



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS CÓRDOBA

POSTGRADO DE INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

***EFFECTO DE FOSFITO Y SU COMPATIBILIDAD CON *Trichoderma sp.*
EN EL CONTROL DE *Fusarium sp.* CAUSANTE DEL
POKKAH BOENG EN CAÑA DE AZÚCAR***

ROCIO SOLIS PALACIOS

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

AMATLÁN DE LOS REYES, VERACRUZ, MÉXICO

AGOSTO, 2019

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe **Rocio Solis Palacios**, Alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del profesor **Fernando Carlos Gómez Merino**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Efecto de fosfito y su compatibilidad con *Trichoderma* sp. en el control de *Fusarium* sp. causante del Pokkah boeng en caña de azúcar** y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Profesor Consejero o Director de Tesis y la que suscribe, de acuerdo con las negociaciones entre las tres partes. Por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Amatlán de los Reyes, Ver., a 8 de agosto de 2019.

Rocio Solis Palacios

Firma

Dr. Fernando Carlos Gómez Merino

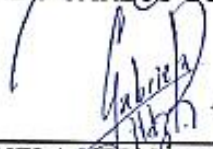
Vo. Bo. del Profesor Consejero


La presente tesis, titulada: **Efecto de fosfito y su compatibilidad con *Trichoderma* sp. en el control de *Fusarium* sp. causante del Pokkah boeng en caña de azúcar**, realizada por la alumna: **Rocio Solis Palacios**, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:


MAESTRA EN CIENCIAS
EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: 
DR. FERNANDO CARLOS GÓMEZ MERINO

ASESORA: 
DRA. GABRIELA HERNÁNDEZ RAMÍREZ

ASESOR: 
DR. JOSAFHAT SALINAS RUÍZ

ASESOR: 
DR. JUAN VALENTE HIDALGO CONTRERAS

Amatlán de los Reyes, Veracruz, a 8 de agosto de 2019

EFFECTO DE FOSFITO Y SU COMPATIBILIDAD CON *Trichoderma* sp. EN EL CONTROL DE *Fusarium* sp. CAUSANTE DEL POKKAH BOENG EN CAÑA DE AZÚCAR

Rocio Solis Palacios, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2019

RESUMEN

El cultivo de la caña de azúcar es uno de los más importantes a nivel mundial, pues aporta hasta el 75% del azúcar que se consume, además de presentar alta eficiencia fotosintética y ser materia prima para la producción de alcohol, butanol, papel, entre otros. Sin embargo, este cultivo es afectado por factores bióticos y abióticos. El género *Fusarium* es uno de los patógenos reportados como agente causal de enfermedades de la caña de azúcar como el Pokkah boeng. Debido al uso indiscriminado de agentes fungicidas para la erradicación de estas enfermedades, se necesitan enfoques alternativos para su control. La integración de sales inorgánicas y agentes de control biológico ofrecen una estrategia para la disminución de fungicidas de síntesis química. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad antagonista que tienen las cepas nativas de *Trichoderma* sp., contra *Fusarium* sp., y su compatibilidad a diferentes concentraciones de fosfito (Phi), así como determinar el efecto del Phi sobre el crecimiento de *Fusarium* sp., y evaluar la fitotoxicidad y compatibilidad del bioregulador con este componente, sobre la morfo-fisiología de plántulas de caña de azúcar (var. CP 72-2086). Los tratamientos consistieron en cinco dosis de Phi (500, 1000, 2000, 4000 y 8000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y un control sin Phi y sus combinaciones con *Trichoderma* (Taz), ajustados a un pH de 5.7. En los ensayos *in vitro*, el Phi mostró un efecto fungistático sobre *Fusarium* sp.; y *Trichoderma* sp., presentó compatibilidad a las altas concentraciones de este compuesto, donde se registró un mayor control del patógeno al estar en combinación. En el ensayo *in vivo* no se observó fitotoxicidad de las plántulas de caña de azúcar en ninguna de las concentraciones evaluadas, aunque se observaron disminuciones en parámetros como longitud y diámetro de tallo. Los tratamientos Taz + Phi presentaron efectos positivos sobre variables como volumen, peso seco de hoja y fresco de raíz. Los aislados del género *Trichoderma* son compatibles con Phi para su uso y aplicación sobre el control de *Fusarium* sp., de caña de azúcar.

Palabras clave: Pokkah boeng, antagonismo, micoparasitismo, biocontrol, ácido fosforoso, manejo integrado

EFFECT OF PHOSPHITE AND ITS COMPATIBILITY WITH *Trichoderma* sp. IN THE CONTROL OF *Fusarium* sp. CAUSING POKKAH BOENG IN SUGARCANE

Rocio Solis Palacios, M. Sc.
Colegio de Postgraduados, 2019

ABSTRACT

Sugarcane is one of the most important crops worldwide, since it produces more than 75% of the sugar, exhibiting high photosynthetic efficiency and is considered raw material for the production of alcohol, butanol, and paper, among others. However, it is affected by biotic and abiotic factors. The genus *Fusarium* is one of the pathogens reported as a causal agent of diseases of sugarcane, such as Pokkah boeng. Due to the indiscriminate use of fungicide agents for the eradication of these diseases, alternative approaches are required for their control. The integration of inorganic salts and biological control agents offers a strategy for the reduction of chemical synthesis fungicides. The aim of the present work was to evaluate the antagonistic capacity of native strains of *Trichoderma* sp. (Taz), against *Fusarium* sp., as well as its compatibility at different concentrations of phosphite (Phi), in order to determine the effect of Phi on the growth of *Fusarium* sp., and evaluate the phytotoxicity and compatibility of the bio regulator with this compound, on the morpho-physiology of sugarcane seedlings (var. CP 72-2086). The treatments consisted of five doses of Phi (500, 1000, 2000, 4000 and 8000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and a control without Phi and its combinations with *Trichoderma*, adjusted to a pH of 5.7. In the *in vitro* tests, the Phi salts showed a fungistatic effect on *Fusarium* sp., and *Trichoderma* sp., showed compatibility to the high concentrations of this salt. Phytotoxicity in sugarcane seedlings was not observed in the *in vivo* test in any of the evaluated concentrations, though reductions were observed in parameters such as stem length and diameter. The Taz + Phi treatments presented positive effects on variables such as volume, dry weight and fresh root. Isolates of the genus *Trichoderma* are compatible with Phi for their use and application on the control of *Fusarium* sp., of sugarcane.

Keywords: Pokkah boeng, antagonism, mycoparasitism, biocontrol, phosphorous acid, integrated management

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo brindado durante mis estudios de posgrado.

Al Colegio de Postgraduados Campus Córdoba y al Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca, por brindarme un espacio y herramientas valiosas para mi desarrollo profesional y académico.

A la Dra. Gabriela Hernández Ramírez, por su cariño, confianza, infinita paciencia, por las horas de trabajo que dedicó incansablemente para la mejora del presente proyecto y por formarme profesionalmente en el área de microbiología aplicada.

Al Dr. Fernando C. Gómez Merino, por el apoyo constante, la confianza demostrada para la realización de esta investigación y su contribución en mi formación dentro de la investigación.

Al Dr. Josafhat Salinas Ruíz, por el apoyo, asesoría y enseñanzas en el área estadística.

Al Dr. Juan Valente Hidalgo contreras, por su apoyo para la mejora de este proyecto.

A los profesores del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba que contribuyeron a formación profesional durante mi estancia en esta institución.

A Martín, Jesús, Xanat, Emmanuel y Jaime del ITSTB por los buenos y tantos momentos que compartimos juntos durante mi estancia, por su compañía y amistad.

A Mariela, Moisés, Benito y Azucena por ser mis amigos incondicionales en este gran viaje.

DEDICATORIA

A mis padres Jesús A. Solís Gonzáles y Zoila Palacios Molina, por apoyarme en cada momento importante de mi vida, por sus consejos, por creer en mí siempre a pesar de todo, por enseñarme el valor del trabajo duro y de la humildad, por darme un hogar y su inmenso amor. Los amo, la vida no me alcanzaría para demostrarles lo agradecida que estoy por ser su hija.

A mis hermanos, Nancy, Diana y Ángel por ser mis compañeros de vida, por llenarme de ese amor incondicional. Los amo.

A mi novio José Ramón por estar durante esta etapa tan importante de mi vida personal y profesional, por no soltar mi mano en los momentos más difíciles y amarme con esa forma inusual que me hace tan feliz.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Importancia de la caña de azúcar	1
1.2. Susceptibilidad de la caña de azúcar a plagas y enfermedades	2
1.3. Genero <i>Fusarium</i> como agente causal de Pokkah boeng en caña de azúcar	3
1.4. Uso de fungicidas de síntesis química en la agricultura	7
1.5. Fosfito como alternativa a fungicidas de síntesis química.....	7
1.6. Ventajas del uso de las sales de fosfito en el control fitosanitario y bioestimulación	8
1.7. Mecanismos de acción de las sales de fosfito	9
1.8. <i>Trichoderma</i> spp. como alternativa a fungicidas químicos.....	9
1.9. Mecanismos de acción del género <i>Trichoderma</i>	10
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
3. OBJETIVOS	12
3.1. Objetivo general	12
3.2. Objetivos particulares.....	12
4. HIPÓTESIS	12
5. LITERATURA CITADA	13
CAPÍTULO I. COMPATIBILIDAD <i>in vitro</i> DE FOSFITO Y <i>Trichoderma</i> sp., CONTRA <i>Fusarium</i> sp., AGENTE CAUSAL DEL POKKAH BOENG EN CAÑA DE AZÚCAR	20
1.1 Resumen	20
1.2 Introducción	20
1.3 Materiales y Métodos	23
1.3.1. Material microbiológico	23
1.3.2 Efecto del Phi sobre el crecimiento de <i>Fusarium</i> sp., <i>in vitro</i>	23
1.3.3 Compatibilidad de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> con Phi	24
1.3.4 Antagonismo <i>in vitro</i> de aislamientos del género <i>Trichoderma</i> contra <i>Fusarium</i> sp ..	25
1.3.5 Compatibilidad <i>in vitro</i> de aislamientos del género <i>Trichoderma</i> con Phi contra <i>Fusarium</i> sp	25
1.3.6 Diseño experimental	25
1.3.7 Análisis estadístico	27
1.4 Resultados	27
1.4.1 Efecto del Phi sobre el crecimiento de <i>Fusarium</i> sp., <i>in vitro</i>	27
1.4.2 Compatibilidad de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> con Phi	31

1.4.3 Antagonismo <i>in vitro</i> de aislamientos del género <i>Trichoderma</i> contra <i>Fusarium</i> sp ..	34
1.4.4 Compatibilidad <i>in vitro</i> de aislamientos del género <i>Trichoderma</i> con Phi contra <i>Fusarium</i> sp ..	35
1.5 Discusión ..	41
1.5.1 Efecto del Phi sobre el crecimiento de <i>Fusarium</i> sp., <i>in vitro</i> ..	41
1.5.2 Compatibilidad de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> con Phi ..	42
1.5.3 Antagonismo <i>in vitro</i> de aislamientos del género <i>Trichoderma</i> contra <i>Fusarium</i> sp ..	43
1.5.4 Compatibilidad <i>in vitro</i> de aislamientos del género <i>Trichoderma</i> con Phi contra <i>Fusarium</i> sp ..	44
1.6 Conclusiones ..	45
1.7 Literatura citada ..	46
CAPÍTULO II. EFECTO DE FOSFITO Y SU COMPATIBILIDAD CON <i>Trichoderma</i> sp., SOBRE LA MORFOLOGÍA DE PLÁNTULAS DE CAÑA DE AZÚCAR (<i>Saccharum</i> sp.)	54
2.1 Resumen ..	54
2.2 Introducción ..	54
2.3 Materiales y métodos ..	56
2.3.1 Material biológico ..	56
2.3.2 Material microbiológico.	56
2.3.3 Sustrato.	57
2.3.4 Unidad experimental ..	57
2.3.5 Establecimiento de experimento ..	57
2.3.6 Trasplante.	57
2.3.7 Tratamientos e inoculación ..	57
2.3.8 Fitotoxicidad de Phi y compatibilidad con <i>Trichoderma</i> en caña de azúcar ..	58
2.3.9. Reaislamiento de <i>Trichoderma</i> sp. de las raíces de las plántulas de caña de azúcar ..	59
2.3.10 Diseño experimental.	60
2.3.11 Análisis estadístico ..	60
2.4. Resultados ..	60
2.4.1 Fitotoxicidad de Phi y compatibilidad con <i>Trichoderma</i> en caña de azúcar ..	60
2.4.2 Reaislamiento de <i>Trichoderma</i> sp. de las plántulas de caña de azúcar ..	65
2.5. Discusión ..	67
2.5.1. Fitotoxicidad ..	67
2.5.2. Compatibilidad de Phi y <i>Trichoderma</i> en caña de azúcar ..	68

2.6 Conclusión.....	69
2.7. Literatura citada.....	69
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES	73
1. Conclusiones	73
2. Recomendaciones.....	73
ANEXOS	74

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Conidiogénesis de <i>Fusarium</i> sp., (esporas mL ⁻¹) con adición de Phi al medio de cultivo PDA.	30
Cuadro 2. Comparación de modelos de correlación.....	30
Cuadro 3. Evaluación de variables morfológicas de plántulas de caña de azúcar.....	62
Cuadro 4. Biomasa fresca y seca de plántulas de caña de azúcar tratadas con diferentes concentraciones de Phi y en combinación con <i>Trichoderma</i>	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características morfológicas de <i>F. sacchari</i> en CLA; (A) Microconidio en cabezas falsas, (B) Conidióforos monofialídicos simples, (C) Conidióforos polifialídicos simples, (D) Micelio aéreo con conidióforos simples y postrados, (E) Macroconidia con 4 septado, (F) 0 - 1 microconidia septada.	5
Figura 2. Diferentes estadios de la enfermedad de Pokkah boeng; (A) Fase I Clorótica, (B) Fase II Clorótica, (C) Fase de Podredumbre superior y (D) Fase de corte con cuchilla.	6
Figura 3. Crecimiento micelial de <i>Fusarium</i> sp. en las diferentes concentraciones de Phi en el medio PDA, después de 7 d. A) Control sin Phi (0 µg·mL ⁻¹), B) 500 µg·mL ⁻¹ , C) 1000 µg·mL ⁻¹ , D) 2000 µg·mL ⁻¹ , E) 4000 µg·mL ⁻¹ , F) 8000 µg·mL ⁻¹	28
Figura 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Fusarium</i> sp., en medio de cultivo PDA, con adición de Phi. Valores con letra distinta, son estadísticamente diferentes con respecto a la prueba de Fisher (P≤0.05).....	29
Figura 5. Tasa de crecimiento de <i>Fusarium</i> sp., en medio de cultivo PDA con adición de Phi en mm día ⁻¹ . Valores con letra distinta, son estadísticamente diferentes con respecto a la prueba de Fisher (P≤0.05).....	31
Figura 6. Conidiogénesis de <i>Fusarium</i> sp. en las diferentes concentraciones de Phi en el medio PDA, después de 7 d.	32

Figura 7. Número de esporas por mililitro de <i>Trichoderma</i> sp. (Taz-001, Taz-013 y Taz-016) con adición de Phi al medio de cultivo. Valores con letra distinta, son estadísticamente diferentes con respecto a la prueba de Fisher ($P \leq 0.05$).	33
Figura 8. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Fusarium</i> sp., con los distintos aislados de <i>Trichoderma</i> sp. (Taz-001, Taz-013 y Taz-016). Valores con letra distinta, son estadísticamente diferentes con respecto a la prueba de Fisher ($P \leq 0.05$)	34
Figura 9. Antagonismo de los distintos aislados de <i>Trichoderma</i> sp. (Taz-001, Taz-013 y Taz-016) contra <i>Fusarium</i> sp., 1) Testigos 1a) <i>Fusarium</i> , 1b) Taz-001, 1c) Taz-013, 1d) Taz-016; 2) Quinto día después de la inoculación 2a) Testigo de <i>Fusarium</i> , 2b) Antagonismo dual Taz-001 (B) vs <i>Fusarium</i> (A), 2c) Antagonismo dual Taz-013 vs <i>Fusarium</i> , 2d) Antagonismo dual Taz-016 vs <i>Fusarium</i> ; 3) Final del bioensayo 3a) Antagonismo dual Taz-001 vs <i>Fusarium</i> , 3b) Antagonismo dual Taz-013 vs <i>Fusarium</i> , 3c) Antagonismo dual Taz-016 vs <i>Fusarium</i>	35
Figura 10. Crecimiento de <i>Fusarium</i> y los aislados de <i>Trichoderma</i> después de 10 días de incubación en las cajas Petri con tres concentraciones diferentes de Phi y un control sin Phi. A) Inoculación del patógeno (<i>Fusarium</i> sp.), B) Inoculación de bioregulador (<i>Trichoderma</i> sp.).....	36
Figura 11. Cinética de crecimiento de las confrontaciones duales de <i>Fusarium</i> y <i>Trichoderma</i> en las cajas Petri con 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Phi y un control de <i>Fusarium</i> en 1000 Phi sin antagonista. A) Inoculación del patógeno (<i>Fusarium</i> sp.), B) Inoculación de bioregulador (<i>Trichoderma</i> sp.).....	37
Figura 12. Cinética de crecimiento de las confrontaciones duales de <i>Fusarium</i> y <i>Trichoderma</i> en las cajas Petri con 4000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Phi y un control de <i>Fusarium</i> en 4000 Phi sin antagonista. A) Inoculación del patógeno (<i>Fusarium</i> sp.), B) Inoculación de bioregulador (<i>Trichoderma</i> sp.).....	38
Figura 13. Cinética de crecimiento de las confrontaciones duales de <i>Fusarium</i> y <i>Trichoderma</i> en las cajas Petri con 8000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Phi y un control de <i>Fusarium</i> en 4000 Phi sin antagonista. A) Inoculación del patógeno (<i>Fusarium</i> sp.), B) Inoculación de bioregulador (<i>Trichoderma</i> sp.).....	39
Figura 14. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Fusarium</i> sp., con las distintas cepas de <i>Trichoderma</i> sp. (Taz-001, Taz-013 y Taz-016) con adición de Phi al medio de cultivo. Valores con letra distinta, son estadísticamente diferentes con base a la prueba de Fisher ($P \leq 0.05$)......	40
Figura 15. Efectos de fitotoxicidad sobre plántulas de caña de azúcar después de 60 d de evaluación.	61
Figura 16. Raíces de plántulas de caña de azúcar con diferentes dosis de Phi y con inoculación de <i>Trichoderma</i> sp.	63

Figura 17. Índice de clorofila de plántulas de caña de azúcar, tratadas con <i>Trichoderma</i> sp., y distintas concentraciones de Phi. Valores con letra distinta, son estadísticamente diferentes con base a la prueba de Fisher ($P \leq 0.05$).....	65
Figura 18. Crecimiento microbiano de <i>Trichoderma</i> sp. en raíces de plántulas de caña de azúcar sembradas en medio PDA de los diferentes tratamientos con Phi; a) Raíces de Taz-0, b) Taz-5000, c) Taz-1000, d) Taz-2000, e) Taz-4000 y f) Taz-8000.....	66
Figura 19. Aislamiento por punta de hifa de <i>Trichoderma</i> sp. de raíces de plántulas de caña de azúcar sembradas en medio PDA de los diferentes tratamientos con Phi; a) Aislado de Taz-0, b) Taz-5000, c) Taz-1000, d) Taz-2000, e) Taz-4000 y f) Taz-8000.	66

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Importancia de la caña de azúcar

La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) es una planta de la familia Poaceae, con importancia industrial para la región tropical y subtropical del mundo, ya que es considerada la principal fuente de azúcar comercial, contribuyendo con el 75 % de la producción mundial (Senties-Herrera *et al.* 2014; Morgado-González *et al.* 2015). Se produce en más de 130 países, incluyendo a México, con una producción global de más de 1,800 millones de toneladas de azúcar anualmente (Senties-Herrera *et al.* 2014; Rao *et al.* 2016; Senties-Herrera *et al.* 2017). Brasil ocupa el primer lugar con 30 % de la producción mundial, seguido de India y China con 21 % y 7 % respectivamente, mientras que México se encuentra en el sexto lugar con 3.5 % (Senties-Herrera *et al.* 2014). Este cultivo se desarrolla en 15 entidades federativas y 227 municipios en México, beneficiando económicamente a cerca de un millón de personas de manera directa y más de 2.2 millones de manera indirecta (Gómez-Merino *et al.* 2014), es el segundo producto agrícola más importante, sólo después del maíz (Senties-Herrera *et al.* 2017). Además, es una de las principales materias primas para la industria azucarera y la producción de alcohol, ácido acético, butanol, papel, enzimas industriales, y bioetanol como biocombustible alternativo a la gasolina (Koizumi 2015 y Rao *et al.* 2016), ya que es considerada una “biofábrica ideal”, que convierte la luz solar y el agua en biomoléculas como azúcar, fibras y ceras de una manera muy eficiente, posicionándola como el cultivo de campo más productivo entre las plantas cultivadas (Gómez-Merino *et al.* 2014)

La Zafra 2017-2018, en México, se realizó en 51 ingenios azucareros en una superficie de 784.661 mil ha⁻¹, alcanzando una molienda de 53,308,643 toneladas de caña de azúcar, con una producción de 6,009 520 de toneladas de azúcar (CONADESUCA, 2018).

En México, desde el 2012, el número de variedades en campo ha venido en descenso, y la producción actual de caña de azúcar se sustenta en solo tres genotipos: Mex 69-290, Mex 79-431 y CP 72-2086 que ocupan el 70 % de la superficie cultivada (Senties-Herrera y Gómez-Merino 2014). El estado de Veracruz cuenta con la mayor extensión territorial de sembradíos de caña de azúcar, donde se cultiva anualmente el 40.5% del total de la producción nacional (CONADESUCA, 2018).

Actualmente el agro cañero enfrenta serios desafíos que hacen necesaria la búsqueda de alternativas que hagan más eficiente el sistema de producción (Morgado-González *et al.* 2015), la participación de diferentes disciplinas en las ciencias biológicas mejorará la dirección de experimentos adicionales en más especies y genotipos de plantas de cultivo (Senties-Herrera *et al.* 2017).

1.2. Susceptibilidad de la caña de azúcar a plagas y enfermedades

El cultivo de caña de azúcar es afectado por diversos factores, tanto abióticos como la inadecuada fertilidad de suelos, la mala irrigación, la toxicidad por el exceso de agroquímicos, la sequía, la salinidad, entre otros (López-Vázquez *et al.* 2016), así como por factores bióticos. Este cultivo alberga más de 100 patógenos (Rott *et al.* 2016), incluyendo bacterias, hongos y virus, que pueden afectar la producción y causar pérdidas de rendimiento (Viswanathan y Rao 2011).

La caña de azúcar en la mayoría de las regiones productoras se practica como monocultivo hasta por cinco ciclos, lo que provoca un desarrollo pobre de las raíces y disminuye el crecimiento de las plantas (Savario y Hoy 2011) además, su forma de propagación favorece la acumulación de patógenos dentro de las cañas y el arrastre del inóculo a través de materiales de siembra (Viswanathan 2016). Los segmentos infectados por enfermedades sirven como fuente principal para su propagación en la mayoría de las enfermedades del cultivo. En el caso de enfermedades fúngicas, la siembra de plantas infectadas provoca su acumulación en los cultivos de plantas y probablemente la muerte del grupo afectado (Viswanathan 2016).

Enfermedades fúngicas como la podredumbre roja, marchitamiento, tizón y la descomposición son las principales enfermedades fúngicas que causan pérdidas considerables en la producción de caña de azúcar en el campo. La podredumbre roja causado por *Colletotrichum falcatum* Went (*Glomerella tucumanensis* [Speg] Arx and Muller) es responsable de la eliminación de algunas variedades (Viswanathan y Rao 2011).

Mientras que *Fusarium sacchari* es causante de otras enfermedades del tallo y raíz que afectan seriamente la producción de caña de azúcar (Viswanathan 2013) . Estudios recientes han revelado la aparición de la enfermedad en casi todos los estados de cultivo de caña de azúcar a distintas intensidades (Viswanathan *et al.* 2017).

1.3. Genero *Fusarium* como agente causal de Pokkah boeng en caña de azúcar

El género de hongos *Fusarium* está compuesto por una gran cantidad de especies que pueden ser patógenas en plantas de importancia económica, se han descrito más de 70 especies (Martínez-Fernández *et al.* 2015; Zhang y Jeyakumar 2018). El género de hongos *Fusarium* perteneciente a los ascomicetos fue descrito por primera vez por Link (1809) (Vishwakarma *et al.* 2016).

Las especies de *Fusarium* se encuentran en el suelo o las raíces de las plantas y en los tejidos internodales (Viswanathan *et al.* 2011), rara vez en el aire, los residuos vegetales en los suelos desempeñan un papel muy importante como reservorio de nutrientes para que las especies de *Fusarium* continúen viviendo en los suelos como saprofitos, además, se sabe que las especies de *Fusarium* producen una gran variedad de micotoxinas y metabolitos secundarios que pueden contaminar los alimentos, incluido el ácido giberélico, fusaproliferina y beauvericina (McFarlane *et al.* 2009) Zhang y Jeyakumar 2018).

Las enfermedades causadas por especies de *Fusarium* en el complejo de especies *Gibberella fujikuroi* se encuentran entre las enfermedades más comunes reportadas en cultivos agrícolas en todo el mundo (Hsuan *et al.* 2011). La patogenicidad del género *Fusarium* en plantas está mediada por la ejecución de diversos mecanismos que incluyen la producción de micotoxinas, colonización en el interior de la planta, afección del sistema vascular y obstrucción del flujo de agua (McGovern 2015).

El patógeno se transmite por las corrientes de aire y las esporas aerotransportadas colonizan las hojas, flores y tallos de la planta, además, la estructura de la curva de macroconidia de las especies de *Fusarium* se puede dispersar fácilmente por la lluvia (Siti-Nordahliawate *et al.* 2008).

El complejo de especies como *F. verticillioides*, *F. sacchari*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum* y *F. fujikuroi* han sido implicadas en enfermedades de varios cultivos agrícolas, incluyendo arroz, maíz y caña de azúcar (Hsuan *et al.* 2011). Ésta último es vulnerable a más de 100 enfermedades, lo que puede causar importantes disminuciones en su rendimiento anual (Zhang y Jeyakumar 2018; Hilton *et al.* 2017).

Entre las diferentes especies de *Fusarium* se encontró que eran responsables de causar enfermedades como marchitamientos, pudriciones de la raíz y Pokkah boeng en caña de azúcar

(Vishwakarma *et al.* 2013), además, de tener la capacidad para combinarse con *Colletotrichum falcatum* y causar la enfermedad de la pudrición roja (Govender *et al.* 2010).

La enfermedad de Pokkah boeng en la caña de azúcar se ha registrado en casi todos los países donde la caña de azúcar se cultiva comercialmente (Zhang y Jeyakumar 2018). Normalmente aparece durante los períodos de calor húmedo cuando la caña está creciendo rápidamente o durante la temporada post monzónica (Lin *et al.* 2014). Esta enfermedad se describió originalmente en Java en 1896, el nombre es un término javanés que denota una parte superior deformada o distorsionada (Mohammadi *et al.* 2012).

Estudios recientes han sugerido que *F. sacchari*, *F. fujikuroi*, *F. verticillioides*, *F. andiyazi* y *F. proliferatum* son los agentes causales de dicha enfermedad (McFarlane *et al.* 2009; Lin *et al.* 2014; Martínez-Fernández *et al.* 2015; Vishwakarma *et al.* 2016; Zhang y Jeyakumar 2018 y (Viswanathan *et al.* 2017), y que producen una variedad de micotoxinas que son perjudiciales para la salud humana y animal, lo que hace que el estudio de estos patógenos sea económico y socialmente significativo (Hilton *et al.* 2017).

Siti-Nordahliawate *et al.* (2008) describieron que *F. sacchari* se caracteriza por la formación de microconidios que producen abundantemente cabezas falsas a partir de monofialides y también de polifialides (Figura 1). Los macroconidios (Fig. 1E) producidos en CLA (El CLA es un medio de sustrato natural que promueve la esporulación en lugar del crecimiento del micelio y, al mismo tiempo, las cabezas falsas se pueden ver directamente *in situ*) son escasos, delgados, ligeramente falcados y de paredes delgadas, 3 a 4 septados y el tamaño varía de 19.0 a 46.2 x 2.7 a 3.3 μm . Los microconidios (Fig. 1F) son ovalados y delgados 0-1 septados con tamaños que van de 5.4 a 15.0 x 1.9 a 4.1 μm (Siti-Nordahliawate *et al.* 2008).

En los países subtropicales la enfermedad de Pokkah boeng, puede resultar en pérdidas significativas en cultivares susceptibles (Munawar *et al.* 2013), se ha estimado una reducción de aproximadamente el 40.8-64.5 % de la producción de azúcares en cañas infectadas con *F. moniliforme var. subglutinans*, dependiendo del cultivar (Siti-Nordahliawate *et al.* 2008 y Goswami *et al.* 2014). La caña de azúcar de tres a siete meses de edad es más susceptible a la infección que las plantas en etapas posteriores de crecimiento (Lin *et al.* 2014).

Los síntomas característicos de la enfermedad de Pokkah boeng son la aparición de parches cloróticos hacia la base de las hojas jóvenes; en los casos agudos, la enfermedad muestra distorsión del tallo con cortes externos e internos como lesiones y pudrición de la parte apical del tallo, el resultado final suele ser una parte superior y un tallo dañados o mal formados (Vishwakarma *et al.* 2013 y 2016). La etapa más seria y avanzada del Pokkah boeng es la podredumbre superior, donde se mata el punto de crecimiento y muere toda la parte superior de la planta (Goswami *et al.* 2014).

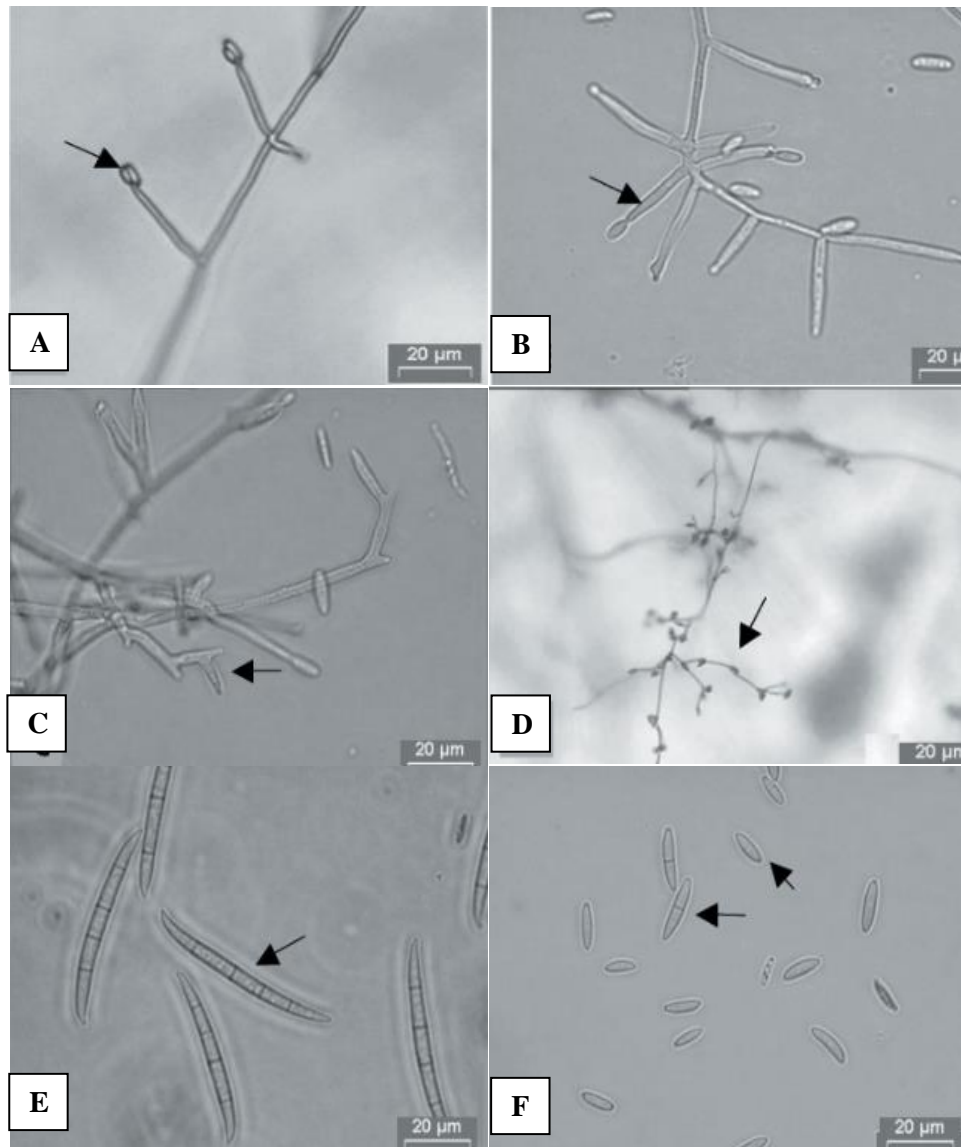


Figura 1. Características morfológicas de *F. sacchari* en CLA; (A) Microconidio en cabezas falsas, (B) Conidióforos monofialdicos simples, (C) Conidióforos polifialdicos simples, (D) Micelio aéreo con conidióforos simples y postrados, (E) Macroconidia con 4 septado, (F) 0 - 1 microconidia septada.

Fuente: Siti-Nordahliawate *et al.* (2008)

Se pueden observar cuatro fases durante el desarrollo de la enfermedad, las fases cloróticas I y II, la fase de podredumbre superior y la fase de corte con cuchilla (Figura 2). Las hojas apicales también pueden mostrar arrugas y torsiones pronunciadas, dependiendo de la susceptibilidad de las variedades y las condiciones climáticas existentes (Vishwakarma *et al.* 2013).



Figura 2. Diferentes estadios de la enfermedad de Pokkah boeng; (A) Fase I Clorótica, (B) Fase II Clorótica, (C) Fase de Podredumbre superior y (D) Fase de corte con cuchilla.

Fuente: Vishwakarma *et al.* (2013)

Por ello, el Pokkah boeng se ha convertido en una seria amenaza para la producción de caña de azúcar en distintas partes del mundo (Lin *et al.* 2014).

Su modo de propagación se realiza a través del arrastre del patógeno en la lluvia, el aire y el suelo, mediante los esquejes de caña infectados, las pupas y los adultos de los barrenadores del tallo de la caña de azúcar (Vishwakarma *et al.* 2013).

1.4. Uso de fungicidas de síntesis química en la agricultura

Los cultivos a menudo son infectados por varios patógenos, lo que resulta en la reducción del rendimiento (Hilton *et al.* 2017). La erradicación de estas enfermedades se realiza de manera convencional con agroquímicos y su uso indiscriminado ha inducido mecanismos de resistencia microbiana, que han generado la existencia de “superpatógenos” (McGovern 2015 y Sharma *et al.* 2009) que, junto con las consecuencias propias del calentamiento global, facilitan la proliferación de las enfermedades y hacen más difícil el control o erradicación de las mismas (Liu *et al.* 2016).

La caña de azúcar, como muchos otros cultivos, depende de los plaguicidas de síntesis química que controlan múltiples enfermedades causadas por hongos, virus o bacterias (Majeed *et al.* 2017), estos agroquímicos son considerados la principal fuente de contaminación de los mantos acuíferos (Lorenz *et al.* 2017).

Es importante destacar que desde hace algunos años se ha cuestionado sobre los efectos que los plaguicidas pueden ocasionar al ambiente, así como a la fauna, flora y sobre todo a los seres humanos, pero hoy en día son pocos los estudios que nos permiten esclarecer el uso, distribución y el impacto que estas sustancias provocan (Fumes *et al.* 2016) y de no ser atendidos podrían resultar en daños ecológicos y epidemiológicos preocupantes, aunado a esto, tanto en México como en el resto del mundo, el uso excesivo de plaguicidas para la erradicación de plagas y enfermedades de la caña de azúcar parece ser una práctica normal.

En la actualidad, la opción de gestión eficiente para controlar la enfermedad causada por *Fusarium* es el uso frecuente de fungicidas. Pero, el alto uso de fungicidas conduce a inmensos daños al medio ambiente. Por lo tanto, es de gran importancia encontrar nuevos métodos ecológicos que puedan minimizar el uso de fungicidas. El uso de la actividad de los microorganismos (biocontrol) se considera un método alternativo ambientalmente racional a los pesticidas químicos para controlar una variedad de enfermedades fúngicas de los cultivos agrícolas (Goswami *et al.* 2014).

1.5. Fosfito como alternativa a fungicidas de síntesis química

Los fosfitos y sus productos relacionados se derivan del ácido fosfórico (fosfonato) y funcionan como una alternativa a los fungicidas convencionales para el control de enfermedades de las plantas (Massoud *et al.* 2012; Liljeroth *et al.* 2016)

El fosfito (Phi; H_2PO_3^-) es un isómero del ión fosfato (Pi; H_2PO_4^-), en cuya molécula tetrahédrica está ausente un átomo de oxígeno, lo que le confiere mayor movilidad dentro de la planta. Además, el Phi muestra propiedades distintas al Pi, incluyendo la estimulación de mecanismos de defensa dentro de la planta contra diversos patógenos (Abbasi y Lazarovits 2005; Amiri y Bompeix 2011; Dorn *et al.* 2007; Olivieri *et al.* 2012). Se ha demostrado que el fosfito de potasio (KPhi; H_2PO_3) aplicado a tubérculos, semillas y plantas genera una mayor resistencia a *Phytophthora infestans*, *Fusarium circinatum*, *Rhizoctonia* spp., entre otros patógenos (Cerqueira *et al.* 2017).

Las sales de fosfito son compuestos químicos biocompatibles que mejoran el control de diversas enfermedades en las plantas a través de la estimulación de mecanismos de Resistencia Inducida (IR) (Oyarburo *et al.* 2015; Massoud *et al.* 2012), y son amigables con el ambiente (Deliopoulos *et al.* 2010). Su efectividad se ha comprobado en diversos cultivos hortícolas (Gómez-Merino y Trejo-Téllez 2015), aunque en cultivos industriales como la caña de azúcar no se ha explorado su uso.

El uso de sales inorgánicas como las de Phi pueden resultar menos efectivas en el control de algunos patógenos en comparación con fungicidas convencionales de síntesis química (Deliopoulos *et al.* 2010), por lo cual no podrían ser reemplazados por completo. Sin embargo, su integración como parte de una estrategia de manejo de enfermedades, puede permitir a una reducción en el número de aplicaciones de fungicidas convencionales (Liljeroth *et al.* 2016).

1.6. Ventajas del uso de las sales de fosfito en el control fitosanitario y bioestimulación

Cuando la planta tiene suficiente abastecimiento de fosfato (Pi) y la aplicación de Phi es a baja concentración (no más del 20% del P total en forma de Phi, esta molécula muestra baja fitotoxicidad (Massoud *et al.* 2012).

El Phi es de fácil aplicación y bajo costo (Yu *et al.* 2015), lo que lo hace una técnica relativamente viable para uso comercial (Carmona *et al.* 2017). El Phi desencadena respuestas de defensa de las plantas y no presenta impactos negativos en el medio ambiente (Machinandarena *et al.* 2012; Massoud *et al.* 2012; Oyarburo *et al.* 2012). El Phi es compatible con otros agentes de control biológico o con moléculas fungicidas, sin problemas de inactivación (Liljeroth *et al.* 2016). Además, estas sales pueden tener efecto directo contra organismos fitopatógenos, como *Fusarium circinatum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia* spp., *Penicillium expansum* y *Colletotrichum*

gloeosporioides (Amiri y Bompeix, 2012; Cerqueira *et al.* 2017; Lai *et al.* 2017; Lopes *et al.* 2017; Lopes *et al.* 2017; Martínez 2016; Oliveri *et al.* 2012).

El Phi presenta translocación basipétala y acropétala. A diferencia de los fungicidas sistémicos clásicos que solo son translocados por el xilema, el fosfito puede ser translocado tanto por xilema como por floema (Yu *et al.* 2015).

Algo muy importante en el manejo fitosanitario de los cultivos es el hecho de que los productos a usar no generen resistencia en los organismos a controlar, y el Phi posee un menor riesgo de generar resistencia a enfermedades, a diferencia de los fungicidas convencionales (Deliopoulos, *et al.* 2010; Liljeroth *et al.* 2016).

1.7. Mecanismos de acción de las sales de fosfito

El mecanismo de acción de las sales de fosfito es complejo y aún no se conoce a detalle (Massoud *et al.* 2012). Se ha demostrado que el fosfito tiene efectos directos sobre *Phytophthora* spp., y otros hongos, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*, reduciendo el número de esporas germinadas e inhibiendo el crecimiento micelial (Amari y Bompeix, 2011; Daniel and Guest 2006; Dort *et al.* 2007; Lopes *et al.* 2017). Sin embargo, se cree que el modo primario de acción del fosfito es indirecto, a través de su estimulación de los mecanismos naturales de defensa de las plantas (Grant *et al.* 1990; Olivieri *et al.* 2012; Silva *et al.* 2011)

También existe una acción combinada en la que el fosfito reduce la tasa de extensión del patógeno, permitiendo que los sistemas de defensa natural del huésped lo detengan, aunque no maten al invasor y este modo puede describirse como mixto (Daniel y Guest, 2006).

1.8. *Trichoderma* spp. como alternativa a fungicidas químicos

El potencial de *Trichoderma* spp como Agente de Control Biológico (ACB), puede proporcionar una mejora en el crecimiento de plantas ornamentales y cultivos agrícolas en invernadero y a cielo abierto, esta actividad es atribuible a diversos compuestos antimicrobianos / antagonistas, además se caracterizan por un rápido desarrollo en diversos sustratos (Verma *et al.* 2007)

Vinale (2004) investigó la capacidad de *T. harzianum* cepa T22 y *Trichoderma atroviride*, cepa P1 para estimular el aumento en el crecimiento de cultivos como lechuga, tomate y chile bajo condiciones de invernadero, y reportó que la productividad del cultivo aumentó 300% frente a los

tratamientos testigo. Asimismo, Bal *et al.* (2008) reportan que algunas especies de *Trichoderma* pueden interactuar mejor con ciertas especies de plantas, debido a la liberación de exudados que secretan las raíces y que hacen que se induzca el crecimiento micelial de *Trichoderma*.

Harman *et al.*, (2004) estudiaron el tratamiento de semillas de maíz con la cepa comercial T22 de *T. harzianum*, para el control de *Pythium ultimum* y *Colletotrichum graminicola*. Reportan efectos importantes en el crecimiento de las plántulas en presencia de T22, que en ausencia del hongo. Además, observaron mayor colonización de raíces, aumento de tamaño y área de pelos radicales. Ellos reportaron que las plantas cultivadas a partir de semillas tratadas con T22, redujeron los síntomas de la antracnosis causada por *C. graminicola* y *P. ultimum*. También concluyen que la colonización de T22 sobre la raíz, puede inducir la resistencia sistémica en el maíz tratado y reducir las pérdidas causadas por estrés biótico.

Hoyos-Carvajal *et al.*, (2009) evaluaron 101 aislamientos de *Trichoderma* para identificar cepas capaces de producir metabolitos que mejoran el crecimiento de las plantas. Ellos reportan que el 20% de los aislamientos estudiados fueron capaces de producir formas solubles de fosfatos y que el 8% mostró la capacidad para producir sideróforos y convertir el hierro férrico en formas solubles mediante el efecto de quelación. Siete aislados de *Trichoderma* mejoraron significativamente el crecimiento de plantas frijol en semillero. Sin embargo, la producción de metabolitos varió ampliamente entre especies y cepas evaluadas. Algunos aislados no produjeron ninguno de los metabolitos medidos. Estos investigadores concluyen que el crecimiento fue mejorado en presencia de estas cepas de *Trichoderma* y de una combinación de factores entre los componentes endofíticos de la rizósfera y el hongo, pero no atribuyen la producción de metabolitos específicos a cada especie de *Trichoderma*.

1.9. Mecanismos de acción del género *Trichoderma*

El principal modo de acción de *Trichoderma* contra los hongos fitopatógenos es a través de la competencia por espacio. El micelio de *Trichoderma* rodea a las hifas del hongo patógeno, produciendo un estrangulamiento, seguido de una penetración que termina por desintegrar a las mismas. Posterior a esto, el micoparásito se alimenta de este sustrato. Por ejemplo; se ha reportado que algunas especies de *Trichoderma* producen antibióticos que actúan sobre *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* produciendo una degradación de sus hifas (Harman 2005; Verma *et al.*, 2007).

Actualmente, la función de los Agentes de Control Biológico (ACB) es un hecho bien conocido y se ha convertido en una estrategia de control cada vez más importante, y en algunos casos, complementario o incluso reemplazando a sus equivalentes químicos. Entre los mecanismos de acción biocontroladora de *Trichoderma* se encuentran diferentes métodos que inhiben la diseminación de los patógenos. Destacan, la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis (Harman, 2006; Infante *et al.*, 2009). Tovar (2008), indicó que *Trichoderma* posee la capacidad de aprovechar de manera eficiente los nutrientes que se encuentran en el medio (sustrato) en cantidades limitadas, impidiendo que otros patógenos tengan acceso a estos y por ende ocasionan su muerte por inanición. Además, el rápido desarrollo y colonización del medio por *Trichoderma* impide el establecimiento de otros microorganismos. El micoparasitismo es otro de los principales mecanismos involucrados en el antagonismo de *Trichoderma*, este crece hacia el patógeno desarrollándose alrededor de él y forma estructuras similares a ganchos en la superficie del hospedero que le permiten penetrar al interior del patógeno y por acción de enzimas líticas degrada su pared celular. Algunas especies de *Trichoderma* sp, producen elevadas concentraciones de enzimas degradadoras, tales como α -1,3-glucanasa y diferentes enzimas quitinolíticas que actúan en conjunto con proteasas y celulasas (Shoresh *et al.*, 2010; Lorito *et al.*, 2010).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La caña de azúcar es un cultivo de importancia económica para México que, como muchos otros, depende de los productos de síntesis química que controlan agentes causales de múltiples enfermedades (Bansal *et al.* 2016; Goswami *et al.* 2013; Mahlanza *et al.* 2013; Martínez-Fernández *et al.* 2015). Además de ser fuente de contaminación de aguas, suelos y aire, estos agroquímicos pueden causar graves daños a la salud humana y generar resistencia en los microorganismos que controlan (Lorenz *et al.* 2017).

La incidencia de hongos causantes de la marchites y pudrición en la caña de azúcar ha ocasionado considerables pérdidas, donde *Fusarium* sp. es uno de los hongos responsables de la pudrición de las raíces, enfermedad por la cual muchas de las variedades comerciales se han retirado de la siembra (Quezada *et al.* 2009), además, aproximadamente el 40.8–64.5% de azúcar puede ser reducido en las cañas de azúcar infectadas por *F. moniliforme* var. *Subglutinanos*, dependiendo de las variedades (Carmona *et al.* 2018).

Veracruz es el estado con mayor producción de caña de azúcar en México siendo CP 72-2086 la variedad con mayor presencia en los campos cañeros del país. El agrocañero ha presentado un rezago en innovación por poseer un genoma complejo, un largo ciclo de reproducción y susceptibilidad a presencia de plagas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Phi y su compatibilidad con *Trichoderma* spp. en el control de *Fusarium* spp. agente causal del Pokkah boeng en caña de azúcar.

3.2. Objetivos particulares

- 1) Cuantificar el porcentaje de inhibición de diferentes concentraciones de Phi sobre el desarrollo vegetativo y conidiogénesis de *Fusarium* sp. *in vitro*.
- 2) Establecer la compatibilidad *in vitro* entre hongo el *Trichoderma* sp. y Phi.
- 3) Determinar el porcentaje de inhibición de *Trichoderma* sp. y compatibilidad con Phi contra *Fusarium* sp. *in vitro*.
- 4) Determinar el efecto fitotóxico y compatibilidad de Phi y *Trichoderma* spp. sobre la morfofisiología de plántulas de caña de azúcar variedad CP 72-2086.

4. HIPÓTESIS

El Phi y el hongo *Trichoderma* spp. son compatibles y ejercen un efecto fungicida sobre *Fusarium* sp. agente causal del Pokkah boeng en caña de azúcar.

5. LITERATURA CITADA

- Abbasi, P. A., and G. Lazarovits. 2005. Effects of AG3 phosphonate formulations on incidence and severity of Pythium damping-off of cucumber seedlings under growth room, microplot, and field conditions. *Canadian Journal of Plant Pathology* 27: 420–429. doi:10.1080/07060660509507241.
- Amiri, A., and G. Bompeix. 2011. Control of *Penicillium expansum* with potassium phosphite and heat treatment. *Crop Protection* 30: 222–227. doi:10.1016/j.cropro.2010.10.010.
- Carmona, Marcelo A, Francisco J Sautua, Pablo E Grijalba, Mariano Cassina, and Oscar Pérez-Hernández. 2017. Effect of K and Mn Phosphites in the control of Pythium damping-off in soybean: a feasible alternative to fungicide seed treatments. *Pest Management Science*: n/a--n/a. doi:10.1002/ps.4714.
- Cerqueira, A., A. Alves, H. Berenguer, B. Correia, A. Gómez-Cadenas, J. J. Diez, P. Monteiro, and G. Pinto. 2017. Phosphite shifts physiological and hormonal profile of Monterey pine and delays *Fusarium circinatum* progression. *Plant Physiology and Biochemistry* 114: 88–99. doi:10.1016/j.plaphy.2017.02.020.
- CONADESUCA. 2018. La zafra 2017/18.
- Daniel, Rosalie, and David Guest. 2006. Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67: 194–201. doi:10.1016/j.pmpp.2006.01.003.
- Deliopoulos, T., P. S. Kettlewell, and M. C. Hare. 2010. Fungal disease suppression by inorganic salts: A review. *Crop Protection* 29: 1059–1075. doi:10.1016/j.cropro.2010.05.011.
- Dorn, B., T. Musa, H. Krebs, P. M. Fried, and H. R. Forrer. 2007. Control of late blight in organic potato production: evaluation of copper-free preparations under field, growth chamber and laboratory conditions. *European Journal of Plant Pathology* 119: 217–240. doi:10.1007/s10658-007-9166-0.
- Fumes, B. H., F. N. Andrade, Á. J. Dos-Santos-Neto, and F. M. Lanças. 2016. Determination of pesticides in sugarcane juice employing microextraction by packed sorbent followed by gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 39: 2823–2830.

doi:10.1002/jssc.201600077.

- Gómez-Merino, F. C., and L. I. Trejo-Téllez. 2015. Biostimulant activity of phosphite in horticulture. *Scientia Horticulturae* 196. Elsevier B.V.: 82–90. doi:10.1016/j.scienta.2015.09.035.
- Gómez-Merino, F. C., L. I. Trejo-Téllez, V. Morales-Ramos, J. Salazar-Ortiz, J. Velasco-Velasco, H.E. Sentíes-Herrera, and P. Ladewig. 2014. Necesidades de Innovación en la producción de Caña de Azúcar. *Agroproductividad*: 22–26.
- Gómez-Merino, F. C., L. I. Trejo-Téllez, and H. E. Sentíes-Herrera. 2014. Chapter 5: Sugarcane as a Novel Biofactory: Potentialities and Challenges. In *Biosystems Engineering: Biofactories for Food Production in the Century XXI*, ed. Ramon Guevara-Gonzalez and Irineo Torres-Pacheco, 129–146. Cham: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-03880-3.
- Goswami, D., P. J. Handique, and S. Deka. 2014. Rhamnolipid biosurfactant against *Fusarium sacchari* -the causal organism of pokkah boeng disease of sugarcane. *Journal of Basic Microbiology* 54: 548–557. doi:10.1002/jobm.201200801.
- Govender, P., S. A. McFarlane, and R. S. Rutherford. 2010. *Fusarium* species causing pokkah boeng and their effect on Eldana saccharina Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Proceedings of the Annual Congress - South African Sugar Technologists' Association* 83: 267–270.
- Grant, B. R., R. H. Dunstan, J. M. Griffith, J. O. Niere, and R. H. Smillie. 1990. The mechanism of phosphonic (phosphorous) acid action in Phytophthora. *Australasian Plant Pathology* 19: 115–121. doi:10.1071/APP9900115.
- Hilton, A., H. Zhang, W. Yu, and W. Shim. 2017. Identification and Characterization of Pathogenic and Endophytic Fungal Species Associated with Pokkah Boeng Disease of Sugarcane. *The Plant Pathology Journal* 33: 238–248. doi:10.5423/PPJ.OA.02.2017.0029.
- Hsuan, H. M., B. Salleh, and L. Zakaria. 2011. Molecular Identification of *Fusarium* Species in Gibberella fujikuroi Species Complex from Rice, Sugarcane and Maize from Peninsular Malaysia. *International Journal of Molecular Sciences* 12: 6722–6732. doi:10.3390/ijms12106722.

- Koizumi, Tatsuji. 2015. Biofuels and food security. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 52. Elsevier: 829–841. doi:10.1007/978-3-319-05645-6_7.
- Lai, Tongfei, Ying Wang, Yaya Fan, Yingying Zhou, Ying Bao, and Ting Zhou. 2017. The response of growth and patulin production of postharvest pathogen *Penicillium expansum* to exogenous potassium phosphite treatment. *International Journal of Food Microbiology* 244. Elsevier B.V.: 1–10. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.12.017.
- Liljeroth, E., Å. Lankinen, L. Wiik, D. D. Burra, E. Alexandersson, and E. Andreasson. 2016. Potassium phosphite combined with reduced doses of fungicides provides efficient protection against potato late blight in large-scale field trials. *Crop Protection* 86. Elsevier Ltd: 42–55. doi:10.1016/j.cropro.2016.04.003.
- Lin, Z., S. Xu, Y. Que, J. Wang, J. C. Comstock, J. Wei, P. H. McCord, B. Chen, R. Chen, and M. Zhang. 2014. Species-Specific Detection and Identification of *Fusarium* Species Complex, the Causal Agent of Sugarcane Pokkah Boeng in China. Edited by Igor Mokrousov. *PloS one* 9: e104195. doi:10.1371/journal.pone.0104195.
- Liu, C., Z. Cui, X. Yan, Z. Qi, M. Ji, and X. Li. 2016. Synthesis, Fungicidal Activity and Mode of Action of 4-Phenyl-6-trifluoromethyl-2-aminopyrimidines against *Botrytis cinerea*. *Molecules* 21: 828. doi:10.3390/molecules21070828.
- Lopes, Leonardo Ferreira, André Freire Cruz, Mariana Layse de Araújo Barreto, Thais Melissa Macedo de Vasconcelos, and Luiz Eduardo Bassay Blum. 2018. Post-harvest treatment with Ca-phosphite reduces anthracnose without altering papaya fruit quality. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 93: 272–278. doi:10.1080/14620316.2017.1361342.
- López-Vázquez, J. J., A. Valdez-Balero, H. V. Silva-Rojas, C. Flores-Revilla, and C. A. Rangel-Ortega. 2016. Evaluación a la escaldadura (*Xanthomonas albinea* (Ashby) Dowson) de la hoja de variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). *Agroproductividad* 9: 48–53.
- Lorenz, S., J. J. Rasmussen, A. Süß, T. Kalettka, B. Golla, P. Horney, M. Stähler, B. Hommel, and R. B. Schäfer. 2017. Specifics and challenges of assessing exposure and effects of pesticides in small water bodies. *Hydrobiologia* 793: 213–224. doi:10.1007/s10750-016-2973-6.

- Machinandiarena, Milagros Florencia, María Candela Lobato, Mariana Laura Feldman, Gustavo Raúl Daleo, and Adriana Balbina Andreu. 2012. Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. *Journal of Plant Physiology* 169: Elsevier GmbH.: 1417–1424. doi:10.1016/j.jplph.2012.05.005.
- Majeed, A., Z. Muhammad, Z. Ullah, R. Ullah, and H. Ahmad. 2017. Late Blight of Potato (*Phytophthora infestans*) I: Fungicides Application and Associated Challenges. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology* 5: 261–266. doi:10.24925/turjaf.v5i3.261-266.1038.
- Martínez-Fernández, E., P. Martínez-Jaimes, D. Guillén Sánchez, G. Peña-Chora, and V. M. Hernández-Hernández. 2015. Diversidad de *Fusarium* en las raíces de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en el estado de Morelos, México. *Revista Mexicana de Micología* 42: 33–43.
- Martínez, Sebastián. 2016. Effects of combined application of potassium phosphite and fungicide on stem and sheath disease control, yield, and quality of rice. *Crop Protection* 89: 259–264. doi:10.1016/j.cropro.2016.08.002.
- Massoud, K., T. Barchietto, T. Le-Rudulier, L. Pallandre, L. Didierlaurent, M. Garmier, F. Ambard-Bretteville, J.-M. Seng, and P. Saindrenan. 2012. Dissecting Phosphite-Induced Priming in *Arabidopsis* Infected with *Hyaloperonospora arabidopsidis*. *Plant Physiology* 159: 286–298. doi:10.1104/pp.112.194647.
- McFarlane, S.A., P. Govender, and R.S. Rutherford. 2009. Interactions between *Fusarium* species from sugarcane and the stalk borer, *Eldana saccharina* (Lepidoptera: Pyralidae). *Annals of Applied Biology* 155: 349–359. doi:10.1111/j.1744-7348.2009.00345.x.
- McGovern, R. J. 2015. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection* 73: 78–92. doi:10.1016/j.cropro.2015.02.021.
- Mohammadi, A., R. F. Nejad, and N. N. Mofrad. 2012. *Fusarium verticillioides* from sugarcane, vegetative compatibility groups and pathogenicity. *Plant Protection Science* 48: 80–84.
- Morgado-González, A., D. Espinosa-Victoria, and F. C. Gómez-Merino. 2015. Efficiency of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Sugarcane. *Terra Latinoamericana* 33: 321–

- Munawar, A., J. W. Marshall, R. J. Cox, A. M. Bailey, and C. M. Lazarus. 2013. Isolation and Characterisation of a Ferrirhodin Synthetase Gene from the Sugarcane Pathogen *Fusarium sacchari*. *ChemBioChem* 14: 388–394. doi:10.1002/cbic.201200587.
- Olivieri, F.P., M.L. Feldman, M.F. Machinandiarena, M.C. Lobato, D.O. Caldiz, G.R. Daleo, and A.B. Andreu. 2012. Phosphite applications induce molecular modifications in potato tuber periderm and cortex that enhance resistance to pathogens. *Crop Protection* 32: 1–6. doi:10.1016/j.cropro.2011.08.025.
- Oyarburo, Natalia Soledad, Milagros Florencia Machinandiarena, Mariana Laura Feldman, Gustavo Raúl Daleo, Adriana Balbina Andreu, and Florencia Pía Olivieri. 2015. Potassium phosphite increases tolerance to UV-B in potato. *Plant Physiology and Biochemistry* 88. Elsevier Masson SAS: 1–8. doi:10.1016/j.plaphy.2015.01.003.
- Rao, Vivekanand P., Sanjay Singh, R. Chaudhary, M. K. Sharma, R.S. Sengar, Uma M. Singh, and Vinay Sharma. 2016. Genetic variability in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) genotypes through inter simple sequence repeats (ISSR) markers. *Journal of Applied and Natural Science* 8: 1404–1409. doi:10.31018/jans.v8i3.973.
- Rott, P. C., C. Kaye, M. Naranjo, J. M. Shine, S. Sood, J. C. Comstock, and R. N Raid. 2016. Controlling sugarcane diseases in Florida: a challenge in constant evolution. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists* 29: 595–600.
- Savario, C. F., and J. W. Hoy. 2011. Microbial communities in sugarcane field soils with and without a sugarcane cropping history. *Plant and Soil* 341: 63–73. doi:10.1007/s11104-010-0622-9.
- Sentías-Herrera, H. E., F. C. Gómez-Merino, A. Valdez-Balero, V. H. Silva-Rojas, and L. I. Trejo-Téllez. 2014. The Agro-Industrial Sugarcane System in Mexico: Current Status, Challenges and Opportunities. *Journal of Agricultural Science* 6: 26. doi:10.5539/jas.v6n4p26.
- Sentías-Herrera, H. E., L. I. Trejo-Téllez, and F. C. Gómez-Merino. 2017. The Mexican sugarcane production system: History, current status and new trends. In *Sugarcane*, ed. Rachel Murphy, 39–72.

- Sentías-Herrera, H.E., and F.C. Gómez-Merino. 2014. Nuevas directrices en mejoramiento genético de caña de azúcar. *Agroproductividad*.
- Sentías-Herrera, H.E., F.C. Gómez-Merino, and R. Loyo-Joachin. 2014. El mejoramiento genético de la caña de azúcar (*Saccharum spp.*) en México: una historia de éxito con los nuevos desafíos. *Agroproductividad* 9: 8–13.
- Sharma, M., R. Manoharlal, S. Shukla, N. Puri, T. Prasad, S. V. Ambudkar, and R. Prasad. 2009. Curcumin Modulates Efflux Mediated by Yeast ABC Multidrug Transporters and Is Synergistic with Antifungals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53: 3256–3265. doi:10.1128/AAC.01497-08.
- Silva, O. C., H. A. A. Santos, M. Dalla Pria, and L. L. May-De Mio. 2011. Potassium phosphite for control of downy mildew of soybean. *Crop Protection* 30: 598–604. doi:10.1016/j.cropro.2011.02.015.
- Siti-Nordahliawate, M. S., M. Z. Nur-Ain-Izzati, A. R. Azmi, and B. Salleh. 2008. Distribution, morphological characterization and pathogenicity of *Fusarium sacchari* associated with pokkah boeng disease of sugarcane in Peninsular Malaysia. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* 31: 279–286.
- Verma, Mausam, Satinder K. Brar, R. D. Tyagi, R. Y. Surampalli, and J. R. Valéro. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma spp.*: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* 37: 1–20. doi:10.1016/j.bej.2007.05.012.
- Vishwakarma, S. K., A. Nigam, and A. Singh. 2016. Molecular phylogenetic analysis of *Fusarium* isolate causing pokkah boeng disease in sugarcane based on RAPD marker. *International Journal of Agricultural* 6: 177–186.
- Vishwakarma, SK, P Kumar, A Nigan, A Singh, and A Kumar. 2013. Pokkah Boeng: An Emerging Disease of Sugarcane. *Journal of Plant Pathology & Microbiology* 04. doi:10.4172/2157-7471.1000170.
- Viswanathan, R. 2013. Status of Sugarcane Wilt : One Hundred Years After Its Occurrence in India. *Journal of Sugarcane Research* 3: 86–106.
- Viswanathan, R. 2016. Varietal Degeneration in Sugarcane and its Management in India. *Sugar*

Tech 18: 1–7. doi:10.1007/s12355-015-0369-y.

Viswanathan, R., C. G. Balaji, R. Selvakumar, P. Malathi, A. R. Sundar, C. N. Prasanth, M. L. Chhabra, and B. Parameswari. 2017. Epidemiology of *Fusarium* Diseases in Sugarcane: A New Discovery of Same *Fusarium* sacchari Causing Two Distinct Diseases, Wilt and Pokkah Boeng. *Sugar Tech* 19. Springer India: 638–646. doi:10.1007/s12355-017-0552-4.

Viswanathan, R., M. Poongothai, and P. Malathi. 2011. Pathogenic and Molecular Confirmation of *Fusarium* sacchari Causing Wilt in Sugarcane. *Sugar Tech* 13: 68–76. doi:10.1007/s12355-011-0066-4.

Viswanathan, R., and G. P. Rao. 2011. Disease Scenario and Management of Major Sugarcane Diseases in India. *Sugar Tech* 13: 336–353. doi:10.1007/s12355-011-0102-4.

Yu, Jiaming, Timothy K Broschat, William G Latham, and Monica L Elliott. 2015. Dynamics and Distribution of Trunk- injected Phosphite in Coconut Palm 50: 1327–1331.

Zhang, M., and J. M. J. Jeyakumar. 2018. *Fusarium* Species Complex Causing Pokkah Boeng in China. In *Fusarium - Plant Diseases, Pathogen Diversity, Genetic Diversity, Resistance and Molecular Markers*, i:139–154. InTech. doi:10.5772/intechopen.73133.

CAPÍTULO I. COMPATIBILIDAD *in vitro* DE FOSFITO Y *Trichoderma* sp., CONTRA *Fusarium* sp., AGENTE CAUSAL DEL POKKAH BOENG EN CAÑA DE AZÚCAR

1.1 Resumen

La caña de azúcar es el cultivo más importante para la producción de azúcar en el mundo, México se encuentra en el sexto lugar de producción mundial, sin embargo, este cultivo se ve afectado por factores bióticos y abióticos. El género *Fusarium* se ha reportado como agente causal de enfermedades en caña de azúcar como el Pokkah boeng. Debido al uso indiscriminado de fungicidas químicos, se necesitan enfoques alternativos para su control, como la integración de sales inorgánicas y agentes de control biológico. El objetivo principal de este estudio fue evaluar la compatibilidad de fosfito (Phi) y *Trichoderma* sp. (Taz-001, Taz-013 y Taz-016) sobre el desarrollo vegetativo y conidiogénesis de *Fusarium*. Se utilizaron diferentes concentraciones de Phi (0, 500, 1000, 4000 y 8000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y tres aislamientos de *Trichoderma* provenientes de la rizósfera de caña de azúcar para evaluar el desarrollo *in vitro* de *Fusarium*, así como la capacidad antagónica de los biocontroladores. Se evaluaron parámetros de porcentaje de inhibición micelial, tasa de crecimiento y conidiogénesis. El Phi mostró un modo de acción directo sobre el desarrollo y esporulación de *Fusarium* sp. El aislado Taz-016 presentó 96.45 y 95.87% de compatibilidad en concentraciones de 500 y 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Phi. Los tres aislados de *Trichoderma* mostraron un alto potencial como biocontroladores de *Fusarium* (60.83% de inhibición). Cuando se combinó *Trichoderma* + 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Phi aumentó en promedio a 76.23% el porcentaje de inhibición de *Fusarium*; 15.4 y 45.94% más en comparación con el tratamiento de *Trichoderma* y Phi solo, respectivamente.

Palabras clave: Pokkah boeng, antagonismo, micoparasitismo, biocontrol, ácido fosforoso, manejo integrado

1.2 Introducción

La caña de azúcar (*Saccharum* sp.) es el cultivo más productivo en el mundo, debido a su alta capacidad fotosintética y de almacenamiento de sacarosa en su tallo, su cultivo se realiza en regiones tropicales y subtropicales del mundo, en más de 130 países y es la principal fuente de

azúcar comercial ya que contribuye con el 75% de la producción mundial. (Senties-Herrera *et al.* 2014; Morgado-González *et al.* 2015; Rao *et al.* 2016). En México, este cultivo se desarrolla en 15 entidades federativas y 227 municipios, que beneficia económicamente a cerca de un millón de personas de manera directa y más de 2.2 millones de manera indirecta (Gómez-Merino *et al.* 2014). Además, es una de las principales materias primas para la producción de alcohol, ácido acético, butanol, papel, enzimas industriales, y bioetanol como biocombustible alternativo a la gasolina (Koizumi 2015; Rao *et al.* 2016).

Dentro del aspecto fitosanitario, este cultivo es afectado por diversos factores abióticos, como la disminución de la fertilidad de suelos, déficit hídrico, fitotoxicidad, sequía prolongada, salinidad, entre otros (Azevedo *et al.* 2011; Showler 2016), así como por factores bióticos, como plagas y enfermedades donde destaca la incidencia de hongos, bacterias y virus (Savario y Hoy 2011).

Uno de los factores bióticos involucrados en el deterioro de la raíz y tallo de la caña de azúcar es la presencia de hongos fitopatógenos del género *Fusarium*, que han sido reportados como agentes causales de enfermedades en aproximadamente el 80% de las plantas cultivadas (Martínez-Fernández *et al.* 2015); algunas especies como *F. sacchari* y *F. moniliforme var. subglutinans* han sido identificadas como agentes causales del Pokkah boeng o deformación del ápice en caña de azúcar. Esta enfermedad puede provocar la reducción del contenido de sacarosa en porcentajes de 40.8 a 64.5% (Siti-Nordahliawate *et al.* 2008; Goswami *et al.* 2013) y además, se ha demostrado que *Fusarium* puede asociarse a la pudrición roja de la caña al combinarse con *Colletotrichum falcatum* (Govender *et al.* 2010).

La erradicación de estas enfermedades en caña de azúcar se realiza de manera convencional con fungicidas benzimidazoles como carbendazim y benomilo, sin embargo, su uso indiscriminado ha inducido mecanismos de resistencia microbiana (Sharma *et al.* 2009; McGovern 2015; Sevastos *et al.* 2018; Patel *et al.* 2019), que, aunado con las consecuencias del calentamiento global, facilitan la proliferación de estas enfermedades y hacen más difícil su control (Fumes *et al.* 2016). La búsqueda de nuevas alternativas bioracionales y uso de variedades resistentes, forma parte de las prioridades en el manejo sustentable de enfermedades, como el empleo del control biológico a través de microorganismos antagonistas o la resistencia inducida con sales inorgánicas (Oyarburo *et al.* 2015; Manayay-Guevara *et al.* 2016)

Trichoderma sp. es un hongo comúnmente utilizado en el biocontrol de patógenos del suelo, y ha sido reportado como un efectivo antagonista y estimulador de la defensa natural de las plantas (Aly y Manal 2009; Qualhato *et al.* 2013; Li *et al.* 2016), así mismo; las sales de fosfito (Phi), que se derivan del ácido fosfórico (fosfonato), se han reportado como una opción a los fungicidas convencionales para el control de fitopatógenos (Massoud *et al.* 2012; Liljeroth *et al.* 2016) como *Phytophthora infestans*, *Fusarium circitatum*, *Rhizoctonia* sp., entre otros (Oyarburo *et al.* 2015; Martínez 2016; Cerqueira *et al.* 2017).

Trichoderma sp., presenta diferentes modos de acción durante el control de patógenos, como la competencia por el sustrato, micoparasitismo, antibiosis y desactivación de enzimas del patógeno, principalmente (Harman 2006; Verma *et al.* 2007; Sharma *et al.* 2017), mientras que el Phi ejerce un efecto directo sobre los hongos fitopatógenos, provocando la reducción de la conidiogénesis y la inhibición del crecimiento micelial (Amiri y Bompeix 2011; Lopes *et al.* 2018). De igual manera, se ha indicado que el fosfito puede actuar de modo indirecto, a través de la estimulación de los mecanismos naturales de defensa de las plantas (Silva *et al.* 2011).

No obstante, el uso de Phi puede resultar menos efectivo para el control de algunos patógenos, en comparación con los fungicidas de síntesis química (Deliopoulos *et al.* 2010), por lo que aplicarlo en una estrategia de manejo integrado, en combinación con *Trichoderma*, podría aumentar su efectividad contra los fitopatógenos. Sin embargo, para la integración de cualquier organismo fúngico con un compuesto inorgánico, se requiere de un conocimiento de la compatibilidad entre los dos agentes, particularmente en la conidiogénesis y desarrollo vegetativo (Kiran *et al.* 2018; Widmer 2019).

Aunque la compatibilidad *in vitro* entre especies de *Trichoderma* y fungicidas como hexaconazol, clorotalonil, Mancozeb y oxiclورو de cobre (Bagwan 2010; Dhanya *et al.* 2016; Padmaja *et al.* 2018), se ha evaluado para el manejo de fitopatógenos de suelo, esta relación no se ha determinado con Phi y *Trichoderma*.

La evaluación de combinaciones de Phi y aislamientos nativos de *Trichoderma*, proporcionará información básica para seleccionar la dosis de Phi y el aislamiento del hongo para dirigir estudios *in vivo* en el control de *Fusarium* sp., en caña de azúcar. Por estas razones, el objetivo de este trabajo fue determinar la compatibilidad de *Trichoderma* sp., a diferentes concentraciones de Phi

y la mínima concentración de Phi que en co-inoculación con *Trichoderma* sp., contribuye al control de *Fusarium* sp.

1.3 Materiales y Métodos

El experimento se realizó en el laboratorio de Microbiología Aplicada del Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca (ITSTB) ubicado en la Avenida Veracruz, esq. Héroes de Puebla, Colonia Pemex, Tierra Blanca, Veracruz, México. El sitio experimental se ubica entre las coordenadas 18°44' de Latitud Norte, 96°45' de Longitud Oeste, a 53 msnm, con un clima tropical seco (clasificación climática de Köppen: Aw).

1.3.1. Material microbiológico

Se empleó un aislado del género *Fusarium*, proveniente de la raíz de una cepa de caña de azúcar de la variedad CP 72-2086, (18°35'31.1'' N; 96°29'20.4'' W), que se sembró en el medio de cultivo Papa y Dextrosa Agar (PDA) (Bioxon®) por el método punta de hifa hasta su purificación e identificación taxonómica (Barnett y Hunter 1978), se dejó en incubación a 28 °C (horno Binder ®) durante 7 d para favorecer su desarrollo. Finalmente se preservó en crioviales con glicerol 10% a 4°C hasta antes de su inoculación.

Se evaluaron tres aislados del género *Trichoderma* sp., como biocontroladores, denominados Taz-001, Taz-013 y Taz-016, pertenecientes al cepario del ITSTB, obtenidos previamente a partir de raíces de plantas de caña de azúcar de la variedad CP 72-2086 (18°35'30.2'' N; 96°29'51.0'' W), Mex 69-290 (18°18'09.0'' N; 96°25'28.1'' W), CP 70-1527 (18°22'22.3'' N; 96°28'24.4'' W) respectivamente, los cuales se sembraron y preservaron hasta antes de su inoculación como se describió anteriormente.

1.3.2 Efecto del Phi sobre el crecimiento de *Fusarium* sp., *in vitro*

Para evaluar el efecto del Phi sobre el desarrollo y conidiogénesis de *Fusarium* sp., se estableció una ventana de respuesta biológica con cinco concentraciones de Phi: 500, 1000, 2000, 4000 y 8000 µg mL⁻¹ preparadas con ácido fosfórico (SIGMA-Aldrich®), así como un testigo sin Phi, en medio de cultivo PDA, suplementado con 1% de bagazo de caña de azúcar, el pH se ajustó a 5.7 con NaOH 1 N. El inóculo de *Fusarium* sp., se ajustó a una concentración de 1x10⁶ esporas mL⁻¹

con Tween 20 al 0.03% y se inocularon 5 μ L de la suspensión del hongo en el centro de las cajas Petri con el medio PDA suplementado, todos los tratamientos se incubaron a 28° C durante 7 d.

El crecimiento micelial se midió cada 24 h con un vernier digital (Soled ®), hasta que el testigo alcanzó a cubrir la superficie total de la caja Petri (90 mm de diámetro en 7 d). Para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial [MGI (%)] y la tasa de crecimiento, las mediciones se realizaron sobre el eje X y Y de cada colonia fúngica y se registró el promedio del crecimiento micelial. El MGI (%) se calculó de acuerdo a la fórmula propuesta por Pandey *et al.* (1981).

$$MGI (\%) = \frac{Dc - Dt}{Dc} \times 100$$

Dónde Dc es el diámetro promedio de las colonias del hongo testigo y Dt es el diámetro promedio de las colonias del hongo en tratamiento.

Para evaluar la conidiogénesis, después de finalizar el periodo de incubación de 7 d se adicionaron sobre las cajas Petri 4 mL de una solución de Tween 0.03%, con ayuda de un pincel estéril se colectaron las esporas de cada uno de los microorganismos y la suspensión recuperada se depositó en un tubo para centrifuga de 50 mL con un volumen final de 30 mL.

La concentración de esporas de cada tratamiento se contabilizó con ayuda de una cámara de Neubauer con microscopio compuesto a 40X. Para determinar la tasa de crecimiento se estudió la estructura de correlación, mediante el análisis de diferentes modelos estadísticos, eligiendo el de mayor ajuste.

1.3.3 Compatibilidad de los aislamientos de *Trichoderma* con Phi

Para evaluar la compatibilidad de *Trichoderma* sp. con fosfito, se prepararon suspensiones de los aislamientos Taz-001, Taz-013 y Taz-016, las cuales se inocularon en el medio PDA bajo las mismas condiciones y concentraciones de Phi del experimento anterior. La compatibilidad de los aislamientos de *Trichoderma* con Phi se evaluó mediante la comparación de la concentración de esporas obtenida en el testigo contra las obtenidas con cada concentración de Phi.

1.3.4 Antagonismo *in vitro* de aislamientos del género *Trichoderma* contra *Fusarium* sp

Las pruebas de confrontación se realizaron empleando la técnica de cultivo dual en cajas Petri de 90 mm de diámetro, con medio de cultivo PDA. Para observar el antagonismo, en la base de la caja se trazó la línea del diámetro y se marcaron dos puntos equidistantes del centro hacia los extremos (22.5 mm) de la caja Petri, de esta manera se ubicaron los puntos de inoculación del patógeno y el antagonista. Para cada confrontación se inocularon 5 μL de las suspensiones de *Trichoderma* sp. (Taz-001, Taz-013 y Taz-016), y *Fusarium* sp., previamente ajustadas a una concentración de 1×10^6 esporas mL^{-1} en Tween 20 al 0.03%. Como tratamiento testigo, se inocularon 5 μL de cada antagonista y del patógeno y se incubaron a 28°C durante 10 d. El MGI (%) se calculó como se describió en el experimento de efecto del Phi sobre el crecimiento de *Fusarium* sp., *in vitro*.

1.3.5 Compatibilidad *in vitro* de aislamientos del género *Trichoderma* con Phi contra *Fusarium* sp

La compatibilidad *in vitro* de aislamientos del género *Trichoderma* con Phi para el control de *Fusarium* sp., se estudió mediante la técnica de cultivos duales como se describió en el experimento de antagonismo. Se evaluaron los aislamientos Taz-001, Taz-013 y Taz-016, cada uno en combinación con tres concentraciones de Phi: 1000, 4000 y 8000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Los tratamientos se inocularon en el medio PDA, que se ajustó a pH de 5.7 con NaOH 1 N. El tratamiento testigo fue el hongo sin la presencia de Phi. Todos los tratamientos se incubaron a 28°C durante 10 d y el MGI (%) se evaluó como se describió en el experimento de efecto del Phi sobre el crecimiento de *Fusarium* sp., *in vitro*.

1.3.6 Diseño experimental

Los diseños experimentales utilizados en este estudio fueron un diseño de bloques completos al azar para el análisis de las variables conidiogénesis y porcentaje de inhibición, así como el diseño completamente al azar con arreglo factorial anidado para tasa de crecimiento. En cada evaluación se utilizaron 4 repeticiones por tratamiento y todos los experimentos se realizaron dos veces en el tiempo. Se emplearon tres modelos estadísticos: 1) Modelo Lineal Generalizado Mixto (MLGM) con respuesta binomial negativa (λ_{ij}, φ) para las variables de respuesta como conidiogénesis de *Trichoderma* sp., y de *Fusarium* sp., 2) Modelo Lineal Generalizado Mixto (MLGM) con respuesta beta (μ_{ij}, φ) para la evaluación de tasa de crecimiento de *Fusarium* sp., y 3) Modelo

Lineal Mixto (MLM) para el MGI (%) de *Fusarium* sp., en el estudio del efecto de Phi, en el antagonismo de *Trichoderma* sp., y la compatibilidad de Phi con *Trichoderma* sp.

1.3.6.1 Efecto del Phi sobre el crecimiento de *Fusarium* sp., in vitro. El MLM para el porcentaje de inhibición de *Fusarium* sp., fue: $y_{ijk} = \mu + Conc_i + Caja(Bioensayo)_{k(j)} + e_{ijk}$, donde: y_{ijk} es el porcentaje de inhibición en la combinación ijk -ésima observación, μ es la media general, $Conc_i$ es el efecto fijo de la concentración de fosfito ($i = 1, \dots, 6$), $Caja (Bioensayo)_{k(j)}$ es el efecto aleatorio caja de Petri dentro del bioensayo y e_{ijk} es el error experimental asumiendo $e_{ijk} \sim N(0, \sigma^2)$. Mientras que el predictor lineal para conidiogénesis de *Fusarium* sp., fue: $\eta_{ijk} = \eta + Conc_i + Caja(Bioensayo)_{k(j)}$, donde: η_{ijk} es el número de esporas en la combinación ijk -ésima observación, η es la media general, $Conc_i$ es el efecto fijo de la concentración de fosfito ($i = 1, \dots, 6$), $Caja (Bioensayo)_{k(j)}$ es el efecto aleatorio caja de Petri dentro del bioensayo con $Caja (Bioensayo)_{k(j)} \sim N(0, \sigma_{Caja(Bioensayo)}^2)$.

El predictor lineal para la respuesta de tasa de crecimiento de *Fusarium* sp., en las diferentes concentraciones de Phi fue $\eta_{ijk} = \theta + Conc(Hongo)_{j(i)} + Rep_{(k)}$, donde: η_{ijk} es el predictor lineal del crecimiento del hongo en la combinación ijk -ésima observación, θ es el intercepto, $Conc(Hongo)_{j(i)}$ es el efecto fijo de concentración de Phi dentro de crecimiento del hongo y $Rep_{(k)}$ es el efecto aleatorio de las repeticiones, asumiendo que $Rep_{(k)} \sim N(0, \sigma_{Rep}^2)$. Se realizó una comparación de las estructuras de correlación, eligiéndose un modelo de correlación con mejor ajuste al fenómeno estudiado.

1.3.6.2 Compatibilidad de los aislamientos de *Trichoderma* con Phi. El predictor lineal para la conidiogénesis de los aislados de *Trichoderma* sp., fue $\eta_{ijkl} = \eta + Cepa_i + Conc_j + (Cepa \times Conc)_{ij} + Caja(Bioensayo)_{l(k)}$, cuya función liga está dada por $\log(\lambda_{ijkl}) = \eta_{ijkl}$, donde: η_{ijkl} es el predictor lineal del número de esporas en la combinación $ijkl$ -ésima observación, η es el intercepto, $Cepa_i$ es el efecto fijo debido a Cepa ($i = 1, 2, 3$), $Conc_j$ es el efecto fijo de la concentración de fosfito ($j = 1, \dots, 6$), $(Cepa \times Conc)_{ij}$ es el efecto fijo de la interacción del tipo de cepa y la concentración de Phi, $Caja (Bioensayo)_{l(k)}$ es el efecto aleatorio caja de Petri dentro del bioensayo, asumiendo que $Caja (Bioensayo)_{l(k)} \sim N(0, \sigma_{Caja(Bioensayo)}^2)$.

1.3.6.3 Antagonismo *in vitro* de aislamientos del género *Trichoderma* contra *Fusarium* sp. El predictor lineal para el antagonismo de *Trichoderma* sp. contra *Fusarium* sp. fue $\eta_{ij} = \Theta + Bio_j + Antagonismo_i$ donde: η_{ij} es el predictor lineal del crecimiento del hongo en la combinación *ij*-ésima observación, Θ es el intercepto, Bio_j es el efecto aleatorio de bioensayo con $Bio_j \sim N(0, \sigma_{Bio}^2)$ y se estableció $Antagonismo_i$ como el efecto fijo de los aislados de *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento de *Fusarium* sp.

1.3.6.4 Compatibilidad *in vitro* de aislamientos del género *Trichoderma* con Phi contra *Fusarium* sp. El predictor lineal para la compatibilidad de *Trichoderma* sp. con Phi contra *Fusarium* $\eta_{ij} = \Theta + Bio_j + Antagonismo_i$ donde: η_{ij} es el crecimiento del hongo en la combinación *ij*-ésima observación, Θ es el intercepto, Bio_j es el efecto aleatorio del número de bioensayo con $Bio_j \sim N(0, \sigma_{Bio}^2)$ y se estableció $Antagonismo_i$ como el efecto fijo de Phi en combinación con los aislados de *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento de *Fusarium* sp.

1.3.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico de las variables evaluadas se realizó mediante el procedimiento glimmix (PROC GLIMMIX) con SAS para Windows (Statistical Analysis System 9.4), y las medias se compararon mediante la prueba de Fisher LSD con una significancia del 5%.

1.4 Resultados

1.4.1 Efecto del Phi sobre el crecimiento de *Fusarium* sp., *in vitro*

Para determinar la susceptibilidad de *Fusarium* a Phi, se evaluó el efecto sobre el crecimiento micelial y la conidiogénesis. Se observaron diferencias estadísticas ($P = 0.001$) en el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium* sp., al aumentar la concentración de Phi en el medio (Figura 3).

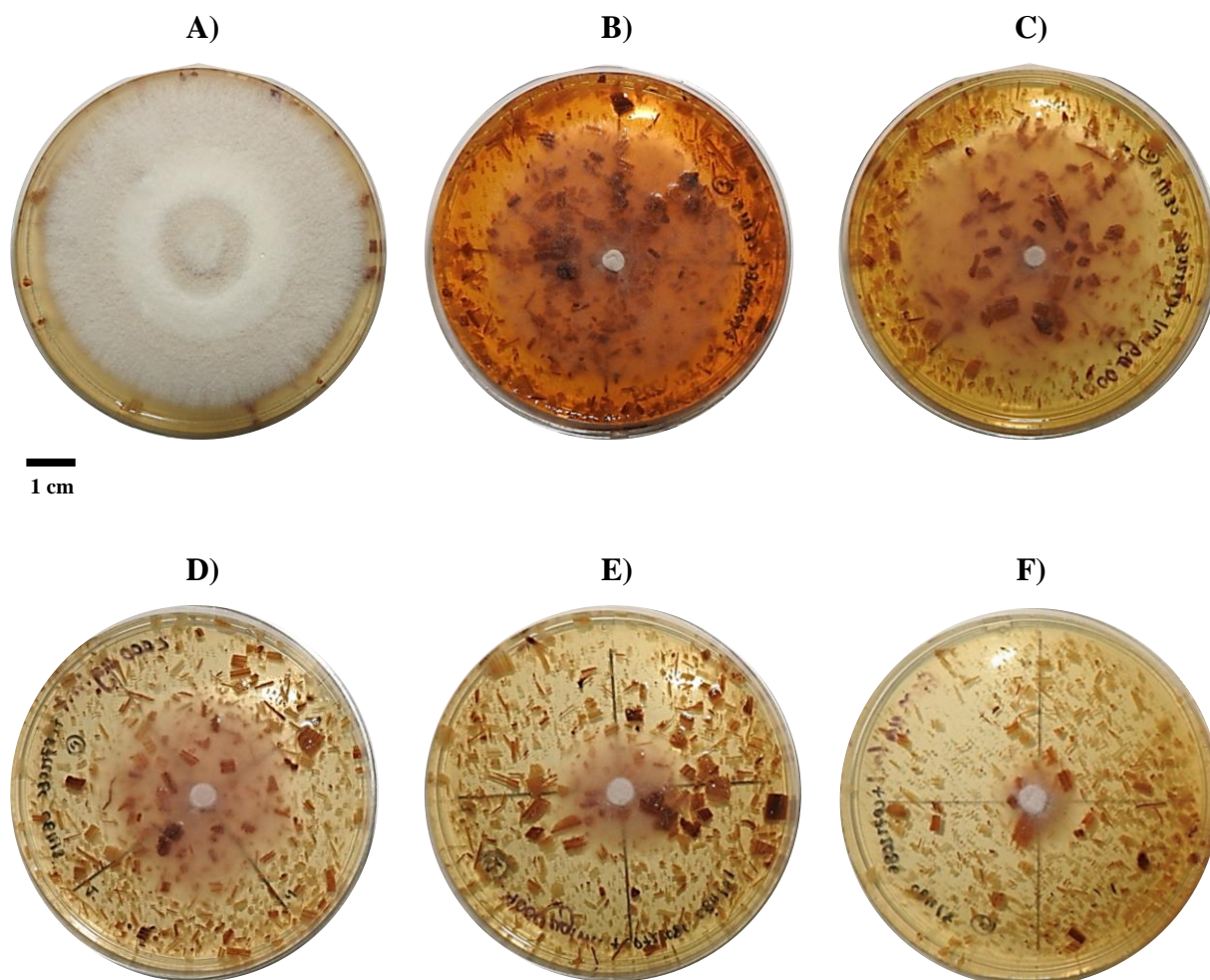


Figura 3. Crecimiento micelial de *Fusarium* sp. en las diferentes concentraciones de Phi en el medio PDA, después de 7 d. A) Control sin Phi ($0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), B) $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, C) $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, D) $2000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, E) $4000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, F) $8000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

El crecimiento micelial de *Fusarium* sp., se inhibió en 25.97% en la concentración más baja de Phi ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$), sin diferencias estadísticas con el efecto de la concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (27.4%); sin embargo, la concentración de $8000 \mu\text{g mL}^{-1}$ inhibió hasta un 81% el crecimiento del patógeno y se observó el 72.42% de inhibición con el tratamiento de $4000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Phi en el medio, en contraste con el testigo, donde se observó un desarrollo vegetativo en toda la caja a los 7 días de haber sido inoculados (Figura 4).

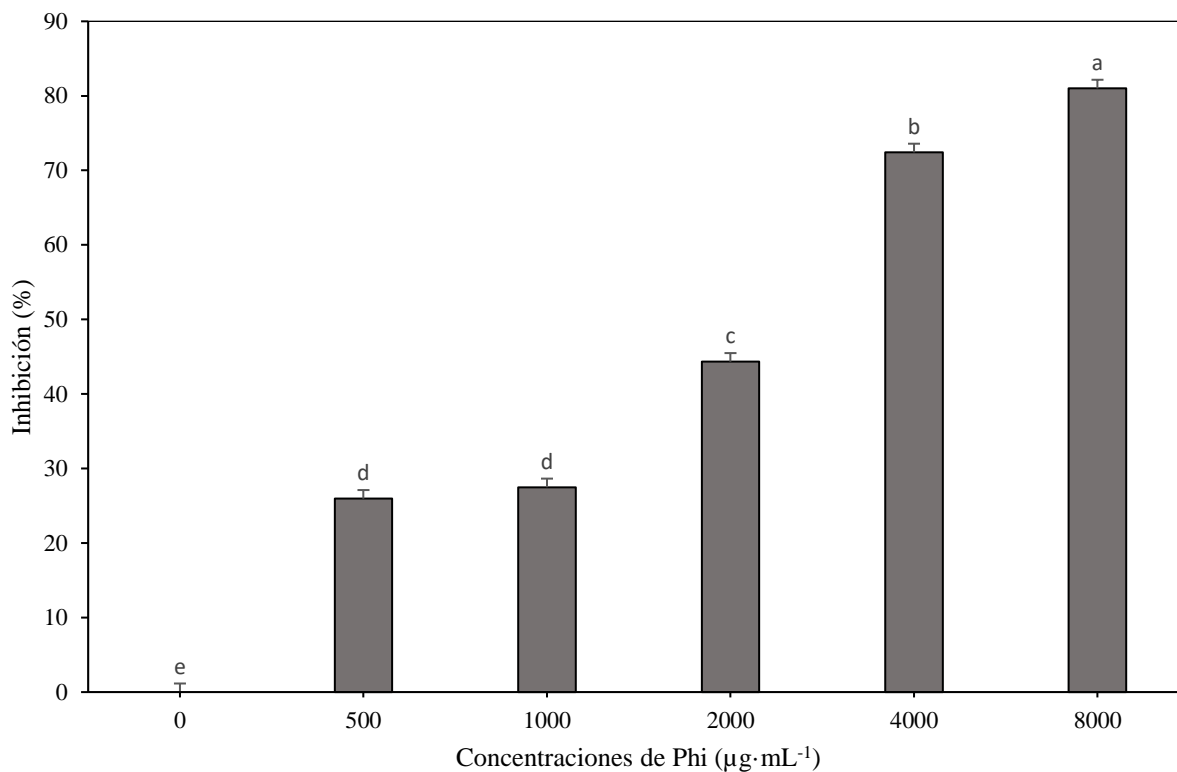


Figura 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium* sp., en medio de cultivo PDA, con adición de Phi. Valores con letra distinta, son estadísticamente diferentes con respecto a la prueba de Fisher ($\alpha = 0.05$)

La conidiogénesis de *Fusarium* sp. disminuyó de manera significativa ($P = 0.0001$) en todos los tratamientos respecto al testigo, y se observó mayor efecto del Phi al aumentar la concentración. La concentración más baja de Phi ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) disminuyó en 99.7% la producción de esporas, mientras que la más alta ($8000 \mu\text{g mL}^{-1}$) hasta 99.9% menos que el testigo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Conidiogénesis de *Fusarium* sp., (esporas mL⁻¹) con adición de Phi al medio de cultivo PDA.

Concentración de Phi (µg·mL ⁻¹)	Conidiogénesis (esporas· mL ⁻¹)
0	1.33x10 ⁹ ± 3.16x10 ⁸ a
500	3.04x10 ⁶ ± 6.77x10 ⁵ b
1000	3.18x10 ⁶ ± 7.07x10 ⁵ b
2000	1.12x10 ⁶ ± 2.49x10 ⁵ c
4000	1.01x10 ⁶ ± 2.41x10 ⁵ c
8000	8.99x10 ⁵ ± 2.52x10 ⁵ c

Valores con letra distinta en la misma columna, son estadísticamente diferentes con respecto a la prueba de Fisher ($\alpha = 0.05$).

Para calcular la tasa de crecimiento micelial de *Fusarium* sp., se compararon cuatro modelos de correlación (Cuadro 2), donde se eligió una estructura de correlación no estructural por su mejor ajuste al comportamiento de los datos para la estimación y predicción del crecimiento en función del tiempo.

Cuadro 2. Comparación de modelos de correlación.

Fit. Statistic	Simetría compuesta	Auto-regresiva de orden 1	Toeplitz	No estructurado
AIC	-94.51	-94.51	-96.51	-96.51
AICC	-94.40	-94.40	-96.45	-96.45

En las curvas de crecimiento micelial de *Fusarium* sp., se observó un descenso en la tasa de crecimiento al aumentar la concentración de Phi. En el tratamiento testigo se registró la máxima tasa de crecimiento (11.05 mm día⁻¹), con diferencias estadísticas sobre el resto de las concentraciones ($P = 0.0001$), las tasas de crecimiento de *Fusarium* sp., con 500 y 1000 µg mL⁻¹

¹ Phi no fueron significativamente diferentes entre ellas. La concentración de 8000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Phi presentó la menor tasa de crecimiento con 2.90 mm día⁻¹ (Figura 5).

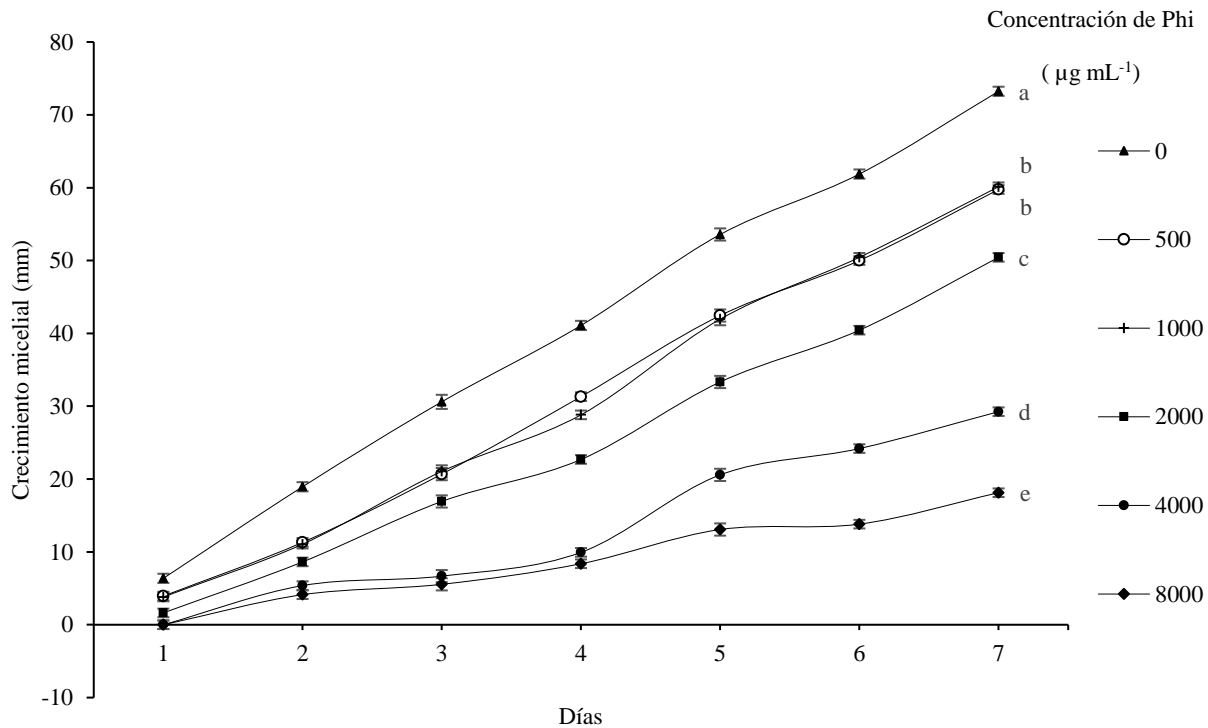


Figura 5. Tasa de crecimiento de *Fusarium sp.*, en medio de cultivo PDA con adición de Phi en mm día⁻¹. Valores con letra distinta, son estadísticamente diferentes con respecto a la prueba de Fisher ($P \leq 0.05$).

1.4.2 Compatibilidad de los aislamientos de *Trichoderma* con Phi

En el experimento de compatibilidad de *Trichoderma* con Phi se observó la disminución de la conidiogénesis del hongo, se obtuvieron diferencias significativas ($P = 0.0001$) en los tres aislamientos tratados al aumentar la concentración de Phi en el medio (Figura 6). Sin embargo, el crecimiento micelial continuó hasta colonizar la totalidad de la caja (7 d después de ser inoculado).

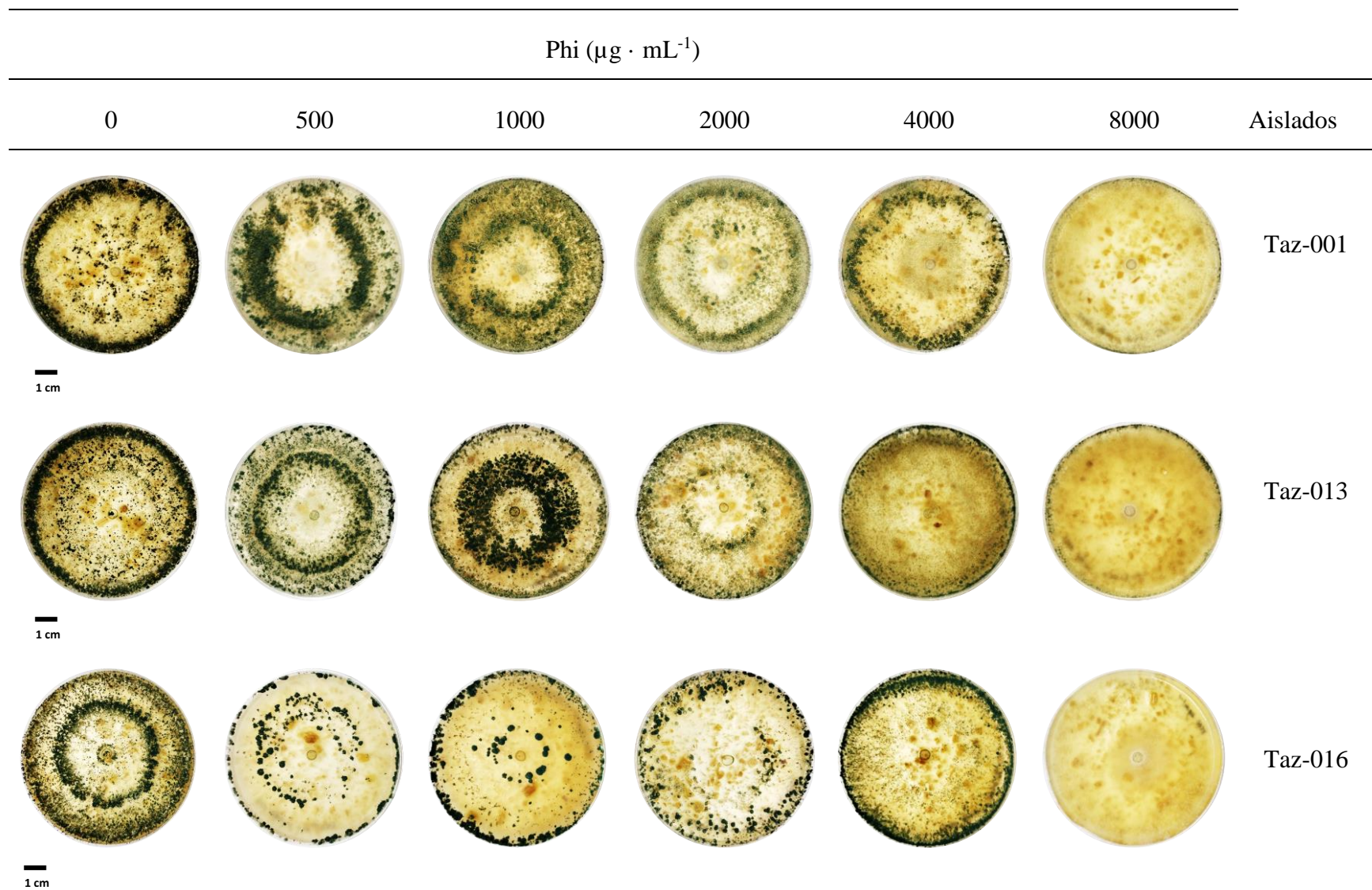


Figura 6. Conidiogénesis de *Fusarium* sp. en las diferentes concentraciones de Phi en el medio PDA, después de 7 d.

La conidiogénesis en el aislamiento Taz-016 no mostró diferencias estadísticas entre las concentraciones de 500 y 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Phi respecto al control, ya que solo disminuyó 3.5 y 4.1% respectivamente. Por el contrario, Taz-001 a las mismas concentraciones presentó diferencias significativas, ya que su conidiogénesis disminuyó a 32.1 y 56.97%, respectivamente, así mismo, Taz-013 disminuyó hasta 49.2 y 50.65%, respectivamente (Figura 7). Sin embargo, Taz-001 registró una mayor conidiogénesis con el tratamiento de 8000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en comparación con el resto de los aislados; 52.6% más que Taz-013 y 97.9% más que Taz-016.

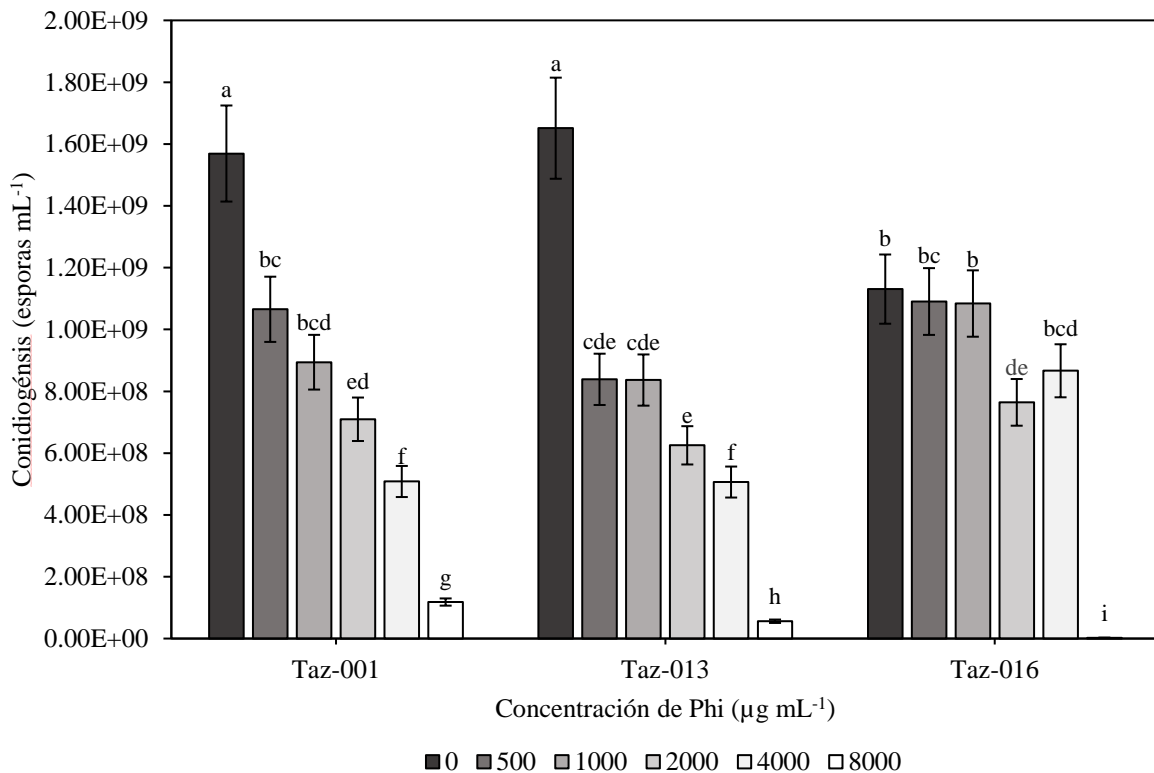


Figura 7. Número de esporas por mililitro de *Trichoderma* sp. (Taz-001, Taz-013 y Taz-016) con adición de Phi al medio de cultivo. Valores con letra distinta, son estadísticamente diferentes con respecto a la prueba de Fisher ($\alpha = 0.05$).

1.4.3 Antagonismo *in vitro* de aislamientos del género *Trichoderma* contra *Fusarium* sp

La capacidad antagónica de los aislamientos de *Trichoderma* sp., se evaluó mediante la inhibición del crecimiento de *Fusarium* a través de la prueba de confrontaciones duales. En general, se observó que los aislamientos antagónicos crecieron considerablemente más rápido que el patógeno. El porcentaje de inhibición que causaron Taz-001, Taz-013 y Taz-016 sobre el crecimiento micelial del patógeno no fue estadísticamente diferente. Taz-013 causó el mayor porcentaje de inhibición (61.46%), sin diferencias significativas con Taz-016 que solo causó 59.9% de inhibición (Figura 8).

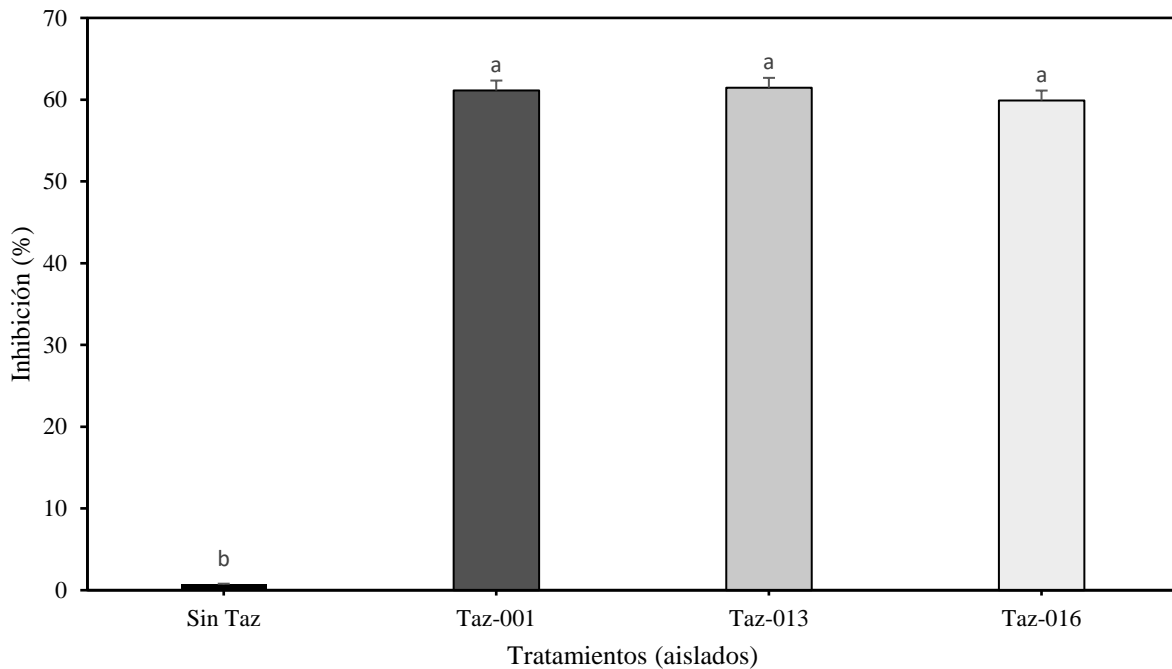


Figura 8. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium* sp., con los distintos aislados de *Trichoderma* sp. (Taz-001, Taz-013 y Taz-016). Valores con letra distinta, son estadísticamente diferentes con respecto a la prueba de Fisher ($\alpha = 0.05$).

Además, los aislamientos Taz-001, Taz-013, causaron micoparasitismo necrotrófico sobre toda la colonia de *Fusarium* sp. al décimo día de haber sido inoculados (Figura 9). En cambio, Taz-016 solo cubrió $\frac{1}{4}$ de la colonia del patógeno.

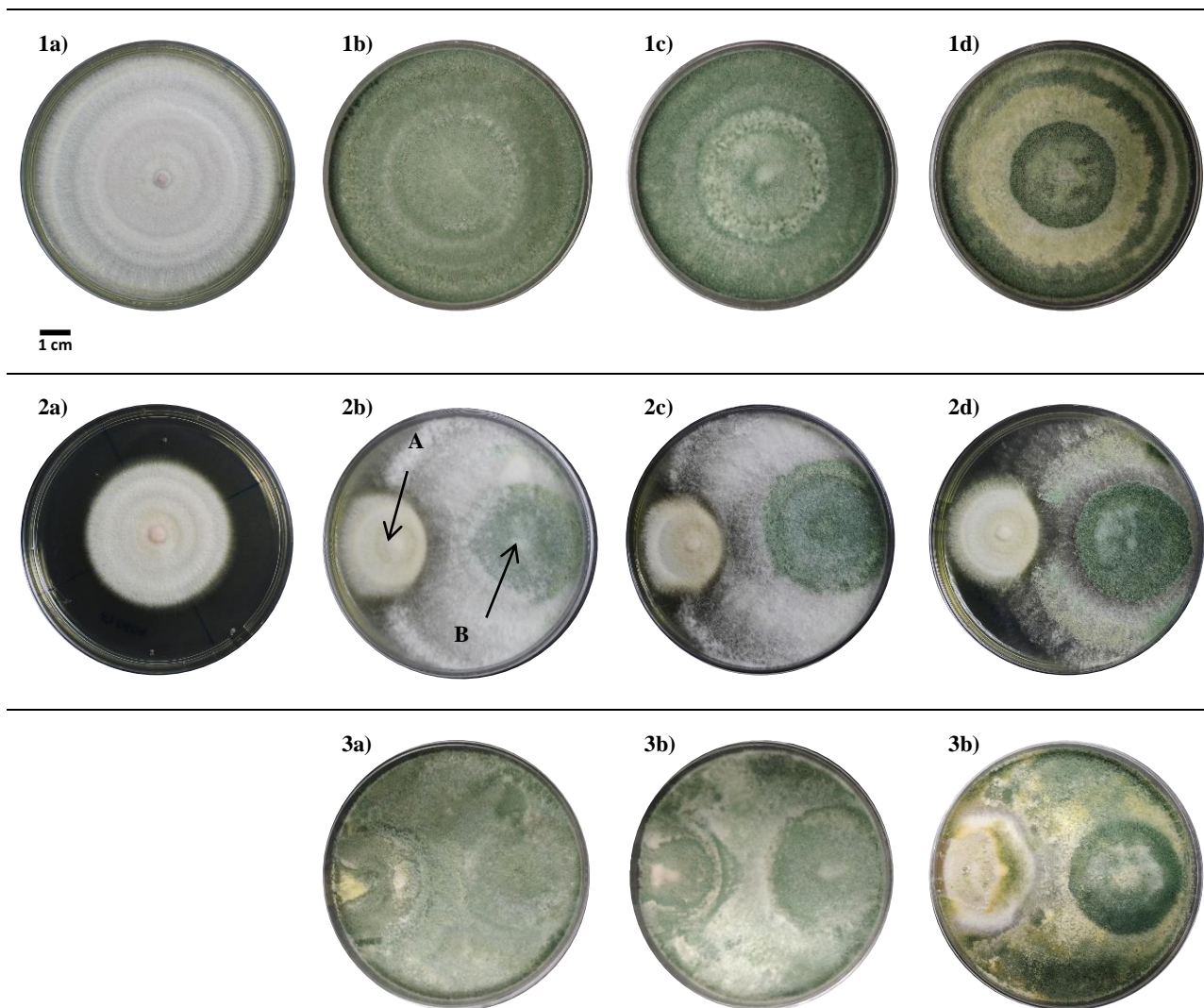


Figura 9. Antagonismo de los distintos aislados de *Trichoderma* sp. (Taz-001, Taz-013 y Taz-016) contra *Fusarium* sp., 1) Testigos 1a) *Fusarium*, 1b) Taz-001, 1c) Taz-013, 1d) Taz-016; 2) Quinto día después de la inoculación 2a) Testigo de *Fusarium*, 2b) Antagonismo dual Taz-001 (B) vs *Fusarium* (A), 2c) Antagonismo dual Taz-013 vs *Fusarium*, 2d) Antagonismo dual Taz-016 vs *Fusarium*; 3) Final del bioensayo 3a) Antagonismo dual Taz-001 vs *Fusarium*, 3b) Antagonismo dual Taz-013 vs *Fusarium*, 3c) Antagonismo dual Taz-016 vs *Fusarium*.

1.4.4 Compatibilidad *in vitro* de aislamientos del género *Trichoderma* con Phi contra *Fusarium* sp

En el experimento de compatibilidad entre *Trichoderma* sp. y Phi para el control de *Fusarium* sp., se observó la colonización total de la caja Petri en los tratamientos testigo a los 10 días después de la inoculación (Figura 10), además, se registró mayor porcentaje de inhibición del patógeno cuando el Phi se aplicó en combinación con las suspensiones de *Trichoderma* (Figura 11, 12 y 13), lo que se tomó como indicador de compatibilidad.

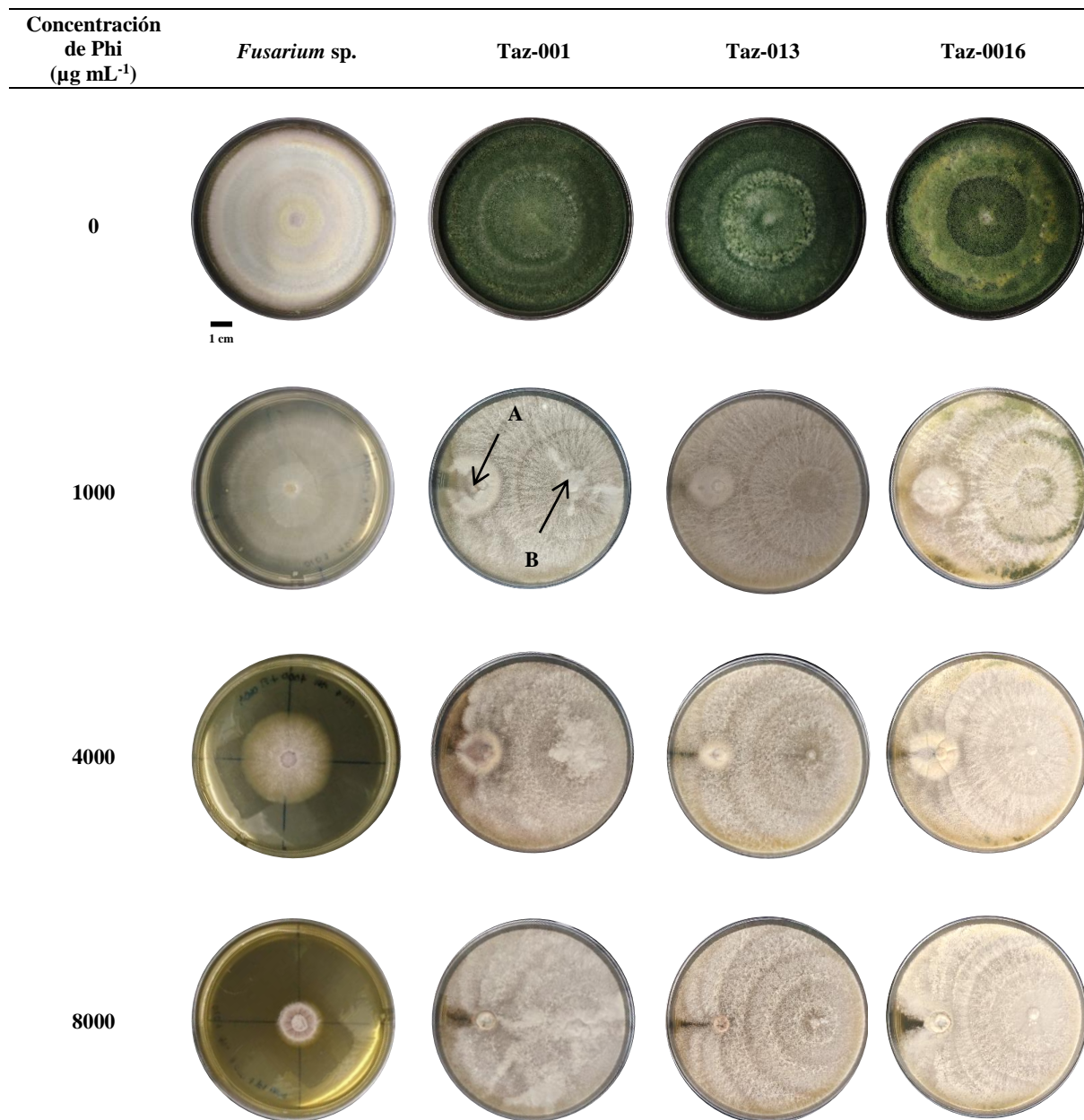


Figura 10. Crecimiento de *Fusarium* y los aislados de *Trichoderma* después de 10 días de incubación en las cajas Petri con tres concentraciones diferentes de Phi y un control sin Phi. A) Inoculación del patógeno (*Fusarium* sp.), B) Inoculación de bioregulador (*Trichoderma* sp.)

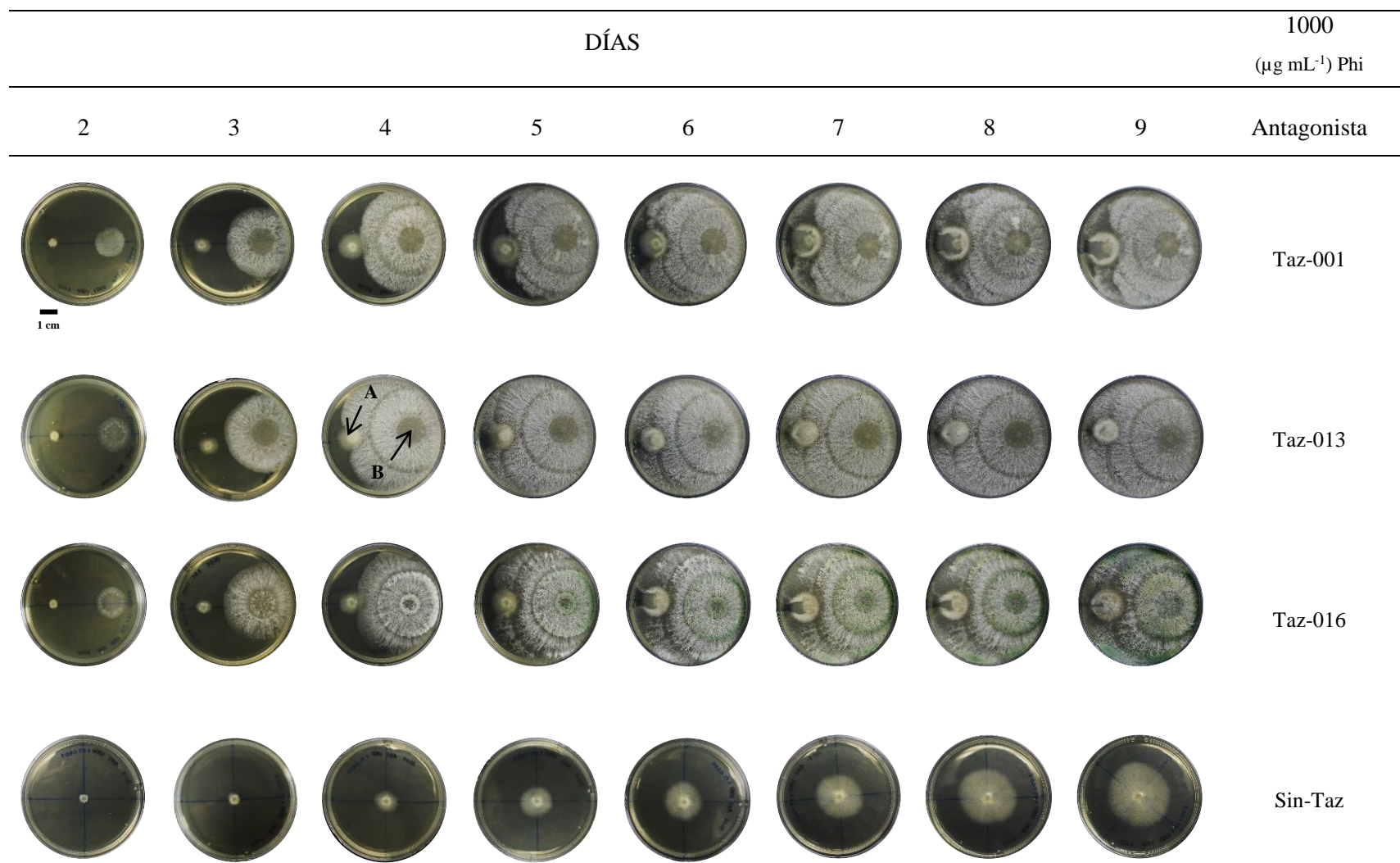


Figura 11. Cinética de crecimiento de las confrontaciones duales de *Fusarium* y *Trichoderma* en las cajas Petri con $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Phi y un control de *Fusarium* en $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ Phi sin antagonista. A) Inoculación del patógeno (*Fusarium* sp.), B) Inoculación de biocontrolador (*Trichoderma* sp.)

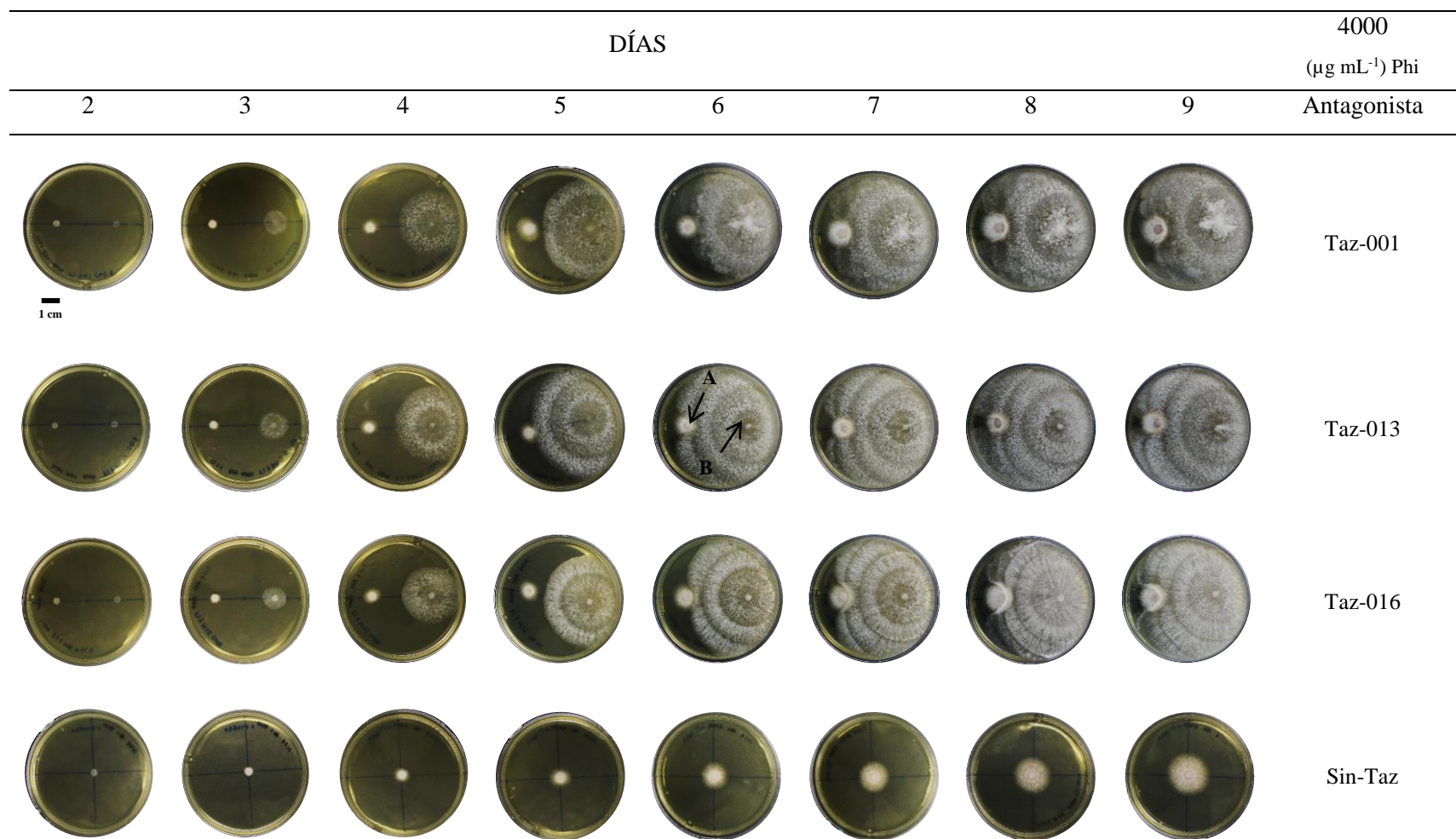


Figura 12. Cinética de crecimiento de las confrontaciones duales de *Fusarium* y *Trichoderma* en las cajas Petri con $4000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Phi y un control de *Fusarium* en $4000 \mu\text{g mL}^{-1}$ Phi sin antagonista. A) Inoculación del patógeno (*Fusarium* sp.), B) Inoculación de biocontrolador (*Trichoderma* sp.)

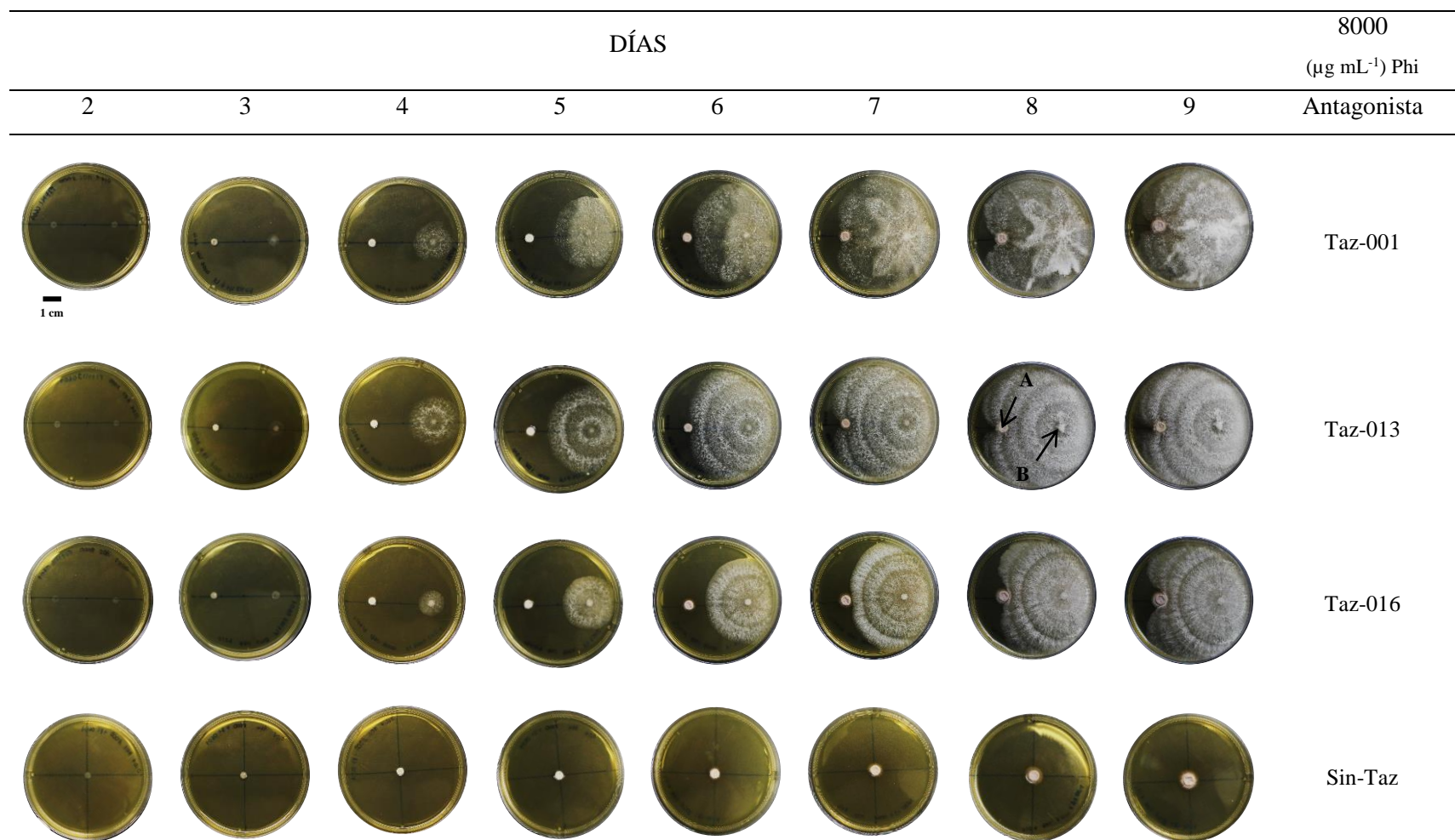


Figura 13. Cinética de crecimiento de las confrontaciones duales de *Fusarium* y *Trichoderma* en las cajas Petri con $8000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Phi y un control de *Fusarium* en $4000 \mu\text{g mL}^{-1}$ Phi sin antagonista. A) Inoculación del patógeno (*Fusarium* sp.), B) Inoculación de biocontrolador (*Trichoderma* sp.)

Hubo diferencias significativas en el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial al aumentar la concentración de Phi en el medio ($P = 0.0001$). La mayor concentración de Phi ($8000 \mu\text{g mL}^{-1}$) inhibió a *Fusarium* sp. 77.83%, mientras que 4000 y $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ causaron 55.98 y 30.29%, respectivamente (Figura 14). Los mayores porcentajes de inhibición se observaron con la combinación del hongo y Phi, cuando se combinó *Trichoderma* + $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, se alcanzó al menos el 74.29% de inhibición, es decir, aumentó 44% más que en el tratamiento de Phi solo, a la misma concentración. Cuando se combinó *Trichoderma* + $4000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Phi, el porcentaje de inhibición aumentó 25.18% con respecto al tratamiento con Phi. Finalmente, cuando se combinó *Trichoderma* + $8000 \mu\text{g mL}^{-1}$ el porcentaje de inhibición aumento 11.17% de inhibición del patógeno en comparación con el tratamiento de Phi solo, a la misma concentración (Figura 15).

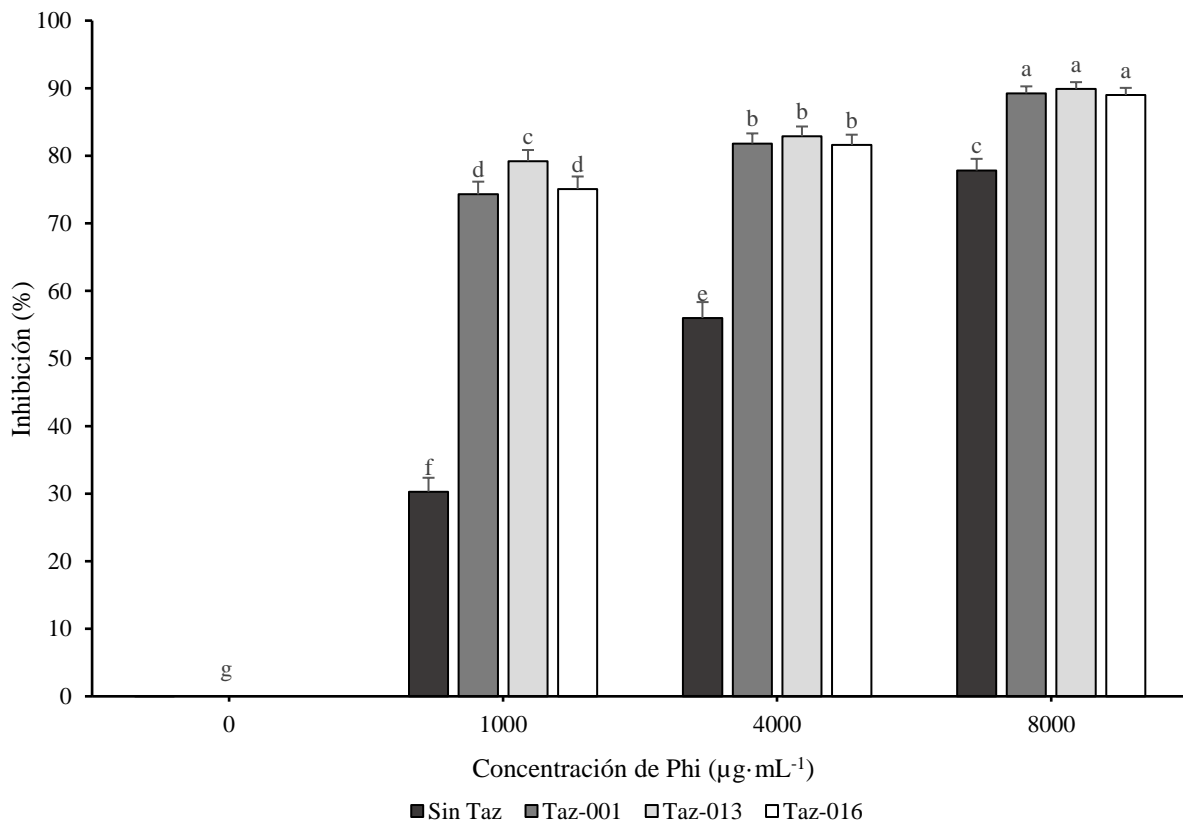


Figura 14. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium* sp., con las distintas cepas de *Trichoderma* sp. (Taz-001, Taz-013 y Taz-016) con adición de Phi al medio de cultivo. Valores con letra distinta, son estadísticamente diferentes con base a la prueba de Fisher ($\alpha = 0.05$).

1.5 Discusión

1.5.1 Efecto del Phi sobre el crecimiento de *Fusarium* sp., *in vitro*

El mecanismo de acción de Phi es complejo y aún no se conoce a detalle (Massoud *et al.* 2012a), sin embargo, se ha demostrado que Phi tiene efectos directos sobre el crecimiento micelial en patógenos del suelo, como *Alternaria alternata* (90%), *Penicillium expansum* (50%), *Phytophthora infestans* (26%), entre otros (Reuveni *et al.* 2003; Dorn *et al.* 2007; Amiri y Bompeix 2011). En este estudio se observó el efecto inhibitorio de las diferentes concentraciones de Phi, sobre el desarrollo vegetativo de *Fusarium* sp.

Las concentraciones evaluadas (desde 500 hasta 8000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Phi) presentaron un efecto fungistático sobre el crecimiento micelial del patógeno, con un intervalo de inhibición de 25.97 a 81%. D'Addazio *et al.* (2016) indicaron que los fosfitos inhiben el crecimiento de los fitopatógenos a través de un efecto fungistático directo, que depende de la concentración de fosfito que se acumula en el hongo, y a su vez se ve influenciado por la concentración de fosfato y la efectividad del sistema de oxidación de fosfito. Amiri y Bompeix (2011) y Cerqueira *et al.* (2017) indicaron que al aumentar la dosis de Phi se observó mayor inhibición en el crecimiento micelial de *Penicillium expansum* (2 y 4 mg mL^{-1}) y contra *Fusarium circinatum* con 4% de Phi. En los resultados de esta investigación se registró un efecto fungistático sobre el GMI (%) cuando se adicionaron las concentraciones de Phi en el medio, y se observó efecto fungicida sobre la conidiogénesis de *Fusarium* desde los 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ya que este disminuyó en 99.7% respecto al control. De la misma manera, Daniel y Guest (2006) confirmaron que el fosfonato en altas concentraciones, tiene un efecto fungistático o fungicida directo sobre los patógenos, mientras que, en concentraciones más bajas, puede inducir estrés metabólico.

Reuveni *et al.* (2003) también reportaron que el fosfito de potasio inhibió parcialmente el desarrollo de *Alternaria alternata*, y se observó que las concentraciones de 229 y 531 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Phi causaron el 50 y 90% de inhibición en la germinación conidial, respectivamente. Además, Massoud *et al.* (2012) indicaron una reducción del 97% en la esporulación de *Hyaloperonospora arabidopsidis* cuando aplicaron concentraciones de 22.5 a 50 mM de Phi. Ellos propusieron que la cantidad de esporas proporciona una estimación válida de la susceptibilidad de los patógenos al Phi. Así mismo, el aumento de la concentración de Phi en medio PDA generó un descenso en la tasa de crecimiento de *Fusarium*, en la concentración de 8000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (2.90 mm día^{-1}), seguida

de 4000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (4.97 mm día⁻¹). Este efecto se le atribuye a la acción directa de Phi sobre el patógeno como se ha reportado en estudios anteriores (Smillie *et al.* 1989; Grant *et al.* 1990).

1.5.2 Compatibilidad de los aislamientos de *Trichoderma* con Phi

Una estrategia combinada de manejo integrado de enfermedades, donde se incluya agentes de control biológico y sales inorgánicas, requiere del estudio de compatibilidad entre ambos, sobre todo en su capacidad de esporulación. En el caso particular de *Trichoderma* sp., con Phi, la conidiogénesis proporciona una estimación válida de compatibilidad, ya que estas estructuras reproductivas le dan a dicho género la capacidad de ejercer antagonismo sobre los fitopatógenos (Koka *et al.* 2017; da Silva *et al.* 2018).

En este estudio se observaron diferencias en el porcentaje de compatibilidad entre los aislamientos del hongo *Trichoderma* sp. y las diferentes concentraciones de Phi ($P = 0.0001$), este fenómeno evidencia el hecho de que *Trichoderma* tiene capacidad natural para tolerar a los agentes con actividad fungicida, lo que se denomina "resistencia natural" o "resistencia inherente" (Chaparro *et al.* 2011). El aislado Taz-016 presentó mayor compatibilidad (96.45 y 95.87%) a las concentraciones de 500 y 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Phi, mientras que Taz-001 (67.88 y 43.03%) y Taz-013 (50.79 y 49.35%) fueron menos compatibles a las mismas concentraciones. Al respecto Ruocco *et al.* (2009) explicaron que la capacidad de *Trichoderma* para resistir concentraciones relativamente altas de compuestos tóxicos sintéticos y naturales, depende de los mecanismos eficientes de desintoxicación celular llevados a cabo por un sistema complejo de bombas de membrana, que incluyen a los transportadores ABC (ATP-binding cassette (ABC)), los cuales pueden proporcionar un mecanismo de protección contra fármacos citotóxicos y agentes xenobióticos a hongos. Los transportadores ABC pueden explicar la tolerancia natural a los agentes con actividad fungicida en *Trichoderma* y su capacidad para sobrevivir con éxito en ambientes con moléculas remanentes de Phi.

A pesar de la reducción generalizada de la conidiogénesis en los tres aislados de *Trichoderma* evaluados con Phi, el crecimiento micelial continuó hasta colonizar la totalidad de la caja Petri, estos resultados comprueban la capacidad de *Trichoderma* para sobrevivir en ambientes desfavorables (Tapwal *et al.* 2012; Kiran *et al.* 2018). Así mismo, Bagwan (2010) reportó que fungicidas como orthocide, propiconazole, mancozeb y chlorothalonil en concentraciones de entre

0.03 y 0.2% no inhibieron el crecimiento de *T. harzianum* (Th09) y *T. viride* (Tv11) por encima del 10%, mientras que Tapwal *et al.* (2012) encontraron una compatibilidad de 34.9% en 300 ppm y 97.9% en 50 ppm con los fungicidas Blue copper® (i. a. Oxicloruro de cobre) y Captan® (i. a. Captan) (16.6 a 25%). Así mismo, Dhanya *et al.* (2016) comprobaron que el fosfonato de potasio y fosetil de aluminio eran 100% compatibles con *T. viride* con tan solo 0.5% de inhibición del crecimiento micelial, por lo que se sugiere que Taz-016 es compatible con Phi a dosis $\leq 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Diversas especies de *Trichoderma* se han reportado con capacidad de tolerar agentes con efectos fungicidas, debido a que se adaptan a diversas condiciones del suelo o del sustrato, donde pueden producir enzimas líticas, antibióticos y/o metabolitos secundarios y colonizarlos rápidamente (Silva *et al.* 2018), así como lo reportaron Živković *et al.* (2010), quienes indicaron que aunque algunos insumos en la agricultura pueden dificultar la acción de *Trichoderma* sp., éstos no impiden su desarrollo, ya que este género presenta plasticidad ecológica (Svistova y Senchakova 2010), desarrollada por su amplia distribución geográfica, la cual depende más del aislamiento que de la propia especie (Infante *et al.* 2009).

1.5.3 Antagonismo *in vitro* de aislamientos del género *Trichoderma* contra *Fusarium* sp

Se ha demostrado que el antagonismo *in vitro* de las especies de *Trichoderma* en confrontación dual contra varios patógenos (Sharma 2011; El_Komy *et al.* 2015; Moosa *et al.* 2017; Veenstra *et al.* 2019) es un método útil y confiable para identificar su potencial de control biológico (Monteiro *et al.* 2010).

En este estudio, se confirmó la capacidad antagónica de los aislamientos de *Trichoderma* evaluados (Taz-001, Taz-013 y Taz-016), contra *Fusarium* sp., [MGI (%): 61.13, 61.46 y 59.9%, respectivamente]. Los aislamientos de *Trichoderma* crecieron considerablemente más rápido que el de *Fusarium*, ya que esta capacidad le confiere al antagonista una ventaja importante contra el patógeno en la competencia por espacio y nutrientes (El_Komy *et al.* 2015; Abhiram y Masih 2018). La competencia por nutrientes y espacio es un mecanismo de antagonismo empleado por *Trichoderma* sp. (Akrami *et al.* 2011) y se ha considerado la fase inicial de la interacción entre *Trichoderma* y *Fusarium*, la cual está marcada por la competencia sin contacto de micelios en el

que los metabolitos difusibles de ambos organismos deciden el destino de la interacción (Sharma 2011).

La inhibición máxima fue causada por Taz-013 con 61.46%, estos resultados coinciden con los rangos observados durante ensayos *in vitro* de *T. velutinum* contra *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* (60-92%) (Matarese *et al.* 2012), así como de *T. harzianum*, *T. viride* contra *F. oxysporum* (56.43-66.3%) (Perveen y Bokhari 2012). Otro mecanismo de control biológico clave para la mayoría de las cepas de *Trichoderma* es el micoparasitismo mediado por la producción de quitinasas y otras enzimas que degradan la pared celular (Tapwal *et al.* 2011; Perveen y Bokhari 2012; Cherkupally *et al.* 2017; Suleiman *et al.* 2019).

El micoparasitismo es un proceso complejo de las cepas antagónicas de *Trichoderma* (Veenstra *et al.* 2019), que involucra el reconocimiento del patógeno, la producción de endoquitinasas tóxicas, seguida de la unión física de *Trichoderma* sp., mediante la cual secretan enzimas que hidrolizan los principales compuestos estructurales de las paredes celulares de los hongos, quitina y β -glucano (Verma *et al.* 2007; Mishra 2010; Rajeswari y Kannabiran 2011; El_Komy *et al.* 2015), en este estudio, los tres aislamientos generaron micoparasitismo sobre el patógeno, sin embargo, los hongos Taz-001 y Taz-013 ejercieron micoparasitismo necrotrófico sobre toda la colonia de *Fusarium*, en contraste con Taz-016 que solo presentó micoparasitismo biotrófico. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Perveen y Bokhari (2012) quienes señalaron que la capacidad micoparasitaria de *Trichoderma* varía entre especies y aislamientos fúngicos, debido que las cepas de *Trichoderma* desarrollan diferentes modos de acción contra los fitopatógenos, lo que indica que los aislamientos estudiados *in vitro* pueden ser una alternativa eficaz para dirigir estudios en el manejo del Pokkah boeng en plantas de caña de azúcar.

1.5.4 Compatibilidad *in vitro* de aislamientos del género *Trichoderma* con Phi contra *Fusarium* sp

Los resultados obtenidos corroboran que la combinación de Phi y los aislados de *Trichoderma* aumenta la eficacia para controlar a *Fusarium*, comparada con la aplicación individual de Phi o los aislados de *Trichoderma*. Esto puede atribuirse a la actividad antifúngica del Phi (Massoud *et al.* 2012; Groves *et al.* 2015; Liljeroth *et al.* 2016) como a la capacidad antagónica de *Trichoderma* (Sharma 2011; Saravanakumar *et al.* 2016; Moosa *et al.* 2017). Chittenden y Singh (2009)

obtuvieron resultados similares al combinar cepas de *T. harzianum* y quitosano, como agente fungicida, para el control de *Leptoglyphium procerum* y *Sphaeropsis sapinea*, ellos observaron la reducción significativa del desarrollo vegetativo ($\geq 40\%$) de *S. sapinea* al adicionar 0.075% y 0.1% v / v de quitosano a una suspensión de *T. harzianum*. Del mismo modo Nallathambi *et al.* (2009) observaron que la combinación de *T. viride* cepa-CIAH240 con fungicidas como tridemefon, thiophanate methyl, mancozeb and alcidine a 50 mg g⁻¹ mejoró el porcentaje de eficiencia en el control de enfermedades a más del 70% durante postcosecha del fruto Bed (*Ziziphus mauritiana*). Los resultados de este trabajo muestran que, los aislamientos de *Trichoderma* y las diferentes concentraciones de Phi (1000, 4000 y 8000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) son compatibles, ya que en todos los tratamientos el biocontrolador fue capaz de colonizar la totalidad de la caja Petri a los 10 d después de su inoculación. Se puede señalar que la combinación de Phi y *Trichoderma*, actúan de manera sinérgica sobre la inhibición del desarrollo vegetativo y la conidiogénesis de *Fusarium* sp., donde el Phi actúa como agente fungistático o fungicida y los aislado de *Trichoderma* como antagonistas mediante la competencia por espacio y nutrientes, y el micoparasitismo.

1.6 Conclusiones

En este estudio se corroboró que el Phi ejerce un modo de acción directo sobre el crecimiento micelial y la conidiogénesis de *Fusarium* sp. aislado de la rizósfera de caña de azúcar. La presencia de Phi en el medio de cultivo PDA, causó un efecto fungistático o fungicida sobre este patógeno a medida que aumentó la concentración de Phi. El aislamiento Taz-016 presentó la mayor compatibilidad con las concentraciones de 500 y 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Phi, ya que no se observó efecto significativo sobre su conidiogénesis, lo que demuestra la capacidad de *Trichoderma* sp., para sobrevivir en ambientes con presencia de moléculas de Phi.

Los aislados de *Trichoderma* (Taz-001, Taz-013 y Taz-016) poseen potencial como agentes de control biológico contra *Fusarium* sp. y pueden ser evaluados dentro de una estrategia de manejo integrado del Pokkah boeng en caña de azúcar.

Las combinaciones de Phi (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y los aislados de *Trichoderma* sp. actúan de manera sinérgica para inhibir el desarrollo vegetativo y la conidiogénesis de *Fusarium* sp. *in vitro*. Esta estrategia de control representa una alternativa para el control del patógeno en campo.

1.7 Literatura citada

- Abhiram, P., and H. Masih. 2018. *In vitro* antagonism of *Trichoderma viride* against *Fusarium oxysporum* strains. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 7: 2816–2819.
- Akrami, M., H. Golzary, and M. Ahmadzadeh. 2011. Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species for controlling *Fusarium* rot of lentil. *African Journal of Biotechnology* 10: 2653–2658. doi:10.5897/ajb10.1274.
- Aly, M. H., and Y. H. Manal. 2009. Vesicular-arbuscular mycorrhiza and *Trichoderma viridi* as deterrents against soil-borne root rot disease of sugar beet. *Sugar Tech* 11: 387–391. doi:10.1007/s12355-009-0066-9.
- Amiri, A., and G. Bompeix. 2011. Control of *Penicillium expansum* with potassium phosphite and heat treatment. *Crop Protection* 30: 222–227. doi:10.1016/j.cropro.2010.10.010.
- Azevedo, R. A., R. F. Carvalho, M. C. Cia, and P. L. Gratão. 2011. Sugarcane under pressure: An overview of biochemical and physiological studies of abiotic stress. *Tropical Plant Biology* 4: 42–51. doi:10.1007/s12042-011-9067-4.
- Bagwan, N. B. 2010. Evaluation of *Trichoderma* compatibility with fungicides, pesticides, organic cakes and botanicals for integrated management of soil borne disease of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *International Journal of Plant Protection* 3: 206–209. doi:10.2514/6.2009-615.
- Barnett, H. L., and B. B. Hunter. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4th ed. St. Paul (Minn.): APS press.
- Cerqueira, A., A. Alves, H. Berenguer, B. Correia, A. Gómez-Cadenas, J. J. Diez, P. Monteiro, and G. Pinto. 2017. Phosphite shifts physiological and hormonal profile of Monterey pine and delays *Fusarium circinatum* progression. *Plant Physiology and Biochemistry* 114: 88–99. doi:10.1016/j.plaphy.2017.02.020.
- Chaparro, A. P., L. H. Carvajal, and S. Orduz. 2011. Fungicide tolerance of *Trichoderma asperelloides* and *T. harzianum* strains. *Agricultural Sciences* 2: 301–307. doi:10.4236/as.2011.23040.

- Cherkupally, R., H. Amballa, and B. N. Reddy. 2017. *In vitro* antagonistic activity of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*. *International Journal of Applied Agricultural Research* 12: 87–95.
- Chittenden, C., and T. Singh. 2009. *In vitro* evaluation of combination of *Trichoderma harzianum* and chitosan for the control of sapstain fungi. *Biological Control* 50: 262–266. doi:10.1016/j.biocontrol.2009.04.015.
- D’Addazio, V., R. A. Ahnert dos Santos, A. S. B. Leitao, M. B. da Silva, A. A. Fernandes, and A. R. Falqueto. 2016. Evaluation of *in vitro* inhibition of mycelial growth of *Fusarium solani* f. sp. *piperis* by different products in Brazil. *African Journal of Microbiology Research* 10: 1992–1998. doi:10.5897/ajmr2016.8292.
- Daniel, R., and D. Guest. 2006. Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67: 194–201. doi:10.1016/j.pmpp.2006.01.003.
- Deliopoulos, T., P. S. Kettlewell, and M. C. Hare. 2010. Fungal disease suppression by inorganic salts: A review. *Crop Protection* 29: 1059–1075. doi:10.1016/j.cropro.2010.05.011.
- Dhanya, M. K., K. B. Anjumol, M. Murugan, and K. B. Deepthy. 2016. With Plant Protection Chemicals and Fertilizers in Cardamom. *Journal of Tropical Agriculture* 54: 129–135.
- Dorn, B., T. Musa, H. Krebs, P. M. Fried, and H. R. Forrer. 2007. Control of late blight in organic potato production: Evaluation of copper-free preparations under field, growth chamber and laboratory conditions. *European Journal of Plant Pathology* 119: 217–240. doi:10.1007/s10658-007-9166-0.
- El-Komy, M. H., A. A. Saleh, A. Eranthodi, and Y. Y. Molan. 2015. Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* wilt. *The Plant Pathology Journal* 31: 50–60. doi:10.5423/PPJ.OA.09.2014.0087.
- Fumes, B. H., F. N. Andrade, Á. J. S. Neto, and F. M. Lanças. 2016. Determination of pesticides in sugarcane juice employing microextraction by packed sorbent followed by gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 39: 2823–2830. doi:10.1002/jssc.201600077.

- Gómez-Merino, F. C., L. I. Trejo-Téllez, V. Morales-Ramos, J. Salazar-Ortiz, J. Velasco-Velasco, H.E. Sentíes-Herrera, and P. Ladewig. 2014. Necessities for innovation in the production of sugarcane (*Saccharum* spp.). *Agroproductividad* 7: 22–26. *Agroproductividad*: 22–26.
- Goswami, D., P. J. Handique, and S. Deka. 2013. Rhamnolipid biosurfactant against *Fusarium sacchari*-the causal organism of pokkah boeng disease of sugarcane. *Journal of Basic Microbiology* 54: 1–10. doi:10.1002/jobm.201200801.
- Govender, P., S. A. McFarlane, and R. S. Rutherford. 2010. *Fusarium* species causing pokkah boeng and their effect on *Eldana saccharina* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Proceedings of the Annual Congress - South African Sugar Technologists' Association* 83: 267–270.
- Grant, B. R., R. H. Dunstan, J. M. Griffith, J. O. Niere, and R. H. Smillie. 1990. The mechanism of phosphonic (phosphorous) acid action in *Phytophthora*. *Australasian Plant Pathology* 19: 115–121. doi:10.1071/APP9900115.
- Groves, E., K. Howard, G. Hardy, and T. Burgess. 2015. Role of salicylic acid in phosphite-induced protection against Oomycetes; a *Phytophthora cinnamomi* - *Lupinus augustifolius* model system. *European Journal of Plant Pathology* 141: 559–569. doi:10.1007/s10658-014-0562-y.
- Harman, G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96: 190–194. doi:10.1094/phyto-96-0190.
- Infante, D., B. Martínez, N. González, and Y. Reyes. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal* 24: 14–21.
- Kiran, G. V. N. S. M., S. S. Thara, and K. R. Jyothi. 2018. Studies on compatibility of biocontrol agents with chemical fungicides for integrated management of *Alternaria* leaf spot of cabbage. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 7: 2974–2977.
- Koizumi, T. 2015. Biofuels and food security. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 52: 829–841. doi:10.1016/j.rser.2015.06.041
- Koka, J. A., A. H. Wani, M. Y. Bhat, and S. Parveen. 2017. *In vitro* efficacy of *Trichoderma* isolates against some fungi causing fungal rot disease of tomato. *International Journal of Advanced Research* 5: 2050–2053. doi:10.21474/ijar01/3725.

- Li, Yaqian, Ruiyan Sun, Jia Yu, Kandasamy Saravanakumar, and Jie Chen. 2016. Antagonistic and Biocontrol Potential of *Trichoderma asperellum* ZJSX5003 Against the Maize Stalk Rot Pathogen *Fusarium graminearum*. *Indian Journal of Microbiology* 56: 318–327. doi:10.1007/s12088-016-0581-9.
- Liljeroth, Erland, Åsa Lankinen, Lars Wiik, Dharani Dhar Burra, Erik Alexandersson, and Erik Andreasson. 2016. Potassium phosphite combined with reduced doses of fungicides provides efficient protection against potato late blight in large-scale field trials. *Crop Protection* 86: 42–55. doi:10.1016/j.cropro.2016.04.003.
- Lopes, F. L., A. F. Cruz, M. L. A. Barreto, T. M. M. de Vasconcelos, and L. E. B. Blum. 2018. Post-harvest treatment with Ca-phosphite reduces anthracnose without altering papaya fruit quality. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 93: 272–278. doi:10.1080/14620316.2017.1361342.
- Manayay-Guevara, C. A. L., L. M. Córdova-Rojas, J. W. García-López, and J. M. Vásquez-Vázquez. 2016. Antagonistic effect of a *Trichoderma* sp. strain over *Fusarium* sp. in a tomato plant Rio Grande (*Solanum lycopersicum*). *UCV-HACER. Revista de Investigación y Cultura* 5: 64–68.
- Martínez-Fernández, E., P. Martínez-Jaimes, D. Guillén-Sánchez, G. Peña-Chora, and V. M. Hernández-Hernández. 2015. *Fusarium* diversity from the roots of sugarcane (*Saccharum officinarum*) in Morelos State, Mexico. *Revista Mexicana de Micología* 42: 33–43.
- Martínez, S. 2016. Effects of combined application of potassium phosphite and fungicide on stem and sheath disease control, yield, and quality of rice. *Crop Protection* 89: 259–264. doi:10.1016/j.cropro.2016.08.002.
- Massoud, K., T. Barchietto, T. Le Rudulier, L. Pallandre, L. Didierlaurent, M. Garmier, F. Ambard-Bretteville, J.-M. Seng, and P. Saindrenan. 2012. Dissecting phosphite-induced priming in *Arabidopsis* infected with *Hyaloperonospora arabidopsidis*. *Plant Physiology* 159: 286–298. doi:10.1104/pp.112.194647.
- Matarese, F., S. Sarrocco, S. Gruber, V. Seidl-Seiboth, and G. Vannacci. 2012. Biocontrol of *Fusarium* head blight: Interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*.

- Microbiology* 158: 98–106. doi:10.1099/mic.0.052639-0.
- McGovern, R. J. 2015. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection* 73: 78–92. doi:10.1016/j.cropro.2015.02.021.
- Mishra, V. K. 2010. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against *Pythium aphanidermatum*. *Journal of Phytology* 2: 28–35.
- Monteiro, V. N., R. N. Silva, A. S. Steindorff, F. T. Costa, E. F. Noronha, C. A. O. Ricart, M. V. S., M. H. Vainstein, and C. J. Ulhoa. 2010. New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. *Current Microbiology* 61: 298–305. doi:10.1007/s00284-010-9611-8.
- Moosa, A., S. T. Sahi, I. U. Haq, A. Farzand, S. A. Khan, and K. Javaid. 2017. Antagonistic potential of *Trichoderma* isolates and manures against *Fusarium* wilt of tomato. *International Journal of Vegetable Science* 23: 207–218. doi:10.1080/19315260.2016.1232329.
- Morgado-González, A., D. Espinosa-Victoria, and F. C. Gómez Merino. 2015. Efficiency of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in sugarcane. *Terra Latinoamericana* 33: 321–330.
- Nallathambi, P., C. Umamaheswari, B. B.L. Thakore, and T. A. More. 2009. Post-harvest management of ber (*Ziziphus mauritiana* Lamk) fruit rot (*Alternaria alternata* Fr. Keissler) using *Trichoderma* species, fungicides and their combinations. *Crop Protection* 28: 525–532. doi:10.1016/j.cropro.2009.02.002.
- Oyarburo, N. S., M. F. Machinandiarena, M. L. Feldman, G. R. Daleo, A. B. Andreu, and F. P. Olivieri. 2015. Potassium phosphite increases tolerance to UV-B in potato. *Plant Physiology and Biochemistry* 88: 1–8. doi:10.1016/j.plaphy.2015.01.003.
- Padmaja, G, G. u. Devi, B. K. Mahalakshmi, and D. Sridevi. 2015. Compatibility of phylloplane microflora of taro and fungicides in managing *Phytophthora colocasiae*. *Progressive Research* 10: 1437–1440.
- Pandey, D. K., N. N. Tripathi, R. D. Tripathi, and S.N Dixit. 1982. Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Journal of Plant Diseases and Protection* 89: 344–348.

- Patel, P., R. Shah, B. Joshi, K. Ramar, and A. Natarajan. 2019. Molecular identification and biocontrol activity of sugarcane rhizosphere bacteria against red rot pathogen *Colletotrichum falcatum*. *Biotechnology Reports* 21: e00317. doi:10.1016/j.btre.2019.e00317.
- Perveen, K., and N. A. Bokhari. 2012. Antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* isolated from soil of date palm field against *Fusarium oxysporum*. *African Journal of Microbiology Research* 6: 3348–3353. doi:10.5897/AJMR12.247.
- Qualhato, T. F., F. A. Ca. Lopes, A. S. Steindorff, R. S. Brandão, R. S. A. Jesuino, and C. J. Ulhoa. 2013. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: Evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters* 35: 1461–1468. doi:10.1007/s10529-013-1225-3.
- Rajeswari, P., and B. Kannabiran. 2011. *In vitro* effects of antagonistic microorganisms on *Fusarium oxysporum* [Schlecht. Emend. Synd & Hans] infecting *Arachis hypogaea* L. *Journal of Phytology* 3: 83–85.
- Rao, V. P., S. Singh, R. Chaudhary, M. K. Sharma, R. S. Sengar, U. M. Singh, and V. Sharma. 2016. Genetic variability in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) genotypes through inter simple sequence repeats (ISSR) markers. *Journal of Applied and Natural Science* 8: 1404–1409. doi:10.31018/jans.v8i3.973.
- Reuveni, M., D. Sheglov, and Y. Cohen. 2003. Control of moldy-core decay in apple fruits by β -aminobutyric acids and potassium phosphites. *Plant Disease* 87: 933–936. doi:10.1094/PDIS.2003.87.8.933.
- Ruocco, M., S. Lanzuise, F. Vinale, R. Marra, D. Turrà, S. L. Woo, and M. Lorito. 2009. Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: The role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 291–301. doi:10.1094/mpmi-22-3-0291.
- Saravanakumar, K., C. Yu, K. Dou, M. Wang, Y. Li, and J. Chen. 2016. Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Biological Control* 94: 37–46. doi:10.1016/j.biocontrol.2015.12.001.

- Savario, C. F., and J. W. Hoy. 2011. Microbial communities in sugarcane field soils with and without a sugarcane cropping history. *Plant and Soil* 341: 63–73. doi:10.1007/s11104-010-0622-9.
- Sentfies-Herrera, H. E., F. C. Gómez-Merino, A. Valdez-Balero, H. V. Silva-Rojas, and L. I. Trejo-Téllez. 2014. The Agro-industrial sugarcane system in Mexico: Current status, challenges and opportunities. *Journal of Agricultural Science* 6: 26. doi:10.5539/jas.v6n4p26.
- Sevastos, A., I. F. Kalampokis, A. Panagiotopoulou, M. Pelecanou, and K. A. Aliferis. 2018. Implication of *Fusarium graminearum* primary metabolism in its resistance to benzimidazole fungicides as revealed by ¹H NMR metabolomics. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 148: 50–61. doi:10.1016/j.pestbp.2018.03.015.
- Sharma, M., R. Manoharlal, S. Shukla, N. Puri, T. Prasad, S. V. Ambudkar, and R. Prasad. 2009. Curcumin modulates efflux mediated by yeast ABC multidrug transporters and is synergistic with antifungals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53: 3256–3265. doi:10.1128/AAC.01497-08.
- Sharma, P. 2011. Complexity of *Trichoderma-Fusarium* interaction and manifestation of biological control. *Australian Journal of Crop Science* 5: 1027–1038.
- Sharma, V., R. Salwan, and P. N. Sharma. 2017. The comparative mechanistic aspects of *Trichoderma* and probiotics: Scope for future research. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 100: 84–96. doi:10.1016/j.pmpp.2017.07.005.
- Showler, A. T. 2016. Selected Abiotic and biotic environmental stress factors affecting two economically important sugarcane stalk boring pests in the United States. *Agronomy* 6: 1–18. doi:10.3390/agronomy6010010.
- Silva, M. A. F., K. E. de Moura, K. E. de Moura, D. Salomão, and F. R. A. Patricio. 2018. Compatibility of *Trichoderma* isolates with pesticides used in lettuce crop. *Summa Phytopathologica* 44: 137–142. doi:10.1590/0100-5405/176873.
- Silva, O. C., H. A. A. Santos, M. D. Pria, and L. L. M. Mio. 2011. Potassium phosphite for control of downy mildew of soybean. *Crop Protection* 30: 598–604. doi:10.1016/j.cropro.2011.02.015.

- Siti-Nordahliawate, M. S., M. Z. Nur-Ain-Izzati, A. R. Azmi, and B. Salleh. 2008. Distribution, morphological characterization and pathogenicity of *Fusarium sacchari* associated with pokkah boeng disease of sugarcane in Peninsular Malaysia. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* 31: 279–286.
- Smillie, R., B. R. Grant, and D. Guest. 1989. The mode of action of phosphite: evidence for both direct and indirect modes of action on three *Phytophthora* spp. in plants. *Phytopathology* 79: 921. doi:10.1094/phyto-79-921.
- Suleiman, A. S., M. S. Gambo, and M. Sunusi. 2019. An *in vitro* antagonistic effect of *Trichoderma* spp. against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *FUDMA Journal of Sciences* 3: 369–374.
- Svistova, I. D., and T. Y. Senchakova. 2010. Ecological plasticity of *Trichoderma* Fungi in leached chernozem. *Eurasian Soil Science* 43: 314–315. doi:10.1134/S1064229310030099.
- Tapwal, A., R. Kumar, N. Gautam, and S. Pandey. 2012. Compatibility of *Trichoderma viride* for Selected fungicides and botanicals. *International Journal of Plant Pathology* 3: 89–94. doi:10.3923/ijpp.2012.89.94.
- Tapwal, A., U. Singh, J. A.T. da Silva, G. Singh, S. Garg, and R. Kumar. 2011. *In vitro* antagonism of *Trichoderma viride* against five phytopathogens. *Pest Technology* 5: 59–62.
- Veenstra, A., M. S. Rafudeen, and S. L. Murray. 2019. *Trichoderma asperellum* isolated from African maize seed directly inhibits *Fusarium verticillioides* growth *in vitro*. *European Journal of Plant Pathology* 153: 279–283. doi:10.1007/s10658-018-1530-8.
- Verma, M., S. K. Brar, R. D. Tyagi, R. Y. Surampalli, and J. R. Valéro. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* 37: 1–20. doi:10.1016/j.bej.2007.05.012.
- Widmer, T. L. 2019. Compatibility of *Trichoderma asperellum* isolates to selected soil fungicides. *Crop Protection* 120: 91–96. doi:10.1016/j.cropro.2019.02.017.
- Živković, S., S. Stojanović, Ž. Ivanović, V. Gavrilović, T. Popović, and J. Balaž. 2010. Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Archives of Biological Sciences* 62: 611–623.

CAPÍTULO II. EFECTO DE FOSFITO Y SU COMPATIBILIDAD CON *Trichoderma* sp., SOBRE LA MORFOLOGÍA Y EL ÍNDICE DE CLOROFILA DE PLÁNTULAS DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum* sp.)

2.1 Resumen

La caña de azúcar es el cultivo más importante para la producción de azúcar en el mundo, y México es el sexto productor mundial de azúcar. A pesar de ser un cultivo rústico y presentar gran resistencia a factores de estrés ambiental, la caña puede ser afectada por diversos factores bióticos y abióticos. El manejo integrado para el control de diversos factores adversos que afecten el desarrollo de cultivos de importancia comercial, como la caña de azúcar, reduce no solo la carga de fertilizantes y fungicidas químicos, sino que también minimiza la contaminación por su uso excesivo. En este trabajo se estudió el efecto de un aislado de *Trichoderma* sp. (Taz-016) en combinación con diferentes concentraciones de Phi sobre plántulas de caña de azúcar de la variedad CP 72-2086 de 20 cm de altura. Se evaluó la posible fitotoxicidad de Phi sobre el área foliar de las plántulas de caña de azúcar y la compatibilidad con el aislado de *Trichoderma* sp., mediante la cuantificación de parámetros morfológicos como número de hojas por planta, número de brotes, altura total, longitud de tallo, diámetro de tallo, volumen de raíz, peso seco y fresco de tallo, raíz y hojas, así como el índice de clorofila. No se observaron efectos fitotóxicos de Phi sobre el área foliar de las plántulas de caña de azúcar y se registró un aumento del volumen de raíz de 22.60% en la combinación de Taz-1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Phi, con respecto a la aplicación individual de Taz-016 y 19.50% más con respecto a la aplicación de Phi individual a 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Así mismo, un aumento en parámetros como el número de hojas por planta y número de brotes en 12.69 y 21.11%, respectivamente, en la aplicación de TAZ+Phi (Taz-2000), con respecto a la aplicación individual de Taz-016.

Palabras clave: Fitotoxicidad, ácido fosforoso, estimulación, CP 72-2086

2.2 Introducción

La caña de azúcar (*Saccharum* sp.) es una planta con importancia industrial para la región tropical y subtropical del mundo, es la principal fuente de azúcar comercial (75%) y se produce en más de 130 países, con una producción anual de 1,800 millones de toneladas de azúcar aproximadamente (Senties-Herrera *et al.* 2014, Rao *et al.* 2016, Senties-Herrera *et al.* 2017). En México, este cultivo

se desarrolla en 15 entidades federativas y 227 municipios en México, que beneficia económicamente a cerca de un millón de personas de manera directa y más de 2.2 millones de manera indirecta (Gómez-Merino *et al.* 2014). Además, es una de las principales materias primas para la producción de alcohol, ácido acético, butanol, papel, enzimas industriales, y bioetanol como biocombustible alternativo a la gasolina (Koizumi 2015 y Rao *et al.* 2016).

Sin embargo, el rendimiento y calidad del cultivo de caña de azúcar es afectado por diversos factores abióticos, como la disminución en la fertilidad de suelos, déficit hídrico, toxicidad por exceso de agroquímicos, la sequía prolongada, la salinidad, entre otros (Azevedo *et al.* 2011, Showler 2016), así como por factores bióticos, donde destaca la incidencia de hongos, virus y bacterias (Savario y Hoy 2011).

La caña de azúcar en la mayoría de las regiones productoras se practica como monocultivo hasta por cinco ciclos, lo que provoca un desarrollo pobre de las raíces y disminuye el crecimiento de las plantas (Gómez-Merino *et al.* 2014). Este cultivo como muchos otros, depende de la aplicación de productos químicos para controlar agentes causales de múltiples enfermedades y mejorar sus características agronómicas (Lin *et al.* 2014, Martínez-Fernández *et al.* 2015, Bansal *et al.* 2016, Lin and Lin 2016). El uso excesivo de productos agrícolas de síntesis química son fuente de contaminación de aguas, suelos y aire, causan graves daños a la salud humana y generan resistencia en los microorganismos que controlan (Sharma *et al.* 2009, McGovern 2015). La búsqueda de nuevas alternativas bioracionales y uso de variedades resistentes, forma parte de las prioridades de sustentabilidad en el manejo de enfermedades y producción de caña de azúcar, como el empleo del control biológico a través de microorganismos antagonistas o la resistencia inducida con sales inorgánicas (Oyarburo *et al.* 2015, Manayay-Guevara *et al.* 2016).

Trichoderma sp. es un hongo comúnmente utilizado en el biocontrol de patógenos del suelo, y ha sido reportado como un efectivo antagonista y estimulador de la defensa natural de las plantas (Aly y Manal 2009, Qualhato *et al.* 2013, Li *et al.* 2016), así mismo; el fosfito (Phi), que se derivan del ácido fosfórico (fosfonato), se han reportado como una opción a los fungicidas convencionales para el control de fitopatógenos (Massoud *et al.* 2012, Liljeroth *et al.* 2016) como *Phytophthora infestans*, *Fusarium circitatum*, *Rhizoctonia* sp., entre otros (Oyarburo *et al.* 2015, Martínez 2016, Cerqueira *et al.* 2017). El manejo integrado de plagas y enfermedades (MIPE) apunta a combinar las ventajas de los diferentes métodos de control, de acuerdo a las condiciones específicas de cada

caso o cultivo, por lo que la compatibilidad de *Trichoderma* spp. con distintos productos es un interrogante a tener en cuenta para lograr un MIPE exitoso.

Sin embargo, las concentraciones excesivas de fosfito han dado lugar a fitotoxicidad en cultivos hortícolas y especies nativas, y se ha encontrado que el aumento de las concentraciones de fosfito se correlaciona con un mejor control de las enfermedades (Hardy *et al.* 2001).

En general, a medida que aumentan las tasas de fosfito aplicado, también lo hacen las concentraciones de fosfito en el tejido vegetal. Los síntomas de fitotoxicidad incluyen necrosis foliar, defoliación y clorosis, además, cuando el fosfito causa una respuesta fitotóxica en las plantas, produce síntomas similares a los patógenos necrotizante. Los síntomas de fitotoxicidad muestran una relación lineal con la tasa de aplicación (Groves *et al.* 2015).

La evaluación de combinaciones de Phi y aislamientos nativos de *Trichoderma*, proporcionarán información básica para seleccionar la dosis de Phi con el hongo para dirigir aplicaciones en campo en el control de patógenos en caña de azúcar. Por estas razones, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto que genera el Phi sobre la morfo-fisiología de plántulas de caña de azúcar, y si el género *Trichoderma* es compatible con dicho compuesto.

2.3 Materiales y métodos

El trabajo experimental fue realizado en el Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca (ITSTB) ubicado en la Avenida Veracruz, esq. Héroes de Puebla, Colonia Pemex, Tierra Blanca-Veracruz, México. El sitio experimental se ubica entre las coordenadas 18°44' de Latitud Norte, 96°45' de Longitud Oeste, a 53 msnm, con un clima tropical seco (clasificación climática de Köppen: Aw).

2.3.1 Material biológico. Se utilizaron plántulas de caña de azúcar de 20 cm de altura de la variedad CP 72-2086 provenientes del cultivo *in vitro*.

2.3.2 Material microbiológico. Se evaluó un aislados del género *Trichoderma* sp., como biocontrolador, denominado Taz-016, perteneciente al cepario del ITSTB, obtenido previamente a partir de raíces de plantas de caña de azúcar de la variedad CP 70-1527 (18°22'22.3'' N; 96°28'24.4'' W), que se sembró en el medio de cultivo Papa y Dextrosa Agar (PDA) (Bioxon®)

por el método punta de hifa hasta su purificación e identificación taxonómica (Barnett y Hunter 1978), se dejó en incubación a 28 °C en una estufa de cultivo (Binder ®) durante 7 d para favorecer su desarrollo. Después de finalizar el periodo de incubación se adicionaron sobre las cajas Petri 4 mL de una solución de Tween 0.03%, con ayuda de un pincel estéril se colectaron las esporas de cada uno de los microorganismos y la suspensión recuperada se depositó en recipientes estériles con un volumen final de 1 L.

2.3.3 Sustrato. El sustrato consistió en una mezcla de suelo del campo agrícola localizado en el ITSTB y un sustrato comercial (Cosmopeat®), en una proporción de 2:3 (v/v), la cual fue previamente esterilizada en autoclave a 121°C con 15 lb/pulg² de presión de vapor por 15 minutos y aireada durante dos días consecutivos.

2.3.4 Unidad experimental. Consistió en plántulas de caña de azúcar individuales trasplantadas en bolsas de 2 L, llenas con el sustrato antes mencionado hasta dos terceras partes de su capacidad.

2.3.5 Establecimiento de experimento. Bajo condiciones de invernadero fueron establecidas 80 bolsas de 2 L de capacidad, distribuidas totalmente al azar. Las bolsas se llenaron hasta dos terceras partes de su capacidad con la mezcla de sustrato estéril, donde se colocaron las plántulas de caña de azúcar con los tratamientos correspondientes y se mantuvieron durante 60 días de evaluación. Este experimento se realizó dos veces en el tiempo.

2.3.6 Trasplante. Las plántulas de caña de azúcar fueron retiradas suavemente del almácigo y trasplantadas sobre las bolsas de 2 L, inoculadas con los diversos tratamientos descritos a continuación. Para lo cual se crearon agujeros de plantación, que tenían aproximadamente una profundidad de 6-8 cm y un diámetro de 4-6 cm, esto sobre la mezcla de sustrato estéril.

2.3.7 Tratamientos e inoculación. Se evaluó un total de 80 unidades experimentales, en cada experimento, divididas en 12 tratamientos, que constaban de 5 concentraciones individuales de Phi, provenientes del ácido fosforoso (SIGMA-Aldrich®) (500, 1000, 2000, 4000 y 8000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (6 repeticiones), las cuales se ajustaron a un pH de 5.7 con NaOH 1 N, 5 combinaciones de Phi con el aislado del género *Trichoderma* (500+Taz-016, 1000+Taz-016, 2000+Taz-016, 4000+Taz-016 y 8000+Taz-016 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (6 repeticiones), un control positivo (0+Taz-016 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (10 repeticiones) y un control negativo (0+Sin Taz-016 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (10 repeticiones).

Los tratamientos que incluían a *Trichoderma*, fueron establecidos mediante la técnica de inmersión a raíz desnuda durante 30 minutos, en una suspensión de esporas ajustada a una concentración de 1×10^8 esporas mL^{-1} con Tween 20 0.03 %. Mientras que los tratamientos que incluían las diferentes concentraciones de Phi se aplicaron hasta escorrentería sobre el follaje de las plántulas de caña de azúcar.

Se realizaron 3 aplicaciones de Phi, una cada semana después del inicio del experimento, 2 aplicaciones con riego (100 mL) de la suspensión de *Trichoderma* a la misma concentración de inoculación, a los 15 y 30 días después del inicio del experimento y 2 fertilizaciones con fosfato monoamónico soluble (Ultrasol® Map (12-61-0), a una concentración de 3 g L^{-1} , una al inicio del experimento y una segunda aplicación 30 días después. Las plántulas fueron regadas con agua todos los días por las mañanas.

2.3.8 Fitotoxicidad de Phi y compatibilidad con *Trichoderma* en caña de azúcar.

2.3.8.1 Fitotoxicidad de Phi. La fitotoxicidad sobre el follaje se evaluó al finalizar el experimento de acuerdo a Barrett *et al.* (2003), se utilizó una calificación de 0-5. Donde 0 = Follaje libre de afección, 1 = 1-20% del follaje afectado, 2 = 21-40% del follaje afectado, 3 = 41-60% de follaje afectado, 4 = 61-80% del follaje afectado, 5 = 81-100% del follaje afectado.

2.3.8.2 Compatibilidad de Phi y *Trichoderma* en caña de azúcar. Para evaluar la compatibilidad de Phi y *Trichoderma*, después de 60 días del establecimiento de los diferentes tratamientos, se extrajeron las plantas y se llevaron al laboratorio de Microbiología Aplicada del ITSTB donde se procedió a separar tallo y hoja, así mismo como lavar la raíz y separarla del tallo. Se evaluaron 6 plantas por cada tratamiento o en su defecto 10 para los controles.

2.3.8.2.1 Variables morfo-fisiológicas

Se cuantificó el número de brotes y número total de hojas por cada planta.

Altura total de planta. La altura de planta se midió con un flexómetro convencional, graduado en milímetros, se midió de la base del tallo hasta la parte apical de la última hoja verdadera. Para el ancho, donde los resultados se expresaron en centímetros

Ancho de hoja. Se midieron las primeras 5 hojas verdaderas por la parte central de la lámina con ayuda de un vernier digital (Soled®), donde los resultados se expresaron en milímetros.

Largo de hoja. Se midieron las primeras 5 hojas verdaderas desde el peciolo hasta el ápice de la lámina con ayuda de un flexómetro convencional, graduado en milímetros, donde los resultados se expresaron en centímetros.

Longitud de tallo. Consistió en medir desde la base del tallo hasta la parte apical de la planta con ayuda de un flexómetro convencional, graduado en milímetros, donde los resultados se expresaron en centímetros.

Diámetro de tallo. Consistió en medir la base del tallo con ayuda de un vernier digital (Soled®), donde los resultados se expresaron en milímetros.

Volumen de raíz. Fue medida con ayuda de una probeta de 1 L de volumen, graduada en mililitros, se midió el cambio de volumen, registrando el volumen inicial y final después de sumergir la raíz en su totalidad, los resultados se expresaron en mililitros.

Biomasa. Consistió en pesar por separado cada uno de los componentes de la planta (tallo, hojas y raíz) utilizando una balanza analítica (Velab-Ve-204®). Los pesos fueron expresados en gramos de materia fresca vegetal (Peso fresco).

Posteriormente se colocaron en bolsas de papel y se introdujeron a una estufa de secado (SHELLAB FX-S®) a una temperatura de 60 °C durante 48 horas, después de la deshidratación total se pesaron en una balanza analítica (Velab-Ve-204®) y el resultado se expresó en gramos de materia vegetal seca (Peso seco).

Determinación de clorofila total. La clorofila total se determinó de manera indirecta con un instrumento portátil denominado Medidor de Contenido de Clorofila (APOGGE MC-100®), esta medición se realizó cada semana desde la inoculación de las plántulas hasta la finalización del experimento, los resultados se expresaron en unidades de CCI (índice de concentración de clorofila).

2.3.9. Reaislamiento de *Trichoderma* sp. de las raíces de las plántulas de caña de azúcar.

Al finalizar la evaluación (60 d) se tomaron muestras de las raíces de las plántulas inoculadas con el aislado de *Trichoderma* (Taz-016) para verificar que el microorganismo estaba presente en la rizósfera. Se seleccionaron las raíces secundarias con presencia de pelos absorbentes de los tratamientos con Taz-016, se lavaron con agua de la llave durante 5 segundos. Posteriormente en

la campana de flujo laminar (Prendo® CFL-101-NW) se secaron sobre papel estéril, con ayuda de un bisturí aséptico se cortaron segmentos de raíz de 1 cm de longitud, las cuales fueron sembradas en triadas sobre medio PDA y se dejaron en incubación a 28 °C durante 5 d. Después de observar el crecimiento micelial y la esporulación típica del género *Trichoderma*, se procedió a la purificación mediante el método de punta de hifa, resemebrándose en medio PDA nuevo. Se realizó la incubación bajo las condiciones antes descritas y finalmente se confirmó su identificación taxonómica (Barnett y Hunter 1978).

2.3.10 Diseño experimental. El diseño experimental utilizado en este estudio fue un diseño de bloques completos al azar para el análisis de las variables evaluadas. Se emplearon dos modelos estadísticos: 1) Modelo Lineal Generalizado Mixto (MLGM) con respuesta Poisson (λ_{ij}, φ) para las variables de número de brotes y hojas por planta., 2) Modelo Lineal Mixto para las variables de respuesta largo de tallo, hoja, ancho de hoja, diámetro de tallo, volumen de raíz, peso fresco y seco de hoja, tallo y raíz.

2.3.11 Análisis estadístico. El análisis estadístico de las variables evaluadas se realizó mediante el procedimiento glimmix (PROC GLIMMIX) de SAS (Statistical Analysis System 9.4), y las medias se compararon mediante la prueba de Fisher LSD con una significancia del 5 %.

2.4. Resultados

2.4.1 Fitotoxicidad de Phi y compatibilidad con *Trichoderma* en caña de azúcar.

2.4.1.1 Fitotoxicidad de Phi. Antes de la inoculación, todas las plantas estaban sanas y sin signos de necrosis foliar. No se observaron signos de fitotoxicidad en ningún tratamiento después de 60 d de evaluación con 3 aplicaciones hasta escorrentía de Phi a diferentes concentraciones con respecto a la presencia de necrosis foliar o defoliación (Figura 15).

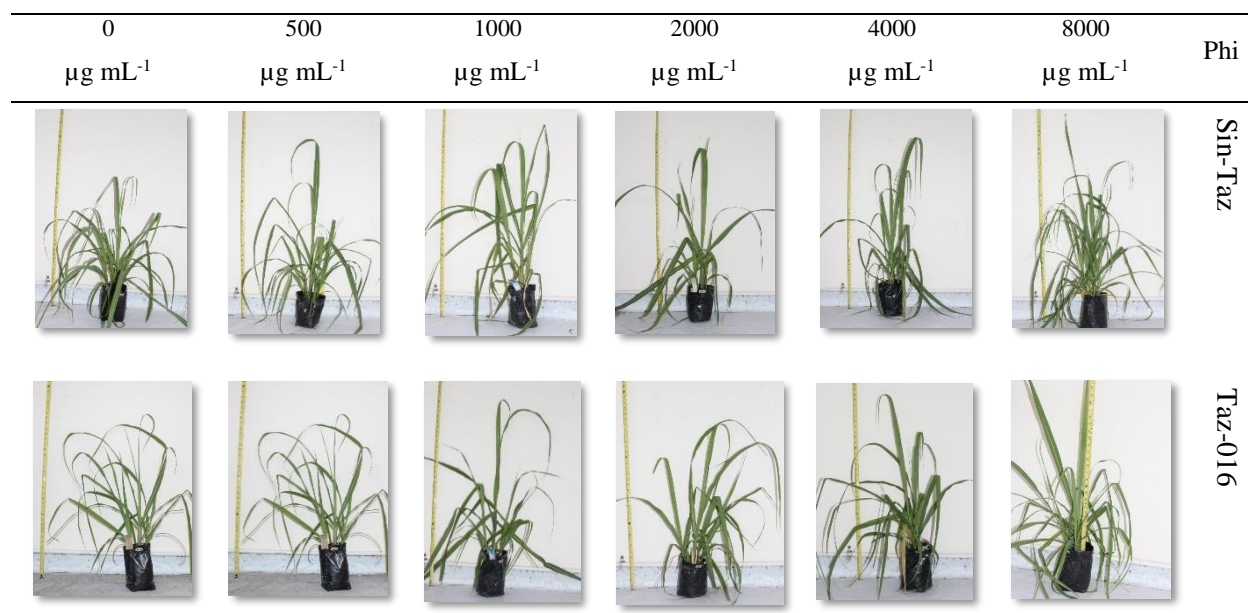


Figura 15. Efectos de fitotoxicidad sobre plántulas de caña de azúcar después de 60 d de evaluación.

2.4.1.2 Compatibilidad de Phi y *Trichoderma* en caña de azúcar

En este experimento no se encontraron diferencias significativas en el número promedio de brotes ($P = 0.9999$), sin embargo, todos los tratamientos fueron mejores con respecto al control. El tratamiento Taz-2000 aumentó 33.02% el número promedio de brotes con respecto al control, seguido del tratamiento 8000, 4000 y Taz-500 con un aumento de 22.42, 19.50 y 19.20%, respectivamente. Tampoco se registraron diferencias significativas en el número de hojas ($P = 0.9888$), este parámetro presentó efectos negativos al disminuir desde un 0.79 a 8.7 % el número de hojas por planta al adicionar las diferentes dosis de Phi en comparación con el control. En cuanto a la altura total de planta, se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($P = 0.0001$), donde el tratamiento Taz-1000 aumentó 8.43% la altura total con respecto al control. Sin embargo, el tratamiento 8000 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de Phi disminuyó 3.24 % este parámetro. Es importante mencionar que la misma concentración de Phi más la adición de esporas del género *Trichoderma* (Taz-8000) aumentaron 3.04% la altura total con respecto al control (Cuadro 3).

Para la variable longitud de hoja, el tratamiento Taz-0 fue el mejor, en donde se observó un aumento del 7.52% con diferencias significativas con respecto al control ($P = 0.0001$). Se observó un efecto negativo para las variables longitud y diámetro de tallo en todos los tratamientos con y sin esporas del género *Trichoderma*, donde el tratamiento 8000 disminuyó 15.53% el

diámetro del tallo, mientras que Taz-8000 12.96% la longitud de tallo con respecto al control (Cuadro 3).

Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control sobre la variable volumen de raíz ($P = 0.0001$), donde el tratamiento Taz-1000 registró el mayor aumento de este parámetro con 37.98% más del volumen de raíz con respecto al control, seguido de los tratamientos Taz-4000 y Taz-2000 con 36.87 y 33.22%, respectivamente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Evaluación de variables morfológicas de plántulas de caña de azúcar.

Tratamiento ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Brotos	Número de hojas	Altura total (cm)	Ancho de hoja (mm)	Longitud de hoja (cm)	Longitud de tallo (cm)	Diámetro de tallo (mm)	Volumen de raíz (mL)
0	6.51±1.55 ^a	27.81±3.44 ^a	108.60±3.84 ^{abc}	19.63±0.59 ^{ab}	74.15±2.58 ^{bc}	15.12±0.72 ^a	13.65±0.49 ^a	79.75±8.57 ^d
500	7.10±1.75 ^a	26.80±3.46 ^a	109.83±4.95 ^{abc}	19.27±0.77 ^{abc}	76.40±3.34 ^{abc}	14.62±0.94 ^{ab}	13.14±0.64 ^{abc}	102.54±11.07 ^{abc}
1000	6.82±1.69 ^a	25.65±3.32 ^a	111.25±4.95 ^{abc}	20.05±0.77 ^{ab}	74.49±3.34 ^{abc}	14.91±0.94 ^{ab}	13.21±0.64 ^{abc}	92.08±11.07 ^{abcd}
2000	7.24±1.78 ^a	25.72±3.33 ^a	109.58±4.95 ^{abc}	19.93±0.77 ^{ab}	75.98±3.34 ^{abc}	14.50±0.94 ^{ab}	12.90±0.64 ^{abc}	86.66±11.07 ^{cd}
4000	7.78±1.90 ^a	28.51±3.66 ^a	107.75±4.95 ^{bc}	18.89±0.77 ^{bc}	75.02±3.34 ^{abc}	13.66±0.94 ^{ab}	11.54±0.64 ^d	90.83±11.07 ^{abcd}
8000	7.97±1.94 ^a	30.65±3.91 ^a	105.08±4.95 ^c	18.15±0.77 ^c	72.15±3.34 ^c	13.50±0.94 ^{ab}	11.53±0.64 ^d	90.41±11.07 ^{abcd}
TAZ-0	7.15±1.69 ^a	27.09±3.36 ^a	115.90±3.84 ^{ab}	20.77±0.59 ^a	79.73±2.58 ^a	14.65±0.72 ^{ab}	14.01±0.49 ^a	89.75±8.57 ^{bcd}
TAZ-500	7.76±1.89 ^a	25.39±3.29 ^a	112.33±4.95 ^{abc}	19.38±0.77 ^{abc}	76.15±3.34 ^{abc}	14.66±0.94 ^{ab}	12.26±0.64 ^{cd}	100.04±11.07 ^{abc}
TAZ-1000	7.52±1.84 ^a	26.65±3.44 ^a	117.66±4.95 ^a	20.78±0.77 ^a	78.75±3.34 ^{ab}	14.75±0.94 ^{ab}	12.72±0.64 ^{bcd}	110.04±11.07 ^a
TAZ-2000	8.66±2.09 ^a	30.53±3.89 ^a	108.58±4.95 ^{abc}	19.42±0.77 ^{abc}	73.40±3.34 ^{bc}	13.50±0.94 ^{ab}	12.26±0.64 ^{cd}	106.25±11.07 ^{abc}
TAZ-4000	7.37±1.80 ^a	28.30±3.63 ^a	110.25±4.95 ^{abc}	19.52±0.77 ^{abc}	75.13±3.34 ^{abc}	13.83±0.94 ^{ab}	13.11±0.64 ^{abc}	109.16±11.07 ^{ab}
TAZ-8000	7.25±1.78 ^a	27.59±3.55 ^a	111.91±4.95 ^{abc}	19.37±0.77 ^{abc}	76.06±3.34 ^{abc}	13.16±0.94 ^b	12.74±0.64 ^{bcd}	102.50±11.07 ^{abc}

Valores con letra distinta en la misma columna, son estadísticamente diferentes con respecto a la prueba de Fisher ($\alpha = 0.05$).

En general, se observó un mayor volumen de raíz al aumentar la dosis de Phi en las plántulas, así mismo al combinar dichas concentraciones con esporas del género *Trichoderma* (Figura 16).

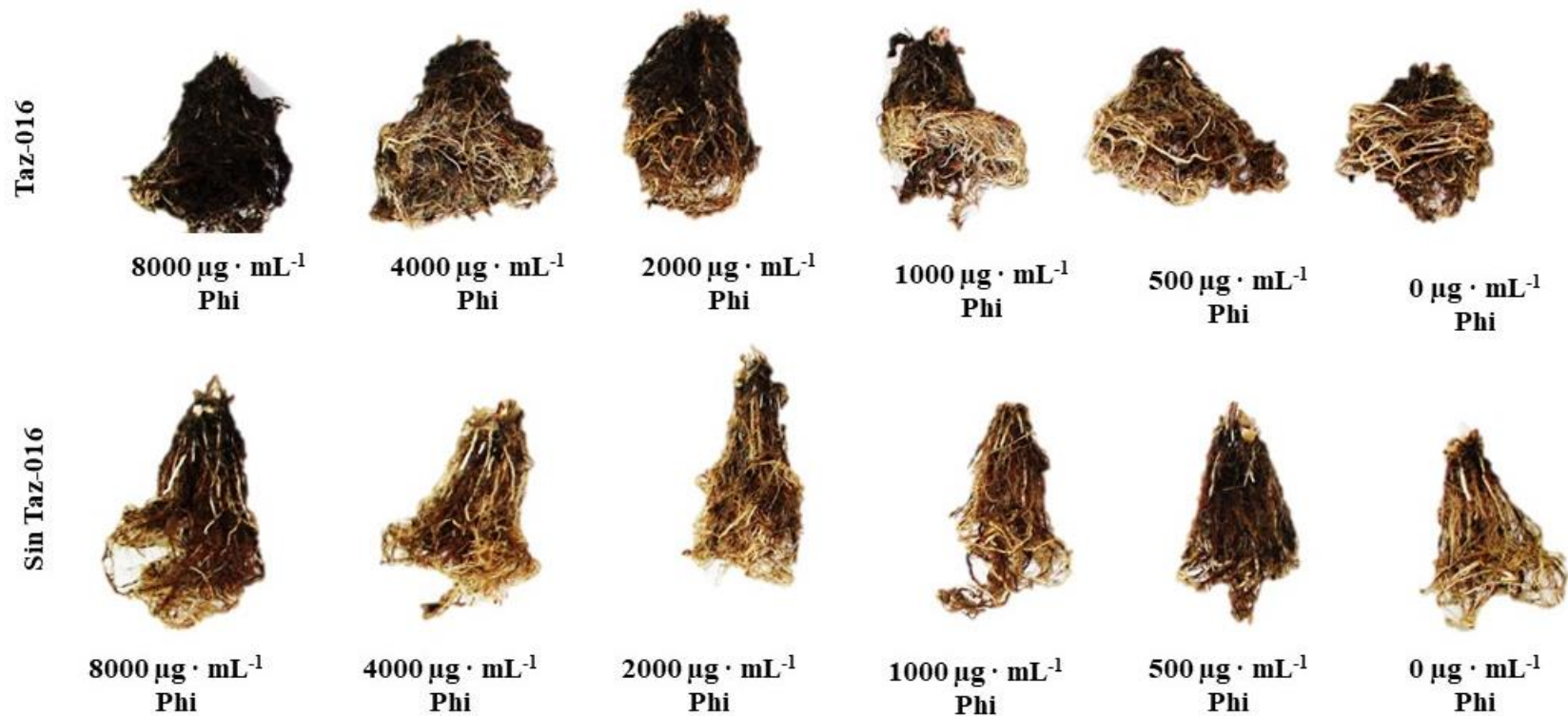


Figura 16. Raíces de plántulas de caña de azúcar con diferentes dosis de Phi y con inoculación de *Trichoderma* sp.

No se observaron diferencias significativas entre tratamientos para el peso fresco de hojas ($P = 0.8216$), sin embargo, se observaron diferencias estadísticas sobre el peso seco de hojas ($P = 0.0001$). En general, los tratamientos de Phi en combinación con Taz-016 aumentaron este parámetro con respecto al control, el tratamiento Taz-4000 presentó el mayor aumento con 26.65% seguido de Taz-2000 y Taz-1000 con 22.85 y 15.93%, respectivamente. En cuanto a las variables de peso fresco y seco de tallo se observaron efectos negativos al aumentar la concentración de Phi sobre las plántulas de caña de azúcar. El tratamiento Taz-8000 redujo 10.41% el peso fresco de tallo, mientras que el tratamiento 8000 disminuyó 9.89% el peso seco de tallo. En general, para las variables de peso fresco y seco de raíz se observó un aumento con diferencias significativas entre tratamientos con respecto al control ($P = 0.0001$). Los tratamientos Taz-0, Taz-4000 y Taz-200 registraron los mayores aumentos en el peso seco de raíz con 29.13, 26.50 y 22.44% con respecto al control (Cuadro 4).

Cuadro 4. Biomasa fresca y seca de plántulas de caña de azúcar tratadas con diferentes concentraciones de Phi y en combinación *Trichoderma*.

Tratamiento ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Peso fresco			Peso seco		
	Hoja (g)	Tallo (g)	Raíz (g)	Hoja (g)	Tallo (g)	Raíz (g)
0	66.20±2.78 ^a	41.20±2.36 ^{ab}	87.50±8.36 ^b	13.43±0.75 ^e	8.29±0.89 ^{ab}	20.90±1.82 ^{cd}
500	64.50±3.59 ^a	39.16±3.05 ^{ab}	112.16±10.77 ^a	13.09±0.97 ^e	9.34±1.15 ^{ab}	21.55±2.36 ^{bed}
1000	61.83±3.59 ^a	38.33±3.05 ^{ab}	97.08±10.77 ^{ab}	13.27±0.97 ^e	9.80±1.15 ^a	18.28±2.36 ^d
2000	65.58±3.59 ^a	44.25±3.05 ^a	85.33±10.77 ^b	13.63±0.97 ^{de}	9.49±1.15 ^{ab}	17.69±2.36 ^d
4000	67.16±3.59 ^a	39.33±3.05 ^{ab}	106.66±10.77 ^a	14.77±0.97 ^{bcde}	9.28±1.15 ^{ab}	20.19±2.36 ^{cd}
8000	66.91±3.59 ^a	39.91±3.05 ^{ab}	102.16±10.77 ^{ab}	14.88±0.97 ^{bcde}	7.47±1.15 ^b	21.37±2.36 ^{bed}
TAZ-0	64.75±2.78 ^a	41.45±2.36 ^{ab}	100.65±8.36 ^{ab}	14.67±0.75 ^{cde}	10.10±0.89 ^a	26.99±1.82 ^a
TAZ-500	63.50±3.59 ^a	41.08±3.05 ^{ab}	108.91±10.77 ^a	13.97±0.97 ^{cde}	7.27±1.15 ^b	25.38±2.36 ^{ab}
TAZ-1000	68.83±3.59 ^a	40.91±3.05 ^{ab}	112.50±10.77 ^a	15.57±0.97 ^{abc}	8.19±1.15 ^{ab}	25.59±2.36 ^{ab}
TAZ-2000	68.00±3.59 ^a	38.75±3.05 ^{ab}	104.25±10.77 ^{ab}	16.50±0.97 ^{ab}	9.04±1.15 ^{ab}	26.44±2.36 ^a
TAZ-4000	66.66±3.59 ^a	37.58±3.05 ^b	104.25±10.77 ^{ab}	17.01±0.97 ^a	8.12±1.15 ^{ab}	23.59±2.36 ^{abc}
TAZ-8000	66.41±3.59 ^a	36.91±3.05 ^b	100.58±10.77 ^{ab}	15.42±0.97 ^{abcd}	8.14±1.15 ^{ab}	21.08±2.36 ^{bed}

Valores con letra distinta en la misma columna, son estadísticamente diferentes con base a la prueba de Fisher ($\alpha = 0.05$).

Se observaron diferencias significativas para el parámetro de índice de clorofila (CCI) ($P = 0.0001$). Se observaron efectos positivos para todos los tratamientos sobre este parámetro, el tratamiento Taz-0 presentó el mayor aumento sobre el índice con 17.41%, seguido del tratamiento Taz-4000 y 500 con 17.30 y 13.14%, respectivamente, en contraste al control (0) (Figura 17).

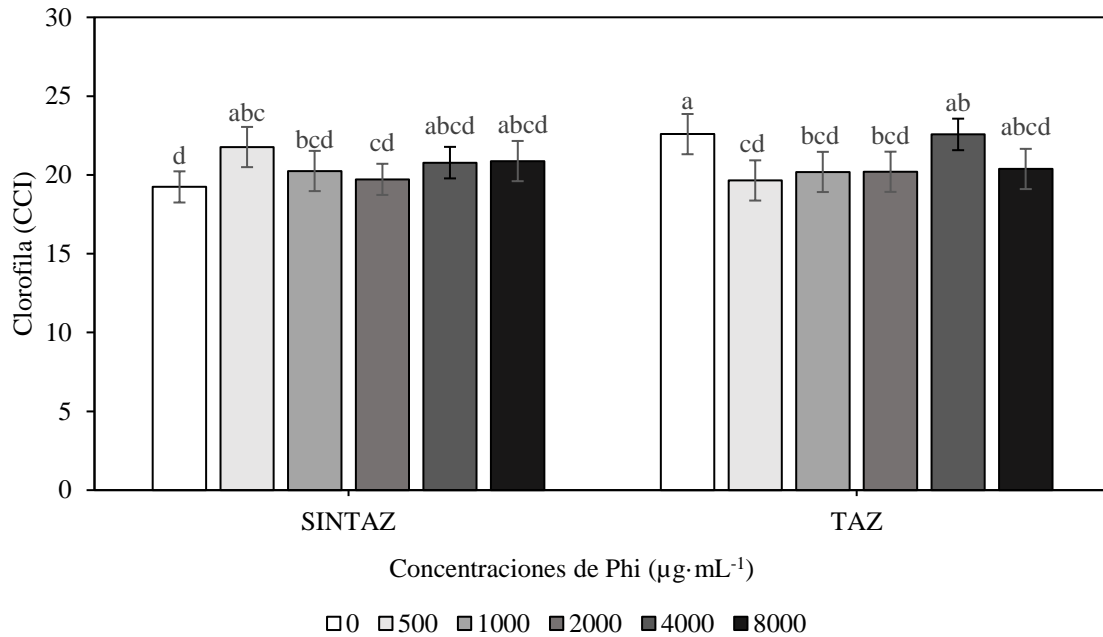


Figura 17. Índice de clorofila de plántulas de caña de azúcar, tratadas con *Trichoderma* sp., y distintas concentraciones de Phi. Valores con letra distinta, son estadísticamente diferentes con base a la prueba de Fisher ($\alpha = 0.05$).

2.4.2 Reislamiento de *Trichoderma* sp. de las plántulas de caña de azúcar

Se observó el crecimiento micelial característica del género *Trichoderma*, de color verde oliva con micelio algodonoso, sobre las raíces sembradas de las plántulas de caña de azúcar en medio PDA después de 3 días. Todos los tratamientos en combinación con Phi (0, 500, 1000, 2000, 4000 y 8000 µg·mL⁻¹) presentaron esporulación a los 5 d (Figura 18).

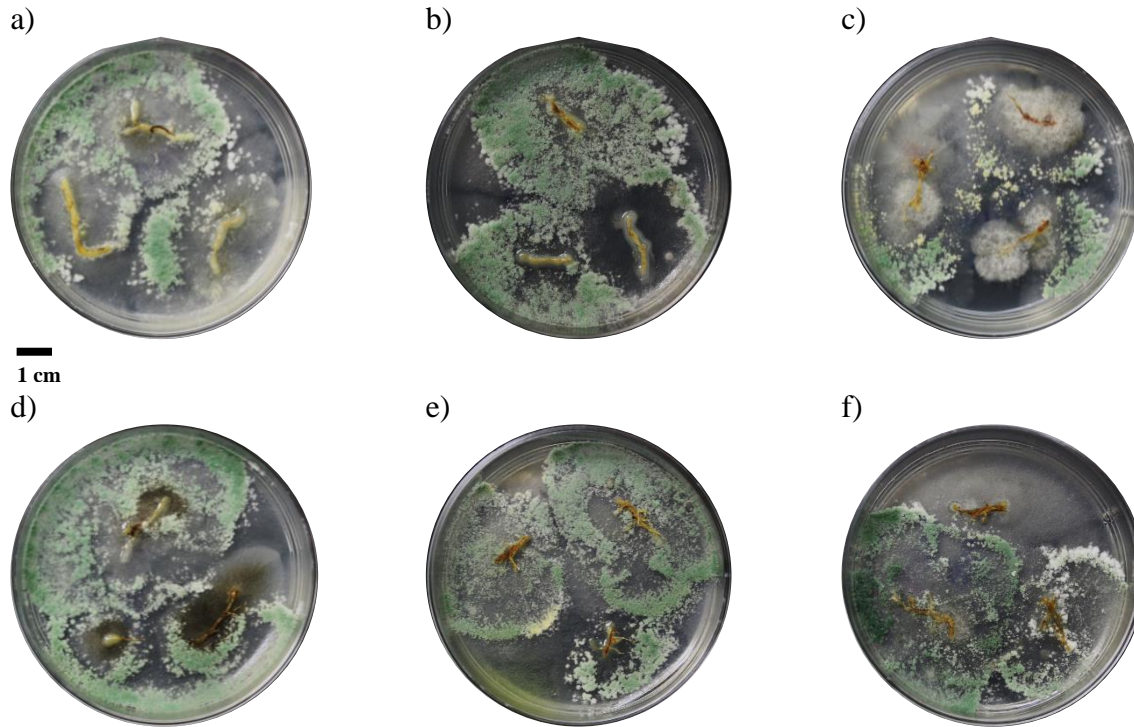


Figura 18. Crecimiento microbiano de *Trichoderma* sp. en raíces de plántulas de caña de azúcar sembradas en medio PDA de los diferentes tratamientos con Phi; a) Raíces de Taz-0, b) Taz-5000, c) Taz-1000, d) Taz-2000, e) Taz-4000 y f) Taz-8000.

Mediante el método de purificación por punta de hifa se obtuvieron 6 aislados de *Trichoderma* sp. de cada una de las combinaciones de Phi (Figura 19).

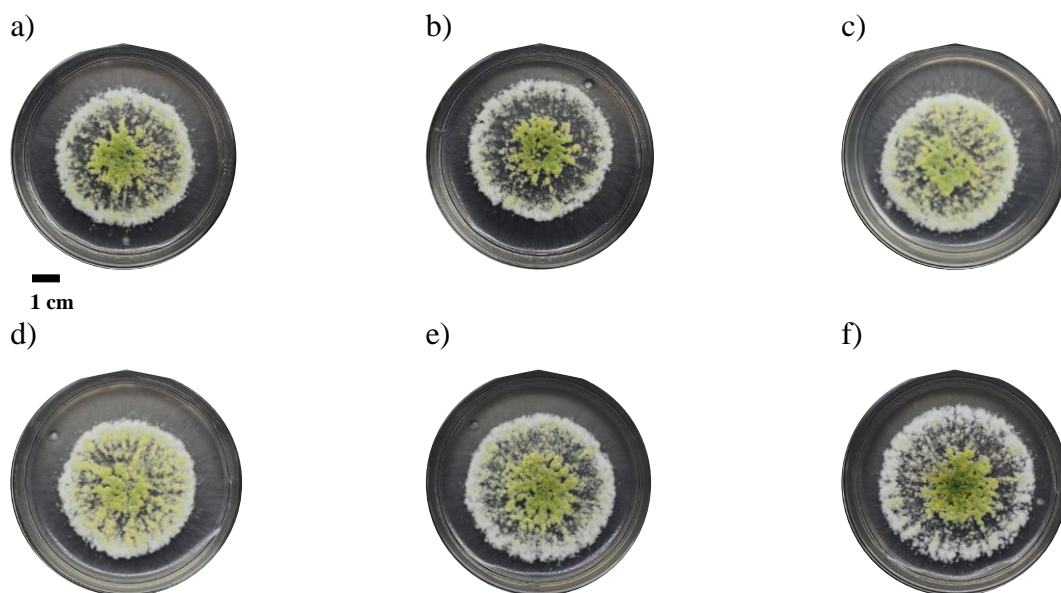


Figura 19. Aislamiento por punta de hifa de *Trichoderma* sp. de raíces de plántulas de caña de azúcar sembradas en medio PDA de los diferentes tratamientos con Phi; a) Aislado de Taz-0, b) Taz-5000, c) Taz-1000, d) Taz-2000, e) Taz-4000 y f) Taz-8000.

2.5. Discusión

2.5.1. Fitotoxicidad

Se ha reportado que el fosfito generan fitotoxicidad sobre plantas tratadas con dicha sal, sin embargo, este efecto es discutible y puede estar mediado por factores como el estado del fosfato (Pi) de la planta (Massoud *et al.* 2012). Pilbeam *et al.* (2011) informaron que en un rango de 0.25-1% de Phi las plantas de *Eucalyptus marginata* presentan fitotoxicidad, al observarse daño irreparable a la corona de la planta. Sin embargo, Dalio *et al.* (2014) a 0.5% de Phi no informaron fitotoxicidad ni trastornos fisiológicos en las plántulas de *Fagus sylvatica* al tiempo que presentaban una eficacia notable en la protección de la haya contra *P. plurivora*. En este estudio las plántulas de caña de azúcar no presentaron síntomas de fitotoxicidad en los rangos establecidos de Phi (500-8000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) sobre follaje, tallo o raíz, lo que pudo verse protegido por la aplicación de fertilizante con 60 ppm de fósforo. En general, se ha reportado que el Phi presentan baja fitotoxicidad (Cerqueira *et al.* 2017).

La aplicación de Phi solo, no mejoró significativamente ningún parámetro morfo-fisiológico de las plantas de caña de azúcar, pero hubo un aumento en parámetros como longitud de hojas, altura total promedio y volumen de raíz. Sin embargo, en concentraciones de 500-8000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Phi solo, se observaron anomalías en el desarrollo como disminución en diámetro y longitud de tallo. Estos resultados son similares a los reportados por Cerqueira *et al.* (2017) quienes reportaron que 4% de Phi genera un efecto negativo sobre la tasa de crecimiento y presenta un daño fotoquímico en Pino Monterrey. En contraste, Pilbeam *et al.* (2011) informaron que Phi a concentraciones de 0.5% a 2% generaron una estimulación sobre el crecimiento en *Adenanthos barbiger*. Estos resultados confirman que los efectos de fitotoxicidad de diferentes concentraciones de Phi difiere entre las especies y dentro de las etapas de desarrollo de la planta (Scott *et al.* 2016).

Además, el índice de clorofila fue afectado en aplicaciones de Phi solo, en concentraciones de 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Cerqueira *et al.* (2017) reportaron efectos contrastantes al observar un mayor contenido de clorofila a una concentración sub-tóxica. Estos resultados sugieren que la aplicación de Phi solo a concentraciones de 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ disminuye la actividad de la cadena transportadora de electrones lineal, es decir, una disminución en la eficiencia fotosintética.

2.5.2. Compatibilidad de Phi y *Trichoderma* en caña de azúcar

La combinación de Phi y *Trichoderma* sp. mejoró características como volumen, peso fresco de la raíz y peso fresco de hoja de la caña de azúcar, esto en relación al aumento del Phi en la mezcla. El volumen de raíz fue 22.60% mayor en la combinación de Taz-1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Phi, con respecto a la aplicación individual de Taz-016, 19.50% mayor con respecto a la aplicación de Phi individual a 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 37.98% mayor que el control; de la misma manera, la combinación Taz+Phi (Taz-1000) mejoró 11.77 y 15.88% el peso fresco de raíz con respecto a los tratamientos individuales de Taz-016 y 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Phi, respectivamente, y 28.57% con respecto al control. Así mismo Taz+4000 mejoró 15.95 y 15.16% el peso seco de hoja con respecto a los tratamientos individuales de Taz-016 y 4000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Phi, respectivamente, y 26.65 % con respecto al control.

Sin embargo, en las concentraciones mayores a 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en las combinaciones con Phi se observaron efectos negativos sobre altura de hoja, peso fresco de tallo, ancho y longitud de hoja, diámetro y longitud de tallo. Se cree que el daño inducido por fosfito al inicio del crecimiento es una adaptación al estrés que permite a las plantas recuperarse de los efectos fitotóxicos del fosfito, por lo cual, el daño inducido por fosfito observado en las raíces puede ser de corta duración y superado por la planta (Groves *et al.* 2015).

Parámetros como el número de hojas por planta y número de brotes no presentaron diferencias significativas entre tratamientos. Sin embargo, mejoraron en un rango máximo de 12.69 y 21.11%, respectivamente, en la aplicación de Taz+Phi (Taz-2000), con respecto al control. Estos resultados coinciden con lo reportado por Molla *et al.* (2012) quienes reportaron que parámetros como la altura de la planta, el número de hojas y ramas por planta se vio significativamente influenciado por la aplicación de biofertilizante (*Trichoderma harzianum*) solo o en combinación con un fertilizante. Lo cual puede deberse a la producción de metabolitos secundarios o fitohormonas, que pueden ejercer acciones estimulantes, similar a la auxina (Molla *et al.* 2012).

Por lo tanto, este estudio es un trabajo preliminar, que podría tener una contribución significativa al desarrollo de nuevos métodos respetuosos con el medio ambiente.

2.6 Conclusión

La aplicación de soluciones con concentraciones de 500 a 8000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Phi sobre las plantulas de caña de azúcar no presentan sintomatología de fitotoxicidad sobre el área foliar.

Las combinaciones de Phi con un aislado de género *Trichoderma* mejoraron de manera significativa distintas variables morfológicas de la caña de azúcar, con respecto a sus aplicaciones individuales como volumen de raíz (Taz-1000, Taz-2000 y Taz-4000), peso fresco de raíz (Taz-1000 y Taz-2000) y peso seco de hoja (Taz-1000, Taz-2000, Taz-4000 y Taz-8000).

2.7. Literatura citada

- Aly, M. H., and Y. Hussein Manal. 2009. Vesicular-arbuscular mycorrhiza and *Trichoderma viridi* as deterrents against soil-borne root rot disease of sugar beet. *Sugar Tech* 11: 387–391. doi:10.1007/s12355-009-0066-9.
- Azevedo, R. A., R. F. Carvalho, M. C. Cia, and P. L. Gratão. 2011. Sugarcane Under Pressure: An Overview of Biochemical and Physiological Studies of Abiotic Stress. *Tropical Plant Biology* 4: 42–51. doi:10.1007/s12042-011-9067-4.
- Bansal, Y., J. Chander, N. Kaistha, N. Singla, S. Sood, and A. D. Van-Diepeningen. 2016. *Fusarium sacchari*, a cause of mycotic keratitis among sugarcane farmers - a series of four cases from North India. *Mycoses* 59: 705–709. doi:10.1111/myc.12518.
- Barrett, S. R., B. L. Shearer, and G. E. St J. Hardy. 2003. The efficacy of phosphite applied after inoculation on the colonisation of *Banksia brownii* stems by *Phytophthora cinnamomi*. *Australasian Plant Pathology* 32: 1–7. doi:10.1071/AP02061.
- Cerqueira, A., A. Alves, H. Berenguer, B. Correia, A. Gómez-Cadenas, J. J. Diez, P. Monteiro, and G. Pinto. 2017. Phosphite shifts physiological and hormonal profile of Monterey pine and delays *Fusarium circinatum* progression. *Plant Physiology and Biochemistry* 114: 88–99. doi:10.1016/j.plaphy.2017.02.020.
- Dalio, R. J. D., F. Fleischmann, M. Humez, and W. Osswald. 2014. Phosphite Protects *Fagus sylvatica* Seedlings towards *Phytophthora plurivora* via Local Toxicity, Priming and Facilitation of Pathogen Recognition. Edited by Richard A. Wilson. *PLoS ONE* 9: e87860. doi:10.1371/journal.pone.0087860.

- Gómez-Merino, F. C., L. I. Trejo-Téllez, V. Morales-Ramos, J. Salazar-Ortiz, J. Velasco-Velasco, H.E. Sentíes-Herrera, and P. Ladewig. 2014. Necesidades de Innovación en la producción de Caña de Azúcar. *Agroproductividad*: 22–26.
- Groves, E., K. Howard, G. Hardy, and T. Burgess. 2015. Role of salicylic acid in phosphite-induced protection against Oomycetes; a *Phytophthora cinnamomi* - *Lupinus augustifolius* model system. *European Journal of Plant Pathology* 141: 559–569. doi:10.1007/s10658-014-0562-y.
- Hardy, G E S, S Barrett, and B L Shearer. 2001. The future of phosphite as a fungicide to control the soilborne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. *Australasian Plant Pathology* 30: 133–139. doi:10.1071/AP01012.
- Koizumi, T. 2015. Biofuels and food security. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 52. Elsevier: 829–841. doi:10.1007/978-3-319-05645-6_7.
- Li, Y., R. Sun, J. Yu, K. Saravanakumar, and J. Chen. 2016. Antagonistic and Biocontrol Potential of *Trichoderma asperellum* ZJSX5003 Against the Maize Stalk Rot Pathogen *Fusarium graminearum*. *Indian Journal of Microbiology* 56: 318–327. doi:10.1007/s12088-016-0581-9.
- Liljeroth, E., Å. Lankinen, L. Wiik, D. D. Burra, E. Alexandersson, and E. Andreasson. 2016. Potassium phosphite combined with reduced doses of fungicides provides efficient protection against potato late blight in large-scale field trials. *Crop Protection* 86: 42–55. doi:10.1016/j.cropro.2016.04.003.
- Lin, Y., and Y. Lin. 2016. Recent Developments in the Molecular Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Journal of Nature and Science* 2: e239.
- Lin, Z., S. Xu, Y. Que, J. Wang, J. C. Comstock, J. Wei, P. H. McCord, B. Chen, R. Chen, and M. Zhang. 2014. Species-Specific Detection and Identification of *Fusarium* Species Complex, the Causal Agent of Sugarcane Pokkah Boeng in China. Edited by Igor Mokrousov. *PloS one* 9: e104195. doi:10.1371/journal.pone.0104195.
- Manayay-Guevara, C. A. L., L. M. Cordova-Rojas, J. W. Garcia-López, and J. M. Vásquez-Vázquez. 2016. Efecto antagónico de una cepa de *Trichoderma* sp sobre *Fusarium* sp. En

- planta de tomate Río Grande (*Solanum lycopersicum*). *UCV-HACER. Revista de Investigación y Cultura* 5: 64–68.
- Martínez-Fernández, E., P. Martínez-Jaimes, D. Guillén Sánchez, G. Peña-Chora, and V. M. Hernández-Hernández. 2015. Diversidad de *Fusarium* en las raíces de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en el estado de Morelos, México. *Revista Mexicana de Micología* 42: 33–43.
- Martínez, S. 2016. Effects of combined application of potassium phosphite and fungicide on stem and sheath disease control, yield, and quality of rice. *Crop Protection* 89: 259–264. doi:10.1016/j.cropro.2016.08.002.
- Massoud, K., T. Barchietto, T. Le-Rudulier, L. Pallandre, L. Didierlaurent, M. Garmier, F. Ambard-Bretteville, J.-M. Seng, and P. Saindrenan. 2012. Dissecting Phosphite-Induced Priming in *Arabidopsis* Infected with *Hyaloperonospora arabidopsidis*. *Plant physiology* 159: 286–298. doi:10.1104/pp.112.194647.
- McGovern, R. J. 2015. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection* 73: 78–92. doi:10.1016/j.cropro.2015.02.021.
- Molla, A. H., M. Haque, A. Haque, and G. N. M. Ilias. 2012. *Trichoderma*-Enriched Biofertilizer Enhances Production and Nutritional Quality of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and Minimizes NPK Fertilizer Use. *Agricultural Research* 1: 265–272. doi:10.1007/s40003-012-0025-7.
- Oyarburo, N. S., M. F. Machinandiarena, M. L. Feldman, G. R. Daleo, A. B. Andreu, and F. P. Olivieri. 2015. Potassium phosphite increases tolerance to UV-B in potato. *Plant Physiology and Biochemistry* 88. Elsevier Masson SAS: 1–8. doi:10.1016/j.plaphy.2015.01.003.
- Pilbeam, R. A., K. Howard, B. L. Shearer, and G. E. St. J. Hardy. 2011. Phosphite stimulated histological responses of *Eucalyptus marginata* to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Trees* 25: 1121–1131. doi:10.1007/s00468-011-0587-1.
- Qualhato, T. F., F. A. C. Lopes, A. S. Steindorff, R. S. Brandão, R. S. A. Jesuino, and C. J. Ulhoa. 2013. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters* 35:

1461–1468. doi:10.1007/s10529-013-1225-3.

- Rao, V. P., S. Singh, R. Chaudhary, M. K. Sharma, R. S. Sengar, U. M. Singh, and V. Sharma. 2016. Genetic variability in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) genotypes through inter simple sequence repeats (ISSR) markers. *Journal of Applied and Natural Science* 8: 1404–1409. doi:10.31018/jans.v8i3.973.
- Savario, C. F., and J. W. Hoy. 2011. Microbial communities in sugarcane field soils with and without a sugarcane cropping history. *Plant and Soil* 341: 63–73. doi:10.1007/s11104-010-0622-9.
- Scott, P., M. K. Bader, and N. M. Williams. 2016. Foliar phosphite application has minor phytotoxic impacts across a diverse range of conifers and woody angiosperms. *Physiologia Plantarum* 158: 124–134. doi:10.1111/ppl.12442.
- Sentías-Herrera, H. E., F. C. Gómez-Merino, A. Valdez-Balero, V. H. Silva-Rojas, and L. I. Trejo-Téllez. 2014. The Agro-Industrial Sugarcane System in Mexico: Current Status, Challenges and Opportunities. *Journal of Agricultural Science* 6: 26. doi:10.5539/jas.v6n4p26.
- Sentías-Herrera, H. E., L. I. Trejo-Téllez, and F. C. Gómez-Merino. 2017. The Mexican sugarcane production system: History, current status and new trends. In *Sugarcane*, ed. Rachel Murphy, 39–72.
- Sharma, M., R. Manoharlal, S. Shukla, N. Puri, T. Prasad, S. V. Ambudkar, and R. Prasad. 2009. Curcumin Modulates Efflux Mediated by Yeast ABC Multidrug Transporters and Is Synergistic with Antifungals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53: 3256–3265. doi:10.1128/AAC.01497-08.
- Showler, A. T. 2016. Selected Abiotic and Biotic Environmental Stress Factors Affecting Two Economically Important Sugarcane Stalk Boring Pests in the United States. *Agronomy* 6: 1–18. doi:10.3390/agronomy6010010.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

1. Conclusiones

El Phi actúa como un agente fungistático sobre el crecimiento micelial de *Fusarium* sp., y como agente fungicida sobre su conidiogénesis.

Los aislados del género *Trichoderma* sp., muestran compatibilidad a altas concentraciones de Phi en el medio. El aislado Taz-016 presentó una compatibilidad de 96.45 y 95.87% a dosis de 500 y 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Phi, respectivamente, con lo que se demuestra la plasticidad del género *Trichoderma* por sobrevivir a ambientes hostiles.

El uso de bio reguladores como aislados del género *Trichoderma* y su integración con agentes fungicidas como el Phi, aumentan el porcentaje de inhibición del desarrollo de patógenos del suelo como *Fusarium* sp., proveniente de la rizósfera de caña de azúcar.

La aplicación en campo de concentraciones de Phi de 500 a 8000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no presenta fitotoxicidad en al menos tres aplicaciones hasta escorrentía. Sin embargo, la aplicación individual de Phi a dosis mayores a 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ puede causar anomalías sobre el desarrollo morfológicos de las plantas, como la disminución en el diámetro y peso fresco de tallo.

La aplicación de bio reguladores como *Trichoderma* sp., sobre la rizósfera de plántulas de caña de azúcar y su combinación con dosis bajas de Phi (500-2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) mejoran variables morfológicas como número de brotes, peso seco de hoja y volumen, peso fresco y seco de raíz.

2. Recomendaciones

La aplicación de concentraciones altas de Phi en caña de azúcar presenta disminución en algunos parámetros morfológicos de las plántulas, por lo cual se sugiere realizar más investigaciones enfocadas en interacciones bioquímicas y moleculares que intervengan en el desarrollo y absorción de este compuesto.

La integración de un agente bio regulador como *Trichoderma* sp., presenta efectos positivos en algunos parámetros de la morfología y el índice de clorofila de plántulas de caña de azúcar, por lo cual se sugiere la combinación de aislados de *Trichoderma* a concentraciones bajas de Phi, provenientes del ácido fosforoso de entre 500 y 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

ANEXOS

ANALISIS ESTADÍSTICOS

A1. Efecto de Phi sobre el desarrollo de *Fusarium* sp., *in vitro*

Model Information	
Data Set	WORK.INHI
Response Variable	Por
Response Distribution	Gaussian
Link Function	Identity
Variance Function	Default
Variance Matrix	Not blocked
Estimation Technique	Restricted Maximum Likelihood
Degrees of Freedom Method	Satterthwaite

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Bio	2	1 2
Dia	7	1 2 3 4 5 6 7
Con	6	0 500 1000 2000 4000 8000
Rep	4	1 2 3 4

Number of Observations Read	28 8
Number of Observations Used	28 8

Dimensions	
G-side Cov. Parameters	1
R-side Cov. Parameters	1
Columns in X	56
Columns in Z	8
Subjects (Blocks in V)	1
Max Obs per Subject	288

Optimization Information	
Optimization Technique	Dual Quasi-Newton
Parameters in Optimization	1
Lower Boundaries	0
Upper Boundaries	0
Fixed Effects	Profiled
Residual Variance	Profiled
Starting From	Data

Iteration History					
Iteration	Restarts	Evaluations	Objective Function	Change	Max Gradient
0	0	4	1786.6027542	.	19.45308
1	0	5	1786.5866011	0.01615314	3.572554
2	0	2	1786.586134	0.00046707	0.568905
3	0	2	1786.5861224	0.00001169	0.013804
4	0	2	1786.5861223	0.00000001	0.000052

Convergence criterion (GCONV=1E-8)
satisfied.

Estimated G matrix is not positive definite.

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	1786.59
AIC (smaller is better)	1790.59
AICC (smaller is better)	1790.64
BIC (smaller is better)	1790.75
CAIC (smaller is better)	1792.75
HQIC (smaller is better)	1789.51
Generalized Chi-Square	15057.28
Gener. Chi-Square / DF	61.21

Covariance Parameter Estimates		
Cov Parm	Estimate	Standard Error
Rep(Bio)	-0.5510	0.7492
Residual	61.2084	5.6240

Type III Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Con	5	236.9	642.58	<.0001
Dia	6	178.6	45.57	<.0001
Dia*Con	30	236.9	4.85	<.0001

Con Least Squares Means					
Con	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
0	2.0629	1.1560	185.8	1.78	0.0760
500	25.9549	1.1560	185.8	22.45	<.0001
1000	27.4903	1.1560	185.8	23.78	<.0001
2000	44.3310	1.1560	185.8	38.35	<.0001
4000	72.4238	1.1560	185.8	62.65	<.0001
8000	81.0043	1.1560	185.8	70.07	<.0001

T Grouping for Con Least Squares Means (Alpha=0.05)		
LS-means with the same letter are not significantly different.		
Con	Estimate	
8000	81.0043	A
4000	72.4238	B
2000	44.3310	C
1000	27.4903	D
		D
500	25.9549	D
0	2.0629	E

Dia Least Squares Means					
Dia	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
1	55.8192	1.0983	172.6	50.82	<.0001
2	47.6977	1.0983	172.6	43.43	<.0001
3	43.8900	1.5450	118.6	28.41	<.0001
4	42.5064	1.0983	172.6	38.70	<.0001
5	36.1160	1.5450	118.6	23.38	<.0001
6	35.3759	1.0983	172.6	32.21	<.0001
7	34.0733	1.0983	172.6	31.02	<.0001

T Grouping for Dia Least Squares Means (Alpha=0.05)		
LS-means with the same letter are not significantly different.		
Dia	Estimate	
1	55.8192	A
2	47.6977	B
3	43.8900	C
		C
4	42.5064	C
5	36.1160	D
		D
6	35.3759	D

T Grouping for Dia Least Squares Means (Alpha=0.05)		
LS-means with the same letter are not significantly different.		
Dia	Estimate	
		D
7	34.0733	D

Dia*Con Least Squares Means						
Dia	Con	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
1	0	3.1015	2.7536	245.1	1.13	0.2611
1	500	30.6391	2.7536	245.1	11.13	<.0001
1	1000	35.3853	2.7536	245.1	12.85	<.0001
1	2000	65.7895	2.7536	245.1	23.89	<.0001
1	4000	100.00	2.7536	245.1	36.32	<.0001
1	8000	100.00	2.7536	245.1	36.32	<.0001
2	0	1.5621	2.7536	245.1	0.57	0.5710
2	500	39.7636	2.7536	245.1	14.44	<.0001
2	1000	41.2528	2.7536	245.1	14.98	<.0001
2	2000	54.0919	2.7536	245.1	19.64	<.0001
2	4000	71.4428	2.7536	245.1	25.95	<.0001
2	8000	78.0734	2.7536	245.1	28.35	<.0001
3	0	5.0724	3.8909	246	1.30	0.1936
3	500	29.4313	3.8909	246	7.56	<.0001
3	1000	28.1493	3.8909	246	7.23	<.0001
3	2000	42.2518	3.8909	246	10.86	<.0001
3	4000	77.2946	3.8909	246	19.87	<.0001

Dia*Con Least Squares Means						
Dia	Con	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
3	8000	81.1407	3.8909	246	20.85	<.0001
4	0	1.1803	2.7536	245.1	0.43	0.6685
4	500	23.7529	2.7536	245.1	8.63	<.0001
4	1000	29.8257	2.7536	245.1	10.83	<.0001
4	2000	44.8323	2.7536	245.1	16.28	<.0001
4	4000	75.8884	2.7536	245.1	27.56	<.0001
4	8000	79.5587	2.7536	245.1	28.89	<.0001
5	0	0.7967	3.8909	246	0.20	0.8379
5	500	20.4229	3.8909	246	5.25	<.0001
5	1000	21.3575	3.8909	246	5.49	<.0001
5	2000	37.4790	3.8909	246	9.63	<.0001
5	4000	61.3107	3.8909	246	15.76	<.0001
5	8000	75.3294	3.8909	246	19.36	<.0001
6	0	1.3175	2.7536	245.1	0.48	0.6328
6	500	19.1963	2.7536	245.1	6.97	<.0001
6	1000	18.4874	2.7536	245.1	6.71	<.0001
6	2000	34.6594	2.7536	245.1	12.59	<.0001
6	4000	60.9254	2.7536	245.1	22.13	<.0001
6	8000	77.6692	2.7536	245.1	28.21	<.0001
7	0	1.4101	2.7536	245.1	0.51	0.6090
7	500	18.4782	2.7536	245.1	6.71	<.0001
7	1000	17.9742	2.7536	245.1	6.53	<.0001
7	2000	31.2134	2.7536	245.1	11.34	<.0001
7	4000	60.1050	2.7536	245.1	21.83	<.0001
7	8000	75.2589	2.7536	245.1	27.33	<.0001

T Grouping for Dia*Con Least Squares Means (Alpha=0.05)						
LS-means with the same letter are not significantly different.						
Dia	Con	Estimate				
1	4000	100.00				A
						A
1	8000	100.00				A
3	8000	81.1407				B
						B
4	8000	79.5587				B
						B
2	8000	78.0734	C			B
			C			B
6	8000	77.6692	C			B
			C			B
3	4000	77.2946	C			B
			C			B
4	4000	75.8884	C			B
			C			B
5	8000	75.3294	C			B
			C			B
7	8000	75.2589	C			B
			C			
2	4000	71.4428	C			D
						D
1	2000	65.7895	E			D
			E			
5	4000	61.3107	E			F
			E			F

T Grouping for Dia*Con Least Squares Means (Alpha=0.05)						
LS-means with the same letter are not significantly different.						
Dia	Con	Estimate				
6	4000	60.9254	E	F		
			E	F		
7	4000	60.1050	E	F		
				F		
2	2000	54.0919		F		
4	2000	44.8323		G		
				G		
3	2000	42.2518	H	G		
			H	G		
2	1000	41.2528	H	G		
			H	G		
2	500	39.7636	H	G		
			H	G		
5	2000	37.4790	H	G	I	
			H		I	
1	1000	35.3853	H		I	
			H		I	
6	2000	34.6594	H		I	
					I	
7	2000	31.2134		J	I	
				J	I	
1	500	30.6391	K	J	I	
			K	J	I	
4	1000	29.8257	K	L	J	I
			K	L	J	I

T Grouping for Dia*Con Least Squares Means (Alpha=0.05)							
LS-means with the same letter are not significantly different.							
Dia	Con	Estimate					
3	500	29.4313		K	L	J	I
				K	L	J	I
3	1000	28.1493	M	K	L	J	I
			M	K	L	J	
4	500	23.7529	M	K	L	J	N
			M	K	L		N
5	1000	21.3575	M	K	L		N
			M		L		N
5	500	20.4229	M		L		N
			M				N
6	500	19.1963	M				N
							N
6	1000	18.4874					N
							N
7	500	18.4782					N
							N
7	1000	17.9742					N
3	0	5.0724				O	
						O	
1	0	3.1015				O	
						O	
2	0	1.5621				O	
						O	
7	0	1.4101				O	
						O	

T Grouping for Dia*Con Least Squares Means (Alpha=0.05)						
LS-means with the same letter are not significantly different.						
Dia	Con	Estimate				
6	0	1.3175				0
						0
4	0	1.1803				0
						0
5	0	0.7967				0

A2. Compatibilidad de aislados de *Trichoderma* sp. con Phi

Model Information	
Data Set	WORK.TRICHO
Response Variable	Esporas
Response Distribution	Negative Binomial
Link Function	Log
Variance Function	Default
Variance Matrix	Not blocked
Estimation Technique	Maximum Likelihood
Likelihood Approximation	Laplace
Degrees of Freedom Method	Containment

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Cepas	3	C1 C2 C3
Conc	6	0 500 1000 2000 4000 8000
rep	2	1 2
Conc1	6	Co1 Co2 Co3 Co4 Co5 Co6

Number of Observations Read	3 6
Number of Observations Used	3 6

Dimensions	
G-side Cov. Parameters	1
R-side Cov. Parameters	1
Columns in X	28
Columns in Z	2
Subjects (Blocks in V)	1
Max Obs per Subject	36

Optimization Information	
Optimization Technique	Dual Quasi-Newton
Parameters in Optimization	20
Lower Boundaries	0
Upper Boundaries	0
Fixed Effects	Not Profiled
Starting From	GLM estimates

Iteration History					
Iteration	Restarts	Evaluations	Objective Function	Change	Max Gradient
0	0	4	1401.2490408	.	1760.147
1	0	48	1401.2278454	0.02119538	1826.86
2	0	41	1401.2278454	0.00000000	1826.86

Convergence criterion (FCNV=2.220446E-16) satisfied.

Estimated G matrix is not positive definite.

Fit Statistics	
-2 Log Likelihood	1401.23
AIC (smaller is better)	1441.23
AICC (smaller is better)	1497.23
BIC (smaller is better)	1415.09
CAIC (smaller is better)	1435.09
HQIC (smaller is better)	1386.57

Fit Statistics for Conditional Distribution	
-2 log L(Esporas r. effects)	1401.23
Pearson Chi-Square	35.31
Pearson Chi-Square / DF	0.98

Covariance Parameter Estimates		
Cov Parm	Estimate	Standard Error
Rep	-0.02295	.
Scale	0.01962	0.004596

Type III Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Cepas	2	17	50.38	<.0001
Conc1	5	17	673.87	<.0001
Cepas*Conc1	10	17	80.02	<.0001

Cepas Least Squares Means							
Cepas	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Mean	Standard Error Mean
C1	20.2641	0.04043	17	501.18	<.0001	6.3184E8	25546942
C2	20.0755	0.04043	17	496.59	<.0001	5.232E8	21151469
C3	19.7004	0.04043	17	487.26	<.0001	3.5955E8	14537017

T Grouping for Cepas Least Squares Means (Alpha=0.05)		
LS-means with the same letter are not significantly different.		
Cepas	Estimate	
C1	20.2641	A
C2	20.0755	B
C3	19.7004	C

Conc1 Least Squares Means							
Conc1	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Mean	Standard Error Mean
Co1	21.0815	0.05718	17	368.67	<.0001	1.4308E9	81817277
Co2	20.7145	0.05717	17	362.31	<.0001	9.9128E8	56674133
Co3	20.6532	0.05718	17	361.22	<.0001	9.3232E8	53306816
Co4	20.3626	0.05716	17	356.21	<.0001	6.9718E8	39853946

Conc1 Least Squares Means							
Conc1	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Mean	Standard Error Mean
Co5	20.2229	0.05718	17	353.67	<.0001	6.0631E8	34669451
Co6	17.0454	0.05718	17	298.09	<.0001	25275744	1445337

T Grouping for Conc1 Least Squares Means (Alpha=0.05)		
LS-means with the same letter are not significantly different.		
Conc1	Estimate	
Co1	21.0815	A
Co2	20.7145	B
		B
Co3	20.6532	B
Co4	20.3626	C
		C
Co5	20.2229	C
Co6	17.0454	D

Cepas*Conc1 Least Squares Means								
Cepas	Conc1	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Mean	Standard Error Mean
C1	Co1	21.1738	0.09904	17	213.80	<.0001	1.5692E9	1.5541E8
C1	Co2	20.7864	0.09904	17	209.87	<.0001	1.0652E9	1.055E8
C1	Co3	20.6113	0.09902	17	208.16	<.0001	8.9404E8	88525615
C1	Co4	20.3799	0.09908	17	205.69	<.0001	7.094E8	70288041
C1	Co5	20.0463	0.09904	17	202.41	<.0001	5.0815E8	50326765
C1	Co6	18.5871	0.09903	17	187.70	<.0001	1.1811E8	11695811
C2	Co1	21.2247	0.09906	17	214.25	<.0001	1.6511E9	1.6356E8
C2	Co2	20.5472	0.09895	17	207.65	<.0001	8.386E8	82981850
C2	Co3	20.5445	0.09904	17	207.44	<.0001	8.363E8	82824815
C2	Co4	20.2535	0.09910	17	204.38	<.0001	6.2513E8	61947010
C2	Co5	20.0427	0.09904	17	202.37	<.0001	5.0631E8	50145671
C2	Co6	17.8404	0.09896	17	180.29	<.0001	55971979	5538763
C3	Co1	20.8460	0.09903	17	210.50	<.0001	1.1305E9	
C3	Co2	20.8098	0.09908	17	210.02	<.0001	1.0904E9	1.0804E8
C3	Co3	20.8038	0.09904	17	210.05	<.0001	1.0839E9	1.0735E8
C3	Co4	20.4543	0.09886	17	206.90	<.0001	7.6415E8	75544528
C3	Co5	20.5798	0.09904	17	207.79	<.0001	8.6632E8	85798868
C3	Co6	14.7086	0.09914	17	148.35	<.0001	2442683	242180

T Grouping for Cepas*Conc1 Least Squares Means (Alpha=0.05)				
LS-means with the same letter are not significantly different.				
Cepas	Conc1	Estimate		
C2	Co1	21.2247	A	
			A	
C1	Co1	21.1738	A	

T Grouping for Cepas*Conc1 Least Squares Means (Alpha=0.05)					
LS-means with the same letter are not significantly different.					
Cepas	Conc1	Estimate			
C3	Co1	20.8460		B	
				B	
C3	Co2	20.8098	C	B	
			C	B	
C3	Co3	20.8038	C	B	
			C	B	
C1	Co2	20.7864	C	B	
			C	B	
C1	Co3	20.6113	C	B	D
			C	B	D
C3	Co5	20.5798	C	B	D
			C		D
C2	Co2	20.5472	C	E	D
			C	E	D
C2	Co3	20.5445	C	E	D
				E	D
C3	Co4	20.4543		E	D
				E	D
C1	Co4	20.3799		E	D
				E	
C2	Co4	20.2535	F	E	
			F		
C1	Co5	20.0463	F		
			F		
C2	Co5	20.0427	F		

T Grouping for Cepas*Conc1 Least Squares Means (Alpha=0.05)				
LS-means with the same letter are not significantly different.				
Cepas	Conc1	Estimate		
C1	Co6	18.5871	G	
C2	Co6	17.8404	H	
C3	Co6	14.7086	I	

A3. Antagonismo de aislados de *Trichoderma s.*, contra *Fusarium sp.* *in vitro*

Model Information	
Data Set	WORK.CONFRONTACION
Response Variable	Pct
Response Distribution	Beta
Link Function	Logit
Variance Function	Default
Variance Matrix Blocked By	BIO
Estimation Technique	Maximum Likelihood
Likelihood Approximation	Laplace
Degrees of Freedom Method	Containment

Class Level Information		
Class	Levels	Values
BIO	2	1 2
ANT	4	CFM1 CFM13 CFM16 CFSN

Number of Observations Read	3
	2
Number of Observations Used	3
	2

Dimensions	
G-side Cov. Parameters	1
R-side Cov. Parameters	1
Columns in X	5
Columns in Z per Subject	1

Dimensions	
Subjects (Blocks in V)	2
Max Obs per Subject	16

Optimization Information	
Optimization Technique	Dual Quasi-Newton
Parameters in Optimization	6
Lower Boundaries	0
Upper Boundaries	0
Fixed Effects	Not Profiled
Starting From	GLM estimates

Iteration History					
Iteration	Restarts	Evaluations	Objective Function	Change	Max Gradient
0	0	4	-67.23019998	.	100.6991
1	0	3	-80.8070439	13.57684392	25009.93
2	0	41	-80.8070439	0.00000000	25009.93
3	0	41	-80.8070439	-0.00000000	25009.93

Convergence criterion (FCONV=2.220446E-16)
satisfied.

Estimated G matrix is not positive definite.

Fit Statistics	
-2 Log Likelihood	-80.81
AIC (smaller is better)	-68.81
AICC (smaller is better)	-65.45
BIC (smaller is better)	-76.65
CAIC (smaller is better)	-70.65
HQIC (smaller is better)	-85.21

Fit Statistics for Conditional Distribution	
-2 log L(pct r. effects)	-80.81
Pearson Chi-Square	28.34
Pearson Chi-Square / DF	0.89

Covariance Parameter Estimates			
Cov Parm	Subject	Estimate	Standard Error
Intercept	BIO	-0.08071	.
Scale		204.25	.

Type III Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
ANT	3	27	1428.46	<.0001

ANT Least Squares Means							
ANT	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Mean	Standard Error Mean
CFM1	0.4528	0.05084	27	8.91	<.0001	0.6113	0.01208
CFM13	0.4667	0.05093	27	9.16	<.0001	0.6146	0.01206
CFM16	0.4014	0.05055	27	7.94	<.0001	0.5990	0.01214
CFSN	-4.8964	0.07608	27	-64.36	<.0001	0.007418	0.000560

T Grouping for ANT Least Squares Means (Alpha=0.05)		
LS-means with the same letter are not significantly different.		
ANT	Estimate	
CFM13	0.4667	A
		A
CFM1	0.4528	A
		A
CFM16	0.4014	A
CFSN	-4.8964	B

A4. Compatibilidad de los aislados de *Trichoderma* sp. con Phi contra *Fusarium* sp., *in vitro*

Model Information	
Data Set	WORK.ANTAGONISMO
Response Variable	pct
Response Distribution	Beta
Link Function	Logit
Variance Function	Default
Variance Matrix	Not blocked
Estimation Technique	Residual PL
Degrees of Freedom Method	Containment

Class Level Information		
Class	Levels	Values
hongo	4	FUS FUSM1 FUSM13 FUSM16
rep	4	1 2 3 4
conc	4	0 1000 4000 8000

Number of Observations Read	5 2
Number of Observations Used	5 2

Dimensions	
G-side Cov. Parameters	1
R-side Cov. Parameters	1
Columns in X	14
Columns in Z	4
Subjects (Blocks in V)	1
Max Obs per Subject	52

Optimization Information	
Optimization Technique	Dual Quasi-Newton
Parameters in Optimization	2
Lower Boundaries	0
Upper Boundaries	0
Fixed Effects	Profiled
Starting From	Data

Iteration History					
Iteration	Restarts	Subiterations	Objective Function	Change	Max Gradient
0	0	11	-23.37411441	2.00000000	0.001952
1	0	4	-23.36418888	0.04108399	0.082912
2	0	2	-23.3523875	0.00428341	4.829958
3	0	3	-23.35226324	0.00152028	0.003923
4	0	0	-23.35219072	0.00000000	0.004506
5	0	2	-23.32248249	0.00433218	0.00061
6	0	2	-23.35364965	0.00428783	0.000916
7	0	2	-23.35219288	0.00009691	0.029062
8	0	2	-23.35218918	0.00000914	0.000034
9	0	1	-23.35218874	0.00000015	0.000439
10	0	2	-23.35218873	0.00000178	0.00521
11	0	2	-23.35218882	0.00000126	0.0012
12	0	2	-23.35218876	0.00000111	0.004632
13	1	1	-23.35218881	0.00000007	0.004416
14	0	0	-23.35218881	0.00000000	0.004416
15	0	2	-23.32248188	0.00432910	0.000609

Iteration History					
Iteration	Restarts	Subiterations	Objective Function	Change	Max Gradient
16	0	2	-23.35364741	0.00428757	0.000915
17	0	1	-23.35219083	0.00004287	7.118E-6
18	0	0	-23.35218874	0.00000000	5.549E-6

Convergence criterion (PCONV=1.11022E-8) satisfied.

Fit Statistics	
-2 Res Log Pseudo-Likelihood	-23.35
Generalized Chi-Square	39.00
Gener. Chi-Square / DF	1.00

Covariance Parameter Estimates		
Cov Parm	Estimate	Standard Error
rep	-0.00020	.
Scale	840.82	198.32

Type III Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
conc(hongo)	12	36	287.98	<.0001

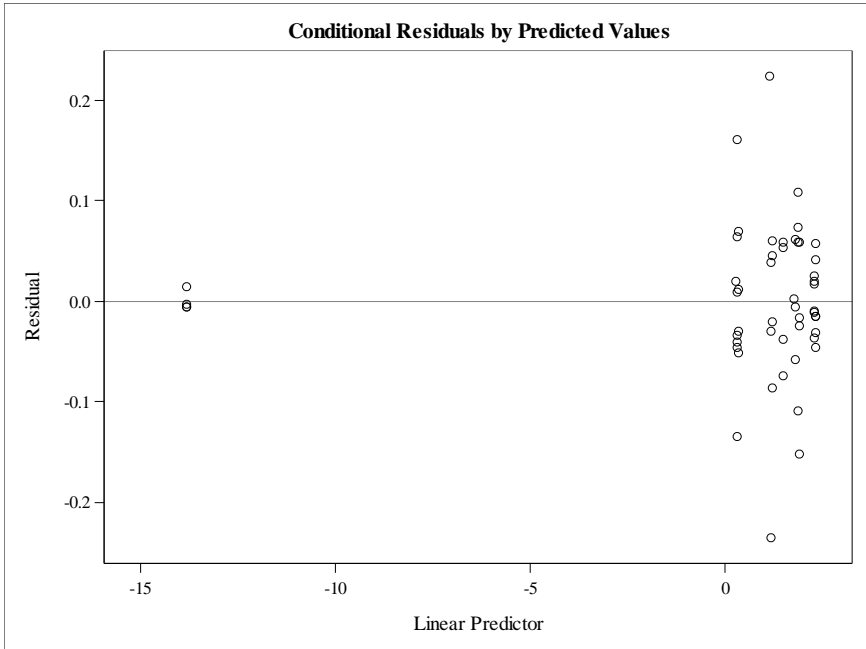
conc(hongo) Least Squares Means								
hongo	conc	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Mean	Standard Error Mean
FUS	0	-13.8155	17.2330	36	-0.80	0.4280	1E-6	0.000017
FUSM1	0	0.2948	0.03410	36	8.64	<.0001	0.5732	0.008344
FUSM1	1000	1.1614	0.03981	36	29.17	<.0001	0.7616	0.007228
FUSM1	4000	1.8727	0.05021	36	37.30	<.0001	0.8668	0.005798
FUSM1	8000	2.2923	0.05927	36	38.68	<.0001	0.9082	0.004939
FUSM13	0	0.3398	0.03423	36	9.93	<.0001	0.5841	0.008315
FUSM13	1000	1.4885	0.04389	36	33.92	<.0001	0.8159	0.006593
FUSM13	4000	1.7858	0.04862	36	36.73	<.0001	0.8564	0.005979
FUSM13	8000	2.2850	0.05909	36	38.67	<.0001	0.9076	0.004954
FUSM16	0	0.3098	0.03414	36	9.07	<.0001	0.5768	0.008335
FUSM16	1000	1.2090	0.04033	36	29.98	<.0001	0.7701	0.007140
FUSM16	4000	1.8754	0.05026	36	37.31	<.0001	0.8671	0.005792
FUSM16	8000	2.3070	0.05963	36	38.69	<.0001	0.9095	0.004910

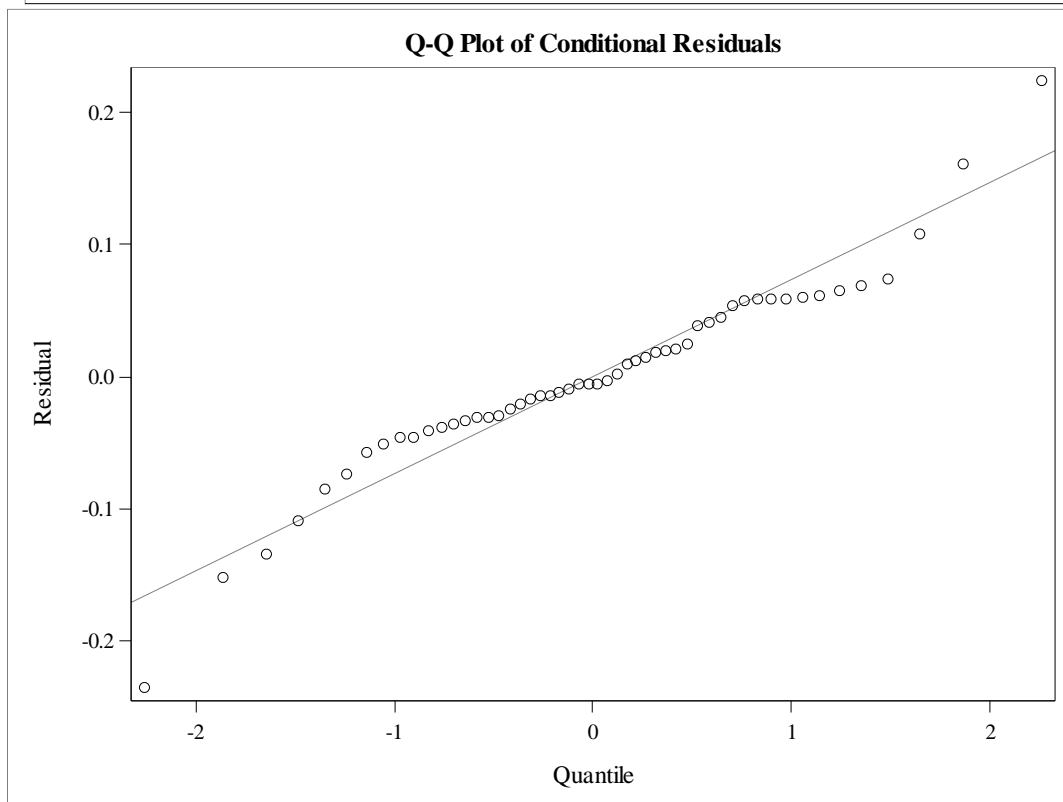
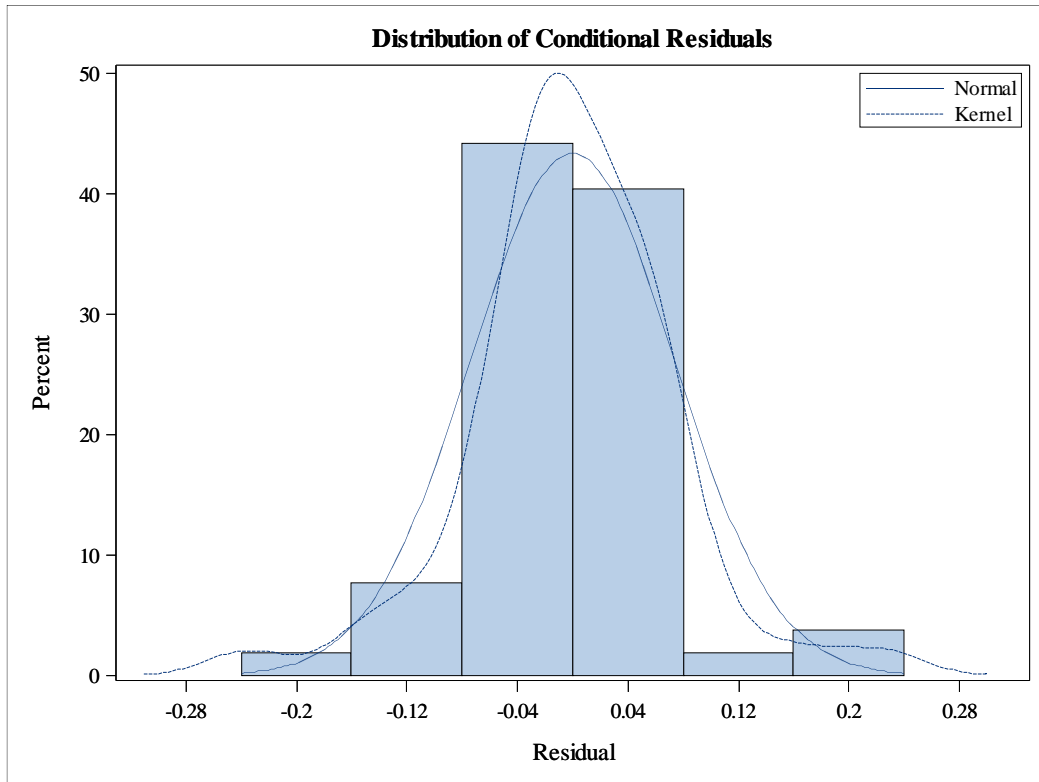
Conservative T Grouping for conc(hongo) Least Squares Means (Alpha=0.05)			
LS-means with the same letter are not significantly different.			
hongo	conc	Estimate	
FUSM16	8000	2.3070	A
			A
FUSM1	8000	2.2923	A
			A
FUSM13	8000	2.2850	A
			A
FUSM16	4000	1.8754	A
			A

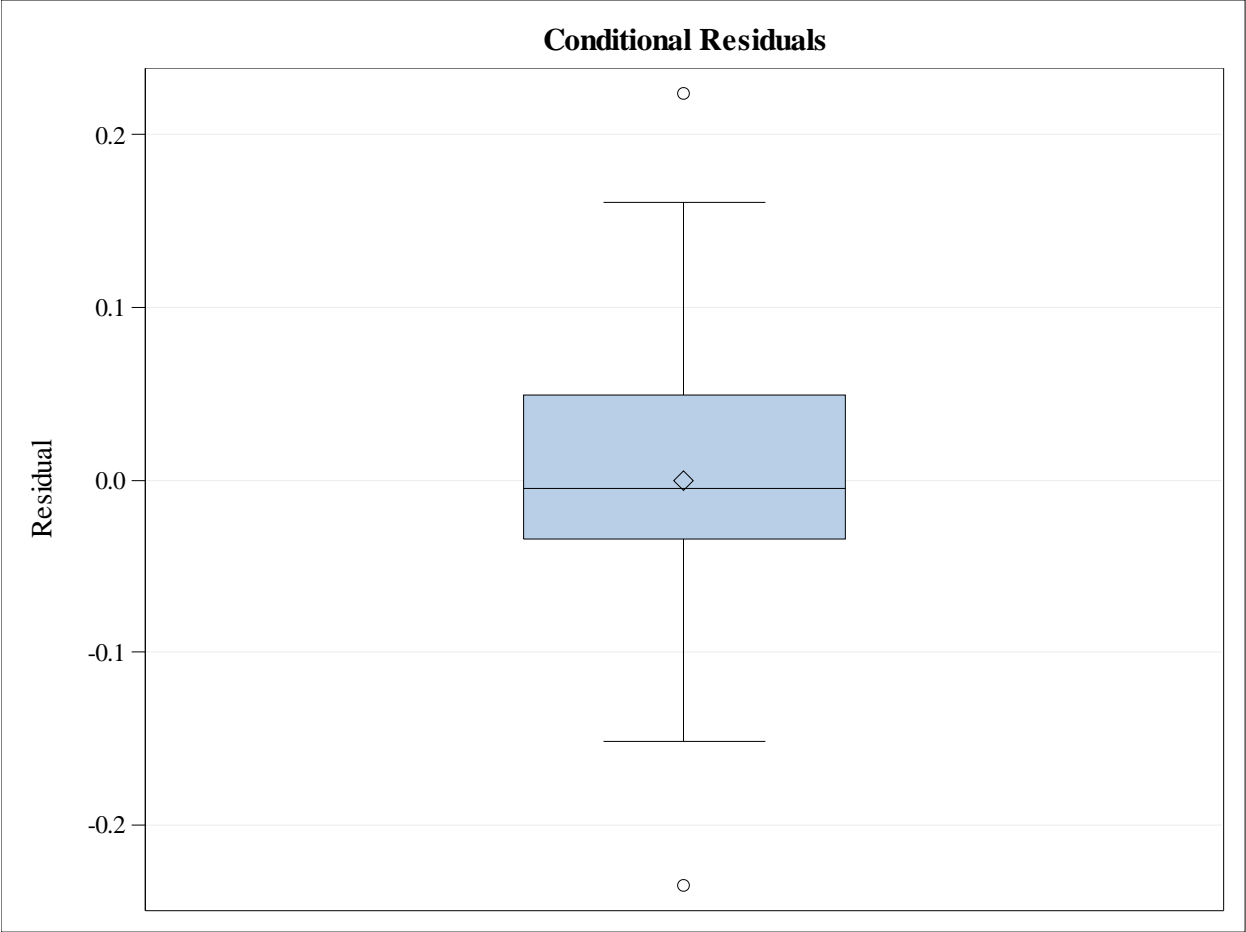
Conservative T Grouping for conc(hongo) Least Squares Means (Alpha=0.05)			
LS-means with the same letter are not significantly different.			
hongo	conc	Estimate	
FUSM1	4000	1.8727	A
			A
FUSM13	4000	1.7858	A
			A
FUSM13	1000	1.4885	A
			A
FUSM16	1000	1.2090	A
			A
FUSM1	1000	1.1614	A
			A
FUSM13	0	0.3398	A
			A
FUSM16	0	0.3098	A
			A
FUSM1	0	0.2948	A
			A

Conservative T Grouping for conc(hongo) Least Squares Means (Alpha=0.05)			
LS-means with the same letter are not significantly different.			
hongo	conc	Estimate	
FUS	0	-13.8155	A

The LINES display does not reflect all significant comparisons. The following additional pairs are significantly different: (8000 FUSM16,4000 FUSM16), (8000 FUSM16,4000 FUSM1), (8000 FUSM16,4000 FUSM13), (8000 FUSM16,1000 FUSM13), (8000 FUSM16,1000 FUSM16), (8000 FUSM16,1000 FUSM1), (8000 FUSM16,0 FUSM13), (8000 FUSM16,0 FUSM16), (8000 FUSM16,0 FUSM1), (8000 FUSM1,4000 FUSM16), (8000 FUSM1,4000 FUSM1), (8000 FUSM1,4000 FUSM13), (8000 FUSM1,1000 FUSM13), (8000 FUSM1,1000 FUSM16)...







Model Information	
Data Set	WORK.ANTAGONISMO
Response Variable	pct
Response Distribution	Gaussian
Link Function	Identity
Variance Function	Default
Variance Matrix	Not blocked
Estimation Technique	Restricted Maximum Likelihood
Degrees of Freedom Method	Containment

Class Level Information		
Class	Levels	Values
hongo	4	FUS FUSM1 FUSM13 FUSM16
rep	4	1 2 3 4
conc	4	0 1000 4000 8000

Number of Observations Read	5
	2
Number of Observations Used	5
	2

Dimensions	
G-side Cov. Parameters	1
R-side Cov. Parameters	1
Columns in X	14
Columns in Z	4
Subjects (Blocks in V)	1
Max Obs per Subject	52

Optimization Information	
Optimization Technique	Dual Quasi-Newton
Parameters in Optimization	1
Lower Boundaries	0
Upper Boundaries	0
Fixed Effects	Profiled
Residual Variance	Profiled
Starting From	Data

Iteration History					
Iteration	Restarts	Evaluations	Objective Function	Change	Max Gradient
0	0	4	-200.7887899	.	1.4E-10

Convergence criterion (ABSGCONV=0.00001) satisfied.

Estimated G matrix is not positive definite.

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	-200.79
AIC (smaller is better)	-196.79
AICC (smaller is better)	-196.46
BIC (smaller is better)	-198.02
CAIC (smaller is better)	-196.02
HQIC (smaller is better)	-199.48
Generalized Chi-Square	0.01
Gener. Chi-Square / DF	0.00

Covariance Parameter Estimates		
Cov Parm	Estimate	Standard Error
rep	-8.5E-6	8.307E-6
Residual	0.000226	0.000053

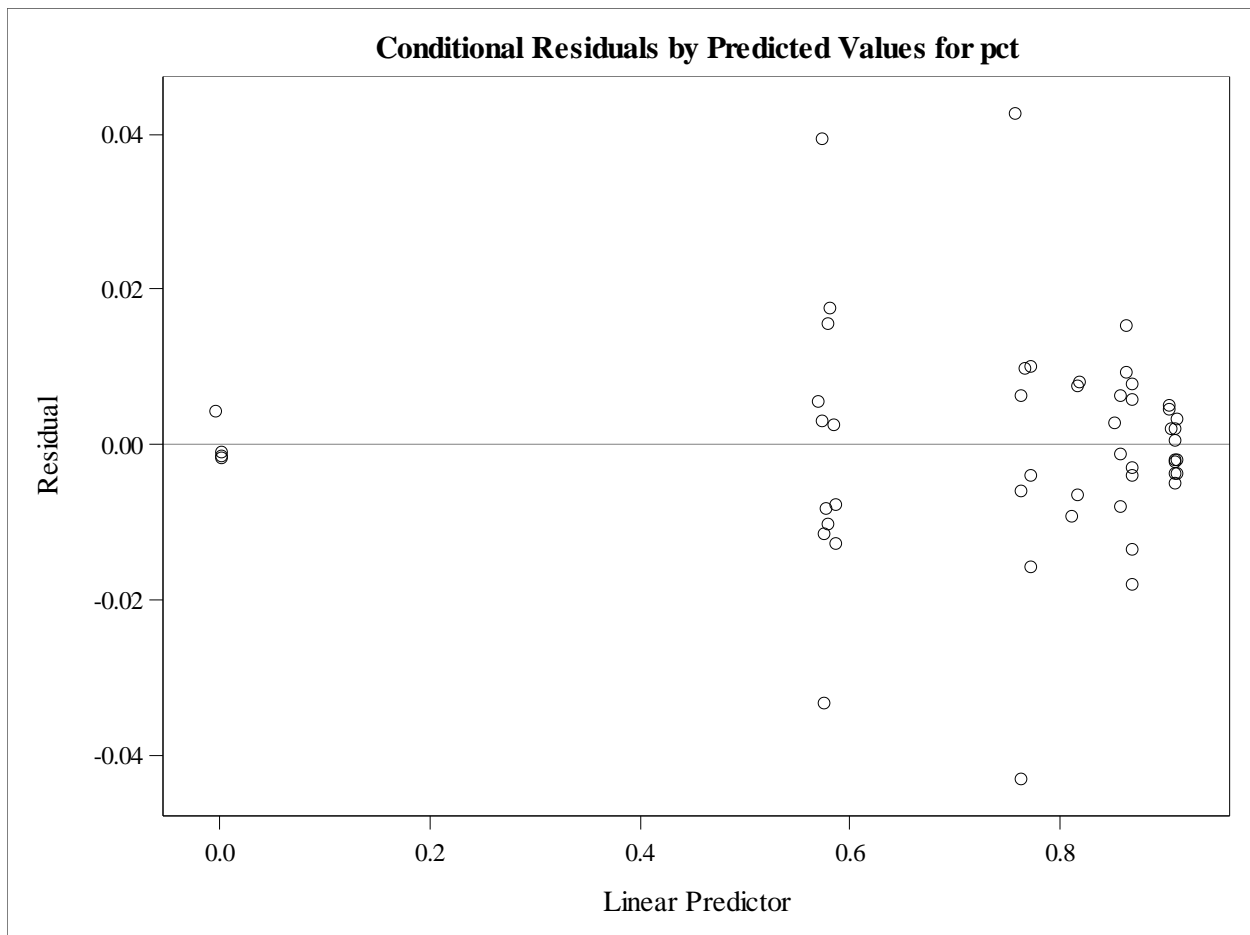
Type III Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
conc(hongo)	12	36	1123.61	<.0001

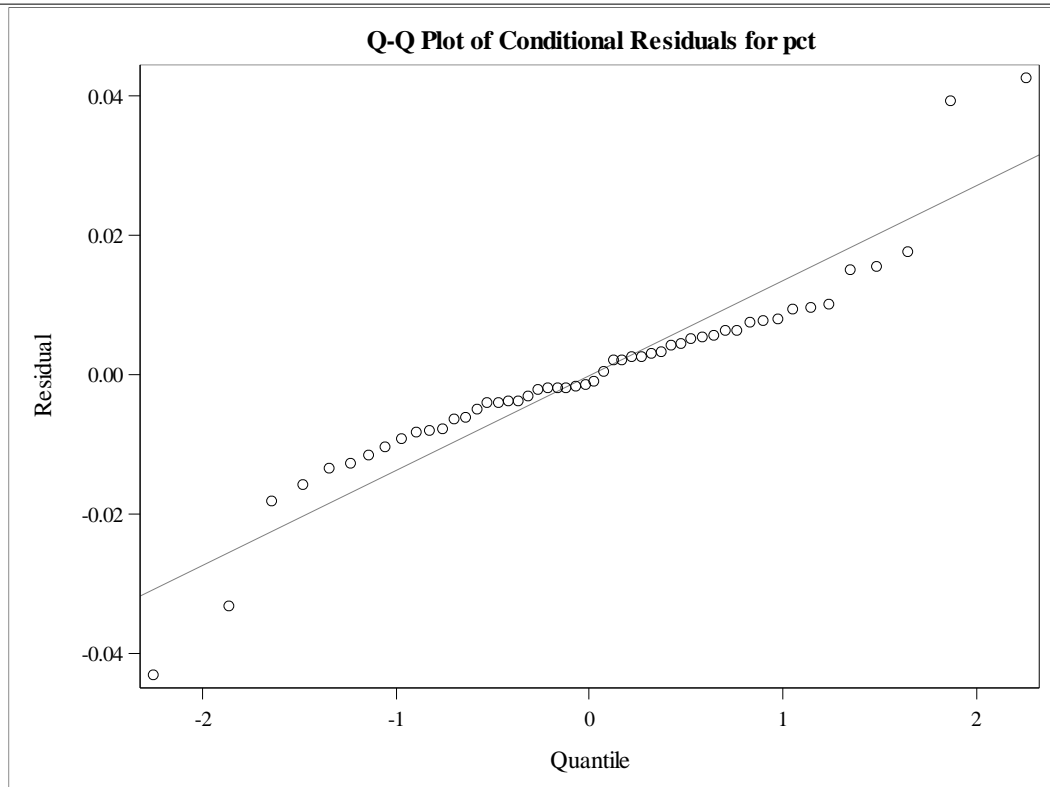
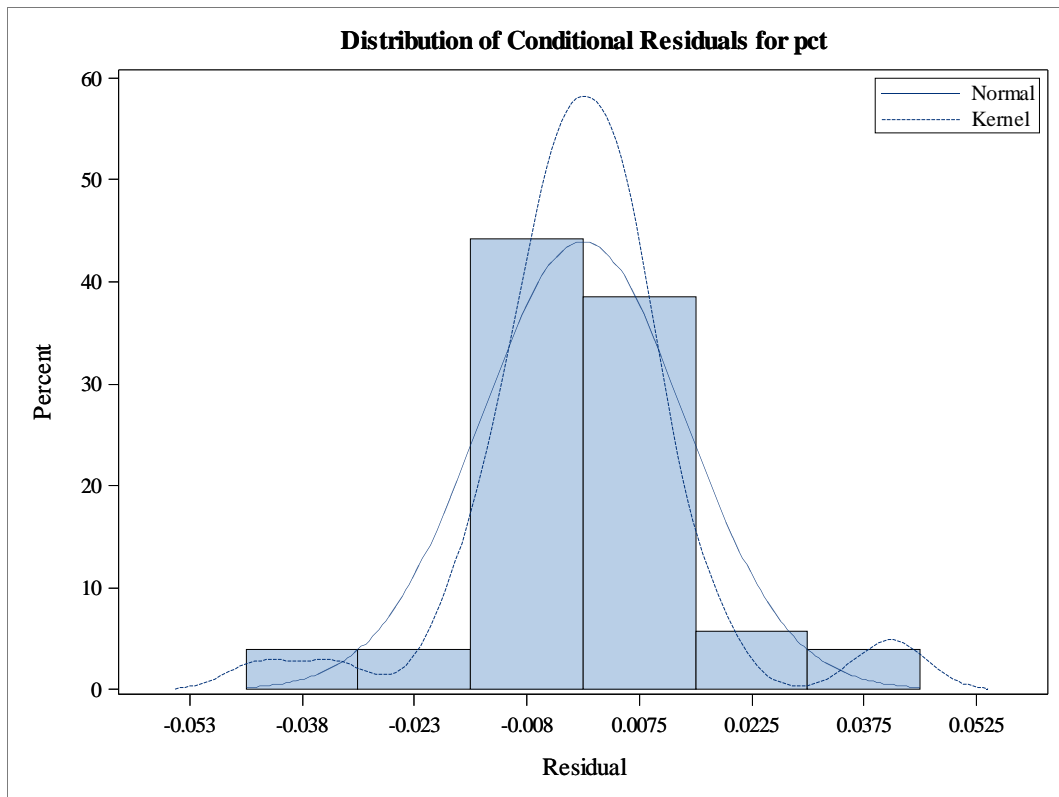
conc(hongo) Least Squares Means						
hongo	conc	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
FUS	0	1E-6	0.007368	36	0.00	0.9999
FUSM1	0	0.5732	0.007368	36	77.80	<.0001
FUSM1	1000	0.7616	0.007368	36	103.37	<.0001
FUSM1	4000	0.8668	0.007368	36	117.65	<.0001
FUSM1	8000	0.9082	0.007368	36	123.27	<.0001
FUSM13	0	0.5841	0.007368	36	79.29	<.0001
FUSM13	1000	0.8159	0.007368	36	110.74	<.0001
FUSM13	4000	0.8564	0.007368	36	116.24	<.0001
FUSM13	8000	0.9076	0.007368	36	123.19	<.0001
FUSM16	0	0.5768	0.007368	36	78.29	<.0001
FUSM16	1000	0.7701	0.007368	36	104.53	<.0001
FUSM16	4000	0.8671	0.007368	36	117.69	<.0001
FUSM16	8000	0.9095	0.007368	36	123.44	<.0001

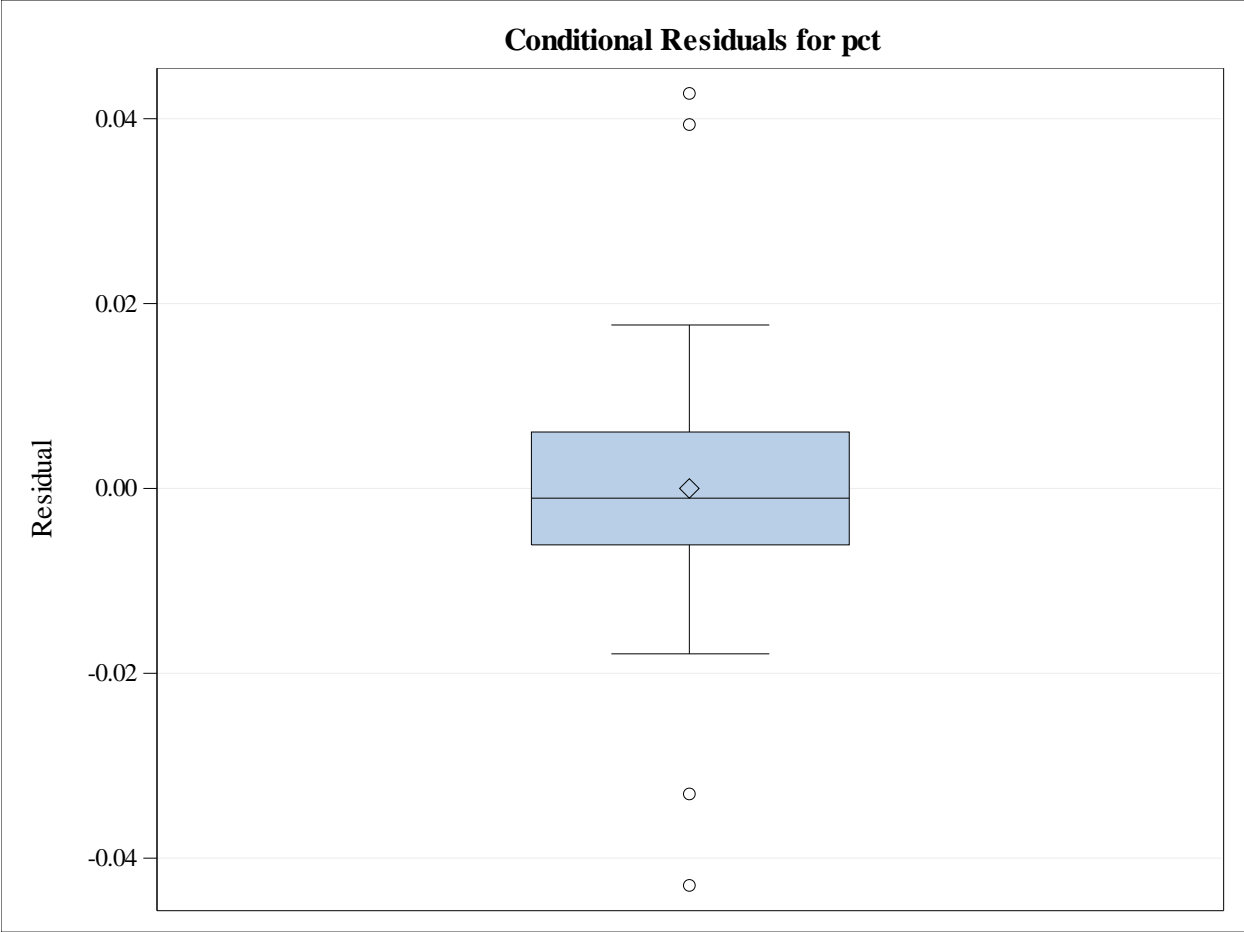
T Grouping for conc(hongo) Least Squares Means (Alpha=0.05)			
LS-means with the same letter are not significantly different.			
hongo	conc	Estimate	
FUSM16	8000	0.9095	A
			A
FUSM1	8000	0.9082	A
			A

T Grouping for conc(hongo) Least Squares Means (Alpha=0.05)			
LS-means with the same letter are not significantly different.			
hongo	conc	Estimate	
FUSM13	8000	0.9076	A
FUSM16	4000	0.8671	B
			B
FUSM1	4000	0.8668	B
			B
FUSM13	4000	0.8564	B
FUSM13	1000	0.8159	<pre> Cproc glimmix data=antagonismo nobound plots(unpack)=residualpanel; class hongo rep conc; model pct = conc(hongo)/dist= beta link=logit; random rep; lsmeans conc(hongo)/lines ilink; run;quit; </pre>
FUSM16	1000	0.7701	D
			D
FUSM1	1000	0.7616	D
FUSM13	0	0.5841	E

T Grouping for conc(hongo) Least Squares Means (Alpha=0.05)			
LS-means with the same letter are not significantly different.			
hongo	conc	Estimate	
			E
FUSM16	0	0.5768	E
			E
FUSM1	0	0.5732	E
FUS	0	1E-6	F







A5. Evaluación de Phi en combinación con *Trichoderma* sp., sobre número de brotes y hojas por planta en ensayo

Model Information	
Data Set	WORK.BIOASSAY
Response Variable	BROT
Response Distribution	Poisson
Link Function	Log
Variance Function	Default
Variance Matrix	Not blocked
Estimation Technique	Maximum Likelihood
Likelihood Approximation	Laplace
Degrees of Freedom Method	Containment

Class Level Information		
Class	Levels	Values
BIO	2	B1 B2
TRAT	12	SINT0 SINT10 SINT20 SINT40 SINT5 SINT80 TRIC0 TRIC10 TRIC20 TRIC40 TRIC5 TRIC80
PLANTA	10	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Number of Observations Read	160
Number of Observations Used	160

Dimensions	
G-side Cov. Parameters	1
Columns in X	13
Columns in Z	24

Dimensions	
Subjects (Blocks in V)	1
Max Obs per Subject	160

Optimization Information	
Optimization Technique	Dual Quasi-Newton
Parameters in Optimization	13
Lower Boundaries	1
Upper Boundaries	0

Fixed Effects	Not Profiled
Starting From	GLM estimates

Iteration History					
Iteration	Restarts	Evaluations	Objective Function	Change	Max Gradient
0	0	4	735.18922241	.	18.06155
1	0	5	735.00764874	0.18157367	43.86675
2	0	2	734.70367818	0.30397056	16.38243
3	0	2	734.62264274	0.08103543	4.11342
4	0	4	734.60319029	0.01945245	4.485669
5	0	4	734.54869971	0.05449057	5.536205
6	0	2	734.52705064	0.02164908	3.592159
7	0	2	734.51395424	0.01309640	1.720902
8	0	3	734.50894394	0.00501029	0.111501
9	0	2	734.50882272	0.00012122	0.967273
10	0	4	734.50815989	0.00066284	0.457529
11	0	4	734.50395907	0.00420081	0.211057

Iteration History					
Iteration	Restarts	Evaluations	Objective Function	Change	Max Gradient
12	0	2	734.50340849	0.00055058	0.539677
13	0	4	734.50151008	0.00189841	0.433669
14	0	3	734.50129883	0.00021125	0.018505
15	0	3	734.5012985	0.00000034	0.009613

Convergence criterion (GCONV=1E-8) satisfied.

Fit Statistics	
-2 Log Likelihood	734.50
AIC (smaller is better)	760.50
AICC (smaller is better)	762.99
BIC (smaller is better)	775.82
CAIC (smaller is better)	788.82
HQIC (smaller is better)	764.56

Fit Statistics for Conditional Distribution	
-2 log L(BROT r. effects)	672.72
Pearson Chi-Square	61.26
Pearson Chi-Square / DF	0.38

Covariance Parameter Estimates		
Cov Parm	Estimate	Standard Error
TRAT(BIO)	0.09764	0.03484

Type III Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TRAT	11	12	0.10	0.9998

TRAT Least Squares Means							
TRAT	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Mean	Standard Error Mean
SINT0	1.8739	0.2385	12	7.86	<.0001	6.5135	1.5532
SINT10	1.9207	0.2489	12	7.72	<.0001	6.8254	1.6989
SINT20	1.9803	0.2464	12	8.04	<.0001	7.2450	1.7850
SINT40	2.0517	0.2448	12	8.38	<.0001	7.7810	1.9046
SINT5	1.9610	0.2472	12	7.93	<.0001	7.1067	1.7569
SINT80	2.0759	0.2443	12	8.50	<.0001	7.9715	1.9478
TRIC0	1.9677	0.2367	12	8.31	<.0001	7.1544	1.6937
TRIC10	2.0178	0.2450	12	8.23	<.0001	7.5218	1.8431
TRIC20	2.1595	0.2417	12	8.93	<.0001	8.6665	2.0950
TRIC40	1.9976	0.2453	12	8.14	<.0001	7.3717	1.8082
TRIC5	2.0492	0.2442	12	8.39	<.0001	7.7617	1.8952
TRIC80	1.9823	0.2457	12	8.07	<.0001	7.2594	1.7837

T Grouping for TRAT Least Squares Means (Alpha=0.05)		
LS-means with the same letter are not significantly different.		
TRAT	Estimate	
TRIC20	2.1595	A
		A
SINT80	2.0759	A
		A
SINT40	2.0517	A
		A
TRIC5	2.0492	A
		A
TRIC10	2.0178	A
		A
TRIC40	1.9976	A
		A
TRIC80	1.9823	A
		A
SINT20	1.9803	A
		A
TRIC0	1.9677	A
		A
SINT5	1.9610	A
		A
SINT10	1.9207	A
		A
SINT0	1.8739	A

Model Information	
Data Set	WORK.BIOASSAY
Response Variable	NHOJAS
Response Distribution	Poisson
Link Function	Log
Variance Function	Default
Variance Matrix	Not blocked
Estimation Technique	Maximum Likelihood
Likelihood Approximation	Laplace
Degrees of Freedom Method	Containment

Class Level Information		
Class	Levels	Values
BIO	2	B1 B2
TRAT	12	SINT0 SINT10 SINT20 SINT40 SINT5 SINT80 TRIC0 TRIC10 TRIC20 TRIC40 TRIC5 TRIC80
PLANTA	10	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Number of Observations Read	16 0
Number of Observations Used	16 0

Dimensions	
G-side Cov. Parameters	1
Columns in X	13
Columns in Z	24
Subjects (Blocks in V)	1
Max Obs per Subject	160

Optimization Information	
Optimization Technique	Dual Quasi-Newton
Parameters in Optimization	13
Lower Boundaries	1
Upper Boundaries	0

Fixed Effects	Not Profiled
Starting From	GLM estimates

Iteration History					
Iteration	Restarts	Evaluations	Objective Function	Change	Max Gradient
0	0	4	1029.64027	.	94.2905
1	0	5	1029.4300161	0.21025390	90.29224
2	0	2	1029.3005015	0.12951463	22.04093
3	0	4	1029.2611184	0.03938306	18.70453
4	0	4	1029.1897472	0.07137120	7.31425
5	0	2	1029.1874418	0.00230541	1.264927
6	0	4	1029.1792676	0.00817421	15.30647
7	0	2	1029.1760228	0.00324478	11.71535
8	0	2	1029.1722792	0.00374361	1.811986
9	0	2	1029.1694262	0.00285299	9.111421
10	0	2	1029.1684891	0.00093707	7.090994
11	0	2	1029.1672682	0.00122090	0.280811
12	0	3	1029.1672587	0.00000953	0.141994
13	0	4	1029.1670978	0.00016089	1.166235

Convergence criterion (GCONV=1E-8)
satisfied.

Fit Statistics	
-2 Log Likelihood	1029.17
AIC (smaller is better)	1055.17
AICC (smaller is better)	1057.66
BIC (smaller is better)	1070.48
CAIC (smaller is better)	1083.48
HQIC (smaller is better)	1059.23

Fit Statistics for Conditional Distribution	
-2 log L(NHOJAS r. effects)	966.70
Pearson Chi-Square	149.54
Pearson Chi-Square / DF	0.93

Covariance Parameter Estimates		
Cov Parm	Estimate	Standard Error
TRAT(BIO)	0.02710	0.009439

Type III Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TRAT	11	12	0.23	0.9888

TRAT Least Squares Means							
TRAT	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Mean	Standard Error Mean
SINT0	3.3258	0.1240	12	26.82	<.0001	27.8199	3.4496
SINT10	3.2447	0.1298	12	25.00	<.0001	25.6537	3.3289
SINT20	3.2474	0.1296	12	25.05	<.0001	25.7223	3.3342
SINT40	3.3505	0.1285	12	26.08	<.0001	28.5176	3.6635
SINT5	3.2886	0.1293	12	25.44	<.0001	26.8046	3.4652
SINT80	3.4229	0.1277	12	26.81	<.0001	30.6574	3.9137
TRIC0	3.2995	0.1241	12	26.58	<.0001	27.0996	3.3641
TRIC10	3.2832	0.1292	12	25.41	<.0001	26.6597	3.4450
TRIC20	3.4188	0.1276	12	26.79	<.0001	30.5342	3.8972
TRIC40	3.3430	0.1285	12	26.02	<.0001	28.3034	3.6368
TRIC5	3.2346	0.1298	12	24.93	<.0001	25.3965	3.2953
TRIC80	3.3176	0.1287	12	25.78	<.0001	27.5935	3.5510

T Grouping for TRAT Least Squares Means (Alpha=0.05)		
LS-means with the same letter are not significantly different.		
TRAT	Estimate	
SINT80	3.4229	A
		A
TRIC20	3.4188	A
		A
SINT40	3.3505	A
		A
TRIC40	3.3430	A
		A
SINT0	3.3258	A
		A
TRIC80	3.3176	A
		A
TRIC0	3.2995	A
		A
SINT5	3.2886	A
		A
TRIC10	3.2832	A
		A
SINT20	3.2474	A
		A
SINT10	3.2447	A
		A
TRIC5	3.2346	A

A6. Evaluación de Phi en combinación con el aislado de *Trichoderma* sp., sobre la morfofisiología de plántulas de caña de azúcar

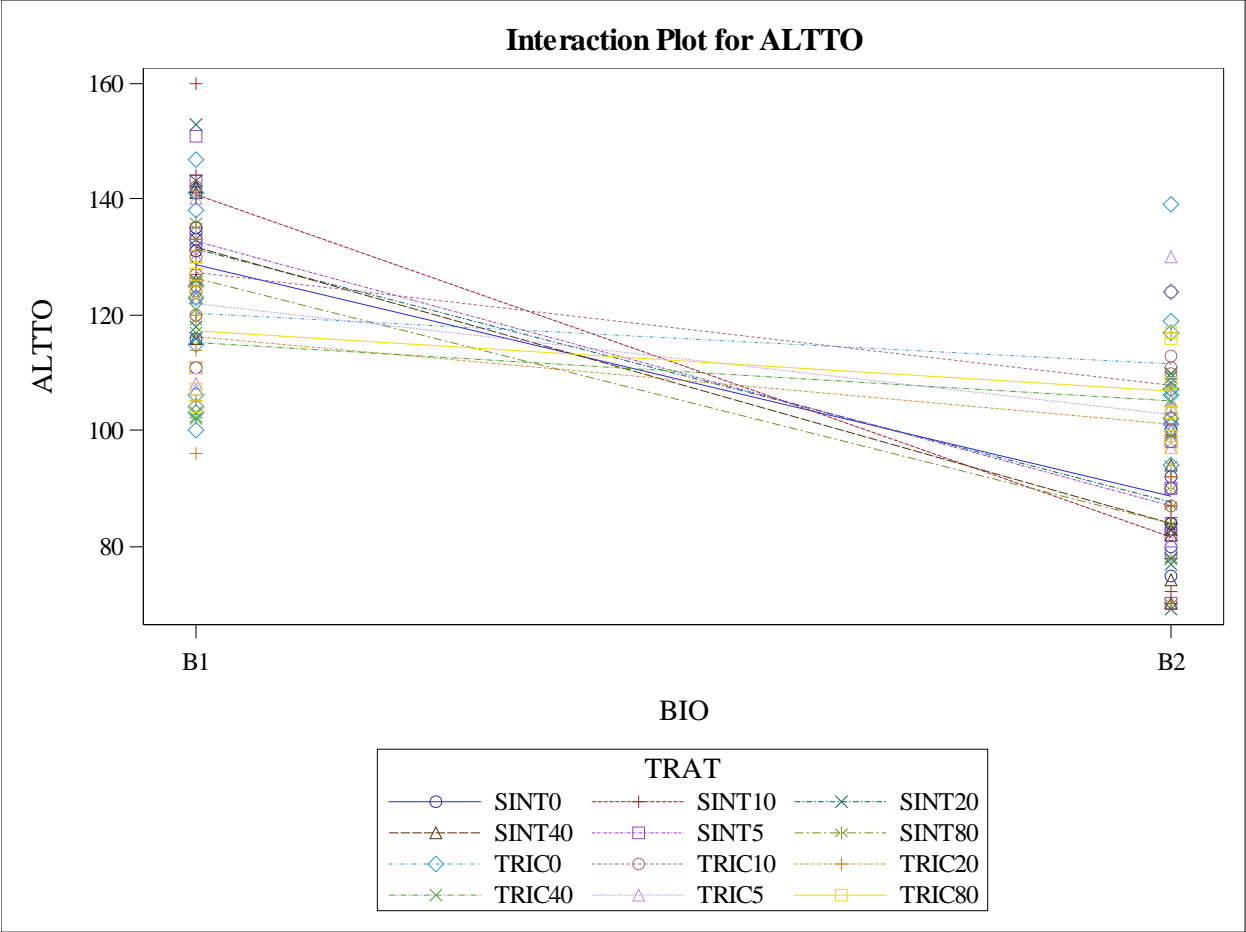
Class Level Information		
Class	Levels	Values
BIO	2	B1 B2
TRAT	12	SINT0 SINT10 SINT20 SINT40 SINT5 SINT80 TRIC0 TRIC10 TRIC20 TRIC40 TRIC5 TRIC80
PLANTA	10	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Number of Observations Read	16 0
Number of Observations Used	16 0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	23	48663.77708	2115.81639	14.34	<.0001
Error	136	20060.96667	147.50711		
Corrected Total	159	68724.74375			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	ALTO Mean
0.708097	10.95339	12.14525	110.8813

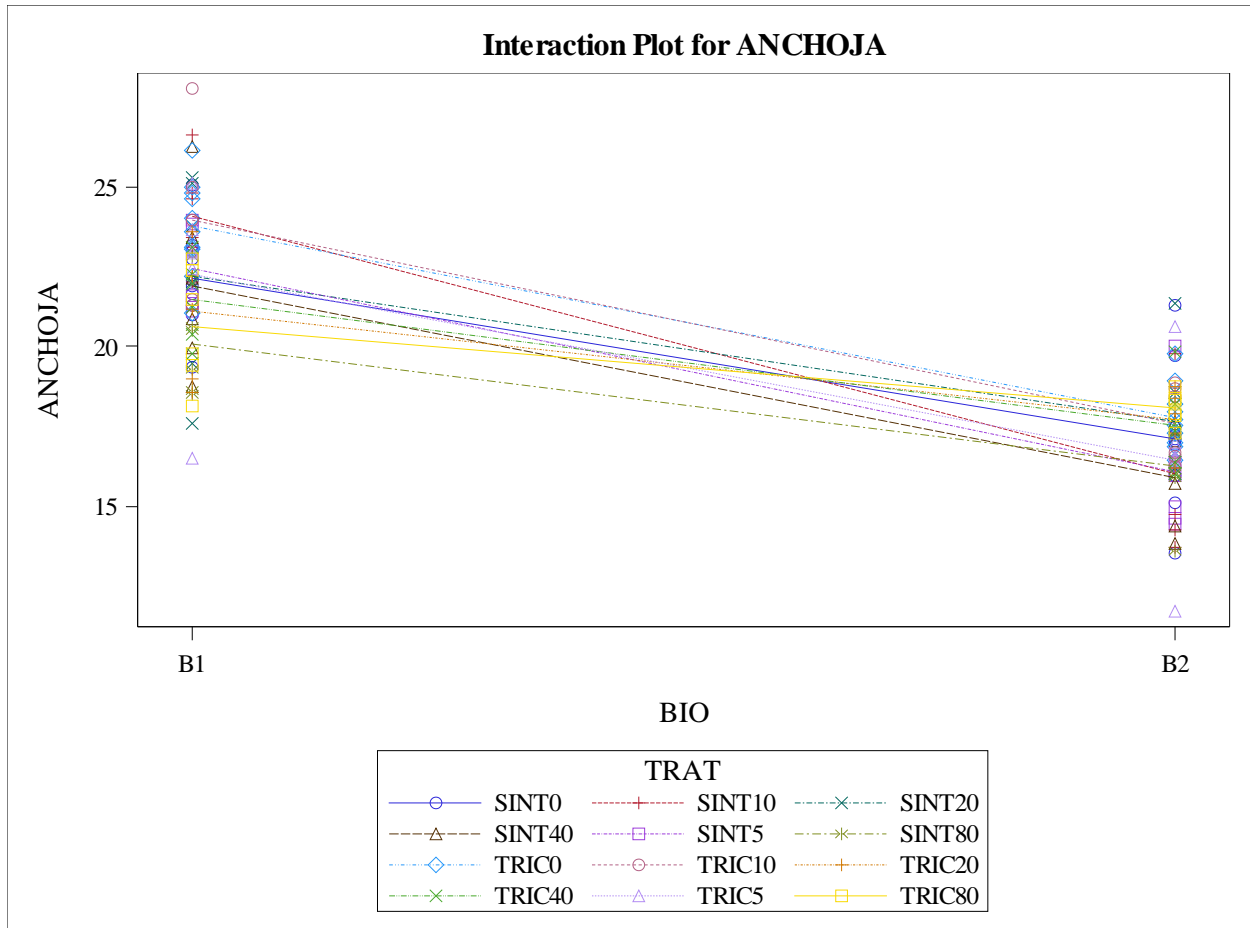
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	11	1822.72708	165.70246	1.12	0.3479
TRAT(BIO)	12	46841.05000	3903.42083	26.46	<.0001



Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	23	1251.237475	54.401629	15.16	<.0001
Error	136	488.182391	3.589576		
Corrected Total	159	1739.419866			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	ANCHOJA Mean
0.719342	9.636610	1.894618	19.66063

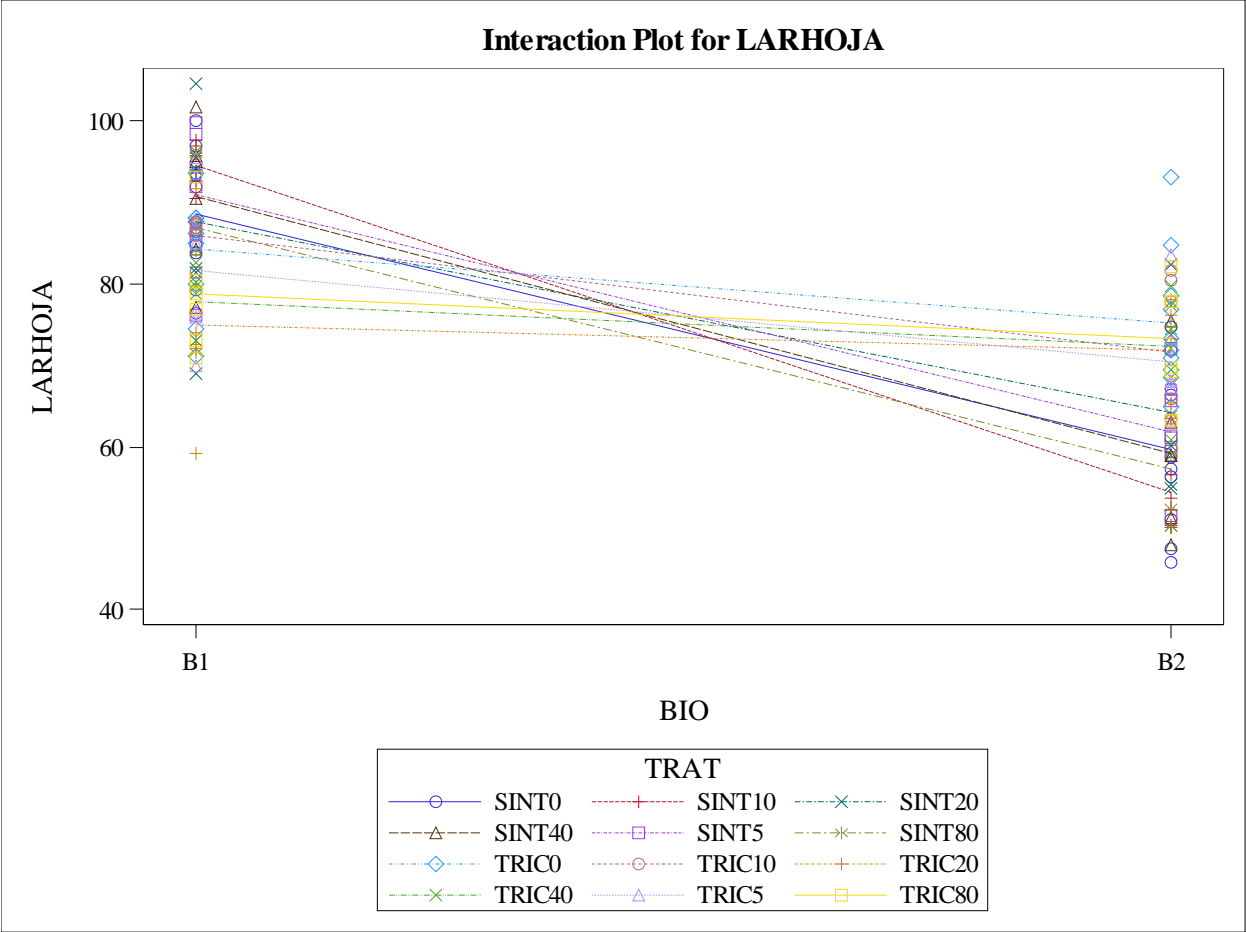
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	11	81.755218	7.432293	2.07	0.0265
TRAT(BIO)	12	1169.482257	97.456855	27.15	<.0001



Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	23	21184.11940	921.04867	13.75	<.0001
Error	136	9107.10489	66.96401		
Corrected Total	159	30291.22430			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	LARHOJA Mean
0.699348	10.80233	8.183154	75.75363

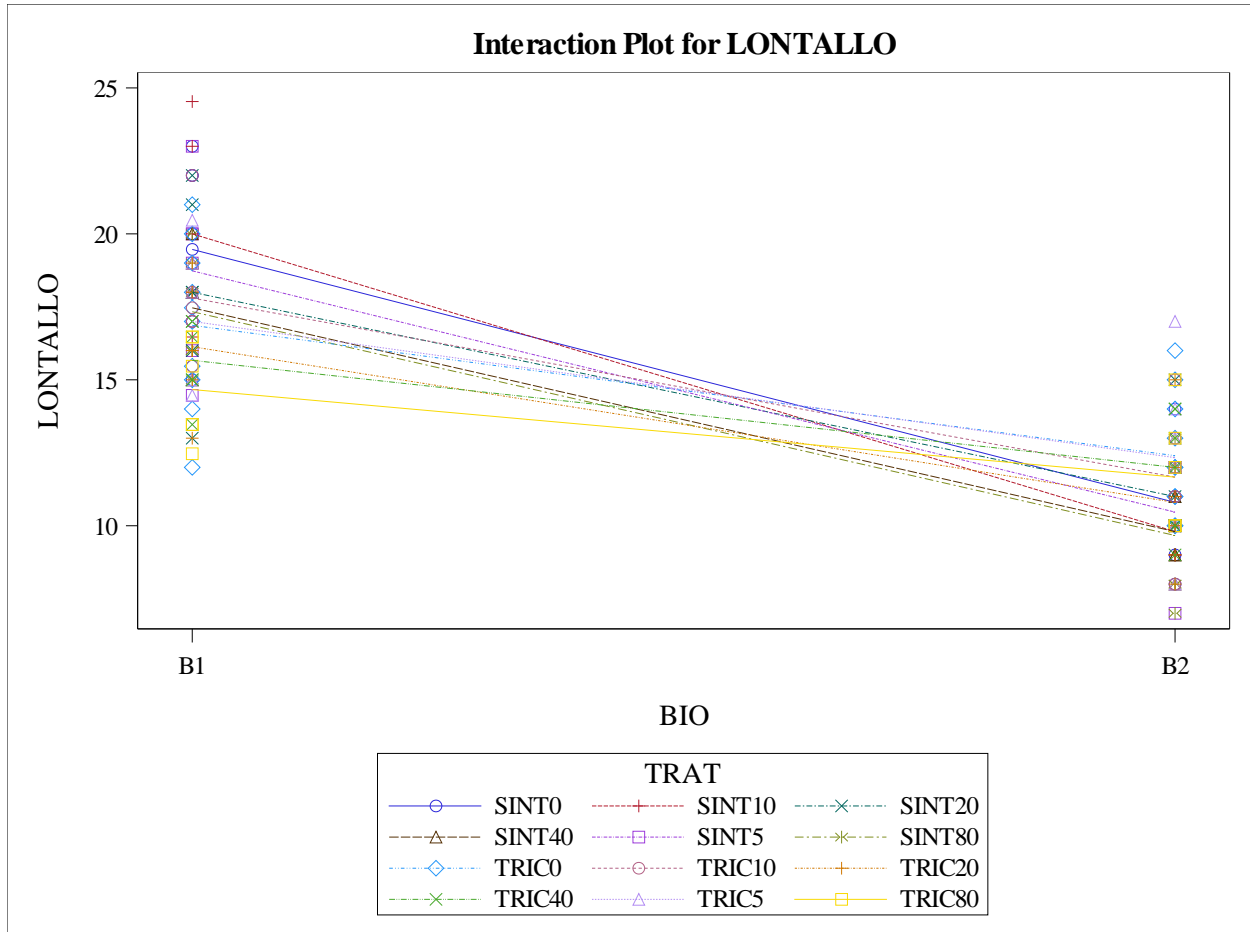
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	11	737.78672	67.07152	1.00	0.4483
TRAT(BIO)	12	20446.33269	1703.86106	25.44	<.0001



Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	23	1885.993750	81.999728	15.39	<.0001
Error	136	724.500000	5.327206		
Corrected Total	159	2610.493750			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	LONTALLO Mean
0.722466	16.13333	2.308074	14.30625

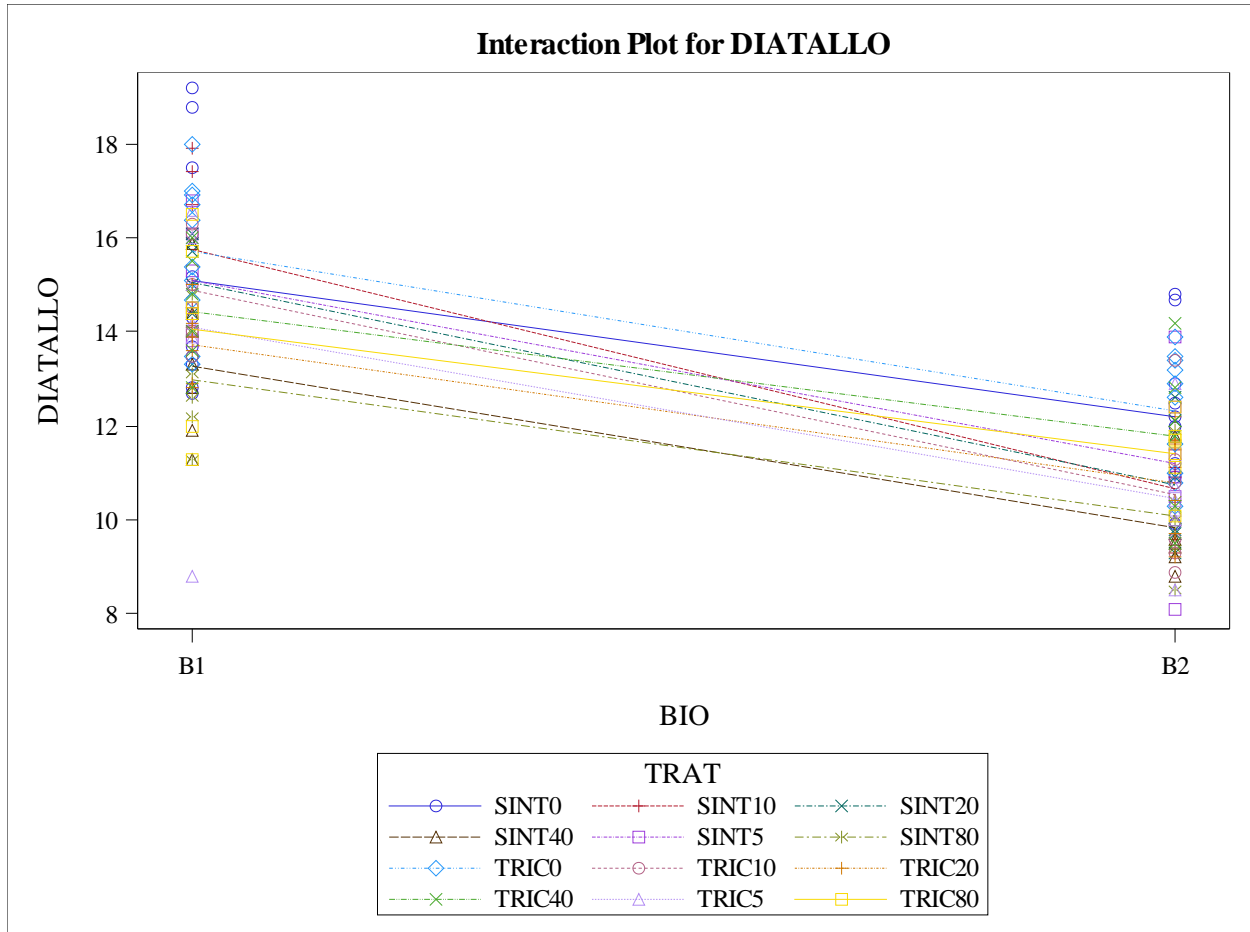
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	11	64.610417	5.873674	1.10	0.3639
TRAT(BIO)	12	1821.383333	151.781944	28.49	<.0001



Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	23	596.7594375	25.9460625	10.46	<.0001
Error	136	337.3750000	2.4806985		
Corrected Total	159	934.1344375			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	DIATALLO Mean
0.638837	12.24092	1.575023	12.86688

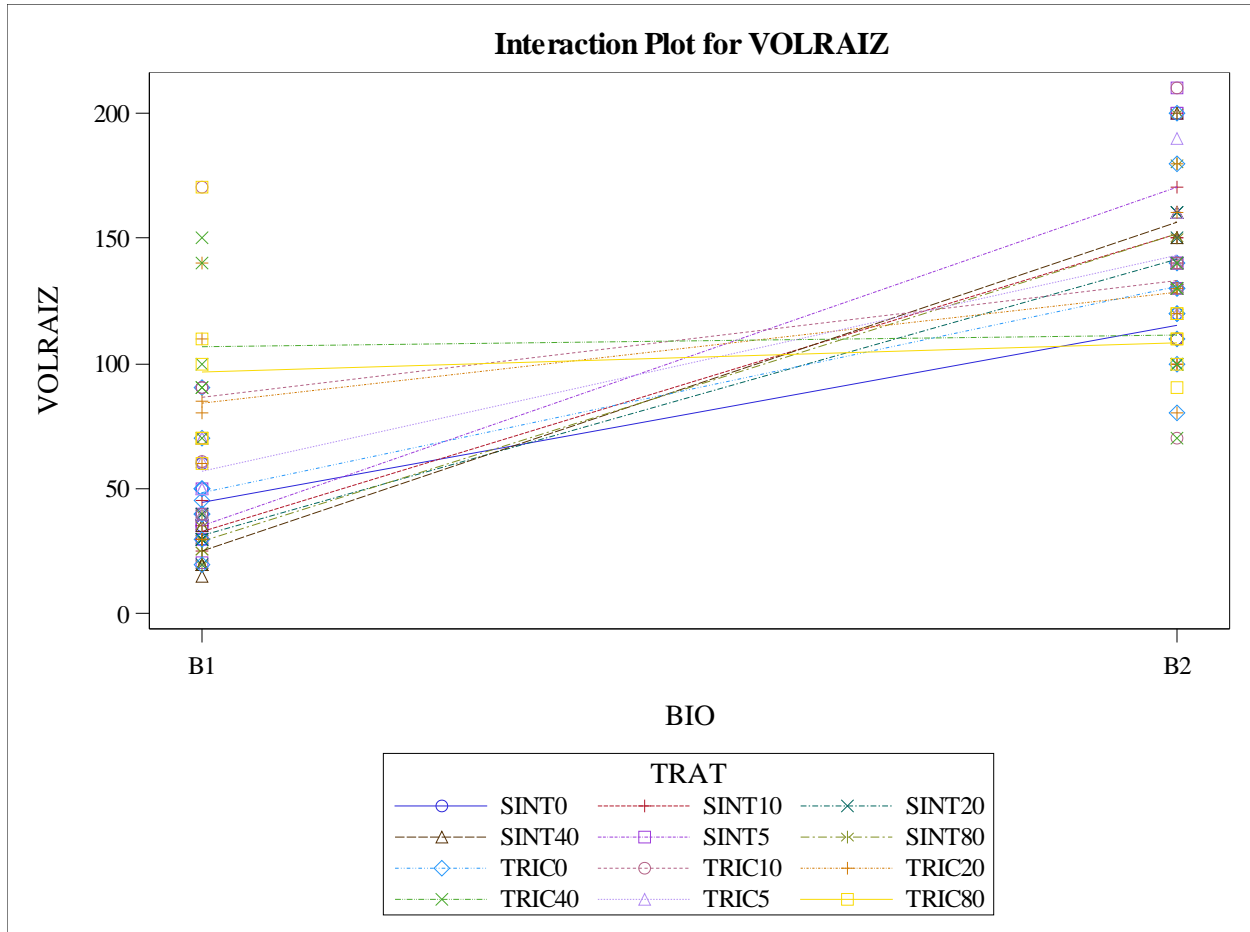
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	11	93.1836042	8.4712367	3.41	0.0003
TRAT(BIO)	12	503.5758333	41.9646528	16.92	<.0001



Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	23	339621.0484	14766.1325	20.07	<.0001
Error	136	100073.1250	735.8318		
Corrected Total	159	439694.1734			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VOLRAIZ Mean
0.772403	28.41093	27.12622	95.47813

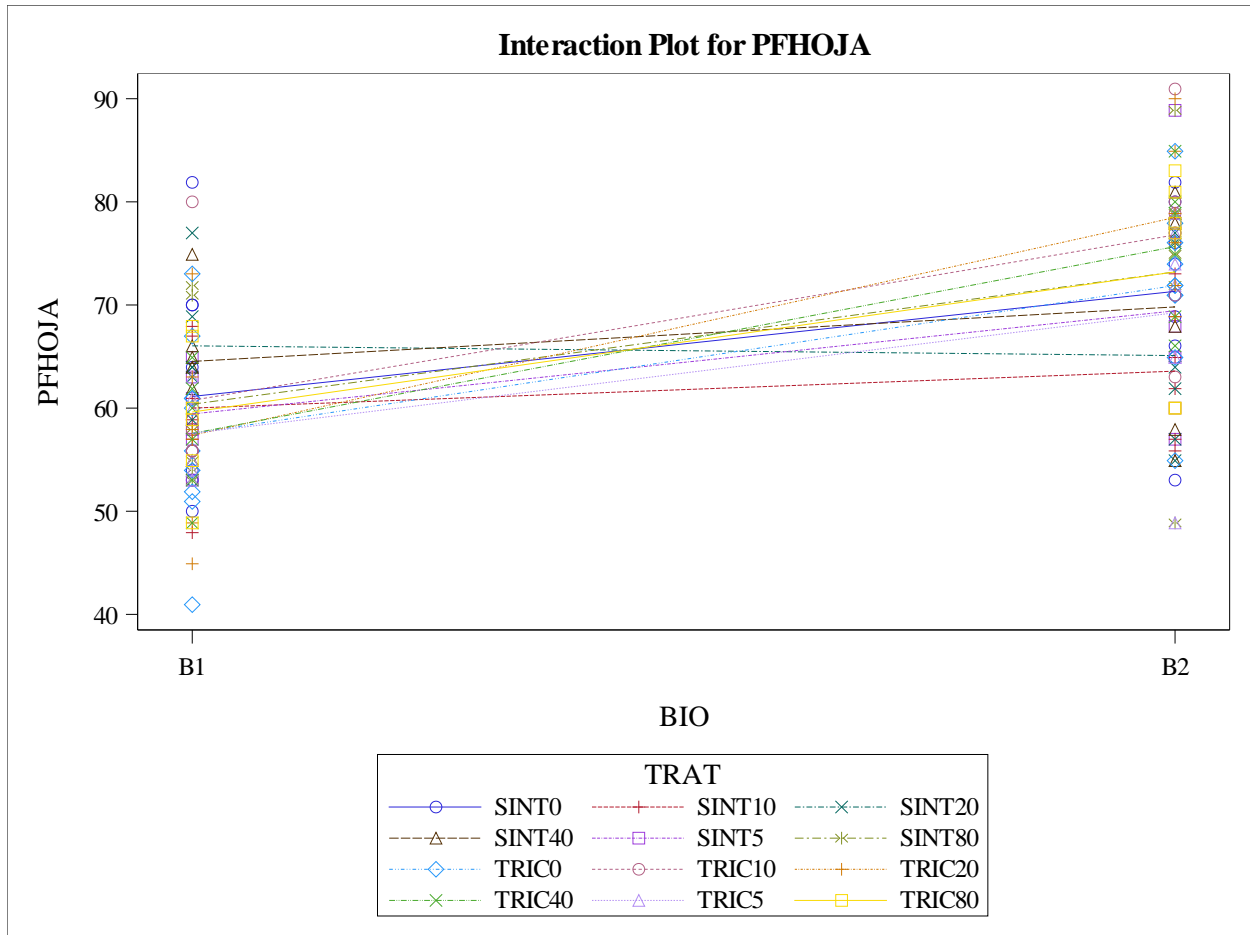
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	11	14866.4026	1351.4911	1.84	0.0535
TRAT(BIO)	12	324754.6458	27062.8872	36.78	<.0001



Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	23	7000.30000	304.36087	3.92	<.0001
Error	136	10570.80000	77.72647		
Corrected Total	159	17571.10000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	PFHOJA Mean
0.398399	13.39349	8.816262	65.82500

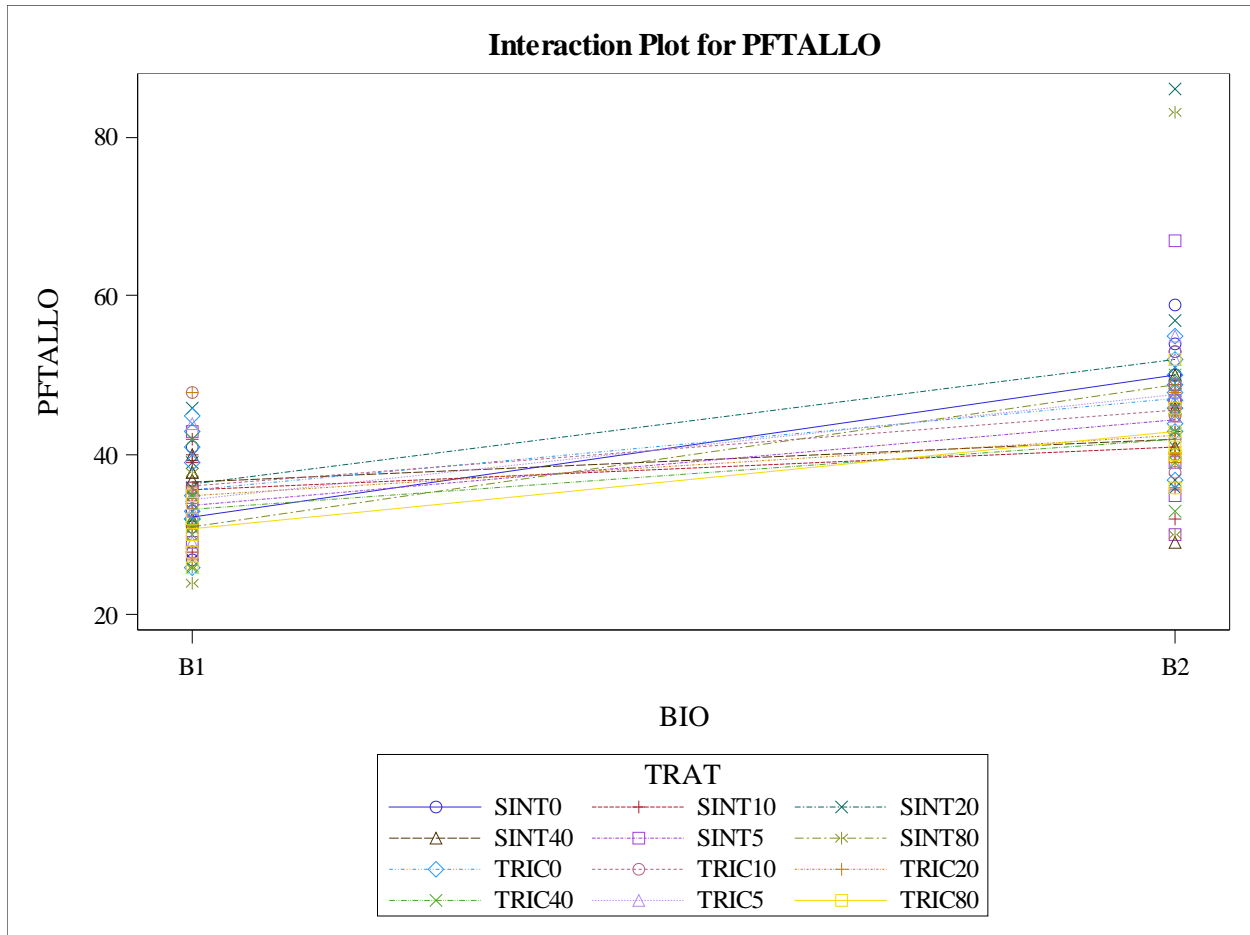
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	11	517.733333	47.066667	0.61	0.8216
TRAT(BIO)	12	6482.566667	540.213889	6.95	<.0001



Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	23	6675.73333	290.24928	5.19	<.0001
Error	136	7611.86667	55.96961		
Corrected Total	159	14287.60000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	PFTALLO Mean
0.467240	18.67986	7.481284	40.05000

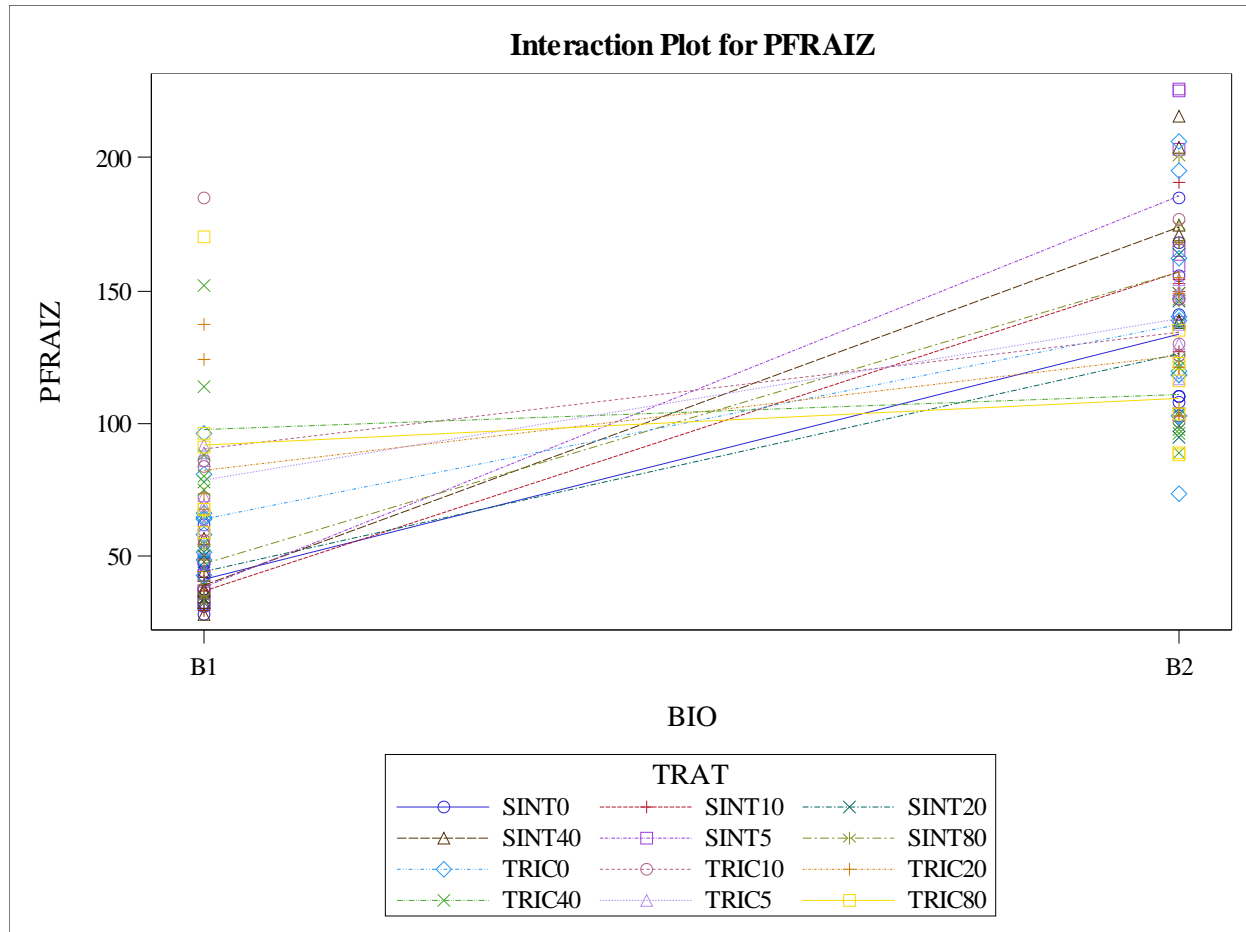
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	11	561.366667	51.033333	0.91	0.5310
TRAT(BIO)	12	6114.366667	509.530556	9.10	<.0001



Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	23	324379.9438	14103.4758	20.25	<.0001
Error	136	94732.3000	696.5610		
Corrected Total	159	419112.2438			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	PFRAIZ Mean
0.773969	26.11336	26.39244	101.0688

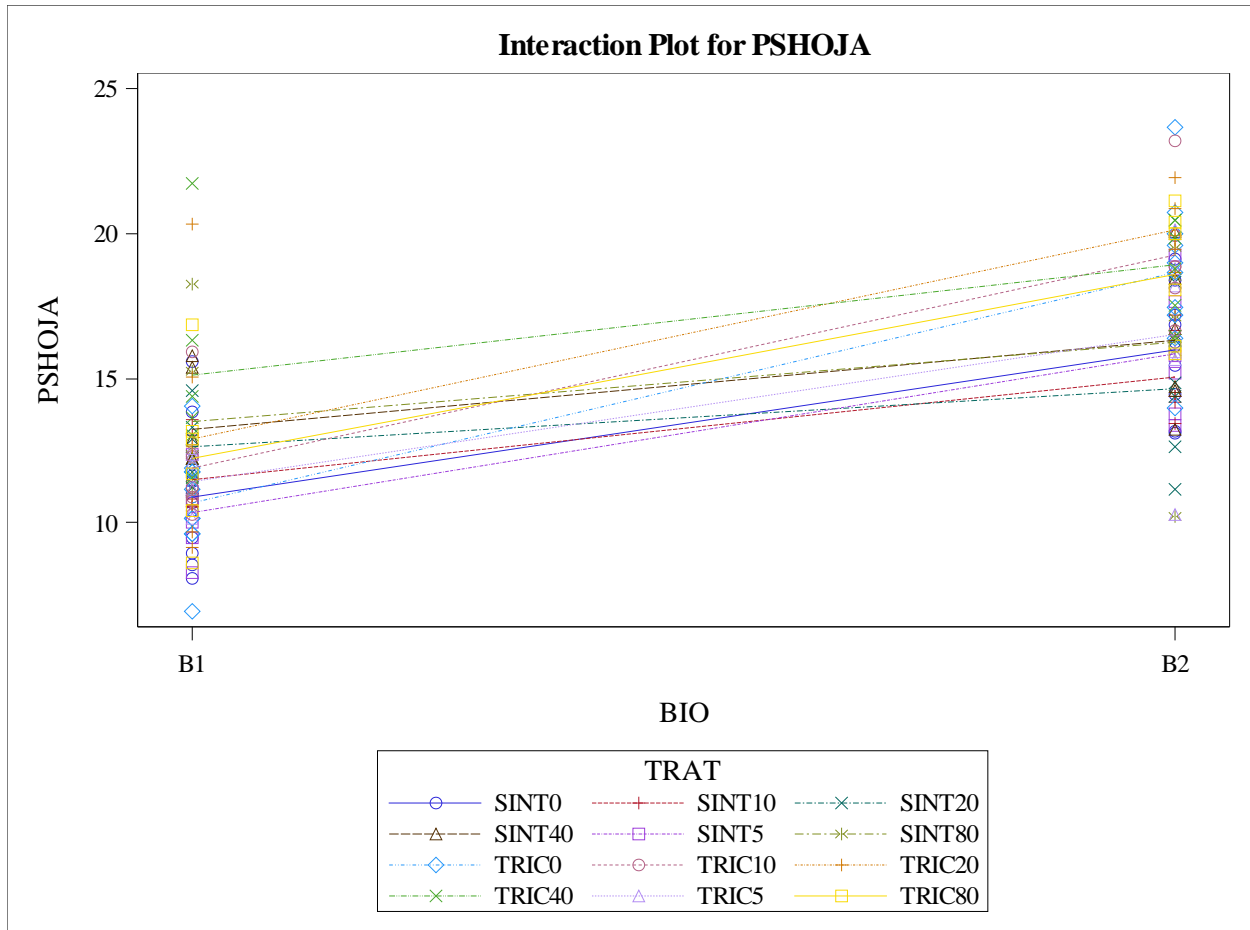
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	11	11275.3604	1025.0328	1.47	0.1491
TRAT(BIO)	12	313104.5833	26092.0486	37.46	<.0001



Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	23	1419.339769	61.710425	10.88	<.0001
Error	136	771.728050	5.674471		
Corrected Total	159	2191.067819			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	PSHOJA Mean
0.647784	16.28678	2.382115	14.62606

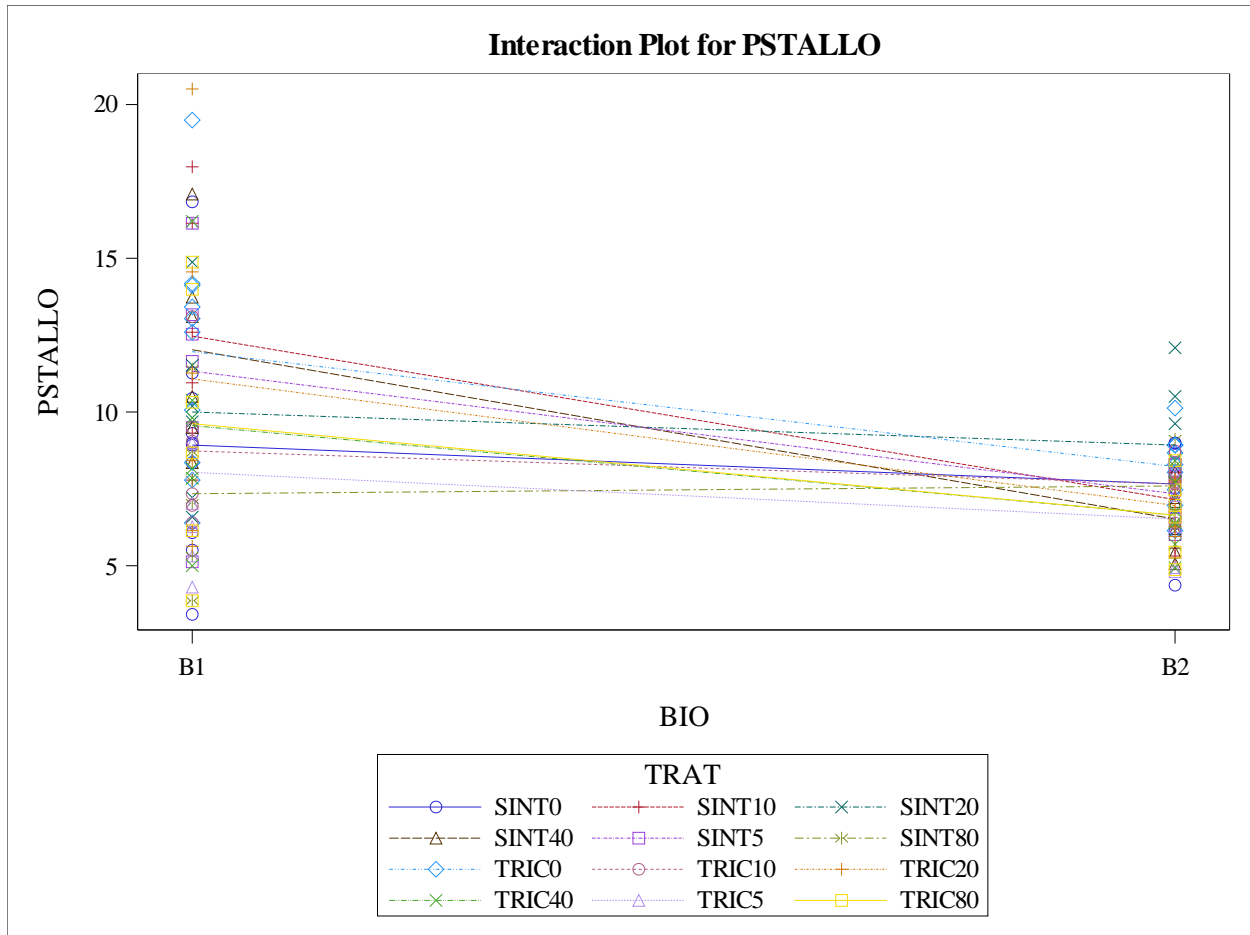
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	11	225.623078	20.511189	3.61	0.0002
TRAT(BIO)	12	1193.716692	99.476391	17.53	<.0001



Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	23	544.697610	23.682505	2.95	<.0001
Error	136	1093.024380	8.036944		
Corrected Total	159	1637.721990			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	PSTALLO Mean
0.332595	32.35414	2.834950	8.762250

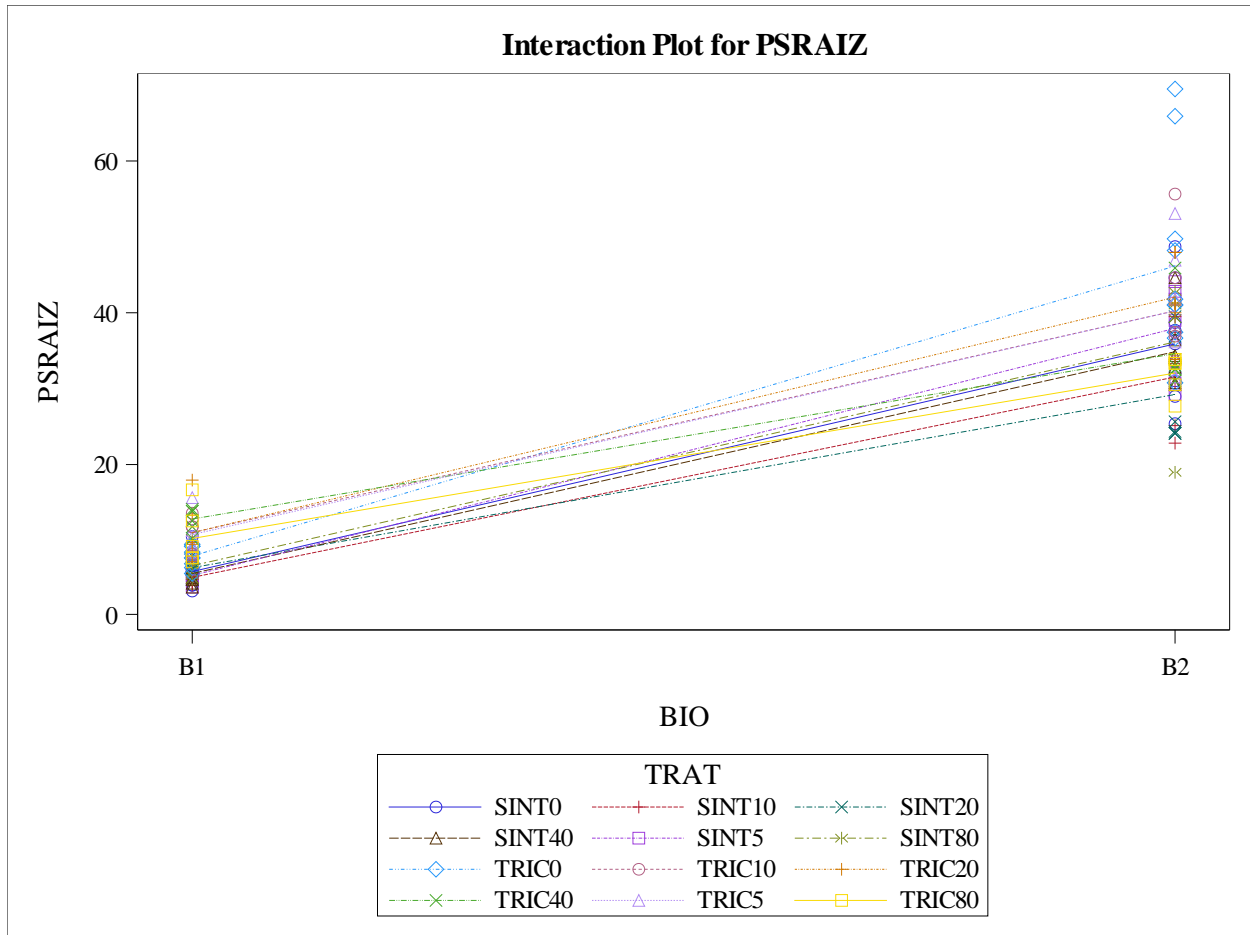
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	11	127.9999000	11.6363545	1.45	0.1586
TRAT(BIO)	12	416.6977100	34.7248092	4.32	<.0001



Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	23	36549.54921	1589.11084	47.52	<.0001
Error	136	4547.98622	33.44108		
Corrected Total	159	41097.53543			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	PSRAIZ Mean
0.889337	25.61381	5.782826	22.57699

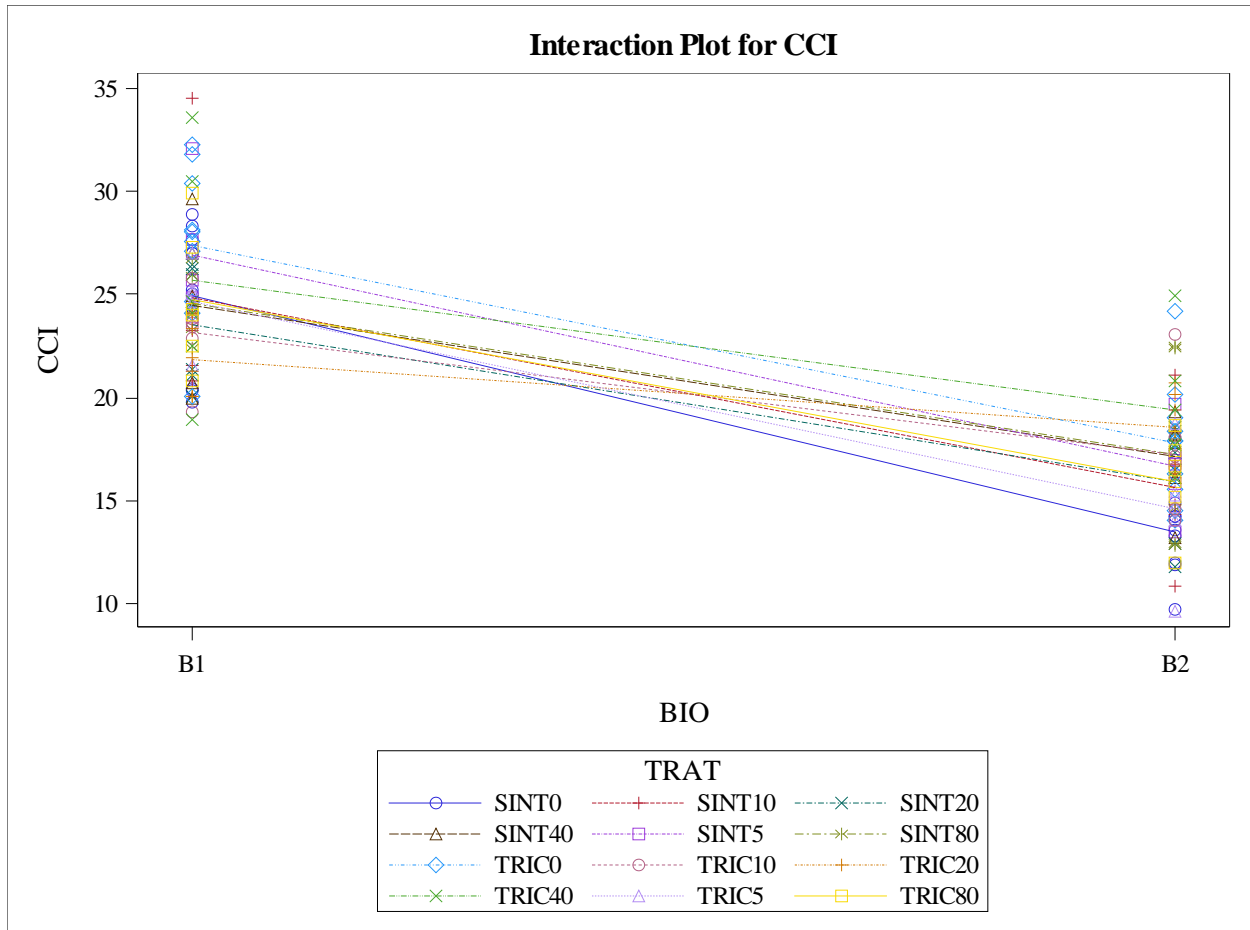
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	11	1474.20125	134.01830	4.01	<.0001
TRAT(BIO)	12	35075.34796	2922.94566	87.41	<.0001



Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	23	3173.967631	137.998593	14.13	<.0001
Error	136	1328.276867	9.766742		
Corrected Total	159	4502.244498			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CCI Mean
0.704975	15.08755	3.125179	20.71363

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	11	205.089941	18.644540	1.91	0.0432
TRAT(BIO)	12	2968.877690	247.406474	25.33	<.0001



E = Error SSCP Matrix							
	ALTO	ANCHOJA	LARHOJA	LONTALLO	DIATALLO	VOLRAIZ	PFHOJA
ALTO	20060.966 667	131.2912	1328.728666 7	257.21666667	177.6366666 7	2931.75	-801.6666667
ANCHOJA	131.2912	488.1823909 3	849.7279466 7	236.50646667	248.93184	-717.108	260.54146667
LARHOJA	1328.7286 667	849.7279466 7	9107.104893 3	1474.009	665.2326666 7	-7914.36	1321.3553333
LONTALLO	257.21666 667	236.5064666 7	1474.009	724.5	231.1816666 7	- 1642.79166 7	269.4
DIATALLO	177.63666 667	248.93184	665.2326666 7	231.18166667	337.375	-826.65	170.55666667
VOLRAIZ	2931.75	-717.108	-7914.36	-1642.791667	-826.65	100073.125	4792.8333333
PFHOJA	- 801.66666 67	260.5414666 7	1321.355333 3	269.4	170.5566666 7	4792.83333 33	10570.8
PFTALLO	- 473.93333 33	- 96.32946667	756.7906666 7	106.98333333	83.04333333 3	3877.08333 33	5289.6666667
PFRAIZ	1180.5666 667	-1082.178	- 5438.202667	-728.5	-532.93	35744.3333 33	4728.7666667
PSHOJA	- 61.893666 67	54.36771933 3	398.86466	69.782666667	40.43016666 7	1864.2225	2272.2553333
PSTALLO	477.208	50.87296866 7	24.4139	-46.852	64.97103333 3	1457.95416 67	905.89966667
PSRAIZ	758.1912	- 143.7912027	-386.551904	-169.0861	- 67.46066667	6551.88316 67	877.39686667
CCI	670.42533 333	-62.271508	226.2586133 3	-15.515	-37.9084	1811.32833 33	-424.6836667

E = Error SSCP Matrix						
	PFTALLO	PFRAIZ	PSHOJA	PSTALLO	PSRAIZ	CCI
ALTO	-473.9333333	1180.5666667	-61.89366667	477.208	758.1912	670.42533333
ANCHOJA	-96.32946667	-1082.178	54.367719333	50.872968667	-143.7912027	-62.271508
LARHOJA	756.79066667	-5438.202667	398.86466	24.4139	-386.551904	226.25861333
LONTALLO	106.98333333	-728.5	69.782666667	-46.852	-169.0861	-15.515
DIATALLO	83.043333333	-532.93	40.430166667	64.971033333	-67.46066667	-37.9084
VOLRAIZ	3877.0833333	35744.333333	1864.2225	1457.9541667	6551.8831667	1811.3283333
PFHOJA	5289.6666667	4728.7666667	2272.2553333	905.89966667	877.39686667	-424.6836667

E = Error SSCP Matrix						
	PFTALLO	PFRAIZ	PSHOJA	PSTALLO	PSRAIZ	CCI
PFTALLO	7611.8666667	-1550.233333	1067.845	1042.137	133.6904	-38.327
PFRAIZ	-1550.233333	94732.3	1647.8823333	-233.4796667	10676.9704	656.80533333
PSHOJA	1067.845	1647.8823333	771.72805	218.81679667	557.42648267	-86.45136
PSTALLO	1042.137	-233.4796667	218.81679667	1093.02438	247.11191333	-93.89883
PSRAIZ	133.6904	10676.9704	557.42648267	247.11191333	4547.9862249	176.44383133
CCI	-38.327	656.80533333	-86.45136	-93.89883	176.44383133	1328.2768667

Partial Correlation Coefficients from the Error SSCP Matrix / Prob > r							
DF = 136	ALTTO	ANCHOJA	LARHOJA	LONTALLO	DIATALLO	VOLRAIZ	PFHOJA
ALTTO	1.000000	0.041954 0.6264	0.098304 0.2531	0.067469 0.4334	0.068281 0.4279	0.065432 0.4475	-0.055051 0.5229
ANCHOJA	0.041954 0.6264	1.000000	0.402994 <.0001	0.397679 <.0001	0.613385 <.0001	-0.102597 0.2329	0.114692 0.1820
LARHOJA	0.098304 0.2531	0.402994 <.0001	1.000000	0.573840 <.0001	0.379513 <.0001	-0.262160 0.0020	0.134671 0.1166
LONTALLO	0.067469 0.4334	0.397679 <.0001	0.573840 <.0001	1.000000	0.467603 <.0001	-0.192932 0.0239	0.097347 0.2578
DIATALLO	0.068281 0.4279	0.613385 <.0001	0.379513 <.0001	0.467603 <.0001	1.000000	-0.142268 0.0972	0.090315 0.2939
VOLRAIZ	0.065432 0.4475	-0.102597 0.2329	-0.262160 0.0020	-0.192932 0.0239	-0.142268 0.0972	1.000000	0.147360 0.0857
PFHOJA	-0.055051 0.5229	0.114692 0.1820	0.134671 0.1166	0.097347 0.2578	0.090315 0.2939	0.147360 0.0857	1.000000
PFTALLO	-0.038353 0.6564	-0.049972 0.5620	0.090895 0.2908	0.045557 0.5971	0.051821 0.5476	0.140476 0.1016	0.589697 <.0001
PFRAIZ	0.027081 0.7534	-0.159132 0.0633	-0.185147 0.0303	-0.087935 0.3069	-0.094268 0.2732	0.367113 <.0001	0.149432 0.0814
PSHOJA	-0.015730 0.8552	0.088576 0.3033	0.150454 0.0793	0.093325 0.2781	0.079235 0.3574	0.212132 0.0128	0.795557 <.0001
PSTALLO	0.101910 0.2360	0.069644 0.4187	0.007738 0.9285	-0.052649 0.5412	0.106991 0.2134	0.139402 0.1042	0.266509 0.0016

Partial Correlation Coefficients from the Error SSCP Matrix / Prob > r							
DF = 136	ALTO	ANCHOJA	LARHOJA	LONTALLO	DIATALLO	VOLRAIZ	PFHOJA
PSRAIZ	0.079377 0.3565	-0.096501 0.2620	-0.060063 0.4857	-0.093149 0.2790	-0.054461 0.5273	0.307113 0.0003	0.126541 0.1406
CCI	0.129876 0.1304	-0.077331 0.3691	0.065053 0.4501	-0.015816 0.8545	-0.056628 0.5110	0.157106 0.0667	-0.113336 0.1873

Partial Correlation Coefficients from the Error SSCP Matrix / Prob > r						
DF = 136	PFTALLO	PFRAIZ	PSHOJA	PSTALLO	PSRAIZ	CCI
ALTO	-0.038353 0.6564	0.027081 0.7534	-0.015730 0.8552	0.101910 0.2360	0.079377 0.3565	0.129876 0.1304
ANCHOJA	-0.049972 0.5620	-0.159132 0.0633	0.088576 0.3033	0.069644 0.4187	-0.096501 0.2620	-0.077331 0.3691
LARHOJA	0.090895 0.2908	-0.185147 0.0303	0.150454 0.0793	0.007738 0.9285	-0.060063 0.4857	0.065053 0.4501
LONTALLO	0.045557 0.5971	-0.087935 0.3069	0.093325 0.2781	-0.052649 0.5412	-0.093149 0.2790	-0.015816 0.8545
DIATALLO	0.051821 0.5476	-0.094268 0.2732	0.079235 0.3574	0.106991 0.2134	-0.054461 0.5273	-0.056628 0.5110
VOLRAIZ	0.140476 0.1016	0.367113 <.0001	0.212132 0.0128	0.139402 0.1042	0.307113 0.0003	0.157106 0.0667
PFHOJA	0.589697 <.0001	0.149432 0.0814	0.795557 <.0001	0.266509 0.0016	0.126541 0.1406	-0.113336 0.1873
PFTALLO	1.000000	-0.057730 0.5028	0.440586 <.0001	0.361297 <.0001	0.022722 0.7921	-0.012054 0.8888
PFRAIZ	-0.057730 0.5028	1.000000	0.192728 0.0240	-0.022945 0.7901	0.514386 <.0001	0.058552 0.4967
PSHOJA	0.440586 <.0001	0.192728 0.0240	1.000000	0.238250 0.0051	0.297540 0.0004	-0.085388 0.3212
PSTALLO	0.361297 <.0001	-0.022945 0.7901	0.238250 0.0051	1.000000	0.110833 0.1973	-0.077929 0.3654
PSRAIZ	0.022722 0.7921	0.514386 <.0001	0.297540 0.0004	0.110833 0.1973	1.000000	0.071788 0.4045
CCI	-0.012054 0.8888	0.058552 0.4967	-0.085388 0.3212	-0.077929 0.3654	0.071788 0.4045	1.000000

H = Type III SSCP Matrix for TRAT							
	ALTO	ANCHOJA	LARHOJA	LONTALLO	DIATALLO	VOLRAIZ	PFHOJA
ALTO	1822.727083 3	339.583575	1058.37354 17	127.01875	210.027291 67	1654.58437 5	-103.175
ANCHOJA	339.583575	81.75521803 3	198.917707 5	41.633241667	63.7945591 67	38.6585208 33	- 31.16216667
LARHOJA	1058.373541 7	198.9177075	737.786717 5	75.154875	138.669112 5	556.236020 83	- 75.22416667
LONTALLO	127.01875	41.63324166 7	75.154875	64.610416667	50.278125	- 411.282291 7	-84.925
DIATALLO	210.0272916 7	63.79455916 7	138.669112 5	50.278125	93.1836041 67	- 323.240937 5	- 81.09916667
VOLRAIZ	1654.584375	38.65852083 3	556.236020 83	-411.2822917	- 323.240937 5	14866.4026 04	807.6375
PFHOJA	-103.175	- 31.16216667	- 75.2241666 7	-84.925	- 81.0991666 7	807.6375	517.7333333 3
PFTALLO	166.5333333 3	76.28593333 3	196.823666 67	107.56666667	52.975	-1552.325	-29.3
PFRAIZ	1327.25625	- 82.16084167	742.026791 67	-249.8354167	- 404.813958 3	10038.4489 58	378.0916666 7
PSHOJA	70.69152083 3	- 4.010526917	- 1.14570291 7	-81.3073125	- 39.6869520 8	1206.59913 54	218.8520833 3
PSTALLO	129.1285833 3	52.97258066 7	130.595185	21.561666667	50.8699916 67	- 329.635875	- 85.01916667
PSRAIZ	924.3932291 7	134.7067189 2	521.240569 25	-8.289720833	60.4134237 5	2052.72470 62	205.7875833 3
CCI	176.888375	24.61802183 3	177.167604 17	-23.38954167	35.3769125	510.078104 17	- 26.19316667

H = Type III SSCP Matrix for TRAT						
	PFTALLO	PFRAIZ	PSHOJA	PSTALLO	PSRAIZ	CCI
ALTO	166.53333333	1327.25625	70.691520833	129.12858333	924.39322917	176.888375
ANCHOJA	76.285933333	-82.16084167	-4.010526917	52.972580667	134.70671892	24.618021833
LARHOJA	196.82366667	742.02679167	-1.145702917	130.595185	521.24056925	177.16760417
LONTALLO	107.56666667	-249.8354167	-81.3073125	21.561666667	-8.289720833	-23.38954167
DIATALLO	52.975	-404.8139583	-39.68695208	50.869991667	60.41342375	35.3769125
VOLRAIZ	-1552.325	10038.448958	1206.5991354	-329.635875	2052.7247062	510.07810417
PFHOJA	-29.3	378.09166667	218.85208333	-85.01916667	205.78758333	-26.19316667
PFTALLO	561.36666667	-1114.116667	-161.5931667	47.011833333	-7.176633333	-86.90816667
PFRAIZ	-1114.116667	11275.360417	612.43764583	-204.96575	2108.0738042	626.078625
PSHOJA	-161.5931667	612.43764583	225.62307771	-39.6903525	296.87835013	78.513990417
PSTALLO	47.011833333	-204.96575	-39.6903525	127.9999	-20.42891483	63.84667
PSRAIZ	-7.176633333	2108.0738042	296.87835013	-20.42891483	1474.2012508	230.22380125
CCI	-86.90816667	626.078625	78.513990417	63.84667	230.22380125	205.08994083

Characteristic Roots and Vectors of: E Inverse * H, where H = Type III SSCP Matrix for TRAT E = Error SSCP Matrix									
Characteristic Root	Percent	Characteristic Vector V'EV=1							
		ALTO	ANCHOJA	LARHOJA	LONTALLO	DIATALLO	VOLRAIZ	PFHOJA	
		PFTALLO	PFRAIZ	PSHOJA	PSTALLO	PSRAIZ	CCI		
0.73631935	33.35	-0.00003487	0.00298275	0.00169668	-0.01268040	-0.00668342	0.00056214	-0.00686551	
		-0.00408799	-0.00004450	0.04913154	-0.00302115	-0.00128278		0.00546742	
0.50043861	22.67	0.00156608	0.01685846	0.00084616	-0.00422131	0.01846242	-0.00031109	-0.00230858	
		0.00363328	-0.00060835	-0.00407549	-0.00033133	0.01203454		0.00490947	
0.30860394	13.98	-0.00149782	-0.02171483	-0.00211118	-0.00550018	0.04778749	-0.00053583	-0.00057922	
		-0.00473959	-0.00044994	0.00977688	0.01400508	-0.00529403		0.01341231	
0.24131026	10.93	0.00073814	0.01811186	0.00572760	-0.00609994	-0.02242035	0.00055226	-0.00218199	
		0.00009250	0.00236673	-0.00742164	0.01663254	-0.00801286		0.00627013	

0.13484815	6.11	-0.00225797	-0.00309666	-0.00058083	0.00163134	-0.02770520	-0.00224931	0.00080915
		0.00154855	0.00028119	-0.00273567	0.00916127	0.00628661		0.01291342

0.12039487	5.45	-0.00077426	-0.03187027	0.00342240	-0.00089561	0.02542244	0.00113395	0.00841493
		-0.00621278	0.00072082	-0.02693210	-0.00716099	0.00412513		0.00386595

0.06261133	2.84	-0.00151581	-0.00045952	-0.00619708	0.03158056	-0.00512033	0.00052678	-0.01081947
		0.00372233	0.00073565	0.01735590	0.00125506	-0.00022323		0.00257029

0.05407605	2.45	-0.00068208	0.00889411	-0.00405571	0.01348610	-0.01142582	0.00019421	0.00587636
		-0.00922572	-0.00048376	-0.00859521	0.01919868	0.00510929		-0.00785012

0.02858737	1.29	0.00087163	0.01727579	-0.00528358	0.02129059	-0.00892486	-0.00051108	0.00705630
		-0.00045919	0.00054026	-0.00001207	-0.00635884	-0.00312507		0.01325974

0.01854556	0.84	-0.00305459	-0.00355377	0.00089918	-0.00171412	0.00288177	0.00216091	0.00255852
		0.00430490	-0.00115253	-0.00815663	0.00535862	0.00162274		0.00179766

0.00191587	0.09	-0.00169704	-0.01973647	0.00656411	0.01227686	0.00865751	-0.00043125	-0.00242242
		0.00049796	0.00077905	0.01520540	0.00520105	-0.00145427		-0.00925996

0.00000000	0.00	0.00508722	-0.02963080	-0.00128357	0.01138089	0.00024628	0.00025885	0.00085354
		0.00036564	-0.00073221	0.00343601	0.00761292	0.00006606		-0.00037083

0.00000000	0.00	0.00061636	0.00028398	-0.00363054	-0.01455046	0.02254359	-0.00101502	-0.00232053
		0.00552168	0.00259568	0.00928220	0.00017619	-0.00290568		-0.00667998

MANOVA Test Criteria and F Approximations for the Hypothesis of No Overall TRAT Effect

H = Type III SSCP Matrix for TRAT

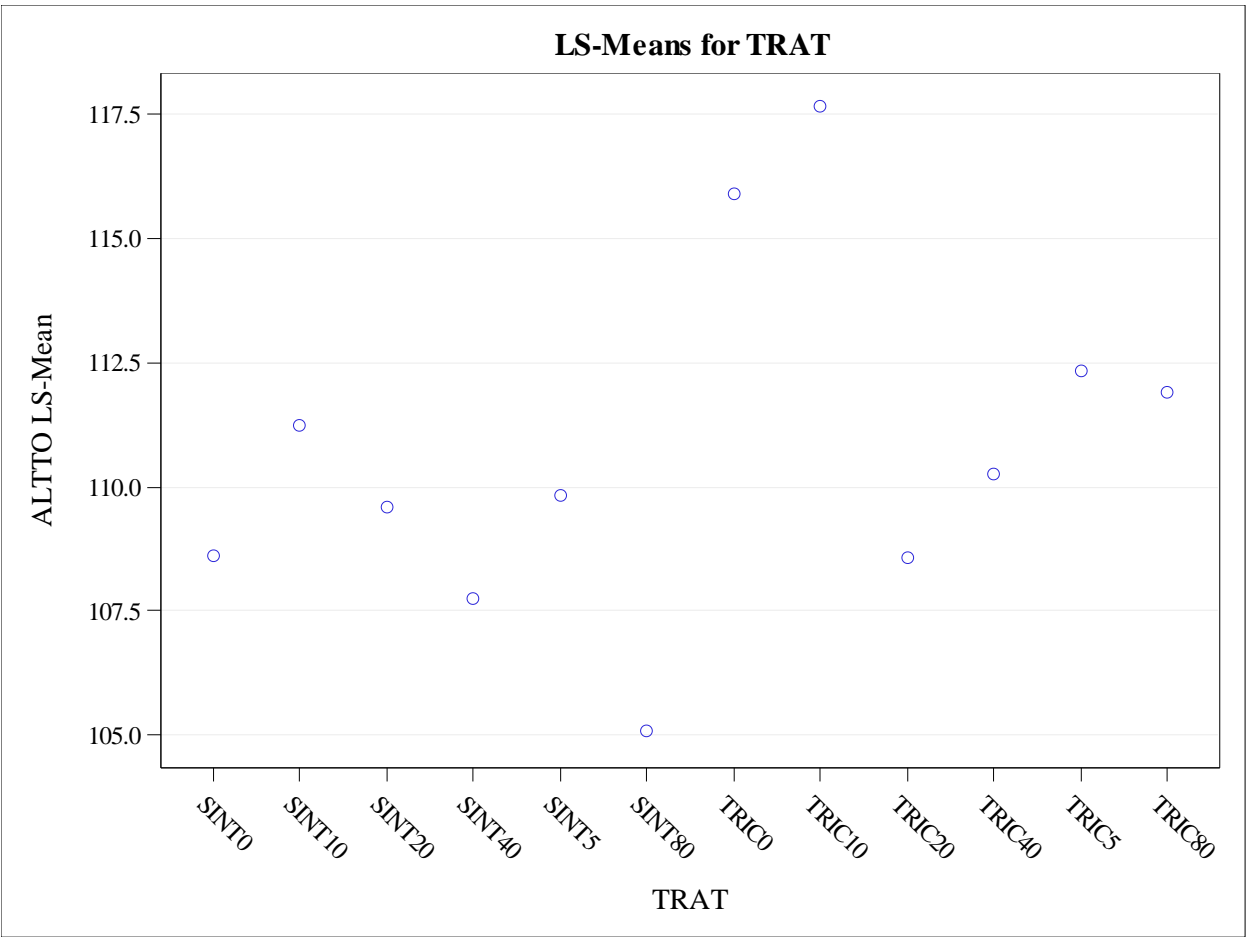
E = Error SSCP Matrix

S=11 M=0.5 N=61

Statistic	Value	F Value	Num DF	Den DF	Pr > F
Wilks' Lambda	0.15807218	1.82	143	1068.7	<.0001
Pillai's Trace	1.57224309	1.72	143	1474	<.0001
Hotelling-Lawley Trace	2.20765138	1.89	143	673.86	<.0001
Roy's Greatest Root	0.73631935	7.59	13	134	<.0001

NOTE: F Statistic for Roy's Greatest Root is an upper bound.

TRAT	ALTO LSMEAN
SINT0	108.600000
SINT10	111.250000
SINT20	109.583333
SINT40	107.750000
SINT5	109.833333
SINT80	105.083333
TRIC0	115.900000
TRIC10	117.666667
TRIC20	108.583333
TRIC40	110.250000
TRIC5	112.333333
TRIC80	111.916667

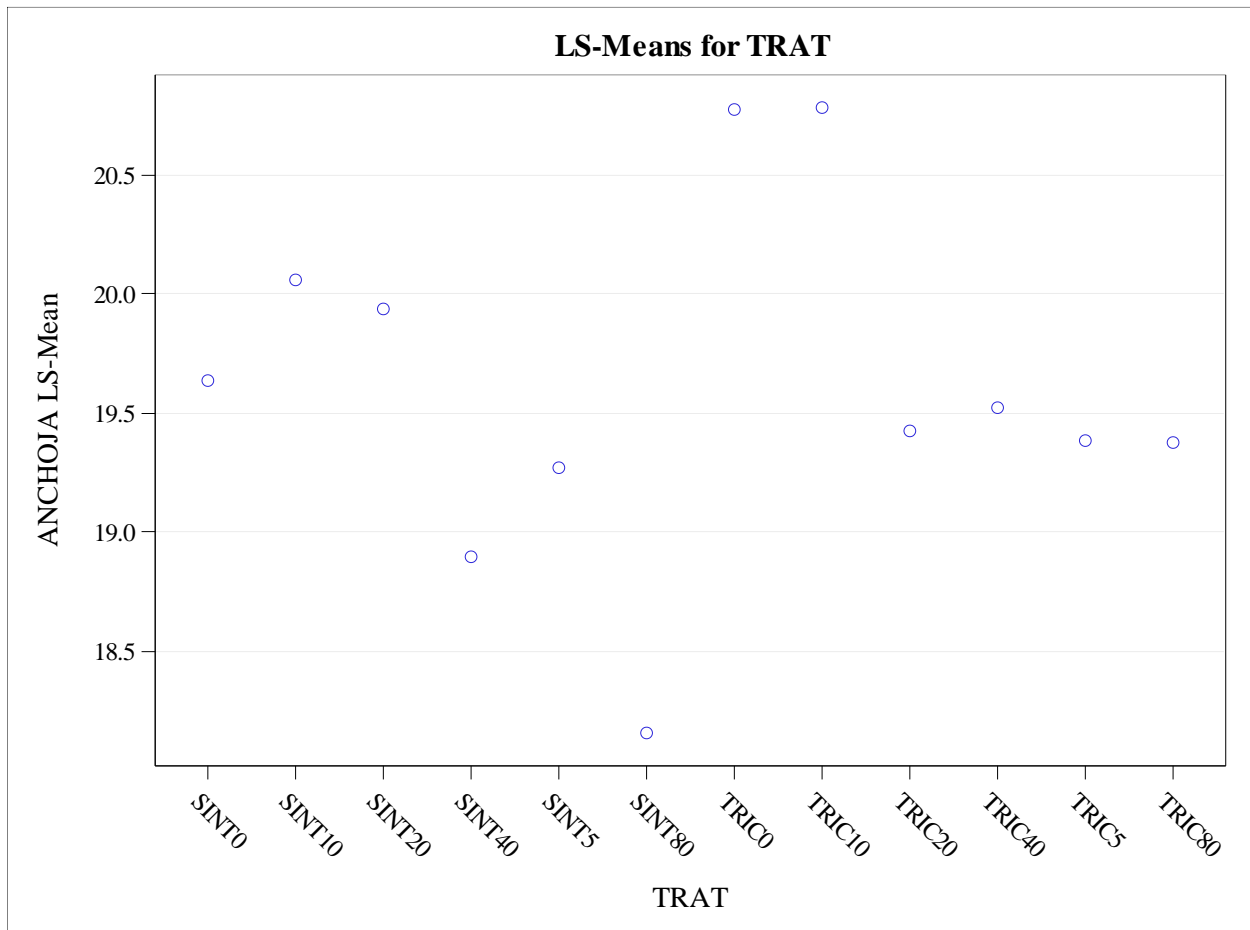


T Comparison Lines for Least Squares Means of TRAT					
LS-means with the same letter are not significantly different.					
			ALTTO LSMEAN	TRAT	LSMEAN Number
	A		117.667	TRIC10	8
	A				
B	A		115.900	TRIC0	7
B	A				
B	A	C	112.333	TRIC5	11
B	A	C			
B	A	C	111.917	TRIC80	12
B	A	C			
B	A	C	111.250	SINT10	2

T Comparison Lines for Least Squares Means of TRAT					
LS-means with the same letter are not significantly different.					
			ALTTO LSMEAN	TRAT	LSMEAN Number
B	A	C			
B	A	C	110.250	TRIC40	10
B	A	C			
B	A	C	109.833	SINT5	5
B	A	C			
B	A	C	109.583	SINT20	3
B	A	C			
B	A	C	108.600	SINT0	1
B	A	C			
B	A	C	108.583	TRIC20	9
B		C			
B		C	107.750	SINT40	4
		C			
		C	105.083	SINT80	6
The LINES display does not reflect all significant comparisons. The following additional pairs are significantly different: (8,1)					

TRAT	ANCHOJA LSMEAN
SINT0	19.6380000
SINT10	20.0566667
SINT20	19.9335000
SINT40	18.8933333
SINT5	19.2716667
SINT80	18.1533333
TRIC0	20.7749000

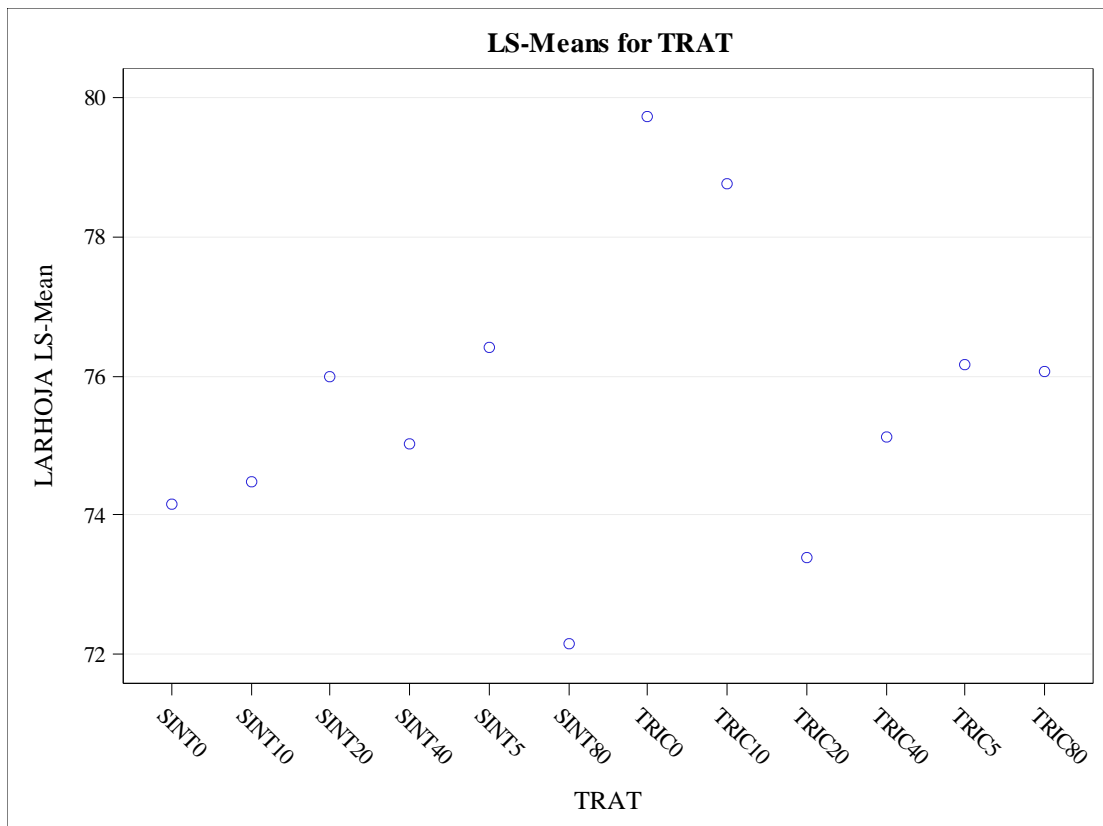
TRAT	ANCHOJA LSMEAN
TRIC10	20.7833333
TRIC20	19.4200000
TRIC40	19.5233333
TRIC5	19.3800000
TRIC80	19.3716667



T Comparison Lines for Least Squares Means of TRAT					
LS-means with the same letter are not significantly different.					
			ANCHOJA LSMEAN	TRAT	LSMEAN Number
	A		20.78333	TRIC10	8
	A				
	A		20.77490	TRIC0	7
	A				
B	A		20.05667	SINT10	2
B	A				
B	A		19.93350	SINT20	3
B	A				
B	A		19.63800	SINT0	1
B	A				
B	A	C	19.52333	TRIC40	10
B	A	C			
B	A	C	19.42000	TRIC20	9
B	A	C			
B	A	C	19.38000	TRIC5	11
B	A	C			
B	A	C	19.37167	TRIC80	12
B	A	C			
B	A	C	19.27167	SINT5	5
B		C			
B		C	18.89333	SINT40	4
		C			
		C	18.15333	SINT80	6

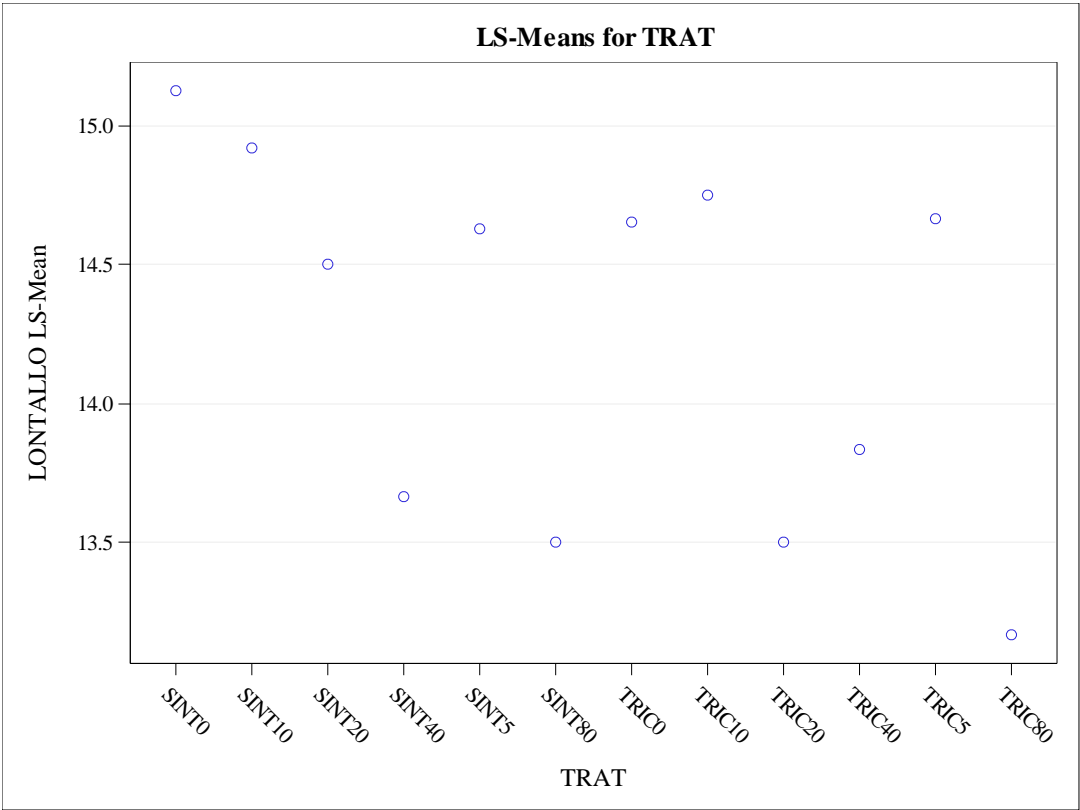
The LINES display does not reflect all significant comparisons. The following additional pairs are significantly different: (7,11) (7,12) (7,5)

TRAT	LARHOJA LSMEAN
SINT0	74.1540000
SINT10	74.4916667
SINT20	75.9833333
SINT40	75.0250000
SINT5	76.4083333
SINT80	72.1500000
TRIC0	79.7350000
TRIC10	78.7583333
TRIC20	73.4000000
TRIC40	75.1333333
TRIC5	76.1500000
TRIC80	76.0666667



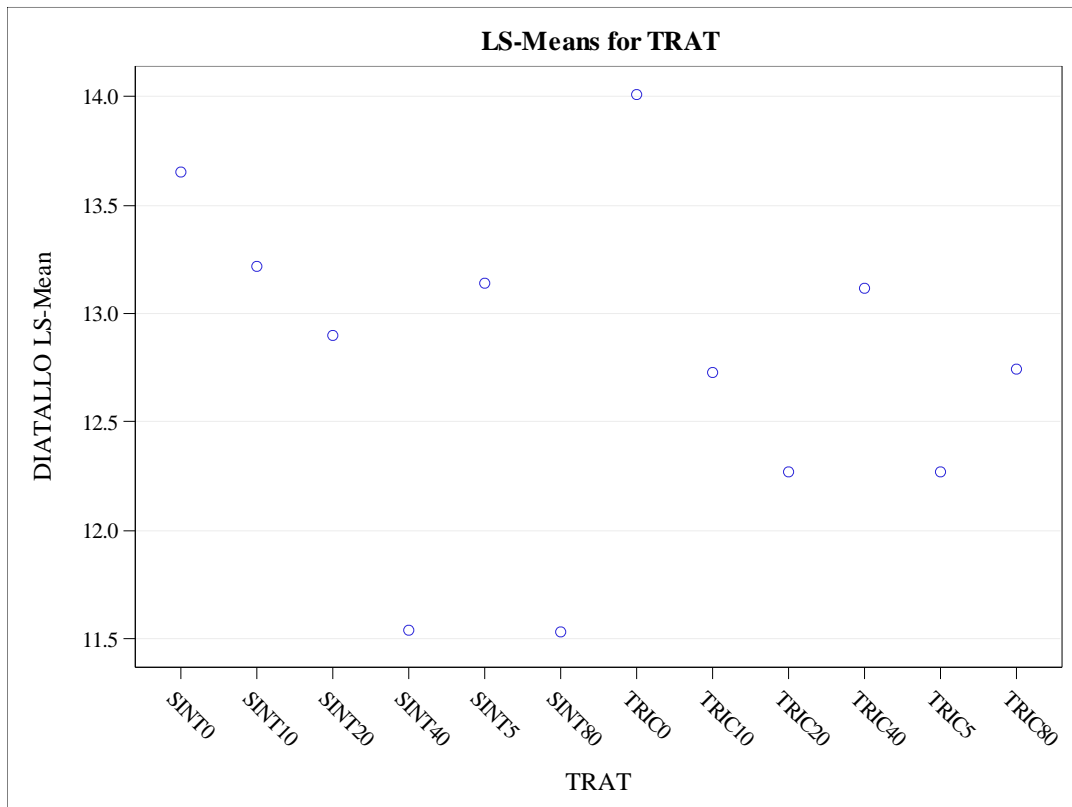
T Comparison Lines for Least Squares Means of TRAT					
LS-means with the same letter are not significantly different.					
			LARHOJA LSMEAN	TRAT	LSMEAN Number
	A		79.73500	TRIC0	7
	A				
B	A		78.75833	TRIC10	8
B	A				
B	A	C	76.40833	SINT5	5
B	A	C			
B	A	C	76.15000	TRIC5	11
B	A	C			
B	A	C	76.06667	TRIC80	12
B	A	C			
B	A	C	75.98333	SINT20	3
B	A	C			
B	A	C	75.13333	TRIC40	10
B	A	C			
B	A	C	75.02500	SINT40	4
B	A	C			
B	A	C	74.49167	SINT10	2
B		C			
B		C	74.15400	SINT0	1
B		C			
B		C	73.40000	TRIC20	9
		C			
		C	72.15000	SINT80	6

TRAT	LONTALLO LSMEAN
SINT0	15.1250000
SINT10	14.9166667
SINT20	14.5000000
SINT40	13.6666667
SINT5	14.6250000
SINT80	13.5000000
TRIC0	14.6500000
TRIC10	14.7500000
TRIC20	13.5000000
TRIC40	13.8333333
TRIC5	14.6666667
TRIC80	13.1666667



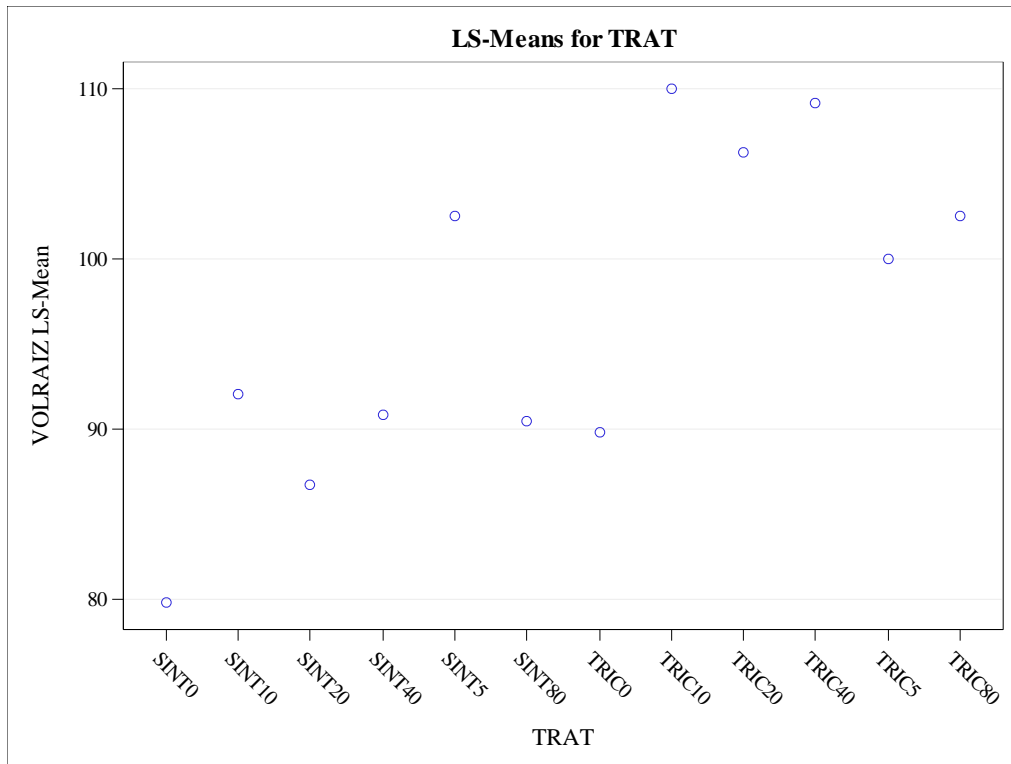
T Comparison Lines for Least Squares Means of TRAT				
LS-means with the same letter are not significantly different.				
		LONTALLO LSMEAN	TRAT	LSMEAN Number
	A	15.12500	SINT0	1
	A			
B	A	14.91667	SINT10	2
B	A			
B	A	14.75000	TRIC10	8
B	A			
B	A	14.66667	TRIC5	11
B	A			
B	A	14.65000	TRIC0	7
B	A			
B	A	14.62500	SINT5	5
B	A			
B	A	14.50000	SINT20	3
B	A			
B	A	13.83333	TRIC40	10
B	A			
B	A	13.66667	SINT40	4
B	A			
B	A	13.50000	SINT80	6
B	A			
B	A	13.50000	TRIC20	9
B				
B		13.16667	TRIC80	12

TRAT	DIATALLO LSMEAN
SINT0	13.6550000
SINT10	13.2166667
SINT20	12.9000000
SINT40	11.5416667
SINT5	13.1416667
SINT80	11.5333333
TRIC0	14.0100000
TRIC10	12.7250000
TRIC20	12.2666667
TRIC40	13.1166667
TRIC5	12.2666667
TRIC80	12.7416667



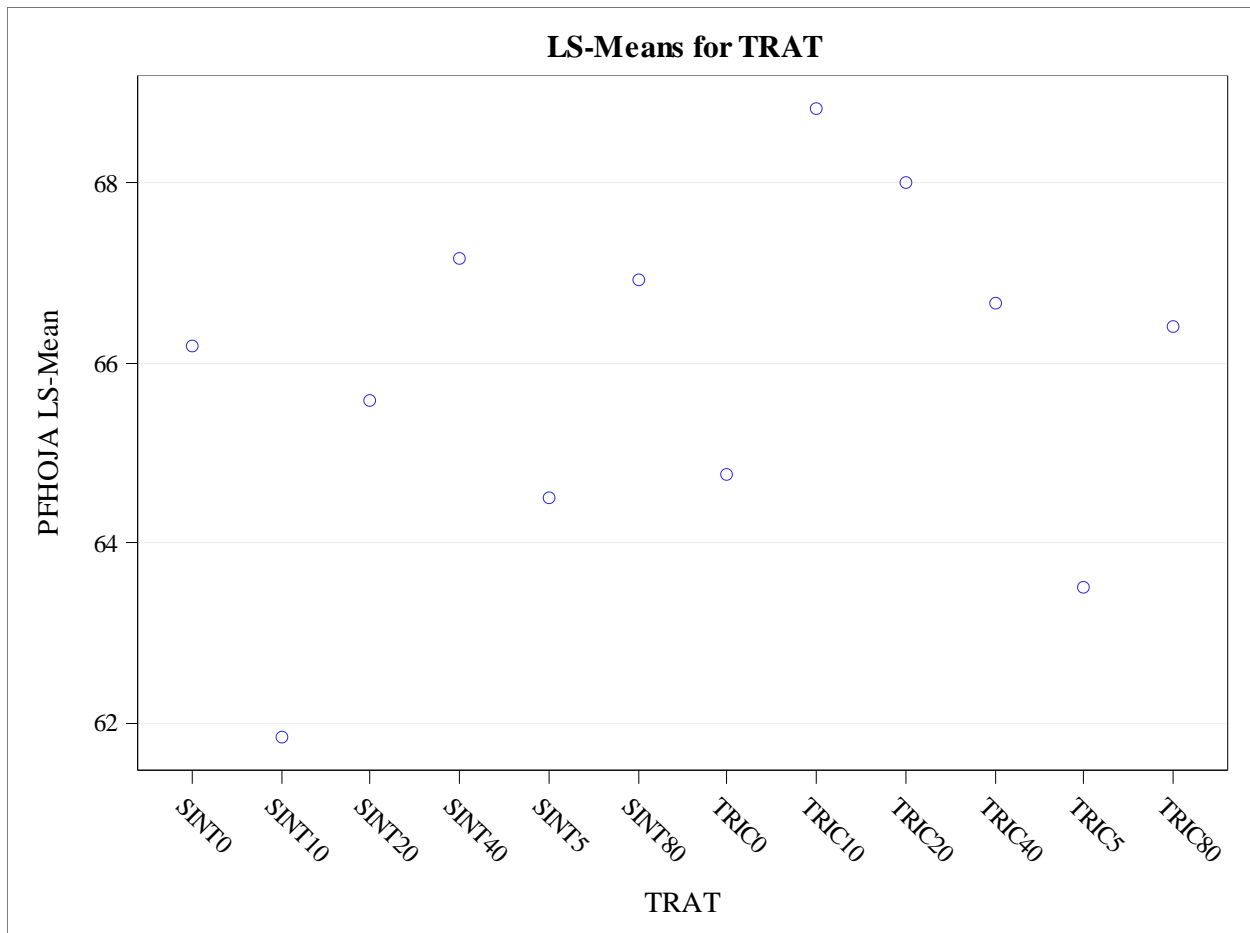
T Comparison Lines for Least Squares Means of TRAT					
LS-means with the same letter are not significantly different.					
			DIATALLO LSMEAN	TRAT	LSMEAN Number
	A		14.01000	TRIC0	7
	A				
B	A		13.65500	SINT0	1
B	A				
B	A	C	13.21667	SINT10	2
B	A	C			
B	A	C	13.14167	SINT5	5
B	A	C			
B	A	C	13.11667	TRIC40	10
B	A	C			
B	A	C	12.90000	SINT20	3
B		C			
B	D	C	12.74167	TRIC80	12
B	D	C			
B	D	C	12.72500	TRIC10	8
	D	C			
	D	C	12.26667	TRIC20	9
	D	C			
	D	C	12.26667	TRIC5	11
	D				
	D		11.54167	SINT40	4
	D				
	D		11.53333	SINT80	6

TRAT	VOLRAIZ LSMEAN
SINT0	79.750000
SINT10	92.083333
SINT20	86.666667
SINT40	90.833333
SINT5	102.541667
SINT80	90.416667
TRIC0	89.750000
TRIC10	110.041667
TRIC20	106.250000
TRIC40	109.166667
TRIC5	100.041667
TRIC80	102.500000



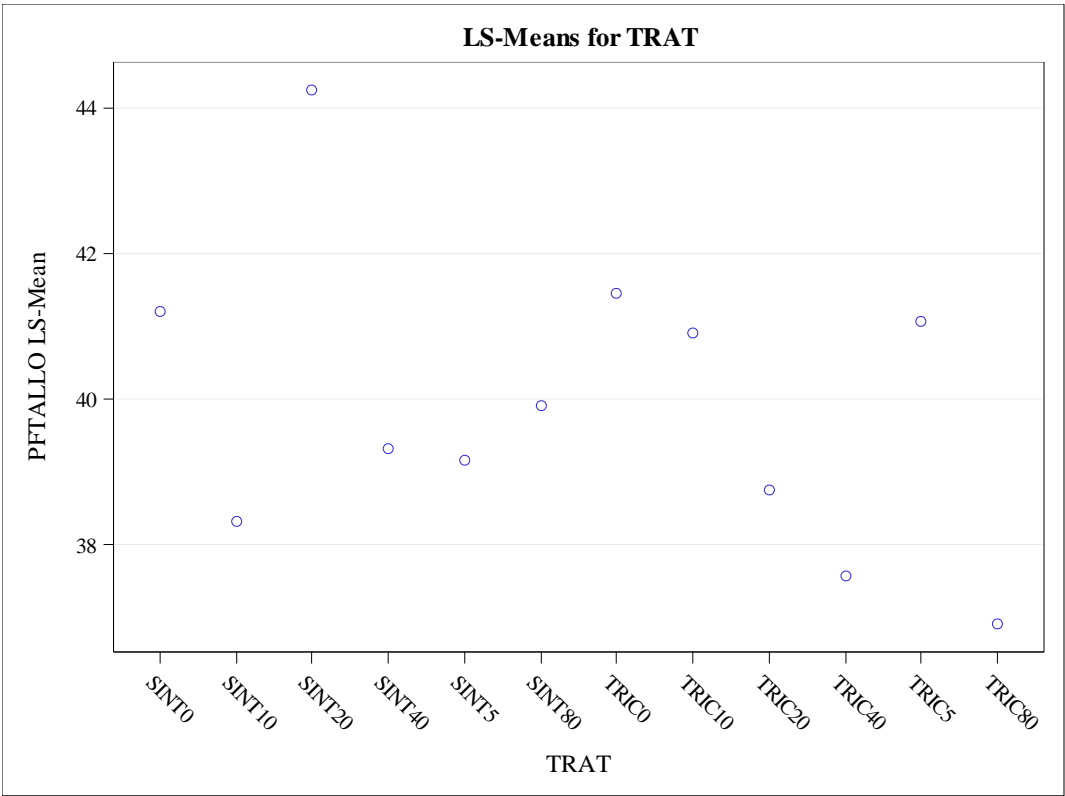
T Comparison Lines for Least Squares Means of TRAT						
LS-means with the same letter are not significantly different.						
				VOLRAIZ LSMEAN	TRAT	LSMEAN Number
		A		110.0417	TRIC10	8
		A				
B		A		109.1667	TRIC40	10
B		A				
B		A	C	106.2500	TRIC20	9
B		A	C			
B		A	C	102.5417	SINT5	5
B		A	C			
B		A	C	102.5000	TRIC80	12
B		A	C			
B		A	C	100.0417	TRIC5	11
B		A	C			
B	D	A	C	92.0833	SINT10	2
B	D	A	C			
B	D	A	C	90.8333	SINT40	4
B	D	A	C			
B	D	A	C	90.4167	SINT80	6
B	D		C			
B	D		C	89.7500	TRIC0	7
	D		C			
	D		C	86.6667	SINT20	3
	D					
	D			79.7500	SINT0	1

TRAT	PFHOJA LSMEAN
SINT0	66.2000000
SINT10	61.8333333
SINT20	65.5833333
SINT40	67.1666667
SINT5	64.5000000
SINT80	66.9166667
TRIC0	64.7500000
TRIC10	68.8333333
TRIC20	68.0000000
TRIC40	66.6666667
TRIC5	63.5000000
TRIC80	66.4166667



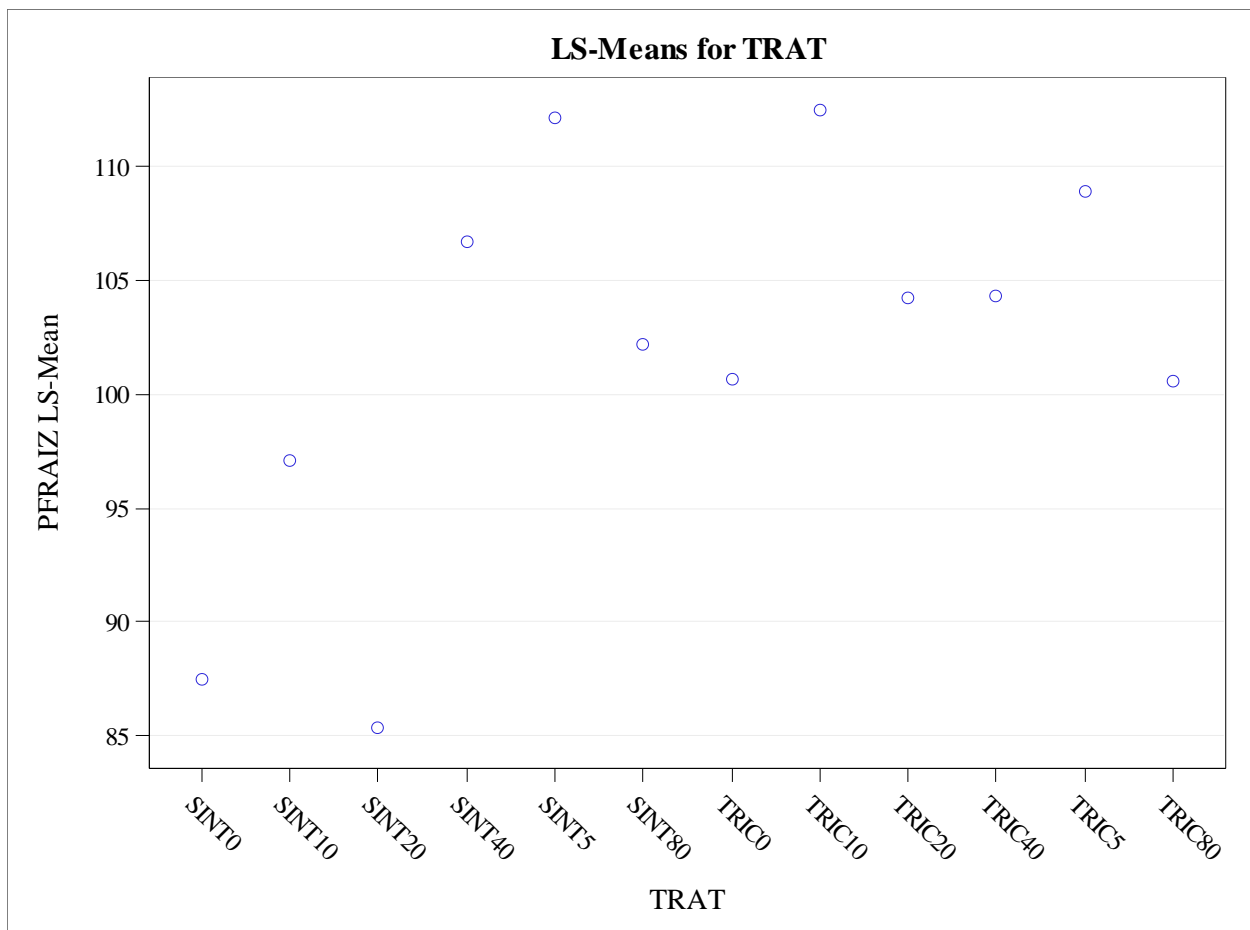
T Comparison Lines for Least Squares Means of TRAT			
LS-means with the same letter are not significantly different.			
	PFHOJA LSMEAN	TRAT	LSMEAN Number
A	68.83333	TRIC10	8
A			
A	68.00000	TRIC20	9
A			
A	67.16667	SINT40	4
A			
A	66.91667	SINT80	6
A			
A	66.66667	TRIC40	10
A			
A	66.41667	TRIC80	12
A			
A	66.20000	SINT0	1
A			
A	65.58333	SINT20	3
A			
A	64.75000	TRIC0	7
A			
A	64.50000	SINT5	5
A			
A	63.50000	TRIC5	11
A			
A	61.83333	SINT10	2

TRAT	PFTALLO LSMEAN
SINT0	41.2000000
SINT10	38.3333333
SINT20	44.2500000
SINT40	39.3333333
SINT5	39.1666667
SINT80	39.9166667
TRIC0	41.4500000
TRIC10	40.9166667
TRIC20	38.7500000
TRIC40	37.5833333
TRIC5	41.0833333
TRIC80	36.9166667



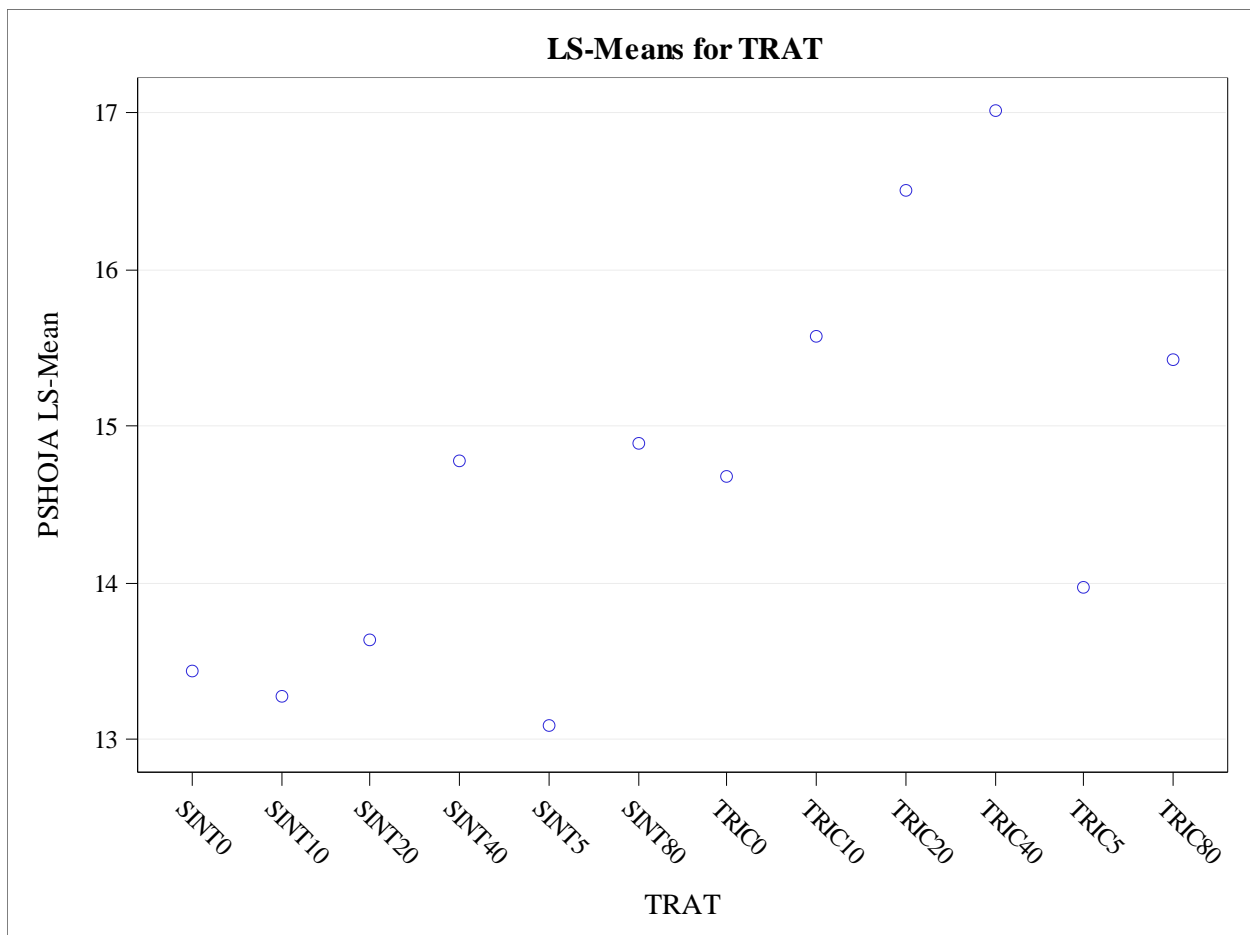
T Comparison Lines for Least Squares Means of TRAT				
LS-means with the same letter are not significantly different.				
		PFTALLO LSMEAN	TRAT	LSMEAN Number
	A	44.25000	SINT20	3
	A			
B	A	41.45000	TRIC0	7
B	A			
B	A	41.20000	SINT0	1
B	A			
B	A	41.08333	TRIC5	11
B	A			
B	A	40.91667	TRIC10	8
B	A			
B	A	39.91667	SINT80	6
B	A			
B	A	39.33333	SINT40	4
B	A			
B	A	39.16667	SINT5	5
B	A			
B	A	38.75000	TRIC20	9
B	A			
B	A	38.33333	SINT10	2
B				
B		37.58333	TRIC40	10
B				
B		36.91667	TRIC80	12

TRAT	PFRAIZ LSMEAN
SINT0	87.500000
SINT10	97.083333
SINT20	85.333333
SINT40	106.666667
SINT5	112.166667
SINT80	102.166667
TRIC0	100.650000
TRIC10	112.500000
TRIC20	104.250000
TRIC40	104.333333
TRIC5	108.916667
TRIC80	100.583333



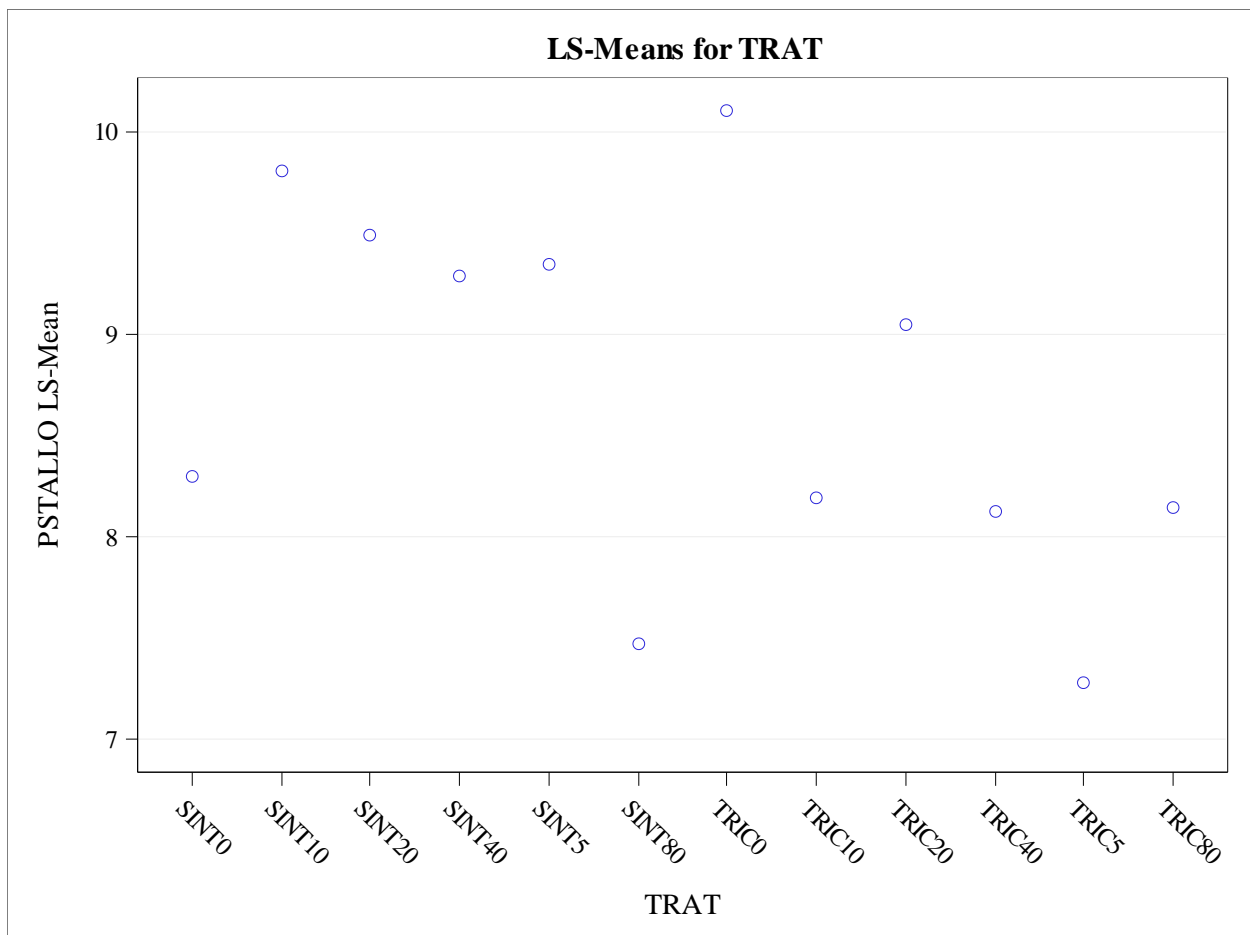
T Comparison Lines for Least Squares Means of TRAT				
LS-means with the same letter are not significantly different.				
		PFRAIZ LSMEAN	TRAT	LSMEAN Number
	A	112.5000	TRIC10	8
	A			
	A	112.1667	SINT5	5
	A			
	A	108.9167	TRIC5	11
	A			
	A	106.6667	SINT40	4
	A			
B	A	104.3333	TRIC40	10
B	A			
B	A	104.2500	TRIC20	9
B	A			
B	A	102.1667	SINT80	6
B	A			
B	A	100.6500	TRIC0	7
B	A			
B	A	100.5833	TRIC80	12
B	A			
B	A	97.0833	SINT10	2
B				
B		87.5000	SINT0	1
B				
B		85.3333	SINT20	3

TRAT	PSHOJA LSMEAN
SINT0	13.4335000
SINT10	13.2750000
SINT20	13.6391667
SINT40	14.7733333
SINT5	13.0933333
SINT80	14.8875000
TRIC0	14.6795000
TRIC10	15.5741667
TRIC20	16.5016667
TRIC40	17.0141667
TRIC5	13.9733333
TRIC80	15.4275000



T Comparison Lines for Least Squares Means of TRAT						
LS-means with the same letter are not significantly different.						
				PSHOJA LSMEAN	TRAT	LSMEAN Number
		A		17.01417	TRIC40	10
		A				
B		A		16.50167	TRIC20	9
B		A				
B		A	C	15.57417	TRIC10	8
B		A	C			
B	D	A	C	15.42750	TRIC80	12
B	D		C			
B	D	E	C	14.88750	SINT80	6
B	D	E	C			
B	D	E	C	14.77333	SINT40	4
	D	E	C			
	D	E	C	14.67950	TRIC0	7
	D	E	C			
	D	E	C	13.97333	TRIC5	11
	D	E				
	D	E		13.63917	SINT20	3
		E				
		E		13.43350	SINT0	1
		E				
		E		13.27500	SINT10	2
		E				
		E		13.09333	SINT5	5

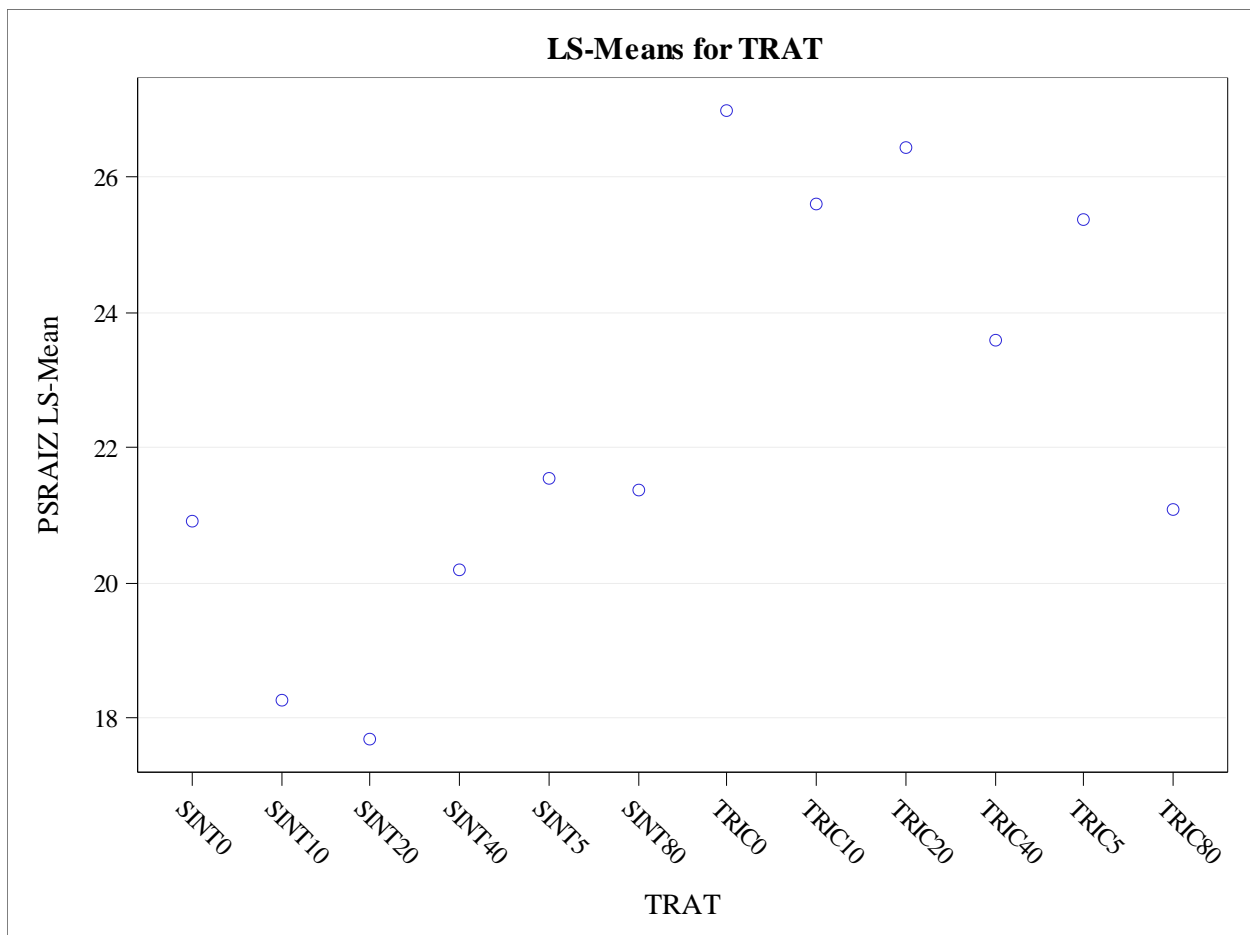
TRAT	PSTALLO LSMEAN
SINT0	8.2930000
SINT10	9.8075000
SINT20	9.4908333
SINT40	9.2825000
SINT5	9.3441667
SINT80	7.4733333
TRIC0	10.1030000
TRIC10	8.1916667
TRIC20	9.0425000
TRIC40	8.1208333
TRIC5	7.2766667
TRIC80	8.1400000



T Comparison Lines for Least Squares Means of TRAT				
LS-means with the same letter are not significantly different.				
		PSTALLO LSMEAN	TRAT	LSMEAN Number
	A	10.103000	TRIC0	7
	A			
	A	9.807500	SINT10	2
	A			
B	A	9.490833	SINT20	3
B	A			
B	A	9.344167	SINT5	5
B	A			
B	A	9.282500	SINT40	4
B	A			
B	A	9.042500	TRIC20	9
B	A			
B	A	8.293000	SINT0	1
B	A			
B	A	8.191667	TRIC10	8
B	A			
B	A	8.140000	TRIC80	12
B	A			
B	A	8.120833	TRIC40	10
B				
B		7.473333	SINT80	6
B				
B		7.276667	TRIC5	11

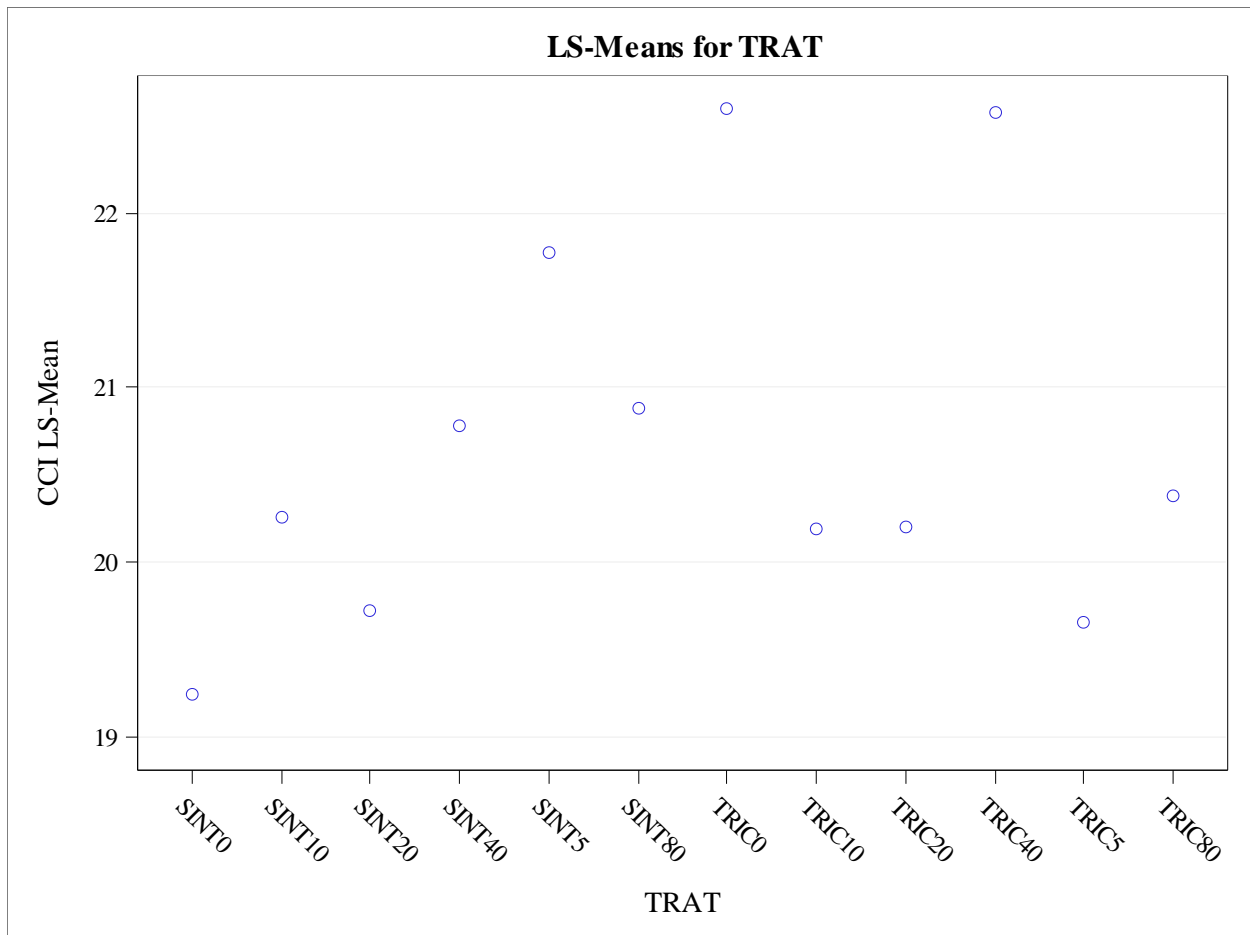
**The LINES display does not reflect all significant comparisons.
The following additional pairs are significantly different: (7,1)**

TRAT	PSRAIZ LSMEAN
SINT0	20.9059000
SINT10	18.2808333
SINT20	17.6900000
SINT40	20.1933333
SINT5	21.5575000
SINT80	21.3783333
TRIC0	26.9915000
TRIC10	25.5983333
TRIC20	26.4408333
TRIC40	23.5908333
TRIC5	25.3866667
TRIC80	21.0808333



T Comparison Lines for Least Squares Means of TRAT					
LS-means with the same letter are not significantly different.					
			PSRAIZ LSMEAN	TRAT	LSMEAN Number
	A		26.99150	TRIC0	7
	A				
	A		26.44083	TRIC20	9
	A				
B	A		25.59833	TRIC10	8
B	A				
B	A		25.38667	TRIC5	11
B	A				
B	A	C	23.59083	TRIC40	10
B		C			
B	D	C	21.55750	SINT5	5
B	D	C			
B	D	C	21.37833	SINT80	6
B	D	C			
B	D	C	21.08083	TRIC80	12
	D	C			
	D	C	20.90590	SINT0	1
	D	C			
	D	C	20.19333	SINT40	4
	D				
	D		18.28083	SINT10	2
	D				
	D		17.69000	SINT20	3

TRAT	CCI LSMEAN
SINT0	19.2430000
SINT10	20.2550000
SINT20	19.7241667
SINT40	20.7866667
SINT5	21.7758333
SINT80	20.8858333
TRIC0	22.5970000
TRIC10	20.1975000
TRIC20	20.2033333
TRIC40	22.5775000
TRIC5	19.6591667
TRIC80	20.3833333



T Comparison Lines for Least Squares Means of TRAT						
LS-means with the same letter are not significantly different.						
				CCI LSMEAN	TRAT	LSMEAN Number
		A		22.59700	TRIC0	7
		A				
B		A		22.57750	TRIC40	10
B		A				
B		A	C	21.77583	SINT5	5
B		A	C			
B	D	A	C	20.88583	SINT80	6
B	D	A	C			
B	D	A	C	20.78667	SINT40	4
B	D	A	C			
B	D	A	C	20.38333	TRIC80	12
B	D		C			
B	D		C	20.25500	SINT10	2
B	D		C			
B	D		C	20.20333	TRIC20	9
B	D		C			
B	D		C	20.19750	TRIC10	8
	D		C			
	D		C	19.72417	SINT20	3
	D		C			
	D		C	19.65917	TRIC5	11
	D					
	D			19.24300	SINT0	1