Al valor de la relación beneficio/costo se le restó el beneficio económico y los costos de producción para obtener la rentabilidad. Al dividir la rentabilidad entre los costos de producción se obtuvo la ganancia neta.

2.6.5.8. Análisis de datos

Los datos de conteo poblacional de trips, minador y mosca blanca, fueron sometidos a análisis de varianza y posterior separación de medias mediante la prueba de diferencia mínima significativa ($\alpha=0.05$).

2.7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las características físicoquímicas del agua de riego utilizada en el presente estudio se muestran en cuadro 2.

Cuadro 2. Análisis de agua de riego del cultivo de crisantemo 'Harman', Tequexquahuac, Texcoco, estado de México.

pH	CE dSm ⁻¹	Ca mg L ⁻¹	Mg mg L ⁻¹	Na mg L ⁻¹	K mg L ⁻¹	CO ₃ ⁻ mg L ⁻¹	HCO ₃ ⁻ mg L ⁻¹	Cl ⁻ mg L ⁻¹	SO ₄ ⁻ mg L ⁻¹	B mg L ⁻¹
6.8	0.24	1.25	0.36	0.58	0.18	ND*	1.64	0.53	0.35	0.08

ND*: no detectado por el método empleado

2.7.1. Análisis de hongos y oomycetos

Las colonias presentes en el muestreo de suelo fueron *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp. y *Trichoderma* sp., en el figura 1 se muestra la densidad de cada género encontrada por tratamiento.

La presencia de *Mucor* sp. y *Rhizopus* sp. los cuales inicialmente no se encontraron al inicio del cultivo, como se muestra en los resultados de análisis de microflora en el capítulo 1, es posible ya que durante el manejo del cultivo se incorporo abono orgánico a base de suelo y estiércol de borrego. Burgues (1960) menciona que cuando se añade abono al suelo la microflora fúngica se modificaba en un doble sentido: se agregan nuevas especies fúngicas al suelo y se favorece el desarrollo de éstas y el de las autóctonas.

Cook y Baker (1983) indican que con una mayor diversidad de especies se confiere una estabilidad y madurez a los ecosistemas y permite alcanzar un control biológico natural de la microbiota del suelo en contra de los hongos fitopatógenos.

En el tratamiento T la densidad de *Fusarium* sp. fue la mayor con 4, 000 ufc g⁻¹, el cual no fue inoculado con *Trichoderma harzianum* al suelo, resultados parecidos con Samaniego y Chew (2007) en su estudio de la estructura de géneros de hongos del suelo en tres campos de cultivo agrícola en La Laguna, Coahuila, Durango, encontraron que el género *Fusarium* tuvo el mayor valor de dominancia en los tres suelos estudiados.

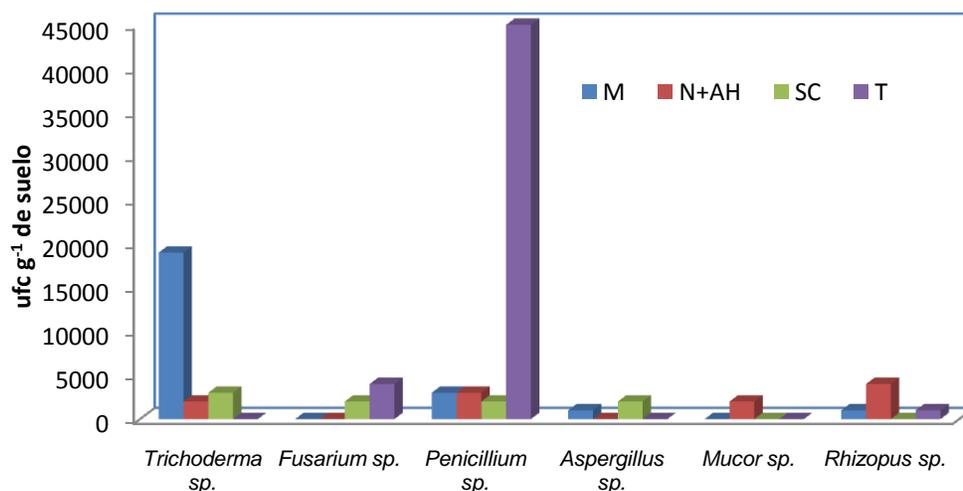


Figura 1. Hongos presentes en muestreo de suelo al final del ciclo del cultivo de crisantemo 'Harman', en diferentes tratamientos. Tequexquinahuac, Texcoco, estado de México. **M:** miel de abeja al 2%; **N+AH:** nitrógeno + ácidos húmicos; **SC:** *Saccharomyces cerevisiae*; **T:** Testigo regional.

En los tratamientos M, N+AH y SC donde se inoculó el suelo con *Trichoderma harzianum* presentan menor cantidad de inóculo de *Fusarium* sp., con base en los resultados de la investigación en el capítulo 1, posible responsable de la marchitez en crisantemo 'Harman', en comparación con el tratamiento T.

En el tratamiento M se observa que el *Trichoderma harzianum* tuvo una mejor colonización en el suelo, esta capacidad competitiva por nutrientes y espacio frente a diferentes patógenos ha hecho que muchos autores consideren un excelente antagonico (Martínez *et al.*, 2008).

Shipton (1977) señala que los monocultivos favorecen el desarrollo de hongos fitopatógenos de cultivos, sin embargo, ciertos residuos de cosecha, cultivos o suelos pueden favorecer especies de *Trichoderma* antagonicas hacia algunas especies de *Fusarium* y *Macrophomina* (Baird *et al.*, 2003).

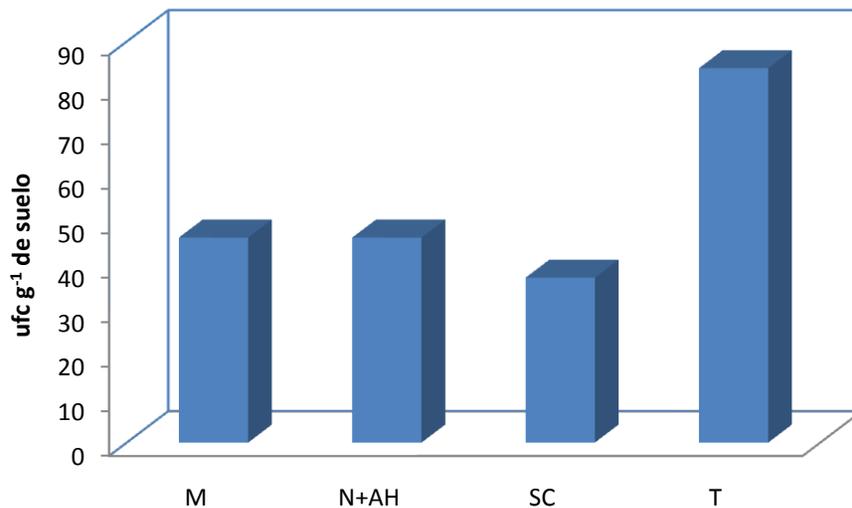


Figura 2. Oomycetos pertenecientes a la familia Pythiaceae presentes en muestreo de suelo al final del ciclo del cultivo de crisantemo 'Harman', en diferentes tratamientos. Tequexquinahuac, Texcoco, estado de México. **M:** miel de abeja al 2%; **N+AH:** nitrógeno + ácidos húmicos; **SC:** *Saccharomyces cerevisiae*; **T:** Testigo regional.

En los tratamientos donde se aplicó *Trichoderma harzianum* se tuvo un menor número de colonias de oomycetos con respecto del tratamiento T (Figura 2). Ezziyyani *et al.*, (2004) al realizar una prueba de antagonismo *in vitro* de *T. harzianum* contra *Phytophthora capsici* en medio PDA enriquecido con laminarina-glucosa (3:1, v/v), encontraron que *T. harzianum* aumenta los niveles de enzimas hidrolíticas β -1,3- glucanasa (lisis enzimática) y que ejerce una mayor competencia por espacio y nutrimentos e interacciona directamente con el patógeno (micoparasitismo), características determinantes en la reducción y destrucción de la colonia del patógeno.

2.7.2. Incidencia de marchitez e índice de dispersión

Se tuvo una incidencia de plantas marchitas de 0.78, 0.78 y 0.0 % en los tratamientos M, N+AH y SC, respectivamente, en los cuales se inoculó *Trichoderma harzianum* al suelo, y 3.56 % en el tratamiento T el cual no recibió ninguna inoculación al suelo. Ezziyyani *et al.* (2004) observó en su evaluación de *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento, un marcado hiperparasitismo que se manifiesta por la inhibición del crecimiento micelial debido a la producción de antibióticos y enzimas (β -1-3-glucanas, quitinasas, proteasas y celulasa) degradadoras de la pared celular (Sid Ahmed *et al.*, 2000).

Flores *et al.* (1997) mencionan como parte del mecanismo de biocontrol, el efecto biológico fungistático de sustancias volátiles emanadas por sistemas vivos del suelo, incluyendo al género *Trichoderma*, aunque en la mayoría de los casos no se especifica la naturaleza de los mismos. Bengston *et al.* (1992) determinaron la presencia de una lactona volátil, 6 -pentyl alfa pirona, con fragancia a coco, como metabolito principal de *Trichoderma viride*. La cepa *Trichoderma harzianum* utilizada en este trabajo perteneciente a este género presenta la misma característica de aroma, que sugiere la presencia del mencionado metabolito o de otro con características similares.

Por otro lado, de acuerdo al índice de dispersión Morisita ($I\delta$), los tratamientos M, N+AH y T mostraron un patrón en agregados. Olanya y Cambell (1988) realizaron un estudio sobre el efecto de la labranza en el patrón espacial de microesclerocios

de *Macrophomina phaseolina* utilizando el índice de Morisita y determinaron un patrón de agregación, resultados similar con la presente investigación. Pérez *et al.* (2004) determinaron que existe cierta relación entre la incidencia y el tipo de patrón de dispersión, determinando que las bajas incidencias se asocian a tipos de patrón aleatorio, y por el contrario altas incidencias a patrones agregados.

2.7.3. Incidencia de plantas con síntomas de virosis e índice de dispersión

Se tuvo una incidencia de plantas con síntomas putativos a virus de 0.35, 0.52, 0.7 y 0.96 % en los tratamientos M, N+AH, SC y T, respectivamente. Estos porcentajes son menores comparados con los reportados por Ochoa *et al.* (1993) para crisantemo 'Polar' en Villa Guerrero, estado de México, debido quizá a las condiciones ambientales diferentes así como al hecho de que esta última variedad es más susceptible a la infección por TSWV el cual es el virus más frecuentemente encontrado en las zonas productoras de crisantemo de México (Cárdenas, 1994).

Entre tratamientos podemos observar los extremos, donde el tratamiento M presenta una incidencia de 0.35 % mientras que el tratamiento T un 0.96 %. Ramírez *et al.* (2006) encontró disminución de la concentración de TSWV en plantas de jitomate con la aspersion de ácido acetil salicílico, miel, melaza o la combinación de ácido acetil salicílico +melaza y ácido acetil salicílico +miel. La miel ha sido una alternativa como complemento a los nutrimentos clásicos en las plantas (Enríquez, 2000; Reyes, 2008), su aplicación disminuye los efectos

posibles por estrés nutrimental, siendo una alternativa en el manejo de enfermedades virales.

La teoría de la trofobiosis, postula, entre otras cosas, una planta que se encuentre en equilibrio nutrimental es más tolerante a plagas y enfermedades (Chaboussou, 1967). En este caso la aplicación de N+ AH estaría disminuyendo los efectos de un posible estrés nutrimental.

En el caso de *Saccharomyces cerevisiae* pudiera tener un efecto en la RSA (resistencia sistémica adquirida) que es inducida por agentes bióticos como virus, bacterias u hongos atenuados o abióticos como compuestos químicos que se asocia al incremento de la concentración de la fitohormona salicilato y a la producción de proteínas relacionadas con patogénesis (Kloepper, *et al.*, 2004). Ruvalcaba (2008) concluye que la aplicación de *Saccharomyces cerevisiae* tiene potencial como inductor de resistencia ya que plantas inoculadas con el *Cucumber mosaic virus* y asperjadas con *S. cerevisiae* fueron negativas en la prueba de DAS-ELISA.

Con base en el cálculo del índice de dispersión Morisita ($I\delta$) en los tratamientos M, N+AH, SC y T se presentó un patrón de dispersión aleatorio. Góngora (2004) en el análisis espacio temporal del CTV en huertos de Tamaulipas, indica que el cambio de patrón de dispersión de agregados a aleatorio se debe a la erradicación realizada de árboles positivos al virus, sin embargo, en un futuro el tipo de patrón aleatorio puede retornar a un patrón agregado. Esto se relaciona a

lo detectado en la presente investigación, ya que el productor aplica el principio de erradicación eliminando las plantas las cuales mostraron síntomas de virosis (tanto plantas madre, esquejes y plantas para producción de flor) de esa manera se disminuye la incidencia de plantas con síntomas putativos a virus.

Pérez *et. al.* (2004) en su estudio del patrón espacio temporal del amarillamiento letal del cocotero con base a los índices de Morisita y Lloyd encontraron un patrón al azar de palmas enfermas y después se presenta un patrón agregado que sugiere que el patógeno se dispersa de palma a palma dentro de la plantación como consecuencia del incremento del número de vectores que han adquirido al patógeno, caso similar con Góngora (2004) y de manera parcial a los resultados encontrados en la presente investigación.

La aleatoriedad indicada con el índice de dispersión puede deberse a la infección asintomática de esquejes.

2.7.4. Conteo poblacional de trips, minador y mosca blanca

No se observaron diferencias estadísticas entre tratamientos en el número de insectos capturados en trampas pegajosas amarillas (Cuadro 3), debido a lo cual se graficó el número promedio de estos insectos con el propósito de mostrar los incrementos poblacionales y su relación con la temperatura y las aplicaciones de agroquímicos que se hicieron (Figura 3). En los tratamientos M, N+AH y SC se realizaron tres aplicaciones con agroquímicos sintéticos (a los 31, 52, y 75 días

después del trasplante) debido a un incremento en la población trips, minador y mosca blanca (Figura 3).

Cuadro 3. Número promedio de trips, mosca blanca y minador registrados en trampas amarillas pegajosas en plantas de crisantemo 'Harman' sometidas a tratamientos, Tequexquahuac, Texcoco, Estado de México, 2010.

Tratamiento	Número de insectos		
	Trips	Minador	Mosca blanca
Miel 2%	31.48 a	23.3 a	44.30 a
Nitrógeno + ácidos húmicos	30.22 a	20.9 a	41.33 a
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35.96 a	26.6 a	49.59 a
Testigo	37.37 a	36.52 a	52.11 a

*Medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente (DMS, $\alpha = 0.05$).

En la figura 3 se muestra la temperatura media diaria registrada durante el ciclo de cultivo del crisantemo 'Harman' de la presente investigación.

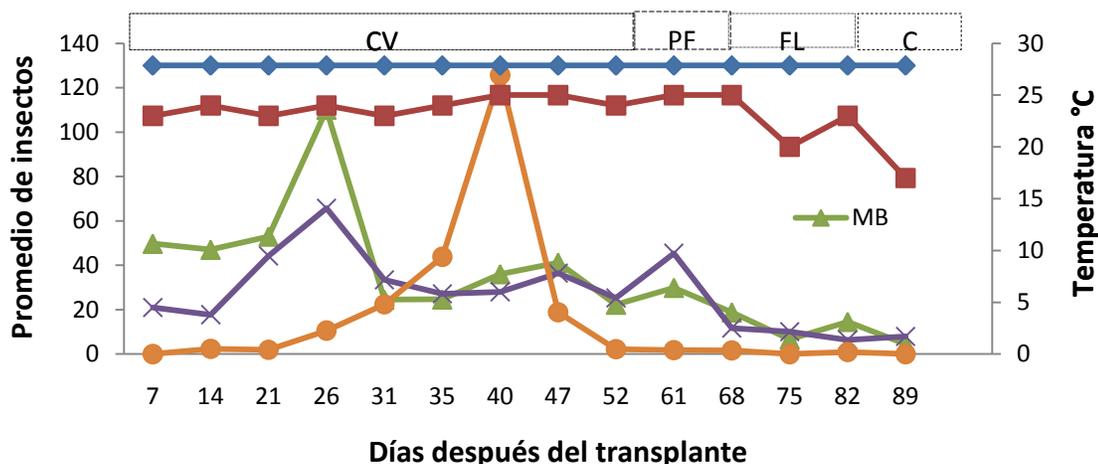


Figura 3. Fluctuación poblacional promedio de trips, minador, mosca blanca de los diferentes tratamientos y temperatura media diaria registradas en el ciclo de cultivo de crisantemo *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. 'Harman' en los meses abril- julio 2010. **TR:** trips, **MN:** minador, **MB:** mosca blanca, **T MED:** temperatura media semanal, **CV:** crecimiento vegetativo, **PF:** prefloración, **FL:** floración y **C:** cosecha. **Aplicaciones:** se refiere a las fechas en las que se aplicó algún insecticida o acaricida por parte del productor.

Caro (2003) en su investigación en dos parcelas de chile morrón 'Guardián' donde comparo dos métodos de combate de mosca blanca; convencional con 45 aplicaciones de insecticidas de amplio espectro (avermectina, carbaril, cipermetrina, clorpirifos, diazinon, dimetoato, endosulfan, imidacloprid, malation, metamidofos, naled, oxamil, paration metílico y permetrina) y el control bioracional con siete aplicaciones incluyendo productos bioracionales (azadiractina, extracto de ajo, imidacloprid, jabón agrícola, malation y endosulfan), encontró que la

densidad poblacional de adultos, huevecillos y ninfas de mosca blanca fue igual en el combate convencional y control bioracional. Resultados similares a los obtenidos en la presente investigación, donde los tratamientos M, N+ AH y SC a base de productos bioracionales presentan estadísticamente igual número de trips, minador y mosca blanca, con respecto al tratamiento T.

Como se sabe, la actividad agrícola es la que consume más plaguicidas, por lo que se considera que este sector productivo es el de mayor exposición a estos contaminantes (Hernández *et al.* 2007). Las formas de exposición a los plaguicidas para los humanos y los animales comprenden la ingesta de alimento contaminados, aun que este no sea un factor directo en la floricultura, la absorción dérmica y la inhalación de vapores emitidos cuando los plaguicidas son rociados en el entorno, si son un factor inmediato de intoxicación (Jury *et al.*, 1983).

En México según el Sistema Único de Información para la vigilancia Epidemiológica (SUIVE), las intoxicaciones agudas por plaguicidas han mostrado tendencia ascendente, reportándose 3849 casos para el año 2003, cifra que se incrementó a 3902 para el 2005. En el estado de México su incidencia ha oscilado, reportándose 73 casos para el año 2002, cifra que se incrementó a 127 en el 2003 y disminuyó a 88 en el año 2005 (Hernández *et al.*, 2007).

Por ello, se propone implementar el manejo bioracional, el cual se basa en acciones de interferencia, distracción, repelencia y supresión como estrategias

inocuas al ambiente y la salud humana. El cual, en esta investigación es evidente el mismo efecto de control que un manejo convencional.

2.7.5. Relación beneficio/costo

Los costos de producción de los tratamientos M, N+AH, SC y T fueron de \$ 2,082.62, \$ 1,786.37, \$ 1,994.02 y \$ 2, 751.65, respectivamente (Cuadro 4). La diferencia en el costo de producción se debió principalmente al uso de insecticidas: Folimat®, Lannate®, Neomectin®, Agrimec® y Trigard® en el tratamiento T con un costo de \$ 1,771.47, en cambio en los tratamientos M, N+AH y SC sólo se requirió de aplicaciones de emergencia, con un costo de \$ 316.98.

Ortega (2001) menciona que actualmente el uso de productos botánicos o repelentes orgánicos sobre salen como táctica para el control de plagas, existen diversos productos biofungicidas comerciales a base de *Trichoderma*, gracias a que es un organismo de fácil aislamiento y cultivo a gran escala, también una gama de bioinsecticidas a base de *Beauveria bassiana*, dichos productos ya se encuentran de fácil acceso en agrícolas de agroquímicos. En el caso de productos comerciales a base de sustancias vegetales Rodríguez y Djar (2008) mencionan que su efecto puede ser variable debido que un no hay un control de calidad y oficialmente no están autorizados en varios países en la agricultura orgánica, sin embargo en el mercado existen diversos productos.

Cuadro 4. Costos por tratamiento del cultivo de crisantemo 'Harman', Tequexquihuac, Texcoco, estado de México. Ciclo abril- julio 2010. **M:** miel de abeja al 2%; **N+AH:** nitrógeno + ácidos húmicos; **SC:** *Saccharomyces cerevisiae*; **T:** Testigo regional.

Actividades	M	N+AH	SC	T
Uso de insecticidas y acaricidas				
Costo de insecticidas y acaricidas	\$ 316.98	\$ 316.98	\$ 316.98	\$ 1,771.47
Uso de fungicidas				
Costo de fungicidas				\$ 108.06
Uso de fertilizantes				
Costo fertilizantes	\$ 365.55	\$ 326.55	\$ 326.55	\$ 326.55
Uso de productos alternativos				
Costo de repelentes y entomopatógeno	\$ 371.97	\$ 371.97	\$ 371.97	
Costo de hongo antagónico	\$ 91.00	\$ 91.00	\$ 91.00	
Costo Miel de abeja Great value ®	\$ 336.00			
Costo Kendal®		\$ 78.75		
Costo Tradipan®			\$ 286.36	
Labores del cultivo				
Costo labores de cultivo	\$ 601.12	\$ 601.12	\$ 601.16	\$ 545.57
Total	\$ 2,082.62	\$ 1,786.37	\$ 1,994.02	\$ 2, 751.65

Cuadro 5. Relación beneficio/costo de los tratamiento del cultivo de crisantemo 'Harman', Tequexquinahuac, Texcoco, estado de México. Ciclo abril- julio 2010. **M:** miel de abeja al 2%; **N+AH:** nitrógeno + ácidos húmicos; **SC:** *Saccharomyces cerevisiae*; **T:** Testigo regional.

Tratamiento	Rendimiento Docenas	Ingreso Bruto	Costo de producción	Rentabilidad	B/C
M	93	\$ 3,255.00	\$ 2,082.62	\$ 1, 172.38	0.56
N+AH	94	\$ 3, 290.00	\$ 1,786.37	\$ 1, 503.63	0.84
SC	95	\$ 3, 325.00	\$ 1,994.02	\$ 1, 330.98	0.66
T	92	\$ 3,220.00	\$ 2, 751.65	\$ 468.35	0.14

Como se aprecia en el Cuadro 5 la relación beneficio/costo en el tratamiento N+AH fue la de mayor valor, pues por cada peso de costo de producción se obtuvo \$ 0.84 de ganancia neta. Mientras que los tratamientos M, SC y T obtuvieron \$ 0.56, 0.66 y 0.14, respectivamente.

La miel de abeja y la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) son productos de fácil acceso para el agricultor en la zona, en cambio el producto comercial Kendal® solo se adquiere por perdido, ya que no es demandado en el mercado por los productores, debido a su costo y pago en una sola exhibición, sin embargo, la dosis requerida es mínima y la ganancia neta en comparación con los otros tratamientos es mayor (Cuadro 5).

Las ventajas de los productos bioracionales, como los utilizados en esta investigación, es que los patógenos tienden a desarrollar menor resistencia a productos microbianos que a productos químicos, la especificidad de su actuación y cuidado al medio ambiente (Boyetchko *et. al.*, 1998).

A pesar de que la efectividad de los productos bioracionales no alcance por lo general el 100 % de control, su aplicación junto a otros productos alternativos e incluso químicos, pero estos últimos de manera racional, permitirá obtener rendimientos satisfactorios sin perjudicar la salud humana y el medio ambiente.

2.8. CONCLUSIONES

Los suelos tratados con *Trichoderma harzianum* tuvieron una menor presencia de hongos fitopatógenos y oomicetos.

Se presentó una incidencia de plantas marchitas de 0.78, 0.78, 0.0 y 3.56 % en los tratamientos M, N+AH, SC y T, respectivamente, con un patrón en agregados.

La incidencia de plantas con síntomas putativos a virus fue de 0.35, 0.52, 0.7 y 0.96 % en los tratamientos M, N+AH, SC y T, respectivamente, con un patrón de dispersión aleatorio.

No se observaron diferencias entre tratamientos en el número de trips, minador y mosca blanca.

El mejor valor de ganancia neta se obtiene con el tratamiento nitrógeno+ ácidos húmicos con un valor de 0.84.

2.9. LITERATURA CITADA

- Baird, E. R., Watson, E. C. y Scruggs, M. 2003. Relative longevity of *Macrophomina phaseolina* and associated mycobiota on residual soybean roots in soil. *Plant Disease* 87:563-566.
- Barnett, H. T. and Hunter, B. B. 1998. Illustrated genera of Imperfect fungi. Fourth Edition. APS Press. 218 p.
- Bengston, G., Boeddeker, K. W., Hanseen, H. P. and Urbasch, I. 1992. Recovery of 6-pentyl- α pyrone from *Trichoderma viride* culture medium by pervaporation. *Biotechnol. Tech.* 6 (1): 23-26.
- Bentz, J., and Larew, H. G. 1992. Ovipositional preference and Nymphal performance of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) on *Dendranthema grandiflora* under different fertilizer regimens. *J. Econ. Entomol.* 85(2): 514-517.
- Boyetchko, S., Pedersen, E., Punja, Z. and Reddy, M. 1998. Formulation of biopesticides. Hall F. R. and Barry J. W. (Ed). In: Environmentally safe approaches. Human Press, Totowa, New Jersey. (5): 487-508
- Caro M., P. H. 2003. Manejo de las plagas de chile morrón mediante controles convencional y biorracional en el Valle de Culiacán, Sinaloa. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. 68 p.
- Campbell, C. L. and Madden, L. V. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley and Sons, New York. 532 p.

- Chau, A. and Heinz, K. M. 2006. Manipulating fertilization: a management tactic against *Frankliniella occidentalis* on potted chrysanthemum. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 120 (3): 201-209.
- Chaboussou, F. 1967. La trophobiose ou les rapports nutritinels entre la plante hôte et ses parasites. *Ann. Soc. Ent. Fr.* 3(3): 797-809
- Cook, J. R. and Baker, K. F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society. 539 p.
- Dobersky, J. W. 1981. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *Scolytus scolytus* of temperature and humidity on infection by *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. *J. of Invertebrate Pathology* 37: 195-200.
- Enríquez, M. A. 2000. Uso de la miel de abeja en la producción de jitomate y chile. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. 115 p.
- Ezziyyani M., Pérez S., C., Sid Ahmed A., Requena, M. E. y Candela M. E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el control de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). *Annales de Biología* 26:35-45.
- Erwin, D. C., and Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press. Minnesota, the United States of America. 562 p.
- Estay, P. 1996. Control alternativo de plagas en la agricultura orgánica chilena. *In*: Seminario Internacional. Producción y comercialización de productos orgánicos. 30 – 31 Mayo. Santiago, Chile. 35 p.

- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2002. Manual práctico: Manejo integrado de plagas y enfermedades en cultivos hidropónicos en invernadero. Proyecto TCP/ECU/066 (A). p.33.
- Flores, A., Chet, I. and Herrera E., A. 1997. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over- expresión of the proteinase- encoding gene prb 1. Current Genetics 31: 30-37.
- Gioanetto, F. y Cerna, E. 2000. Desarrollo actual de las investigaciones alelopáticas y de la producción de insecticidas botánicos en Michoacan (México). En: Memorias de VI simposio nacional sobre sustancias vegetales y minerales en el combate de plagas. Rodriguez H., C. (ed.). Acapulco, Gro. México.
- Gómez C., R. 2003. La fertilización foliar de silicio y miel de abeja como alternativas para el control de la marchitez (*Fusarium oxysporum* Brot.) en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot). Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. México. 86 p.
- Góngora C., C. C. 2004. Regionalización, riesgo de establecimiento y caracterización espacial de focos del *Citrus tristeza closterovirus* en Tamaulipas, México. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. México. 145 p.
- Hernández G., M. M., Jiménez G., C., Jiménez A., F. R. y Arceo G., M. 2007. Caracterización de las intoxicaciones agudas por plaguicidas: perfil ocupacional y conductas de uso de agroquímicos en una zona agrícola del estado de México, México. Revista Internacional Contaminación Ambiental. 23 (4): 159-167

- Howell Jr, H. N. and Andrews K. L. 1989. Utilización de métodos físicos y mecánicos. En: Andrews, K. L. y Quezada J. R. (Eds.) 1989. Manejo integrado de plagas insectiles en la agricultura: estado actual y futuro. Departamento de protección vegetal. Escuela agrícola panamericana. El Zamorano, Honduras. pp. 255-260.
- Huerta P., R. A. 2000. Diagnóstico agroecológico del cultivo de crisantemo en Texcoco, México y propuesta de manejo para el control de plagas. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México. 170 p.
- Ibarra M., V. A. 2008. Aislamiento y selección de cepas de *Trichoderma* para el control biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *Sclerotinia minor* Jagger. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. 88 p.
- IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). 2006. Protocolo estandarizado de ofertas tecnológicas para el cultivo del cacao en el Perú. Lima, Perú. 75 p.
- Jury W. A., Spencer W. F. and Farmer W. J. 1983. Use of models for assessing relative volatility, mobility and persistence of pesticides and other trace organics in soil systems. En: Hazard Assessment of Chemicals: Current Developments. Vol. 2. Academic Press, San Diego. pp: 10-43
- King, E. G. 1996. Control de insectos y ácaros. En: Avances recientes en la biotecnología en *Bacillus thuringiensis*. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. 209 p.
- Klement Z., Rudolph K. and Sands D. C. 1990. Methods In Phytobacteriology. Académiai I Kiadó - Nyomda Vállalat. Budapest, Hungary. pp. 99-100.

- Kloepper, J. W., Choong-Min, R. and Zhang, S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus spp.* in Agricultural systems. *Phytopathology* 94:1259-1266.
- Lagunes T., A y Villanueva J., J. A. 1999. Toxicología y manejo de insecticidas. Colegio de Postgraduados. México. pp.103-113.
- Mukerji, K. G. and Garg K. L. 1988. Biocontrol of plant diseases, Vol. 1. CRC Press, Inc. Florida. The United States of America. 211 p.
- Olanya, O. M. and Cambell, C. L. 1988. Effect of tillage on spatial pattern of microsclerotia of *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology*. 78:217-221
- Painter, R. H. 1951. Insect resistance in crop plants. Lawrence, KS: University of Kansas Press. 520 p.
- Pandya, H. A. and Saxena, O. P. 2001. Preservation of *Chrysanthemum* sp. by drying. *Acta Horticulturae* 543: 367-370.
- Pérez H., O., Góngora C., C. C., Medina L., M. F., Oropeza S., C., Escamilla B., J. A. y Mora A., G. 2004. Patrón espacio temporal del amarillamiento letal en cocotero (*Cocos nucifera* L.) en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 22(2): 231-238
- Ponz, F. 2000. Resistencia a virus de plantas. *In: Patología vegetal*. G. Llácer, M.M. López, A. Trapero, A. Bello (Eds.). Ed. Phytoma España S. L. España. pp. 101-118.
- Ramírez F. J., Ochoa M., D. L., Rodríguez M., M. N. y Mora A., G. 2006. Efecto del ácido acetil salicílico, miel y melaza en la movilidad y concentración de TSWV. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 12 (2): 239-243.

- Reyes O., M. 2008. Efecto de miel, aminoácidos, ácido acetilsalicílico y *Bacillus subtilis* contra *Cucumber mosaic virus* en calabacita, efecto de terpenoides en la infección causada por *cucumber mosaic virus* (CMV) en calabacita y determinación del contenido total de estos compuestos en un material tolerante y uno susceptible a CMV. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. 54 p.
- Rodríguez H., C. y Djair V., J. 2008. Substancias vegetales para el manejo de las moscas blancas. En: moscas blancas temas selectos sobre su manejo. Mundi Prensa. pp: 83-102
- Rodríguez H. C. 2000. Plantas contra plagas. Potencial práctico de ajo, anona, nim, chile y tabaco. RAAPAN.RAAA. México. 133 p.
- Samaniego G., J. A. y Chew M., Y. 2007. Diversidad de géneros de hongos del suelo en tres campos con diferente condición agrícola en la Laguna, México. Revista Mexicana de Biodiversidad. 78: 383-390
- Santamaría A., Costa C. J., Alonso A., Rodríguez J., M. y Ferrer, J. 1998. Ensayo del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin para el control de la mosca blanca de los cítricos *Aleurothrixus floccosus* (Maskell) (Homoptera: Aleyrodidae) y su acción sobre el parásito *Cales noacki* (Howard) (Hymenoptera: Aphelinidae). Boletín Sanidad Vegetal Plagas (24): 695-706.
- Salisbury, B. F. y Ross, W. C. 1994. Fisiología vegetal. Traducción español González V., V. Iberoamericana. México, D.F. 749 p.

- Sandoval, C. 1997. Regulación biológica de enfermedades. *In*: Paillán, H. (ed). Curso Taller Horticultura orgánica perspectivas y oportunidades. 23–24 Septiembre. Talca, Chile. pp: 41 – 48.
- Shipton, P. J. 1977. Monoculture and soilborne plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 12:387-407.
- Sid Ahmed A., Pérez S., C. y Candela, M. E. 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *European Journal of Plant Pathology*. 106: 817-824.
- Snyder, W. C. and Hanssen, H. N. 1940. The species concept in *Fusarium*. *American Journal Botanical*. 27: 64-67.
- Steiner, G. W., Watson, R .D. 1965. Use of surfactants in the soil dilution and plate count method. *Phytopathology*. 55: 728-730.
- Tanada, Y. and Kaya, H. K. 1993. *Insect Phathology*. Academic Press, London. 666 p.
- Van Emden, H. F. 1966. Studies on the relations of insect and host plant. III. A comparison of the reproduction of *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae* on Brussels sprout plants supplie whit different rates of nitrogen and potassium. *Entomolo. Exp. Appl.* 9:440-460
- Van Emden, H. F. 1977. *Control de plagas y su ecología*. Ed. Omega, S.A. Barcelona, España. 65 p.
- Van iersel, M. W., Oetting, R. D. and Hall, D. B. 2000. Imicacloprid applications by subirrigation for control of silverleaf whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) on poinsettia. *J. Econ. Entomol.* 93(3): 813-819.

- Velasco V., V. A. 1999. Papel de la nutrición mineral en la tolerancia a las enfermedades de las plantas. *Terra* 17(3):193-200.
- Vélez L. E. 1974. Parasitocidas agrícolas. Departamento de Parasitología Agrícola. Escuela Nacional de Agricultura. Chapingo, México. 397 p.
- Venegas, R. 1996. La transición. Diseño de sistemas sustentables de producción agropecuaria. *In*: seminario Internacional. Producción y comercialización de productos orgánicos. Santiago, Chile. 25 p.
- Verma, A. K., Gupta, Y. C., Dhiman, S. R. y Thakur, K. S. 2007. Influence of nitrogen and potassium levels and holding solutions on postharvest quality of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) cut flowers. *Journal of Ornamental Horticulture*, 10(4):222-228.

CAPITULO 3. PRODUCTOS BIORACIONALES EN LA CALIDAD COMERCIAL DE FLOR DE CRISANTEMO 'Harman'

3.1. RESUMEN

Se evaluó el efecto de la miel, *Saccharomyces cerevisiae* y nitrógeno + ácidos húmicos en el diámetro y color de inflorescencia, altura y diámetro de tallo, el contenido de macro y micronutrientes, peso de biomasa seca por planta y determinación indirecta del contenido de clorofila en tejido foliar de crisantemo 'Harman'. Se tuvo un diseño experimental de bloques completos al azar con cuatro tratamientos y tres repeticiones. Los tratamientos evaluados fueron: miel de abeja al 2 % (M), nitrógeno + ácidos húmicos (N+AH), *S. cerevisiae* (SC) y testigo regional (T). En los tratamientos M, N+AH y SC se aplicó repelente orgánico contra insectos y ácaros, así como *Beauveria bassiana* para control de trips. El tratamiento T consistió en el manejo convencional del cultivo como lo hace el productor con aplicaciones calendarizadas de agroquímicos. Se utilizó el programa estadístico SAS® System for Windows 9.0 para realizar el análisis de varianza de los datos de altura y diámetro de tallo, diámetro de inflorescencia y peso de biomasa seca; en los casos donde hubo diferencia se utilizó la prueba de diferencia mínima significativa ($\alpha=0.05$). El color de inflorescencia se comparó de manera visual con las cartas de la Royal Horticultural Society (2007) of London in association with the Flowers Council of Holland. El contenido de macro y micronutrientes así como la concentración relativa de clorofila se comparó entre los diferentes tratamientos. Se encontró mayor altura de tallo en el tratamiento T, mientras que el tratamiento N+AH registró el mejor valor en diámetro de tallo,

diámetro de inflorescencia y peso de biomasa seca por planta, seguido por el tratamiento M. El color de inflorescencia fue el mismo en todos los casos.

Palabras clave: *Dendranthema grandiflorum*, peso biomasa seca, análisis de tejido vegetal, concentración de clorofila.

3.2. ABSTRACT

The effect of honey, *Saccharomyces cerevisiae* and nitrogen + humic acids was evaluated on diameter and colour of inflorescence, height and stem diameter, content of macro and micronutrients, dry weight of plants and indirect determination of chlorophyll content in leaf tissue of chrysanthemum cv. 'Harman'. There were four treatments with three replications arranged under a random block design. The treatments were: honey 2% (H), nitrogen + humic acid (N + HA), *S. cerevisiae* (SC) and control (C). An organic repellent against insects and mites and *Beauveria bassiana* for control of thrips were applied in treatments H, N + HA and CS. Control consisted of conventional crop management in which the pesticide application is done weekly. The statistical program SAS ® System for Windows 9.0 was used for the analysis of variance for height and stem diameter, diameter of inflorescence and dry weight of plants. The least significant difference test ($\alpha = 0.05$) was used if differences were observed among treatments. The colour of inflorescence was compared visually with colour charts of the Royal Horticultural Society of London in association with Flower Council of Holland 2007. The content of macro and micronutrients and the relative concentration of chlorophyll were compared among treatments. The greater stem height was recorded in control, while N + HA treatment had the highest value in diameter of stem, diameter of inflorescence and dry weight of plant, followed by H treatment. No differences in color of inflorescence were observed among treatments.

Keywords: *Dendranthema grandiflorum*, dry weight mass, nutrient analysis, chlorophyll concentration.

3.3. INTRODUCCIÓN

El crisantemo *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. 'Harman' es una especie ornamental para flor de corte con alta demanda en el mercado (Enríquez *et al.*, 2005). Sin embargo, una limitante en su producción y calidad son los problemas fitosanitarios que se presentan a lo largo del cultivo (Bautista *et al.*, 2002).

En nuestro país, el manejo de plagas por la mayor parte de los productores se realiza con agroquímicos, mismos que son aplicados comúnmente de manera semanal independientemente de la presencia u observación de cierto insecto o síntomas causados por algún microorganismo fitopatógeno. Con menos frecuencia se realiza un manejo integrado del cultivo que incluya el uso de productos de bajo impacto ambiental que, además, sean inocuos para el productor.

Díaz *et al.* (2005) propusieron el uso de insecticidas bioracionales y mezclas de hongos a base de *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii* y *Metarhizium anisopliae*, debido a que fueron tan efectivos como los agroquímicos sobre *Bactericera cockerelli*. Ramírez *et al.* (2006) encontraron que la aplicación de miel no afecta el movimiento del *Tomato spotted wilt virus* en plantas infectadas de jitomate pero sí disminuye su concentración. Gouvea *et al.* (2009) reportaron que las aplicaciones de *Saccharomyces cerevisiae* obtenida de levadura comercial redujo la incidencia de *Botrytis cinerea* en la postcosecha de frutos de fresa.

El desbalance nutricional influye en el crecimiento y la supervivencia de los patógenos así como en la predisposición, tolerancia y resistencia de las plantas a las plagas en general, en la producción y calidad de la misma (Velasco, 1999).

Asimismo, mediante el análisis de tejido vegetal es posible determinar la concentración mineral de las plantas como un indicador de su situación nutrimental, la cual está asociada al rendimiento y mejores características del producto cosechado (Sánchez *et al.*, 2009). Por otro lado, es posible evaluar indirectamente y en forma no destructiva el estado nutricional del cultivo cuantificando el contenido de clorofila. Otra variable como el área foliar, ha sido correlacionada con la producción de biomasa seca, el metabolismo de carbohidratos, el rendimiento, la eficiencia fotosintética y la calidad de la cosecha (Bugarín *et al.*, 2002).

Se conocen ejemplos exitosos del uso de productos bioracionales en el manejo de plagas y enfermedades, sin embargo, se desconoce el efecto que pueden tener en la calidad comercial de crisantemo para flor de corte.

3.4. OBJETIVO

Conocer el efecto de la miel, *Saccharomyces cerevisiae* y nitrógeno + ácidos húmicos en el diámetro y color de inflorescencia, altura y diámetro de tallo, el contenido de macro y micronutrientes, peso de biomasa seca por planta y determinación indirecta del contenido de clorofila en tejido foliar de crisantemo 'Harman'.

3.5. REVISION DE LITERATURA

3.5.1. Calidad comercial

Las condiciones ambientales en los invernaderos donde se cultivan las plantas madre de crisantemo y donde se hace el enraizado de los esquejes, también son propicios para la incidencia de patógenos. Durante varios ciclos de propagación los patógenos pueden reducir la calidad sanitaria y vigor de las plantas, así como la calidad y valor comercial de las flores cosechadas (Enríquez *et al.*, 2005).

El concepto de calidad en ornamentales es muy amplio y ambiguo, ya que se deben satisfacer los gustos y preferencias de los consumidores. Es decir, mientras para alguien puede ser más importante el tamaño, aroma o forma del botón, para otras su coloración, la duración de la vida en florero, longitud o grosor de tallos, forma de hojas, entre otros, pueden adquirir mayor importancia (Cabezas, 2000).

Gaytán *et al.*, (2006) proponen como estándares de calidad de flor cortada para crisantemo 'Polaris' cultivada en México para mercado nacional, una inflorescencia con un diámetro de 11.4 cm, color de inflorescencia Yellow Orange en el centro y Yellow 11C en la periferia de acuerdo con las tablas de color (Royal Horticultural Society, 1973) un diámetro de tallo de 0.6 cm, 19 hojas por tallo y longitud de tallo de 104 cm.

3.5.2. Acumulación de biomasa fresca y seca

El área foliar ha sido correlacionada con la producción de biomasa seca, el metabolismo de carbohidratos, el rendimiento, la eficiencia fotosintética y la

calidad de la cosecha (Bugarín *et al.*, 2002; Díaz, 2002). Una disminución del área foliar durante la emergencia de la flor disminuye el tamaño de ésta Díaz (2002).

Los incrementos de biomasa fresca se registraron cosechando la planta completa o la parte de interés y pesándola inmediatamente antes de la pérdida de agua. De esta manera se obtiene la materia fresca, que es una cantidad variable, misma que depende del estado hídrico de la planta.

A menudo, una hoja tiene mayor masa fresca por la mañana que al medio día, simplemente a causa de la transpiración. Por otro lado, la biomasa seca de una planta se obtiene secando el material recién cortado durante 24 a 48 horas a temperaturas entre 70 y 80 °C. Sin embargo es probable que la hoja que tiene menor biomasa fresca en la tarde tenga mayor biomasa seca porque fotosintetizó y absorbió sales minerales del suelo durante la mañana (Salisbury y Ross, 1994).

3.6. MATERIALES Y MÉTODOS

3.6.1. Localización del experimento

El experimento se estableció durante los meses de abril a julio del 2010 en una sección de invernadero en producción comercial de crisantemo (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. 'Harman' ubicado en Tequexquihuac, municipio de Texcoco, Estado de México ubicado a 19° 28' 37.65" de latitud norte y 98 ° 49' 36.45 " de longitud oeste a 2480 m de altitud.

3.6.2. Diseño experimental

El ensayo se instaló bajo la concepción de un diseño experimental en bloques completos al azar con cuatro tratamientos y tres repeticiones. Se tuvieron tres camas de siembra con una longitud de 18.4 m por 1.2 m de ancho cada una, donde se efectuó el trasplante de esqueje de crisantemo 'Harman' a una distancia entre plantas de 11 x 12 cm, con una población total de 4600 plantas. Cada unidad experimental consistió en una superficie de 4.6 m de largo x 1.2 m de ancho.

3.6.3. Tratamientos y forma de aplicación

Los tratamientos evaluados fueron: miel de abeja disuelta en agua al 2 % (M), nitrógeno + ácidos húmicos (N+AH), *Saccharomyces cerevisiae* (SC) y testigo regional (T). Para la aplicación de nitrógeno + ácidos húmicos se utilizó el producto comercial Kendal® a una dosis de 1 mL L⁻¹ de agua; en el caso de *S. cerevisiae* se empleó levadura comercial para panadería de la marca Tradipan® a una dosis de 10 g L⁻¹ de agua. Estos tres productos se asperjaron al follaje hasta punto de goteo previa mezcla con el adherente Inex® a una dosis de 1.5 mL L⁻¹ de agua.

Las aplicaciones se realizaron semanalmente desde 7 días después del trasplante y hasta 7 días antes de la cosecha. Asimismo, de manera preventiva se realizaron 14 aplicaciones semanales de repelente orgánico contra insectos y ácaros, hecho a base de manzanilla, ajo y ruda (Bug balancer®) a una dosis de 5 mL L⁻¹, así como *Beauveria bassiana* (PHC® BEA TRON®) a una dosis de 2.5 g L⁻¹ para el control de trips y mosca blanca. Las plantas se manejaron a un solo tallo con una flor por planta, eliminando los botones laterales cuando el botón central tuvo un diámetro de 1.0 a 1.5 cm.

El tratamiento testigo consistió en el manejo convencional del cultivo tal como lo hace el productor, el cual básicamente consiste en la aplicación calendarizada (generalmente semanal) de insecticidas, acaricidas, fungicidas y fertilizantes o, de manera excepcional, cada 4 ó 5 días si se presenta una alta incidencia de marchitez de plantas, manchas foliares, trips o ácaros (Cuadro 1 Capítulo 2).

En este sistema la fertilización la realizó el productor cooperante, de acuerdo con un programa establecido que repite cada ciclo de cultivo. La aplicación de fertilizantes sólidos se realizó a los 30 días después del trasplante con la fórmula 46-00-00 y 18-46-00 de N-P₂O₅-K₂O a dosis de 54 g m², al voleo. De la semana dos después del trasplante a la semana 10, se aplicaron fertilizantes foliares Biozyme® y Bayfolan® a dosis comercial.

En las camas de siembra se aplicaron riegos con manguera a baja presión, cada tercer día a punto de saturación, desde el trasplante hasta la cosecha.

3.6.4. Variables respuesta

3.6.4.1. Diámetro y color de inflorescencia

A la cosecha del cultivo en cada unidad experimental se determinó el diámetro y color de inflorescencia así como el diámetro y longitud de tallo, seleccionando de manera dirigida 5 flores que se encontraban en el punto óptimo de corte, teniendo al final 15 flores evaluadas por tratamiento. Se colocó un flexómetro debajo de la inflorescencia para medir la distancia de extremo a extremo de la misma. El color de la inflorescencia se comparó de manera visual contrastándolo con las cartas Fan1 yellow, Fan4 greyed colours of yellow de la Royal Horticultural Society (2007) of London in association with the Flowers Council of Holland .

3.6.4.2. Altura y diámetro de tallo

La longitud del tallo se midió con un flexómetro desde la base del receptáculo de la inflorescencia hasta el extremo del tallo cortado. El diámetro de tallo se midió a una altura de 90 cm a partir de la base del mismo con un vernier.

3.6.4.3. Peso de biomasa seca por planta

Todos los órganos componentes (raíz, tallo, hojas e inflorescencia) de las plantas de cada tratamiento utilizadas para medir el diámetro y color de inflorescencia y longitud y diámetro de tallo, se colocaron por separado en bolsas de papel y se metieron a la estufa a 70°C por 72 h para su total deshidratación y posterior cuantificación del peso de biomasa seca en una balanza analítica.

3.6.4.4. Contenido de macronutrientes y micronutrientes

Una muestra compuesta de los órganos componentes de las plantas de cada tratamiento fue enviada al Laboratorio Central Universitario de la Universidad Autónoma Chapingo para determinar el contenido de macro y micronutrientes.

3.6.4.5. Determinación indirecta del contenido de clorofila con el SPAD

El contenido de clorofila fue determinado en la cuarta hoja madura más próxima al botón floral en 5 plantas por unidad experimental (15 plantas por tratamiento), en una zona localizada aproximadamente a la mitad de la distancia entre el pedicelo y el ápice de la hoja y a ambos lados de la mitad de la distancia entre el borde la hoja y el nervio medio. En cada caso se realizaron tres mediciones por hoja según lo indicado por Blackmer y Schepers (1995). Las lecturas se realizaron cada 10 días a partir del comienzo del llenado de botón (66 días después del trasplante) con un medidor SPAD 502 de la marca Minolta®, que cuantifica la concentración relativa de clorofila por medio de la luz transmitida a través de la hoja en 650 nm (longitud de onda fotosintéticamente activa) y 940 nm.

3. 6. 5. Análisis de datos

Los datos de diámetro y longitud de tallo, diámetro de inflorescencia y peso de biomasa seca fueron sometidos a análisis de varianza y posterior separación de medias mediante la prueba de diferencia mínima significativa ($\alpha=0.05$) utilizando el programa estadístico SAS System for Windows 9.0®.

3.7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.7.1. Diámetro y color de inflorescencia

En la comparación múltiple de medias con la prueba de diferencia mínima significativa, el tratamiento testigo (T) tuvo el menor diámetro de inflorescencia en comparación con los demás tratamientos (Cuadro 1). Flores *et al.* (2005) determinaron un diámetro promedio de la inflorescencia de crisantemo 'Polaris' de 16.5 cm que es menor al encontrado en el presente trabajo con la variedad 'Harman' por ser esta última más vigorosa.

Cuadro 1. Diámetro de inflorescencia, altura y diámetro de tallo de plantas de crisantemo 'Harman' cultivadas en invernadero con diferentes tratamientos foliares.

Tratamiento	Diámetro de inflorescencia (cm)	Altura de tallo (cm)	Diámetro de tallo (cm)	Peso de biomasa seca por planta (g)
Miel 2%	20.50 a	148.60 b	1.10 ab	35.53 a
Nitrógeno + ácidos húmicos	20.80 a	149.00 b	1.13 a	37.64 a
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20.20 ab	148.90 b	1.10 ab	31.27 b
Testigo	19.60 b	155.00 a	1.06 b	36.05 a

*Medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente (DMS, $\alpha = 0.05$).

No hubo diferencias en color de inflorescencia entre tratamientos. En todos los casos se tuvo una coloración (de acuerdo con las cartas de color Fan 1 y Fan 4 de la Royal Horticultural Society (2007) in association with the Flowers Council of Holland, White group NN 155 B en flores liguladas de la periferia, Yellow group 4B en flores liguladas de la parte media y Yellow group 1A en flores liguladas del centro, combinación que proporciona un contraste de color a la inflorescencia

atractivo y apreciado por los productores y consumidores de crisantemo (Gaytán *et al.*, 2006) (Figura 1). La disponibilidad de nitrógeno y magnesio participa en la formación de los pigmentos (carotenoides) que proporcionan el color amarillo de la inflorescencia, ya que una deficiencia limitaría la inducción y desarrollo floral (Ivanova y Vassilev, 2003; Marschener, 2002). Gaytán *et al.* (2006) para crisantemo 'Polaris' describieron la inflorescencia solo con dos campos de color; la periferia de color amarillo muy pálido (Yellow 11 C) y el centro de 4 cm de diámetro con coloración amarillo oro (Yellow-orange 17 A), utilizando como referencia las cartas de color Royal Horticultural Society (1973). En el presente estudio, a diferencia de lo observado en la variedad 'Polaris', se apreciaron tres campos de color en la inflorescencia de la variedad 'Harman'.

3.7.2. Altura y diámetro de tallo

En la comparación múltiple de medias con la prueba de diferencia mínima significativa, el tratamiento testigo (T) tuvo la mayor altura de tallo en comparación con los demás tratamientos. Por otra parte, el tratamiento nitrógeno + ácidos húmicos resultó con el mayor diámetro de tallo (Cuadro 1).

Aunque las plantas del tratamiento T tuvieron la mayor longitud de tallo, el diámetro de inflorescencia fue el más bajo, lo cual resulta desventajoso al tener una desproporción entre estas estructuras que visualmente las hace menos atractivas al consumidor (Gaytán *et al.*, 2006). El crisantemo por ser un cultivo ornamental, basa su valor en aspectos cualitativos dentro de los cuales se considera principalmente un balance entre la altura y grosor del tallo con el

diámetro y color de inflorescencia, vida poscosecha y presencia de un follaje abundante de color verde intenso sin manchas.

Arbos (1992) indica que la altura de tallo es un parámetro importante para seleccionar y clasificar flor de corte y que plantas de crisantemo con una altura mayor a 100 cm es adecuada para su comercialización. Flores *et al.* (2005) al evaluar niveles de presión osmótica en la solución nutritiva, encontraron un incremento en la altura de tallo en plantas de crisantemo 'Polaris White' de 110 a 115 cm y diámetro de tallo de 0.6 a 0.63 cm. Por otro lado, Gaytán *et al.* (2006) al evaluar el efecto de la fertilización en la altura y diámetro de crisantemo 'Polaris' determinaron que las plantas del mejor tratamiento tuvieron una altura de 104 cm y un diámetro de 0.6 cm. Con los resultados derivados del presente estudio, se proponen como parámetros de calidad para el crisantemo 'Harman' una altura y diámetro de tallo de 149 cm y 1.1 cm, respectivamente por tratarse de una variedad más vigorosa que la 'Polaris'.

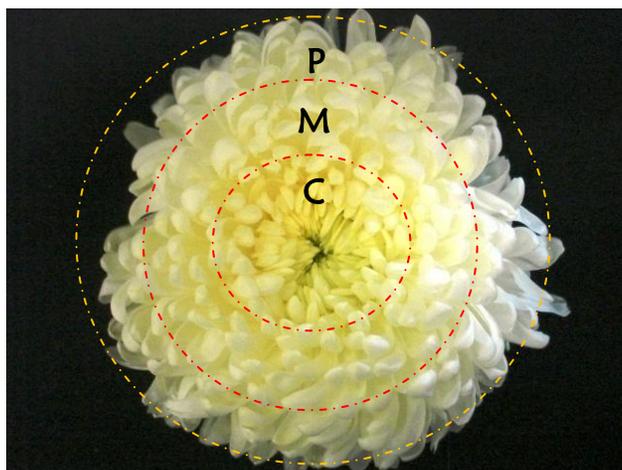


Figura 1. Coloración de inflorescencia de crisantemo *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. 'Harman' de acuerdo con las cartas de color Fan 1 y Fan 4 de la Royal Horticultural Society (2007) London in association with the Flowers Council of Holland . **P:** flores liguladas de la periferia con un color White group NN 155 B; **M:** flores liguladas de la parte media con un color Yelow group 4B; **C:** flores liguladas del centro con un color Yelow group 1A.

3.7.3. Peso de biomasa seca por planta

En la comparación múltiple de medias con la prueba de diferencia mínima significativa, se observó que los tratamientos M, N+AH y T tuvieron los mayores valores de peso de biomasa seca por planta (Figura 2). En el caso de órganos, el tallo representa la porción mayor constituyente del peso de biomasa seca por planta, seguido por el tejido foliar. Vega *et al.* (2001) al trabajar con girasol, determinaron que existe una asociación entre el contenido de nitrógeno con la acumulación de biomasa seca. Se sabe que los ácidos húmicos y fúlvicos son los

principales constituyentes de la materia orgánica en avanzado estado de descomposición que contribuyen al incremento de la capacidad de intercambio catiónico y tienen un efecto auxiliar en el crecimiento vegetal al ser una fuente primaria y activador de los componentes que las plantas utilizan en su metabolismo además de incrementar la asimilación de N (Nieves *et al.*, 2002). Si bien en el tratamiento T se tuvo estadísticamente un peso de biomasa seca similar al del tratamiento N+AH, en el primer caso hubo mayor altura de tallo y menor diámetro de inflorescencia que origina un desbalance entre estas estructuras que pueden afectar su calidad visual, en contraste con el tratamiento N+AH en el cual se tuvo un mayor diámetro de inflorescencia y de tallo.

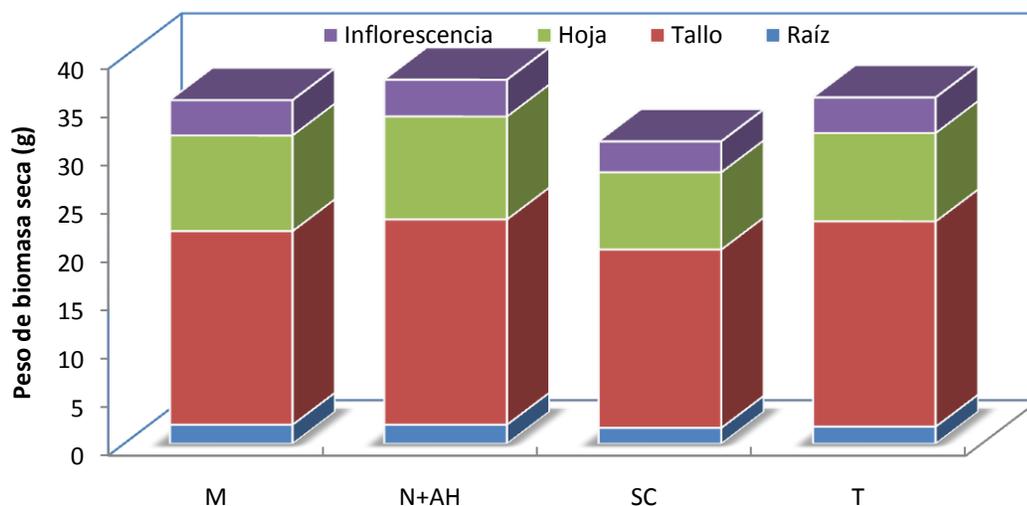


Figura 2. Contribución de cada órgano al total de peso de biomasa seca (g) por planta de crisantemo *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. 'Harman' cultivadas en invernadero con diferentes tratamientos foliares. **M**: miel de abeja al 2%; **N+AH**: nitrógeno + ácidos húmicos; **SC**: *Saccharomyces cerevisiae*; **T**: Testigo regional.

Asofeifa y Moreira (2005) determinaron el peso seco y se analizaron el contenido de N, P, K, Ca, Mg y S, en cada sección de la planta de chile dulce, encontrando que el contenido de N, K, Ca y Mg es mayor en tallos y hojas.

Gaytán *et al.* (2006) analizaron el peso de biomasa seca con el contenido de macro y micronutrientes en tejidos vegetales de crisantemo 'Polaris' por partes de planta, clasificando en tallo parte basal (TPB), tallo parte apical (TBA), hoja parte basal (HPB) y hojas parte apical (HPA) encontrando que la TPB y TPA presenta el mayor peso de biomasa seca pero no el mayor contenido de macro y micronutrientes.

3.7.4. Contenido de macro y micronutrientes

Los resultados del análisis de tejido vegetal (Cuadro 2) muestran que en los tratamientos M y SC se promueve una alta acumulación de Fe, lo cual coincide con lo reportado por Gaytán *et al.* (2006) donde obtuvieron mayor contenido de este elemento en tejido vegetal de HPB y HPA. El Fe es un elemento esencial que participa en la síntesis de clorofila, en el funcionamiento y estructura del cloroplasto. Una deficiencia de Fe ocasiona una baja síntesis de clorofilas, carotenos y xantofilas, lo cual afecta la actividad de transportadores de electrones en los fotosistemas (Alcántar *et al.*, 2009).

Cuadro 2. Contenido de macro y micronutrientos en tejido vegetal de plantas de *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. 'Harman' cultivadas en invernadero con diferentes tratamientos foliares, Tequexquihuac, Texcoco, Estado de México, 2010.

Tratamiento*	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	Fe mg Kg ⁻¹	Cu mg Kg ⁻¹	Zn mg Kg ⁻¹	Mn mg Kg ⁻¹	B mg Kg ⁻¹
M	1.73	0.43	2.73	0.97	0.32	665.75	0.74	65.43	17.7	64.09
N+AH	1.62	0.63	2.91	1.56	0.5	140.78	2.93	65.4	22.48	54.97
SC	1.42	0.47	2.41	1.17	0.38	424.7	3.93	42.8	15.8	40.67
T	1.12	0.42	1.85	1.02	0.31	85.8	6.13	18.95	17.18	55.45

***M**: miel de abeja al 2%; **N+AH**: nitrógeno + ácidos húmicos; **SC**: *Saccharomyces cerevisiae*; **T**: Testigo regional.

Reyes (2008) evaluó en invernadero el efecto de la miel, ácido acetil salicílico, aminoácidos y *Bacillus subtilis* en la concentración y severidad de *Cucumber mosaic virus* (CMV), peso de biomasa fresca, contenido total de triterpenos y contenido de nutrientes en calabacita variedad grey Zucchini y encontró que el tratamiento con miel tuvo el mayor contenido de Fe, Zn y Mn lo cual es similar a lo encontrado en el presente trabajo.

Considerando el diagnóstico visual con base en los resultados de los análisis de suelo (Cuadro 1 del Capítulo 1), la cantidad de nutrientes aplicados durante la fertilización y los resultados del análisis de contenido de macro y micronutrientos (Cuadro 2) en tejido vegetal se establece que las plantas tuvieron un nivel adecuado de nutrición al no observarse deficiencias o toxicidad por algún elemento.

3.7.5. Determinación indirecta del contenido de clorofila con el SPAD en hojas

Las unidades SPAD encontradas en crisantemo 'Harman' en los diferentes tratamientos se encontraron en un rango de 36 a 54 durante el llenado del botón y floración (Figura 3). La tonalidad verde en las hojas es característica específica de cada especie vegetal. Marquard y Tipton (1987) encontraron valores de SPAD de 12 a 40 en espinacas y de 3 a 54 en otros cultivos evaluados. Asimismo, Rodríguez *et al.* (1998), al evaluar diferentes tonalidades de color verde en tomate encontraron valores mínimos y máximos de 7.73 y 53.93 unidades SPAD, respectivamente.

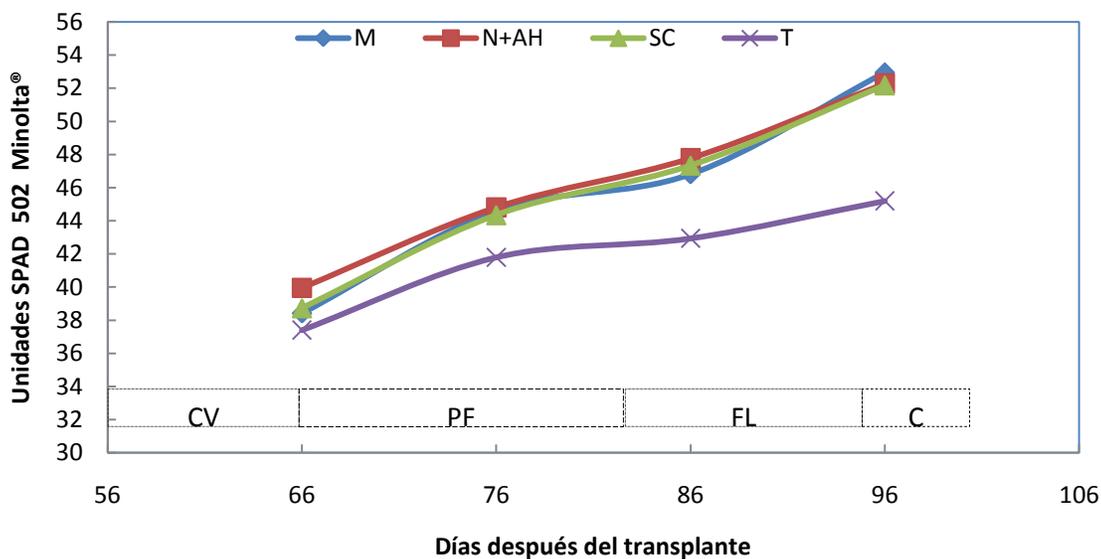


Figura 3. Determinación indirecta de clorofila (Unidades SPAD 502 Minolta®) durante el llenado de botón, floración y cosecha en plantas de crisantemo *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. 'Harman' cultivadas en invernadero con diferentes tratamientos foliares, Tequexquinahuac, Texcoco,

Estado de México, 2010. **M**: miel de abeja al 2%; **N+AH**: nitrógeno + ácidos húmicos; **SC**: *Saccharomyces cerevisiae*; **T**: Testigo regional. **CV**: crecimiento vegetativo, **PF**: prefloración, **FL**: floración y **C**: cosecha.

En los tratamientos M, N+AH y SC se observa un comportamiento ascendente y mayor en la determinación indirecta de clorofila que en el tratamiento T. Villar y Ortega (2007) indican que la concentración de clorofila y el contenido de N presentan una relación directa y que la presencia de este elemento determina el nivel de verdor en las hojas y la eficiencia de los procesos fotosintéticos que se realizan en ellas.

Se sabe que existe una alta correlación entre los contenidos de clorofila y de nitrógeno total con las unidades SPAD en especies leguminosas, gramíneas, frutales y hortícolas (Reeves *et al.*, 1993) pero hay poca información en el caso de ornamentales. En maíz se ha encontrado un incremento en los niveles de clorofila, cantidad de materia seca y rendimiento asociados con altos contenidos de nitrógeno (Mendoza *et al.*, 2006), lo cual no se observó en este trabajo ya que todos los tratamientos tuvieron valores similares de nitrógeno y un contenido mayor de clorofila, excepto en el tratamiento testigo que tuvo el valor más bajo de este pigmento. En tomate se encontraron los niveles más altos de clorofila y nitrógeno a los 45 días después del trasplante los cuales fueron disminuyendo con el desarrollo del cultivo (Mendoza, 1998), observaciones que contrastan con las registradas en este trabajo en el caso de la clorofila donde se tuvo el mayor contenido prácticamente en la cosecha.

En el caso de ornamentales, Zamora (2001) encontró una alta correlación entre el contenido de N y las lecturas obtenidas con el medidor portátil de clorofila SPAD 502 en hojas recientemente maduras de *Anthurium andreanum*, con un valor máximo alcanzado de 41.48, determinado por la cantidad de fertilizante nitrogenado aplicado a dosis de 375 y 450 Kg ha⁻¹.

3.8. CONCLUSIONES

El tratamiento nitrógeno + ácidos húmicos tuvo el mayor diámetro de inflorescencia. En todos los casos se tuvo una coloración White group NN 155 B en flores liguladas de la periferia, Yellow group 4B en flores liguladas de la parte media y Yellow group 1A en flores liguladas del centro.

El tratamiento testigo regional tuvo la mayor altura de tallo, mientras que el tratamiento nitrógeno + ácidos húmicos registró el más alto valor en diámetro de tallo.

En cuanto a peso de biomasa seca por planta los valores más altos se presentaron en los tratamientos miel de abeja al 2%, nitrógeno + ácidos húmicos y testigo regional.

El contenido nutrimental en tejido vegetal de los tratamientos miel de abeja al 2% y nitrógeno + ácidos húmicos superan a los obtenidos en el tratamiento testigo regional.

En los tratamientos miel de abeja 2% y *Saccharomyces cerevisiae* presentaron un nivel elevado de Fe sin evidencia de toxicidad.

La miel de abeja al 2% y el nitrógeno+ ácidos húmicos son productos que hacen eficiente la absorción foliar de macro y micronutrientes.

El análisis indirecto de clorofila en tejido vegetal en la cuarta hoja madura próxima al botón presentó valores altos en todos los tratamientos con respecto del testigo regional, los cuales fueron incrementándose hasta la cosecha.

Las variables de calidad propuestas para la inflorescencia de crisantemo *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. 'Harman' en México para mercado nacional: longitud 149 cm y diámetro 1.1 cm de tallo, diámetro de inflorescencia 21 cm con color White group NN 155 B en flores liguladas de la periferia, Yellow group 4B en flores liguladas de la parte media y Yellow group 1A en flores liguladas del centro.

3.9. LITERATURA CITADA

- Alcántar G. G, Trejo T., L. I., Fernández P., L y Rodríguez M., M. 2009. Elementos esenciales: En: Nutrición de cultivos. Mundi-Prensa. México. pp: 8-47
- Arbos L., A. M. 1992. El Crisantemo, Cultivo, Multiplicación y Enfermedades. Ediciones Mundi - Prensa. Madrid, España. 170 p.
- Azofeifa, A. y Moreira M., A. 2005. Absorción y distribución de nutrimentos en plantas de chile dulce (*Capsicum annuum* cv. ucr 589) en alajuela, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 29(1): 77-84
- Bautista M., N., Alvarado L., J, Chavarín P., J. C. y Sánchez A., H. 2002. Manejo fitosanitario de ornamentales. Colegio de Postgraduados. México. 237 p.
- Blackmer, T. M. and Shepers, J. S. 1995. Use of chlorophyll meter to monitor nitrogen status and Schedule fertigation for corn. *J. Prod. Agric.* 8:56-60
- Bugarín, M. R. y Espíndola, A. G., García, P. S. y Paredes, D.G. 2002. Acumulación diaria de materia seca y de potasio en la biomasa aérea total de tomate. *Terra* 20: 401-409.
- Cabezas A.C.E. 2000. Nutrición vegetal en flor de corte en el sur del estado de México. Tomo VIII. Grupo Visaflor S.A: de C.V. Villa Guerrero, estado de México. 68 p.
- Díaz D., H. 2002. Fisiología de árboles frutales. AGT Editor. pp: 127-128
- Díaz G., O., Tejeda M., E. I. y Avalos A., L. 2005. Efecto de insecticidas biorracionales y mezclas de hongos sobre *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Homoptera: Psyllidae). *Entomología México* 5: 539–541.

- Enríquez V., J. R., Velásquez T., B., Vallejo F., A. R. y Velasco V., V. A. . 2005. Nutrición de plantas de *Dendranthema grandiflora* obtenidas in vitro durante su aclimatación en invernadero. Revista Fitotecnia Mexicana 28: 377-383
- Flores R., J. S., Becerril R., A. E., González H., V. A., Tijerina C., L. y Vásquez R., T. 2005. Crecimiento vegetativo y floral del crisantemo [*Dendranthema X grandiflorum* (Ramat) Kitamura] en respuesta a la presión osmótica de la solución nutritiva revista chapingo. Serie horticultura 11: 241-249
- Gaytán A., E. A., Ochoa M., D. L., García V., R., Zavaleta M., E. y Mora A., G. 2006. Producción y calidad comercial de flor de crisantemo. TERRA Latinoamericana 24: 541-548
- Gouvea, A., Kuhn O., J., Mazaro, S. M., Mio L., L. M., Deschamps, C., Biasi, L. A. and Fonseca, V. C. 2009. Control of leaf and flower diseases and postharvest quality of strawberry plants treated with *Saccharomyces cerevisiae*. Horticultura Brasileira 27:527-533
- Ivanova, V. y Vassilev, A. 2003. Biometric and physiological characteristic of chrysanthemum (*Chrysanthemum indicum* L.) plants grown at different rates of nitrogen fertilization. Journal of Central European Agriculture 4(1): 1-6
- Kofranek, M. A. 1988. Flores de corte: En: Introducción a la floricultura. R. A. Larson. AGT Editor, S.A. México. pp. 3-41
- Marschner, H. 2002. Mineral nutrition of higher plants. Second edition. Academic Press. San Diego, California, USA. pp. 184-312.
- Marquard, R. D. and Tipton, J. L. 1987. Relationship between extractable chlorophyll and in situ method to estimate leaf greenness. HortScience (22): 1,327

- Mendoza E., M., Mosqueda V., C., Rangel L., J. A., López B., A., Rodríguez H., S. A., Latournerie, M., L. y Moreno M., E. 2006. Densidad de población y fertilización nitrogenada en la clorofila, materia seca y rendimiento de maíz normal y QPM. *Agricultura Técnica en México* 32(1):89-99
- Nieves O. F., Ruiz N., L. A. 2002. Alternativas ecológicas para el manejo de plagas y enfermedades en ornamentales: En: Manejo fitosanitario de ornamentales. Colegio de Postgraduados. México. pp 170-179
- Ortega A. D. L. 2002. Moscas Blancas en ornamentales: En: Manejo fitosanitario de ornamentales. Colegio de Postgraduados. México. pp. 41-52
- Ramírez F. J., Ochoa M., D. L., Rodríguez M., M. N. y Mora A., G. 2006. Efecto del ácido acetil salicílico, miel y melaza en la movilidad y concentración de TSWV. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 12 (2): 239-243
- Reeves, W. D., Mask, P. L., Wood, C. W. and Delay, D. P. 1993. Determination of wheat nitrogen status with a handheld chlorophyll meter. Influence of management practices. *Journal of Plant Nutrition* 16: 7781-7796
- Reyes O., M. 2008. Efecto de miel, aminoácidos, ácido acetil salicílico y *Bacillus subtilis* contra *Cucumber mosaic virus* (CMV) en calabacita, efecto de terpenoides en la infección causada por (CMV) en calabacita y determinación del contenido total de estos compuestos en un tolerante y uno susceptible a CMV. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados.
- Rodríguez M., M. N., Alcántar G., G., Aguilar S., A., Etchevers B., J. D. y Santizó R., J. A. 1998. Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila. *Terra* (16): 135-141

- Royal Horticultural Society. 2007. Colour Chart. In association with the Flower Council of Holland. Leiden. The Netherlands.
- Sánchez G., P., Molinos S., C., Alcántar G., G. y Sandoval V., M. 2009. Diagnóstico nutrimental en plantas. En: Nutrición de cultivos. Mundi-Prensa. México. pp. 201-247
- Salisbury, B. F. y Ross, W. C. 1994. Fisiología vegetal. Traducción español González V., V. Iberoamericana. México, D.F. 749 p.
- Vega M., R., Escalante E., J. A., Sánchez G., P., Ramírez A., C. y Cuenca A., E. 2001. Asignación de biomasa y rendimiento de girasol con relación al nitrógeno y densidad de población. Terra Latinoamericana 19: 75-81
- Velasco V., V. A. 1999. Papel de la nutrición mineral en la tolerancia a las enfermedades de las plantas. Terra 17(3):193-200.
- Villar Z., D. y Ortega B., R. 2007. Bases teóricas y su aplicación para la fertilización nitrogenada en cultivos. Centro de Agricultura de Precisión. Departamento de Ciencias Vegetales. Universidad de Colombia.
- Zamora M., B. P. 2001. Diagnóstico nutrimental y fertilización para una óptima producción de flores de *Anthurium andreanum*. Tesis de Maestría en Ciencias. Edafología. Colegio de Postgraduados.

ANEXO I. Medios de cultivo

Medio PDA (Papa- dextrosa- agar)

- Papa en trozo 200 g
- Dextrosa 20 g
- Agar 15 g

- Agua destilada (aforar a 1000 mL)

El medio se prepara utilizando trozos de papas peladas. Se introducen por 20 minutos en autoclave a 15 libras de presión en un matraz de 1 L con 300 mL de agua destilada estéril. Posteriormente se procede a filtrar para obtener una suspensión a la cual se le adicionan los reactivos y se afora a 1 L de agua, se mezcla bien. Se vierten 500 mL en un matraz de 1L y los otros 500 mL en otro matraz de la misma capacidad, se les coloca un tapón de algodón y se esteriliza por 20 a minutos a 15 libras de presión en autoclave.

Medio PDA- F (papa dextrosa agar- Penetrex-F®) (Steiner y Watson, 1965)

Preparación de medio PDA-F

- Papa 50 g
- Dextrosa 5 g
- Agar 3.5 g
- Agua destilada (aforar a 250 mL)

Lavar las papas, cortarlas y hacerlas hervir en un litro de agua destilada por 20 minutos, colar y disolver en el líquido la dextrosa y el agar. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión. Se deja enfriar y se adicionan 0.5 mL de surfactante Fenetrex- F®.

Preparación de diluciones

En un matraz de 250 mL con 90 mL de agua destilada estéril agregar 10 g de suelo, obteniendo un volumen total de 100mL. Agitar, tomar 1 mL de la suspensión madre y colocarlo en un tubo de ensaye con 9mL de agua destilada estéril, realizar dos diluciones más.

Siembra

Colocar 0.1 mL de la dilución 1×10^{-3} en cada caja Petri (10 repeticiones). Vertir casi frío el medio en las cajas Petri y con la ayuda de una varilla de vidrio homogenizar la gota con el medio.

Medio selectivo PARPH (pimaricina, ampicilina, rifampicina, PCNB e himexazol) (Erwin y Ribeiro, 1996)

Preparación de medio base

- Harina de maíz 5 g
- Dextrosa 5 g
- Agar 3.5 g
- Agua destilada (aforar a 250 mL)

Poner a hervir 100 ml de agua destilada, vertir la harina de maíz y cocer bien la mezcla. Centrifugar la pasta que queda a 3000 rpm por 20 minutos. Colocar el sobrenadante un matraz y añadir la dextrosa y el agar. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión. Se deja enfriar y se adicionan los siguientes antibióticos (dosis para un litro)

- Pimaricin 0.4 mL
- Rifampicin 0.010 g
- Ampicilina 0.250g
- PCNB 5 mL de solución stock preparada 5 mg/ml

Vertir el medio en cajas Petri.

Preparación de diluciones

En un matraz con 90 mL de agar al 0.02% preparado con agua destilada estéril agregar los antibióticos, a la dosis respectiva más 10 g de suelo, obteniendo un volumen total de 100mL. Agitar, tomar 1 mL de la suspensión y colocarlo en un tubo de ensaye con 9mL de agua destilada estéril, realizar dos diluciones más.

Siembra

Ya solidificado el medio, colocar 0.1 mL de la dilución 1×10^{-3} en cada caja Petri estéril, teniendo en total 10 repeticiones. Con ayuda de una varilla de vidrio distribuir uniformemente las colonias

Medio B de King

- K_2HPO_4 0.37g
- $MgSO_4$ 0.37 g
- Glicerol 4 mL
- Polipeptona 5 g
- Agar 4.5 g
- Agua destilada (aforar a 250 mL)

Se adicionan los reactivos en un matraz de 500 mL, posteriormente se afora a 250 mL de agua destilada, se mezcla bien, finalmente se le coloca un tapón de algodón y se esteriliza por 20 a minutos a 15 libras de presión en autoclave.

ANEXO II. Claves taxonomicas

CLAVE PARA NINFA DE 4° ÍNSTAR (PUPAS) DE ALEYRODIDAE DE
IMPORTANCIA ECONÓMICA EN MÉXICO

1. Pupa con poros compuestos, en el caso de que sean simples pupa plana,
con o sin rayos.....2

1'. Pupa sin poros compuestos y sin rayos	6
2. Dorso pupal con poros compuestos sin rayos.....	3
2'. Dorso pupal sin poros compuestos, con rayos, hospederos de <i>Heliconia</i> <i>Boaia</i>	3'
3. Submargen de la cubierta pupal doblado ventralmente, hospederos de cacao.....	<i>Lecanoideus floccissimus</i> Martin
3'. Submargen de la pupa no doblado ventralmente.....	4
4. Primeros dos poros compuestos del abdomen más pequeños que el resto, sin un proceso central, hospederos de Citrus, Persea y otros.....	<i>Paraleyrodes</i> Quaintance
4'. Primeros dos pares de poros compuestos del abdomen de igual tamaño que los dos siguientes, con un proceso central.....	5
5. Siete pares de poros compuestos, hospederos de <i>Psidium</i> , <i>Hibiscus</i> y otros.....	<i>Aleurodicus dugesii</i> (Cockerell)
5'. Cinco pares de poros compuestos, hospederos de <i>Psidium</i> y otros.....	<i>A. coccolobae</i> Quaintance y Baker
6. Dorso de la cubierta pupal con un patrón de espinas agudas o en forma de sifón.....	7
6'. Dorso de la cubierta pupal sin un patrón de espinas agudas o en forma de sifón.....	8
7. Dorso de la cubierta pupal con un patrón de espinas agudas, hospederos de <i>Citrus</i>	<i>Aleurocanthus woglumi</i> Ashby

- 7'. Dorso de la cubierta pupal con un patrón de espinas en forma de sifón, hospederos de *Psidium*, *Fraxinus*.....*Siphoninus phillyreae* (Holiday)
8. Parte antero media del octavo segmento abdominal elevado en forma de cuerno bifurcado, hospederos de begonia.....*Aleurocerus bondar*
- 8'. Parte antero media del octavo segmento abdominal no elevada en forma de cuerno bifurcado 9
9. Submargen con una hilera regular de 15 pares de finas sedas, hospederos de *Citrus*.....*Parabemisia myricae* (Kuwana)
- 9'. Submargen sin una hilera regular de 15 pares de finas sedas.....10
10. Submargen con una hilera de papilas o en pocos casos con papilas dorsales11
- 10'. Submargen sin una hilera de papilas.....18
11. Granulaciones marginales relativamente angostas, usualmente más de 24 100 μm , polífaga.....*Trialeurodes abutiloneus* (Haldeman)
- 11'. Granulaciones marginales relativamente anchas , usualmente menos de 24 100 μm 12
12. Orificio vasiforme subcordiforme, papilas submarginales muy cercanas entre sí.....13
- 12'. Orificio vasiforme cordiforme, papilas submarginales no muy cercanas entre sí.....15

13. Sección media de la séptima sutura abdominal al mismo nivel que la sexta, hospederos de *Quercus*.....*T. oblongifoliae* Russell
- 13'. Sección media de la séptima sutura abdominal posterior a la sexta.....14
14. Granulaciones marginales con una anchura variable, hospederos de *Psidium**T. floridensis* (Quaintance)
- 14'. Granulaciones marginales con una anchura constante, hospederos de *Citrus* y otros..... *T. vitrinellus* (Cockerell)
15. Con un surco subdorsal ligeramente esclerosado, hospederos de *Cucurbita*, *Phaseolus*, *Alnus*, *Montanoa*, *Philadelphus* y otros..... *T. varia* Quaintance y Baker
- 15'. Sin un surco subdorsal ligeramente esclerosado16
16. Sección media de la séptima sutura abdominal al mismo nivel que la sexta.....17
- 16'. Sección media de la séptima sutura abdominal posterior a la sexta, polífaga.....*T. vaporariorum* (Westwood)
17. Setas cefálicas, primeras y octavas abdominales relativamente grandes (75-100 μm de largo), hospederos de *Psidium*, *Persea*, *Picus*, *Stemmadenia* y otros *T. similis* Russell
- 17'. Setas cefálicas, primeras y octavas abdominales relativamente pequeñas (menos de 75 μm de largo), hospederos de *Carica**T. variabilis* (Quaintance)

18. Aberturas traqueales torácicas y caudales marcadas por poros invaginados.....	19
18'. Aberturas traqueales torácicas y caudales no marcadas por poros invaginados.....	21
19. Con dos pares de grandes áreas circulares dorsales, una en la parte torácica y otro en los primeros segmentos abdominales, hospederos de alcatraz.....	<i>Aleuroglandulus</i> Bondar
19'. Sin dos pares de grandes áreas circulares , en el dorso torácico y abdominal.....	20
20. Línea media de la cubierta pupal con pigmento marrón, sin 3-5 dientes internos en los poros invaginados, hospederos de jazmín.....	<i>Dialeurodes kirkaldyi</i> (Kotinsky)
20'. Línea media de la cubierta pupal sin pigmento marrón, con 3 a 5 dientes internos en los poros invaginados, hospederos de <i>Citrus</i>	<i>D. citrifolli</i> Morgan
21. Cubiertas pupales negras	22
21'. Cubiertas pupales de color pálido a marrón	24
22. Área submarginal separada del disco dorsal por una línea o pliegue, hospederos de <i>Citrus</i> y otros	<i>Tetraleurodes</i> Cockerell
22'. Área submarginal no separada del disco dorsal por una línea o pliegue.....	23
23. Margen de la pupa replegado hacia el lado ventral, hospederos de <i>Persea</i> .	

- 23'. Margen de la pupa no replegado hacia el lado ventral, con dos surcos subdorsales , hospederos de *Spondias*..... *Aleurotrachelus* Quaintance y Baker
24. Área submarginal amplia, separada del disco dorsal por un pliegue, margen con dientes, hospederos de *Citrus*, *Psidium* y otros *Aleurotrixus floccosus* (Maskell)
- 24'. Area submarginal no separada del disco dorsal por un pliegue, margen sin dientes..... 25
25. Longitud media de los segmentos abdominales muy similar, hospederos de *Solanum* *Aleyrodes* Latreille
- 25'. Longitud media del séptimo segmento abdominal muy reducido.....26
26. Setas caudales siempre robustas (usualmente más de la mitad de la longitud del orificio vasiforme), polífaga..... *Bemisia tabaci* (Gennadius)
- 26'. Setas caudales pequeñas (usualmente menos de la mitad de la longitud el orificio vasiforme), hospederos de *Spondias*..... *B. afer* (Priesner y Hosny)

CLAVES PARA SUBGENEROS DE *Tetranychus*

(Tuttle *et al.*, 1976)

1. Estrías histerosomales totalmente transversales entre la serie de setas dorsocentrales..... *T.* (*Armenychus*)

- 1'. Estrías histerosomales longitudinales entre el 4° par de setas dorsocentrales.....2
2. Estrías histerosomales longitudinales entre el 3° par de setas dorsocentrales..... *T. (Polynychus)*
- 2'. Estrías histerosomales longitudinales entre el 3° par de setas dorsocentrales, formando una especie de diamante, estrías transversales entre el 3° y 4 ° par de setas dorsocentrales..... *T. (Tetranychus)*

CLAVE PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE FUSARIUM

(Snyder & Hansen, 1940)

A1. Microconidios presentes:

B1. Microconidios piriformes; conidióforos en forma de botella.....

..... *F. tricinctum*

B2. Microconidios pequeños y elípticos; conidióforos alargados.....C1

..... Clamidosporas ausentes

D1. Macroconidios con pared gruesa, mayores de 50, con muchas septas (5-10)..... *F. rigidiuscula*

D2. Macroconidios angostos, con pared delgada, microconidios abundantes..... *F. moniliforme*

C2. Clamidosporas presentes

D1. Macroconidios finos, alargados, puntiagudos, pared delgada, anchura máxima 3-4.5. Masa de esporas ocre, rosa, pigmento rosa, púrpura o violeta..... *F. oxysporum*

D2. Macroconidios gruesos, no puntiagudos pared gruesa, anchura máxima 4.5-5.5. Masa de esporas, crema amarilla, pigmento azul, azul-verde o violeta..... *F. solani*

A2. Microconidios ausentes

B1. Macroconidios sin pie.

C1. Conidios muy finos terminando en un apéndice filiforme *F. ciliatum*

C2. Conidios muy variables en forma, colonias creciendo despacio, grandes conglomerados de esporas de colores brillantes *F. episphaeria*

C3. Conidios nunca formando conglomerados; micelio blanco y algodonoso, de rápido crecimiento. Conidios de 15 a 25 *F. nivale*

B2. Macroconios con pie

C1. Macroconidios con las células terminales en forma de goteros y el pie encorvado, masa de esporas amarilla; rosa o salmon. Pigmento café o azul, esclerocios cafés o azules. Colores similares a *F. oxysporum* *F. lateritium*

C2. Macroconidios con terminales puntiagudas; blanco, amarillo o rosa, masa de esporas amarilla, rosa o café, pigmento amarillo, rosa, rojo o café rojizo pero nunca azul o violeta..... *F. roseum*

ANEXO III. Extracción de DNA por el método AP

1. Con una pinza de relojero estéril tomar 0.1 g de micelio en un tubo eppendorf.
2. Macerar el micelio con 250 μ L de buffer AP en una cápsula de porcelana estéril, después complementar a un volumen de 750 μ L, transferir al tubo eppendorf.
3. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Centrifugar un minuto a 12,000 rpm, tomar el sobrenadante y pasar a un tubo eppendorf estéril.
5. Agregar 500 μ L de fenol cloroformo 1:1 volumen:volumen, agitar suavemente.
6. Centrifugar 3 minutos a 12,000 rpm, recuperar la fase acuosa y pasarla a un tubo eppendorf estéril.
7. Repetir los pasos 5 y 6

8. Agregar 500 μL de isopropanol y 50 μL de acetato de amonio 10 M, agitar bien.
9. Centrifugar a 12,000 rpm por 10 minutos.
10. Tirar el sobrenadante con cuidado y dejar la pastilla.
11. Lavar la pastilla con 50 μL de etanol al 70%.
12. Centrifugar a 12,000 rpm por 3 minutos y tirar el etanol.
13. Repetir los pasos 11 y 12.
14. Poner el tubo boca abajo en un papel absorbente estéril y dejar secar la pastilla.
15. Resuspender la pastilla en 50 μL de agua de ampolleta.
16. Guardar el DNA a 4°C o -20°C.

Reactivos para preparar 50 mL buffer AP

- Urea 7 M 21.02 g
- NaCl 0.35 M 2.04 g
- Tris base 0.05 M 0.607 g
- EDTA 0.02 M 0.744 g
- Sarcosina 1 % 0.5 g

ANEXO IV. DAS- ELISA

PROTOCOLO ENSAYO DE INMUNOABSORBENCIA CON ENZIMAS CONJUGADAS (ELISA), SANDWICH DE DOBLE ANTICUERPO (DAS) PARA FOSFATASA ALCALINA

Método de Clark y Adams (1977) modificado por Sutula (1993) para fosfatasa alcalina.

1. Definir la distribución de tratamientos y sus repeticiones en la placa de ELISA.
Es recomendable que para cada virus que se quiera detectar se considere: testigo positivo (planta enferma con el virus objetivo), testigo negativo (planta sana de cada especie vegetal, incluida en las muestras), testigo blanco (sin tejido vegetal) y muestras problema.
2. Calcular el volumen a utilizar de cada antisuero, de acuerdo con la sugerencia del distribuidor. Se divide el volumen de amortiguador de cobertura requerido para ese antisuero entre la dilución sugerida. Es recomendable hacer los

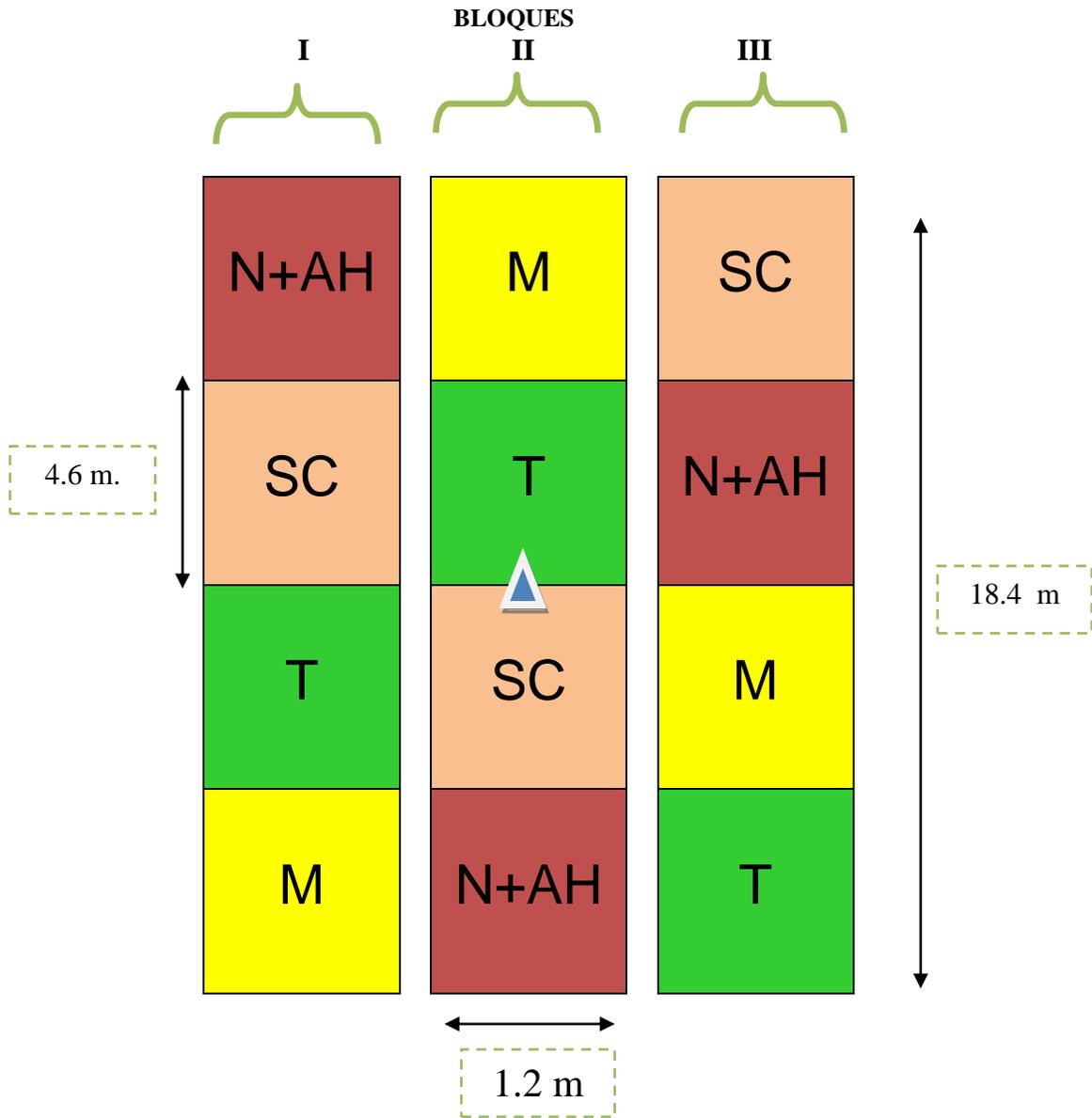
cálculos considerando algunos pozos más de los requeridos, para compensar errores de pipeteo.

3. Medir el volumen de amortiguador de cobertura requerido en cada caso, y colocarlo en un tubo de ensaye. Agregar el volumen de antisuero calculado en el paso anterior, con una micropipeta. Agitar en un vortex por 30 s para su adecuada incorporación.
4. Agregar 100 μ L de antisuero diluido en amortiguador de cobertura en cada pozo, de acuerdo con el esquema de distribución previamente definido.
5. Incubar la placa a temperatura ambiente y luz natural por 4 horas. Colocarla dentro de una bolsa de polietileno de tamaño adecuado conteniendo papel húmedo, para evitar la evaporación del amortiguador.
6. Al término del periodo de incubación deseche la solución del anticuerpo y lave tres veces la placa con el buffer de lavado con PBSt 1X. Secar la placa con papel absorbente.
7. Por cada muestra, colocar 2 g de tejido vegetal fresco o congelado en una bolsita de polietileno grueso. Con ayuda de un macerador de tejido obtenga el extracto vegetal, se añade 2 mL de amortiguador de extracción y se colecta en una bolsa de polietileno.
8. Añadir 100 μ L de la muestra en los pozos correspondientes según el esquema previo.
9. Incubar la placa a 4°C durante toda la noche. Colocarlas dentro de una bolsa de polietileno de tamaño adecuado conteniendo papel húmedo, para evitar la evaporación del amortiguador.

10. Al término del periodo de incubación deseche la solución del antígeno y lave tres veces la placa con el buffer de lavado con PBSt 1X. Secar la placa con papel absorbente.
11. Medir el volumen de amortiguador de conjugado requerido en cada caso, que debe ser igual al calculado para amortiguador de cobertura. Colocarlo en un tubo de ensaye. Agregar un volumen de conjugado (antisuero + fosfatasa alcalina) igual al calculado para el antisuero, con una micropipeta. Agitar en un vortex por 30 s para su adecuada incorporación.
12. Colocar 100 μ l del conjugado diluido en cada pozo, de acuerdo con el esquema previo.
13. Incubar la placa a temperatura ambiente y luz natural por 2 horas. Colocarla dentro de una bolsa de polietileno de tamaño adecuado conteniendo papel húmedo, para evitar la evaporación del amortiguador.
14. Al término del periodo de incubación deseche el conjugado y lave tres veces la placa con el buffer de lavado con PBSt 1X. Secar la placa con papel absorbente.
15. Preparar el volumen adecuado de amortiguador de sustrato. Agregar una pastilla de PNP (P-nitrofenil fosfato) por cada 10 mL de amortiguador de sustrato. Mantener en agitación durante 2 minutos para su incorporación.
16. Colocar 100 μ L de amortiguador de sustrato más PNP en cada pozo, cubriendo todos los pozos útiles de la placa.
17. Incubar la placa a temperatura ambiente y oscuridad total cubiertas con papel aluminio por 15 minutos.

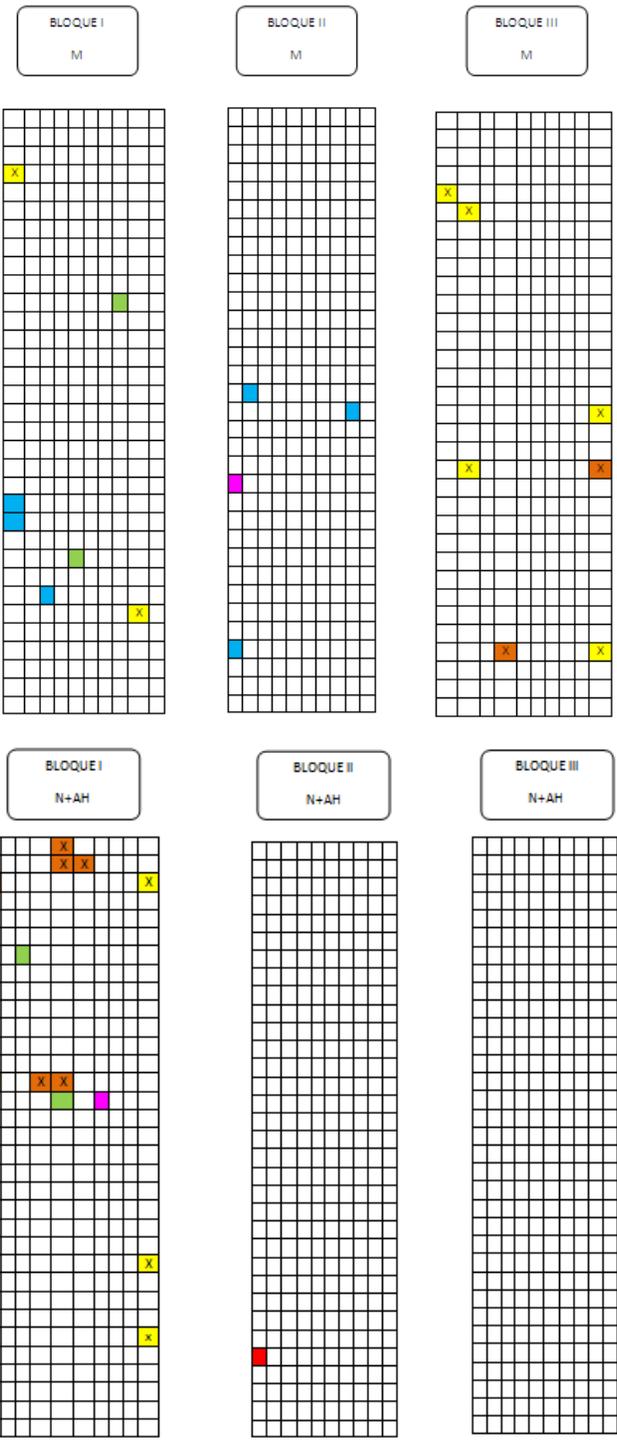
18. Revisar la placa para detectar la reacción positiva, que consiste en una coloración amarilla. Evaluar visualmente los resultados, o medir la absorbencia de cada pozo de la placa en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 405 nm.

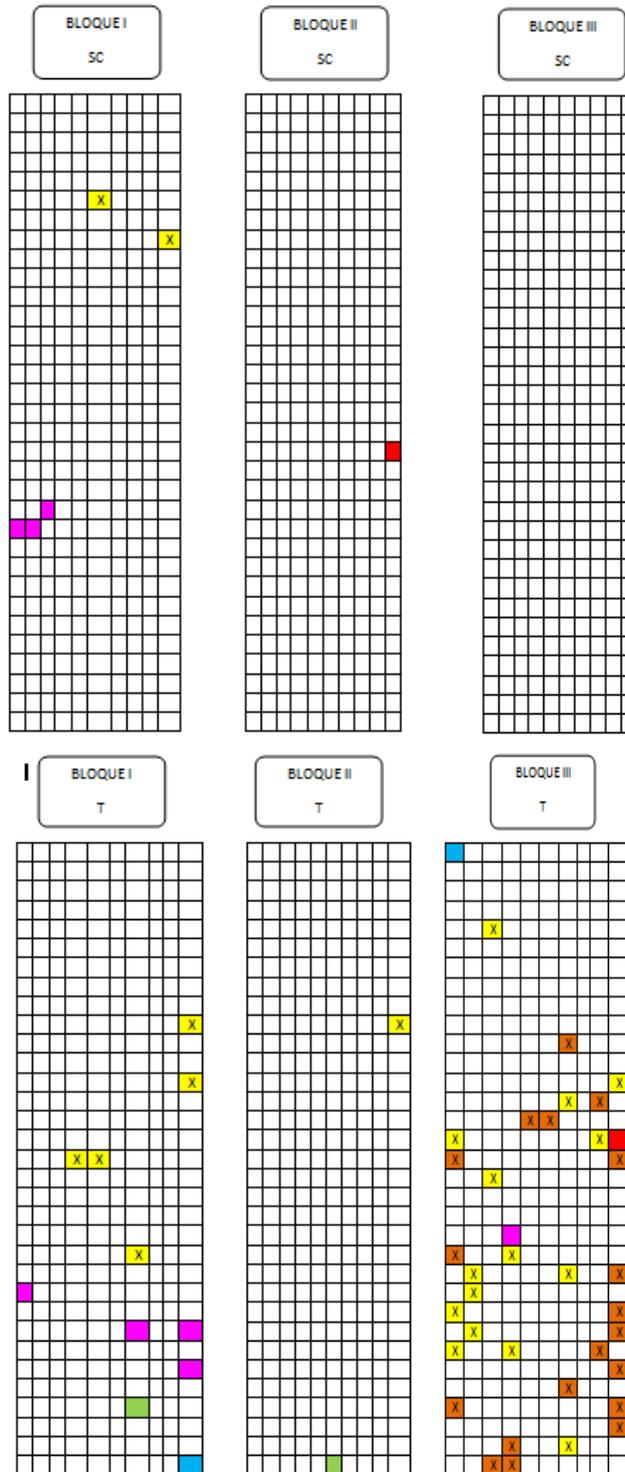
ANEXO V. Diseño experimental



Los tratamientos a evaluar son; **M**; Miel de abeja al 2% (Great value®), **N+AH**; Nitrógeno+ ácidos húmicos (Kendal®), **SC**; *Saccharomyces cerevisiae* (Tridi-Pan®), **T**; Testigo regional.  Ubicación del hidrotérmografo.

ANEXO VI. Distribucion espacial y fechas de evaluacion de plantas con sintomas de marchitez y virosis en el cultivo de crisantemo 'Harman'





Tratamientos: **M**; Miel de abeja al 2% (Great value®), **N+AH**; Nitrógeno+ ácidos húmicos (Kendal®), **SC**; *Saccharomyces cerevisiae* (Tridi-Pan®), **T**; Testigo regional.

Fechas de evaluación de marchitez de crisantemo a los 15 y 30 días después del trasplante

X	24 de Abril del 2010
X	08 de Mayo del 2010

Fechas de evaluación semanal de síntomas de virosis de los 30 hasta los 60 días después del trasplante.

	08 de Mayo del 2010
	15 de Mayo del 2010
	06 de Junio del 2010
	12 de Junio del 2010