



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

## **INTERACCIÓN DE ACTINOBACTERIAS Y PLANTAS DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) CULTIVADO EN LOS VALLES ALTOS DE MÉXICO**

MARIANA GUADALUPE SÁNCHEZ ALONSO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2021

La presente tesis titulada: **Interacción de actinobacterias y plantas de trigo (*Triticum aestivum*) cultivado en los Valles Altos de México**, realizada por la alumna: **Mariana Guadalupe Sánchez Alonso**, 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  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
FISIOLOGÍA VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



---

DR. SERAFÍN CRUZ IZQUIERDO

ASESORA



---

DRA. PATRICIA RIVAS VALENCIA

ASESOR



---

DR. VÍCTOR HEBER AGUILAR RINCÓN

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Septiembre 2021.

# INTERACCIÓN DE ACTINOBACTERIAS Y PLANTAS DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) CULTIVADO EN LOS VALLES ALTOS DE MÉXICO

Mariana Guadalupe Sánchez Alonso, M.C.  
Colegio de Postgraduados, 2021

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar el potencial de actinobacterias como agentes antagónicos de patógenos presentes en trigo (semillas, hojas y raíz) producido en los Valles Altos de México, y evaluar el potencial como promotores de crecimiento. Los resultados mostraron el potencial como herramienta en el manejo integral en el cultivo de trigo. Se identificaron a los géneros *Alternaria*, *Bipolaris*, *Fusarium* y *Puccinia* en 136 muestras foliares de diferentes unidades productivas ubicadas en los Valles Altos de México. Los bioensayos preliminares se realizaron *in vitro* a 27 °C con 144 morfotipos de actinobacterias. Se comprobó que al menos tres morfotipos de actinobacterias inhiben el crecimiento micelial en un rango de 42.5 – 66.87 %, diferencialmente en las tres especies del género *Fusarium* estudiadas. En cuanto al potencial como pretratamiento para disminuir el porcentaje de contaminación, las actinobacterias redujeron la incidencia de *Fusarium* spp. y *Alternaria* spp., en semillas provenientes de sistemas de temporal, sin afectar significativamente el porcentaje de germinación (37.5 % incidencia y del 60 a 90 % en germinación). Sin embargo, la exposición prolongada (mayores a 12 h) de semillas a actinobacterias produjo un efecto de inhibición en la germinación reduciendo este valor hasta 0. Otros efectos se observaron en el crecimiento de la planta, principalmente como promotores de crecimiento ya que presentaron los valores máximos en diferentes variables como pesos secos de la planta, raíz, foliar, altura de la planta, contenido de clorofila, área foliar e índice de área foliar.

Los experimentos se analizaron como diseño completamente al azar, con análisis de varianza ( $p \leq 0.05$ ) y prueba de medias (Tukey  $p \leq 0.05$ ) encontrando diferencias significativas en el crecimiento de plantas testigo, inoculadas con *Fusarium* spp. y aquellas que fueron inoculadas con los morfotipos M1BM33 Y M2BM60.

**Palabras clave:** antagonismo, trigo, *in vitro*, invernadero, germinación, manchas foliares.

# INTERACTION OF ACTINOBACTERIA AND WHEAT PLANTS (*Triticum aestivum* L.) CULTIVATED IN THE HIGH VALLEYS OF MEXICO

Mariana Guadalupe Sánchez Alonso, M.C.  
Colegio de Postgraduados, 2021

## ABSTRACT

The objective of the present work was to determine the potential of actinobacteria as antagonistic agents of pathogens present in wheat (seeds, leaves and roots) produced in the High Valleys of Mexico, and to evaluate their potential as growth promoters. The results showed the potential as a tool in the integral management of wheat cultivation. The genera *Alternaria*, *Bipolaris*, *Fusarium* and *Puccinia* were identified in 136 foliar samples from different productive units located in the High Valleys of Mexico. Preliminary bioassays were performed in vitro at 27 ° C with 144 actinobacteria morphotypes. At least three actinobacterial morphotypes were found to inhibit mycelial growth in a range of 42.5 - 66.87%, differentially in the three species of the genus *Fusarium* studied. Regarding the potential as a pretreatment to reduce the percentage of contamination, actinobacteria reduced the incidence of *Fusarium* spp. and *Alternaria* spp., in seeds from rainfed systems, without significantly affecting the germination percentage (37.5% incidence and 60 to 90% germination). However, prolonged exposure (greater than 12 h) of seeds to actinobacteria produced an inhibiting effect on germination, reducing this value to 0. Other effects were observed in plant growth, mainly as growth promoters since they presented the maximum values in different variables such as dry weights of the plant, root, foliar, plant height, chlorophyll content, foliar area and leaf area index.

The experiments were analyzed as a completely randomized design, with analysis of variance ( $p \leq 0.05$ ) and test of means (Tukey  $p \leq 0.05$ ), finding significant differences in the growth of control plants, inoculated with *Fusarium* spp. and those that were inoculated with the M1BM33 and M2BM60 morphotypes.

**Keywords:** antagonism, wheat, in vitro, greenhouse, germination, leaf spots.

## **DEDICATORIA**

Les dedico este trabajo a mis padres, por creer en mí y estar siempre presente en cada paso que doy.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación se realizó con el apoyo económico y académico de COMECyT, el Colegio de Postgraduados y el Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria, por lo que agradezco la oportunidad que me brindaron para crecer académicamente.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo y a mi Programa en Recursos Genéticos y Productividad- Fisiología Vegetal, por hacerme parte de su comunidad y ponerme a mi disposición todo el acervo académico necesario para mi formación.

Dra. Patricia Rivas Valencia, le agradezco su paciencia, el infinito apoyo académico y moral que me ha dado a lo largo de mi camino y por orientarme hacia el emocionante mundo de la investigación agrícola, incluso antes de ingresar a la maestría, motivándome pese a las dificultades que se presentaron.

Dr. Serafín Cruz Izquierdo y Dr. V. Heber Aguilar Rincón, les agradezco su paciencia, su apoyo incondicional y orientación en el Colegio de Postgraduados, al igual que el tiempo que han dedicado al presente trabajo.

Dra. Leticia Rodríguez, gracias por compartirme sus conocimientos, asesorarme en los experimentos y mostrarme diferentes perspectivas de trabajo, además de siempre tratarme con amabilidad y respeto.

A la Dra. M. Florencia Rodríguez por su apoyo en la realización de los experimentos dentro de las instalaciones del LANARET.

A mis padres y mi hermana M. Columba S., por apoyarme en mis decisiones, ayudarme en los momentos difíciles y por enseñarme la importancia desarrollarme profesionalmente sin olvidar los valores que desde niña me han inculcado.

A mi amigo, compañero y pareja Mario Torres, por motivarme a ser mejor persona, por ayudarme cuando lo necesitaba y por no dejarme rendir en los momentos difíciles.

A mis amigos Alehí, Daniel y Fabián, por estar al pendiente de mí en todo momento y por su apoyo en momentos de estrés.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	iii
ABSTRACT .....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE CUADROS .....	xi
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
3.1 Crecimiento y desarrollo de plantas de trigo ( <i>T. aestivum</i> L.).....	3
3.1.1 Plagas y enfermedades de trigo .....	4
3.2 Importancia del trigo en México.....	4
3.2.1 Principales enfermedades del trigo .....	5
3.2.2 <i>Bipolaris</i> spp. y <i>Alternaria</i> spp.....	5
3.2.3 <i>Fusarium</i> spp. ....	6
3.2.4 <i>Septoria</i> y <i>Zymoseptoria</i> spp. ....	8
3.3 Métodos alternativos de control de enfermedades: Actinobacterias.....	10
3.3.1 Diversidad e identificación .....	10
3.3.2 Importancia agrícola .....	13
IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
4.1 Hongos .....	16
4.1.1 Muestreo .....	16
4.1.2 Procesamiento de muestras .....	16
4.1.3 Aislamiento e incremento del patógeno .....	16
4.2 Actinobacterias.....	17
4.2.1 Selección de actinobacterias .....	17
4.2.2 Calidad de semilla: fitosanidad .....	18
4.2.3 Calidad de semilla: Germinación .....	19
4.2.4 Efecto en el crecimiento y desarrollo de plantas .....	20
V. RESULTADOS.....	22
5.1 Aislamiento e identificación de patógenos.....	22
5.1.1 Identificación morfológica.....	22

5.1.2 Incidencia de enfermedades .....	33
5. 2 Efectos de actinobacterias.....	34
5.2.1 Selección de actinobacterias: Bioensayos preliminares .....	35
5.2.2 Selección de actinobacterias: Confrontación dual .....	46
5.2.3 Calidad de semilla: fitosanidad .....	62
5.2.4 Calidad de semilla: Germinación .....	65
5.2.5 Efecto en el crecimiento de plantas .....	68
VI. DISCUSIÓN.....	79
VII. CONCLUSIONES .....	86
VIII. LITERATURA CITADA .....	87



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas y signos de <i>Alternaria alternata</i> y <i>Bipolaris sorokiniana</i> .....	6
Figura 2. Escala de daño causado por <i>Fusarium</i> spp., en plántulas de maíz. ....	7
Figura 3. Estructuras de referencia para la identificación de <i>Fusarium</i> spp.....	8
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Z. tritici</i> en trigo. ....	9
Figura 5. Distribución mundial de <i>Septoria</i> spp. que afectan al trigo. ....	9
Figura 6. Árbol filogenético de diferentes especies de actinobacterias.....	11
Figura 7. Esquema de aislamiento e identificación de actinobacterias. ....	12
Figura 8. Diversidad morfológica de algunas Actinobacterias.....	13
Figura 9. Atizonamiento en hoja de trigo causado por <i>Alternaria</i> spp.....	22
Figura 10. Conidios y micelio de <i>Alternaria</i> spp. ....	23
Figura 11. Colonias de <i>Alternaria</i> spp en diferentes medios de cultivos.....	24
Figura 12. Tizón de la hoja de trigo.....	25
Figura 13. Estructuras de <i>Bipolaris</i> spp.. ....	25
Figura 14. Colonias de <i>Bipolaris</i> spp. en diferentes medios de cultivos.....	26
Figura 15. Características de <i>Fusarium</i> spp.. ....	27
Figura 16. Estructuras morfológicas de la primera cepa aislada.....	27
Figura 17. Estructuras morfológicas de la segunda cepa aislada. ....	27
Figura 18. Colonias de <i>Fusarium</i> spp. en diferentes medios de cultivo.. ....	29
Figura 19. Pústulas de roya.. ....	29
Figura 20. Esporas de <i>P. recondita</i> .....	30
Figura 21. Esporas de <i>P. striiformis</i> . ....	30
Figura 22. Síntomas del género <i>Zymoseptoria</i> spp.....	31
Figura 23. Muestra observada en microscopio estéreo a 25x.....	32
Figura 24. Colonias de <i>Septoria</i> spp. y <i>Zymoseptoria</i> spp.....	32
Figura 25. Porcentaje de incidencia de géneros fúngicos por estado. ....	34
Figura 26. Colonia de <i>Alternaria</i> spp.....	37
Figura 27. Colonia de <i>B. sorokiniana</i> .. ....	40
Figura 28. Colonia de <i>B. sorokiniana</i> . ....	41
Figura 29. Colonia de <i>Fusarium</i> spp.. ....	44
Figura 30. Colonia de <i>Fusarium</i> spp. ....	46

Figura 31. Colonia de <i>Fusarium</i> spp. clave 31b.....	51
Figura 32. Colonia de <i>Fusarium</i> spp. clave 62b.....	56
Figura 33. Colonia de <i>F. proliferatum</i> .....	61
Figura 34. Semillas contaminadas. ....	62
Figura 35. Efectividad de técnicas de desinfestación de semillas de trigo.....	64
Figura 36. Comparación del tratamiento más efectivo y el testigo. ....	65
Figura 37. Efecto en semilla de trigo al estar expuestos a M1B M4 a diferentes periodos. ....	67
Figura 38. Peso seco de la planta, raíz y hojas. ....	69
Figura 39. Pesos secos de planta, raíz y hojas por tratamientos. ....	71
Figura 40. Variables foliares de altura, clorofila y área foliar de acuerdo a la variedad. ....	73
Figura 41. Variables foliares de acuerdo a los organismos inoculados.....	75
Figura 42. Índice de Área Foliar de 49 dds por variedad. ....	77
Figura 43. Índice de Área Foliar durante 49 dds por tratamiento. ....	78
Figura 44. Temperatura máxima, promedio y mínima registrados durante la realización del experimento en invernadero.....	85
Figura 45. Humedad máxima, promedio y mínima registrados durante la realización del experimento en invernadero.....	85
Figura 46. Referencia de temperatura y humedad registrada durante la realización del experimento en invernadero.....	86

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Especificación de los diferentes tratamientos.....	18
Cuadro 2. Continuación de especificación de los diferentes tratamientos. ....	19
Cuadro 3. Especificación de los diferentes tratamientos.....	19
Cuadro 4. Continuación de especificación de los diferentes tratamientos. ....	20
Cuadro 5. Tratamientos por variedad de trigo y la interacción con microorganismos. .....	21
Cuadro 6. Frecuencia de los géneros fúngicos identificados en los Valles Altos de México.....	33
Cuadro 7. Porcentaje de incidencia de los géneros identificados por estado. ....	34
Cuadro 8. Crecimiento radial y porcentaje de inhibición de morfotipos del grupo M1B con <i>Alternaria</i> spp. de trigo a los 5 días después de la inoculación.....	35
Cuadro 9. Crecimiento radial y porcentaje de inhibición de morfotipos del grupo M2B con <i>Alternaria</i> spp. a los 5 días después de la inoculación.....	36
Cuadro 10. Morfotipos con potencial al control de <i>Alternaria</i> spp. ....	37
Cuadro 11. Crecimiento radial y porcentaje de inhibición de morfotipos del grupo M1B con <i>B. sorokiniana</i> a los 5 días después de la inoculación. ....	38
Cuadro 12. Crecimiento radial y porcentaje de inhibición de morfotipos del grupo M2B, con <i>B. sorokiniana</i> a los 5 días después de la inoculación. ....	39
Cuadro 13. Morfotipos con potencial al control de <i>Bipolaris</i> spp.....	40
Cuadro 14. Crecimiento micelial y porcentaje de inhibición de <i>B. sorokiniana</i> con morfotipos seleccionados.....	41
Cuadro 15. Crecimiento radial y porcentaje de inhibición de morfotipos por grupo. ....	42
Cuadro 16. Crecimiento radial y porcentaje de inhibición de morfotipos del grupo M2B con <i>Fusarium</i> spp. de trigo a los 3 días después de la inoculación. ....	43
Cuadro 17. Actinobacterias seleccionadas en el ensayo de <i>Fusarium</i> spp. ....	45
Cuadro 18. Crecimiento micelial y PICM de los diferentes morfotipos de acuerdo a su grupo de evaluación. ....	45
Cuadro 19. Tasa de crecimiento micelial de <i>Fusarium</i> spp. Clave 31 b.....	46
Cuadro 20. Área bajo la curva del crecimiento micelial de <i>Fusarium</i> spp. clave 31 b. ....	50

Cuadro 21. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Fusarium</i> spp.....	51
Cuadro 22. Tasa de crecimiento de la cepa de <i>Fusarium</i> spp. clave 62 b.....	52
Cuadro 23. Área bajo la curva del crecimiento micelial de <i>Fusarium</i> spp. 62 b.....	55
Cuadro 24. Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de siete morfotipos. ....	56
Cuadro 25. Tasa de crecimiento del hongo <i>F. proliferatum</i> con siete actinobacterias. .....	57
Cuadro 26. Área bajo de la curva de la tasa de crecimiento de <i>F. proliferatum</i> .....	60
Cuadro 27. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de morfotipos seleccionados en los bioensayos.....	61
Cuadro 28. Porcentaje de contaminación y el efecto en el porcentaje de germinación.....	63
Cuadro 29. Efecto en la germinación de semillas de trigo de acuerdo al tiempo de exposición. ....	66
Cuadro 30. Peso seco de la planta, raíz y foliar de acuerdo a la variedad y al organismo inoculado. ....	68
Cuadro 31. Peso seco de la planta, raíz y hojas por variedad. ....	69
Cuadro 32. Pesos secos de planta, raíz y hojas de trigo por morfotipo inoculado. ....	70
Cuadro 33. Altura, medición de clorofila y área foliar de acuerdo con la variedad y el organismo con el que fue inoculado.....	72
Cuadro 34. Altura, medición de clorofila y área foliar de acuerdo con la variedad.....	73
Cuadro 35. Variables foliares de acuerdo a los organismos inoculados.....	74
Cuadro 36. Índice del área foliar de cinco registros de datos durante 49 dds de acuerdo a la variedad y tratamiento aplicado.....	76
Cuadro 37. Índice de área foliar de 49 dds de acuerdo con la variedad. ....	77
Cuadro 38. Índice de Área Foliar de 49 dds.....	78
Cuadro 39. Comparación de los patógenos aislados y lo reportado en la literatura. ....	80
Cuadro 40. Resumen.....	84

## I. INTRODUCCIÓN

El rendimiento agronómico de las plantas es el resultado del crecimiento y desarrollo de las mismas, en estos procesos fisiológicos hay inversión de energía y nutrientes, que se transforman y almacenan en órganos de reserva, que generalmente son producidos en estructuras definidas de la planta; como lo son las hojas, tallos y raíces. Las hojas por medio de la fotosíntesis generan energía química, los tallos son el soporte físico, la raíz es la que permite un adecuado anclaje de la planta junto con una absorción de agua y minerales (Taiz y Zeiger, 2006).

Cada estructura es afectada por factores ambientales (abióticos o bióticos) que limitan el crecimiento y desarrollo de las plantas. La FAO (2001) menciona que las plagas y enfermedades son los factores que influyen directamente en la cantidad y calidad de la producción de cultivos, por ello, es importante no subestimar el impacto de enfermedades, específicamente de origen fúngico ya que son los patógenos más abundantes (Agrios, 2005).

En estudios previos de la raíz, se ha encontrado el control de hongos edáficos de diferente género como *Fusarium* spp., *Phymatotrichum* sp. y *Rhizoctonia* sp., y de oomicetos como *Phytophthora* sp. y *Pythium* spp., priorizados en su estudio por su “amplio rango de plantas hospedantes que atacan a su distribución cosmopolita y a los daños económicos que provocan en cultivos de importancia económica” (Rodríguez, 2001).

En trigo (*Triticum aestivum* L.) “la presencia de las enfermedades conocidas como manchas foliares, tizones y roña de la espiga se manifiestan debido a los cambios de clima”, condiciones que se presentan en el temporal de los Valles Altos de México (México, Puebla, Tlaxcala, Hidalgo) al igual que en Michoacán y Jalisco (Villaseñor y Espitia, 2000). Dichas enfermedades comprenden a agentes patógenos que pertenecen a los géneros *Septoria* spp. (incluyendo al nuevo género *Zymoseptoria*), *Helminthosporium* spp. (syn. *Bipolaris sorokiniana*) y *Fusarium* spp. (Villaseñor y Espitia, 2000). Todos reducen considerablemente la producción de trigo: *Bipolaris sorokiniana*

puede provocar la pérdida hasta el 50 % del rendimiento (Lozano-Ramírez *et al.*, 2006), *Fusarium* spp. tiene registros de causar pérdidas hasta del 60 % (Pereyra y Dill-Macky, 2010) y *Septoria* (incluyendo *Zymoseptoria tritici*) puede provocar una reducción hasta del 30 al 40 % (Eyal *et al.*, 1987).

Por otro lado, no sólo se encuentran organismos patógenos en el ambiente, sino también benéficos, la alteración en el equilibrio de estos dos organismos puede determinar la expresión o represión de una enfermedad. Un ejemplo de los organismos que pueden favorecer el control de enfermedades son las actinobacterias, consideradas como organismos que participan en la descomposición de la materia orgánica y de propiedades antagónicas contra hongos fitopatógenos (Evangelista *et al.*, 2017). Las actinobacterias o actinomicetos, como también se les conoce (Macagnan *et al.*, 2006; Barka *et al.*, 2016; Rodríguez-Villareal *et al.*, 2014), son bacterias gram-positivas filamentosas o con la habilidad de formar hifas ramificadas en alguna etapa de su desarrollo. En algunos casos, también esporulan como mecanismo de reproducción (por ello este phylum se consideró como organismos de transición entre hongos y bacterias) (Barka *et al.*, 2016; Goodfellow y Williams, 1983). El hábitat más dominante de las actinobacterias es el suelo, desde la superficie hasta a una profundidad de 2 m, por lo que tiene sentido que la colonización sea de manera natural en la raíz de las plantas, siendo agentes probióticos potenciales de las mismas (Salwan y Sharma, 2018; Bulgarelli *et al.*, 2013). Específicamente existe una fitoestimulación por parte de la actinobacteria ayudando a la planta en: 1) absorción de los nutrientes como C, H, N, O, P y algunos micronutrientes, 2) producción de fitohormonas (auxinas, citoquininas y giberelinas) y 3) producción de enzimas (por ejemplo, 1-aminociclopropano-1-carboxilasa) (Hazarika y Thakur, 2020). Las características anteriormente mencionadas, contribuyen de forma benéfica, no obstante, existe una alta especificidad de las actinobacterias, las especies que funcionan como antagónicas en un cultivo, pueden ser patogénicas para otros (Emmert y Handelsman, 1999; Glick, 1995); motivo por el cual es importante hacer una correcta identificación y estudio de las especies de actinobacterias y de esta manera aprovechar el potencial benéfico de los actinomicetos.

## II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Los objetivos del presente trabajo fueron identificar y caracterizar los patógenos de trigo con mayor incidencia en el Valle de México, para así evaluar el potencial de actinobacterias como medio alternativo en el control de dichos patógenos, al igual que analizar el potencial de las actinobacterias como promotores de crecimiento en variedades de trigo (semillas y plantas) cultivados en los Valles Altos de México.

La hipótesis formulada fue que las actinobacterias promoverían el desarrollo de las plántulas de trigo y disminuiría el crecimiento micelial de *Alternaria* spp., *Bipolaris* spp., *Fusarium* spp., *Septoria* sp. y *Zymoseptoria* spp. en condiciones de invernadero e *in vitro*, respectivamente.

## III. REVISIÓN DE LITERATURA

### 3.1 Crecimiento y desarrollo de plantas de trigo (*T. aestivum* L.)

La fisiología vegetal es la ciencia que estudia las respuestas de los organismos vegetales, o partes vivas de los mismos, frente a agentes externos o internos variables (Barceló *et al.*, 2019). Parte de esas respuestas se trata de procesos de crecimiento y desarrollo, los cuales involucran una serie de cambios catalizados por reguladores de crecimiento. Por otra parte Mohr (1995), menciona que el crecimiento de los diferentes órganos de las plantas, es un proceso fisiológico complejo, dependiente de la fotosíntesis, la respiración, la división celular, la elongación, la diferenciación, entre otros procesos bioquímicos, mismos que son influenciados por la temperatura, intensidad de luz, densidad de población, calidad de la semilla, variación genética, disponibilidad de agua y de nutrientes, y cualquier condición ambiental que influya en la relación planta-suelo-atmósfera (Barrera *et al.*, 2010).

Existe una inversión de energía y nutrientes que generalmente son aportados por estructuras definidas de la planta, como lo son las hojas, tallos y raíces. Las hojas por medio de la fotosíntesis generan energía química, los tallos son de soporte físico, y

finalmente, la raíz es la que permite un adecuado anclaje de la planta junto con la absorción de agua y minerales (Taiz y Zeiger, 2006).

### **3.1.1 Plagas y enfermedades de trigo**

Las plagas y enfermedades tienen un efecto directo en la cantidad y calidad del producto cultivado (FAO, 2001), lo que se traduce en términos económicos como un menor ingreso monetario para el productor agrícola. En el caso de las enfermedades se considera que existen tres elementos importantes que determinan la expresión de un patógeno, estos son: 1 ) la planta hospedante, 2) el organismo patógeno y 3) el ambiente (Zadoks y Schein, 1980); aunque cada elemento es complejo en sí mismo, como los patógenos específicamente en los hongos ya que presentan una gran diversidad e impacto en la producción agrícola, con aproximadamente 8,000 especies (los que ocasionan cerca de 80,000 enfermedades), mientras que en bacterias se registran 200 especies, 75 micoplasmas, más de 500 virus y más de 500 especies de nematodos (Agrios, 2005).

Atendiendo la gran diversidad de hongos que existen, se puede clasificar de acuerdo al hábitat en el que se encuentran y realizan su ciclo de vida, como los hongos edáficos, que son de vital importancia considerando los daños que causan en la raíz de las plantas. En especial los hongos que pertenecen al género *Fusarium* spp., *Phymatotrichum* spp. y *Rhizoctonia* spp., o también de oomicetos como *Phytophthora* spp. y *Pythium* spp., priorizados en su estudio por su amplio rango de plantas hospedantes que atacan su distribución cosmopolita y a los elevados daños económicos que provocan en cultivos de importancia económica (Rodríguez, 2001).

### **3.2 Importancia del trigo en México**

Los principales cultivos a nivel nacional corresponden a maíz (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum vulgare*) y trigo (*Triticum aestivum*) por su importancia e impacto socioeconómico. De acuerdo con el resumen nacional del 2019, la superficie destinada a la producción agrícola fue de 3.5 millones de ha, de los cuales el 36 % fue utilizada para la producción maíz, el 24 % a sorgo y el 15 % a la producción de trigo con medio millón de ha y un rendimiento promedio de 6 t.ha<sup>-1</sup> (SIAP, 2020).



### 3.2.1 Principales enfermedades del trigo

“La presencia de las enfermedades del trigo conocidas como manchas foliares, tizones y roña de la espiga se manifiestan con los cambios de clima” condiciones que se presentan en el temporal de “los Valles Altos de México” (Estado de México, Puebla, Tlaxcala e Hidalgo) al igual que Michoacán y Jalisco. Los principales agentes patógenos causantes de las manchas foliares en trigo pertenecen a los géneros *Septoria* (incluyendo al ahora reclasificado *Zymoseptoria tritici*), *Helminthosporium* (syn. *Drechslera tritici-repentis*) y *Fusarium* (Villaseñor y Espitia, 2000). Todos reducen considerablemente la producción de trigo: *Bipolaris sorokiniana* a pesar de ser reconocida como un patógeno débil, puede provocar la pérdida hasta el 50 % del rendimiento (Lozano-Ramírez *et al.*, 2006), *Fusarium* spp. con registros de causar pérdidas del 60 % (Velázquez y Formento, 2012) y *Septoria* (incluyendo *Z. tritici*) puede provocar una reducción del 30 al 40 % (Eyal *et al.*, 1987).

### 3.2.2 *Bipolaris* spp. y *Alternaria* spp.

*Bipolaris sorokiniana* ha sido reportada como agente causal de la mancha borrosa en trigo, no obstante, también se encuentra relacionado con otros hongos como *Alternaria* spp. y *Pyrenophora tritici-repentis*. El agente causal de la enfermedad conocida como “Spot blotch” es *Bipolaris sorokiniana*, pero en muestras de trigo con síntomas de la mancha borrosa (Figura 1) se encontró la presencia de *A. alternata* y se asume que participa como un hongo saprófito o potenciador del daño (Mata-Santoyo *et al.*, 2018).

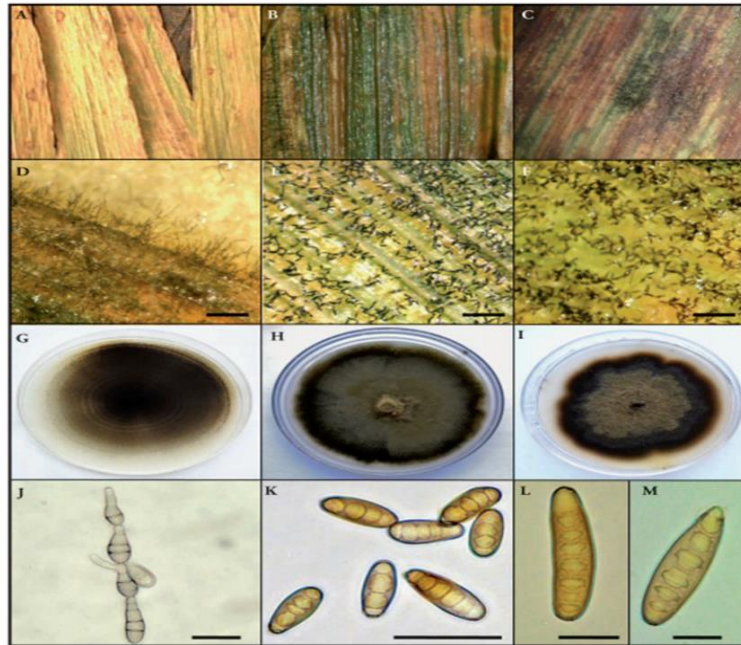


Figura 1. Síntomas y signos de *Alternaria alternata* y *Bipolaris sorokiniana*. Fuente: García-León *et al.*, 2013.

### 3.2.3 *Fusarium* spp.

*Fusarium* tiene una alta diversidad de especies patógenas comunes en el suelo, en el aire y en el agua (Ma *et al.*, 2017), y se considera un género cosmopolita por tener un amplio número de plantas hospederas como avena (*Avena sativa*), centeno (*Secale cereale*), chile (*Capsicum annum*), maíz, trigo, entre otros cultivos (Leyva-Mir *et al.*, 2017; Guillén-Cruz *et al.*, 2006; Vázquez-Ramírez *et al.*, 2017).

En el trigo, se han registrado una gran cantidad de especies del género *Fusarium* que afectan al cultivo de trigo a nivel mundial, tales como: *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. pseudograminearum*, *F. avenaceum*, *F. acuminatum*, *F. crookwellense* y *F. poae* (Cook, 2010); sin embargo, en México, se han reportado a *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. equiseti* y *F. proliferatum* como las especies asociadas a síntomas de pudrición de raíz (Gilchrist-Saavedra *et al.*, 2005).

La sintomatología se puede observar como una necrosis en la raíz o una pudrición total de las raíces, teniendo un efecto en el porcentaje de germinación (reducción del 88 % en algunas variedades), en una disminución en la longitud de raíz (raíces de 3.2 cm en plantas de 12 dds) e incluso en la longitud del follaje (hojas de 7.5 cm en plantas de 12 dds) (Leyva-Mir *et al.*, 2017) (Figura 2).



Figura 2. Escala de daño causado por *Fusarium* spp., en plántulas de maíz. Fuente: Figueroa-Rivera *et al.*, 2010.

Para la identificación morfológica se recurre a las claves de Leslie y Summerell (2006), en las que se deben observar diversas estructuras como conidióforos, fiálides (células conidiógenas), conidios, macroconidios, microconidios, clamidosporas, mesoconidias, esporodoquios, esclerotia y estroma, entre otros aspectos (Figura 3).

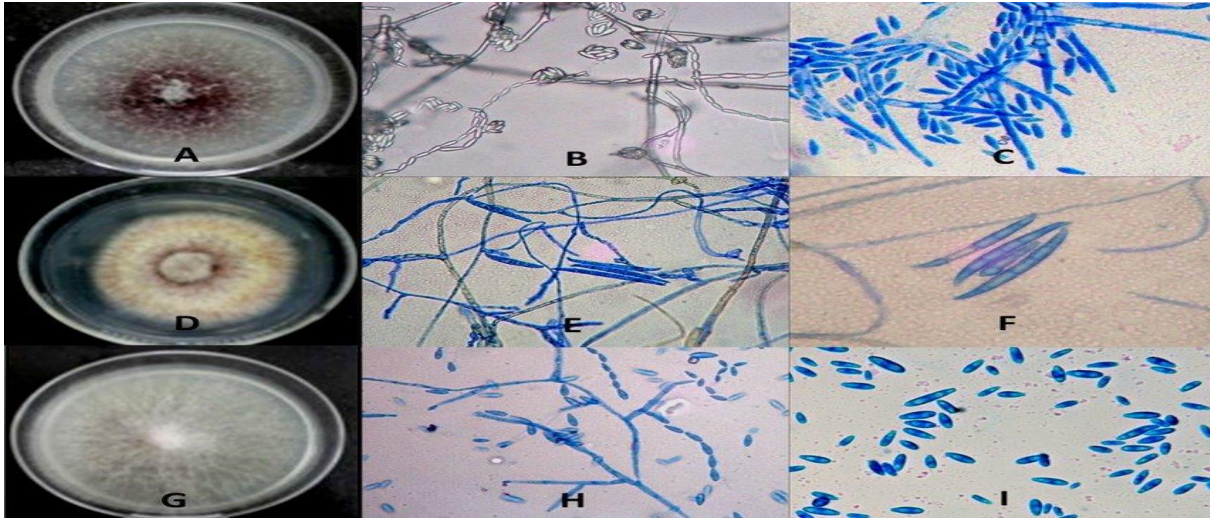


Figura 3. Estructuras de referencia para la identificación de *Fusarium* spp. Fuente: Pascual *et al.*, 2016.

### 3.2.4 *Septoria* y *Zymoseptoria* spp.

Los síntomas se presentan en los primeros estadios del desarrollo de la planta. Inicia con manchas ovales claras (clorosis), las cuales se esparcen de forma irregular e indefinida, al secarse se tornan en color rojizo y sobre estas aparecen numerosos puntos negros (picnidios) de tamaño muy reducido. Un ataque severo destruye parcial o totalmente el follaje. El daño que produce el patógeno, en el tejido vegetal, se extienden más allá del área colonizada debido a la difusión, a través de los tejidos y de toxinas producidas por el hongo (Andrade y Contreras, 2007).

En presencia de *Z. tritici*, se observan picnidios a lo largo de la hoja, cuyas picnidiosporas pueden presentarse de dos formas dentro del picnidio: como macropicnidiosporas (35-98 x 1-3  $\mu\text{m}$ ) con tres o cinco septas o micropicnidiosporas (8-10.5 x 0.8-1  $\mu\text{m}$ ) sin septas. Ambos tipos de esporas son igualmente capaces de infectar el trigo (Eyal *et al.*, 1987).

A continuación, se presenta el ciclo de vida de *Z. tritici* considerando también su forma sexual *M. graminis* (Figura 4).

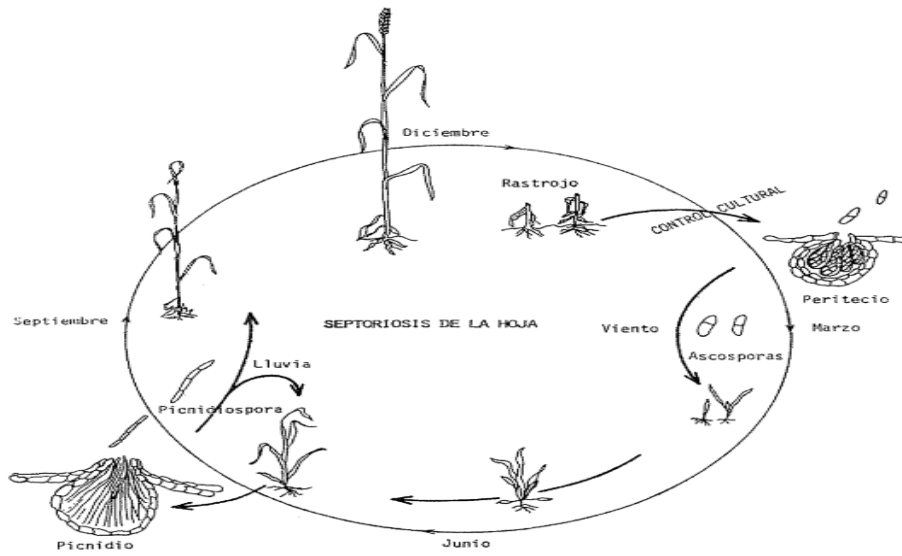


Figura 4. Ciclo de vida de *Z. tritici* en trigo. Fuente: Eyal *et al.*, 1987.

*Septoria tritici* fue reclasificada como *Zymoseptoria tritici* (Desm.) Quaedvl y Crous debido al surgimiento del nuevo género de *Zymoseptoria*, dicho género se originó debido a que las especies que se encuentran en hospedantes de gramíneas representan un género aún no descrito, para el cual se propuso el nombre *Zymoseptoria*. Aunado a lo anterior, por medio de pruebas filogénicas y morfológicas, se comprobó que *S. tritici* pertenecía al nuevo género (Quaedvlieg *et al.*, 2011).

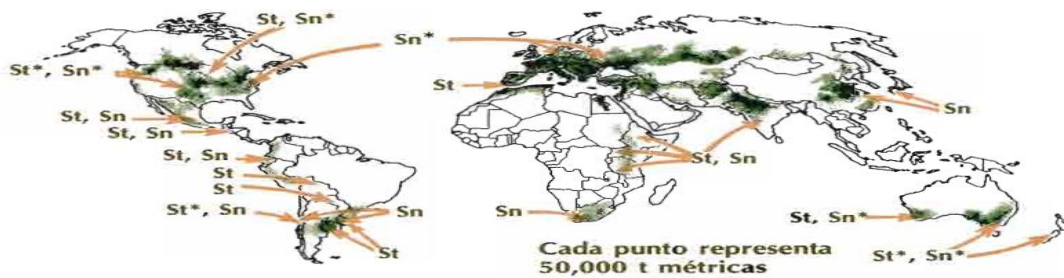


Figura 5. Distribución mundial de *Septoria* spp. que afectan al trigo. Los nombres *Z. tritici* (St) y *S. nordorum* (Sn) se utilizan para designar a los agentes patógenos en todos los lugares. Un asterisco indica los lugares donde se ha informado de su presencia. Fuente: Eyal *et al.*, 1987.

### 3.3 Métodos alternativos de control de enfermedades: Actinobacterias

#### 3.3.1 Diversidad e identificación

Los géneros del *phylum* Actinobacteria presentan gran diversidad de especies, lo que implica que hay variaciones en cuanto a su morfología, fisiología, capacidad metabólica y su hábitat de crecimiento (Barka *et al.*, 2016).

Dentro de los géneros de mayor importancia se encuentran *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Frankia* y *Micromonospora* (Getha *et al.*, 2005). Sin embargo, para cada género se ha logrado la identificación de diferentes especies (Figura 6), tan solo para el género *Streptomyces* cuenta con más de 500 especies y en los últimos cuatro años se identificaron al menos 12 nuevas especies de actinobacterias (Barka *et al.*, 2016).



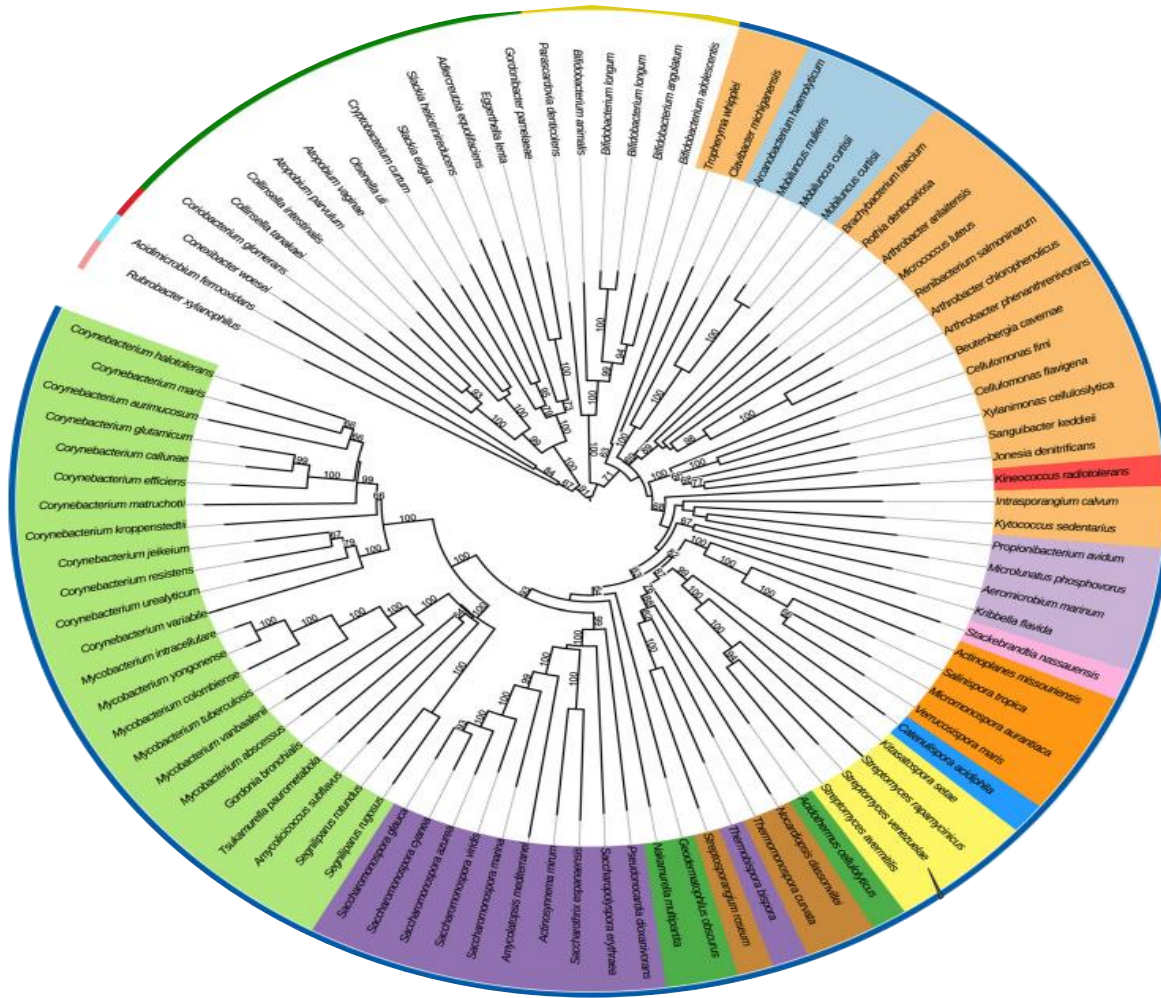


Figura 6. Árbol filogenético de diferentes especies de actinobacterias. Fuente: Barka *et al.*, 2016.

La identificación se realiza por medio la de morfología, la quimitaxonomía (composición de la pared celular y la distribución de azúcar de la célula completa principalmente) y pruebas moleculares (Labeda, 1987; Barka *et al.*, 2016; Hazarika y Thakur, 2020)(Figura 7).

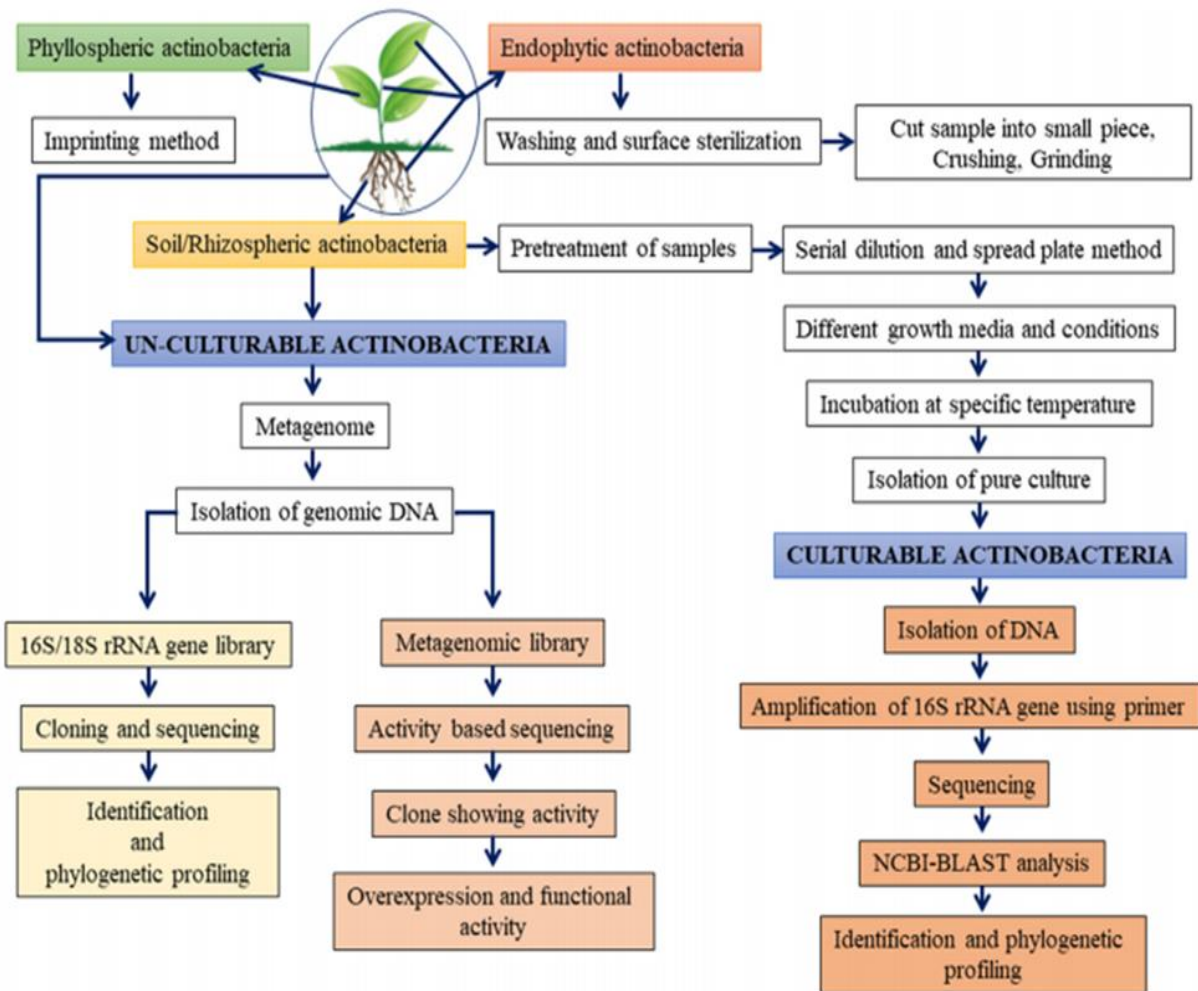


Figura 7. Esquema de aislamiento e identificación de actinobacterias. Fuente: Hazarika y Thakur, 2020.

Como se ha mencionado anteriormente, las actinobacterias presentan variaciones en su morfología, por lo que es importante observar el micelio, es decir si se desarrolla en el sustrato o en la parte aérea, el color del mismo, la producción de pigmentos (pueden ser de color amarillo, azul, diferentes grados de marrón, naranja, rojo, rosa y violeta) y la aparición de esporas al igual que sus estructuras (Figura 8) (Barka *et al.*, 2016).



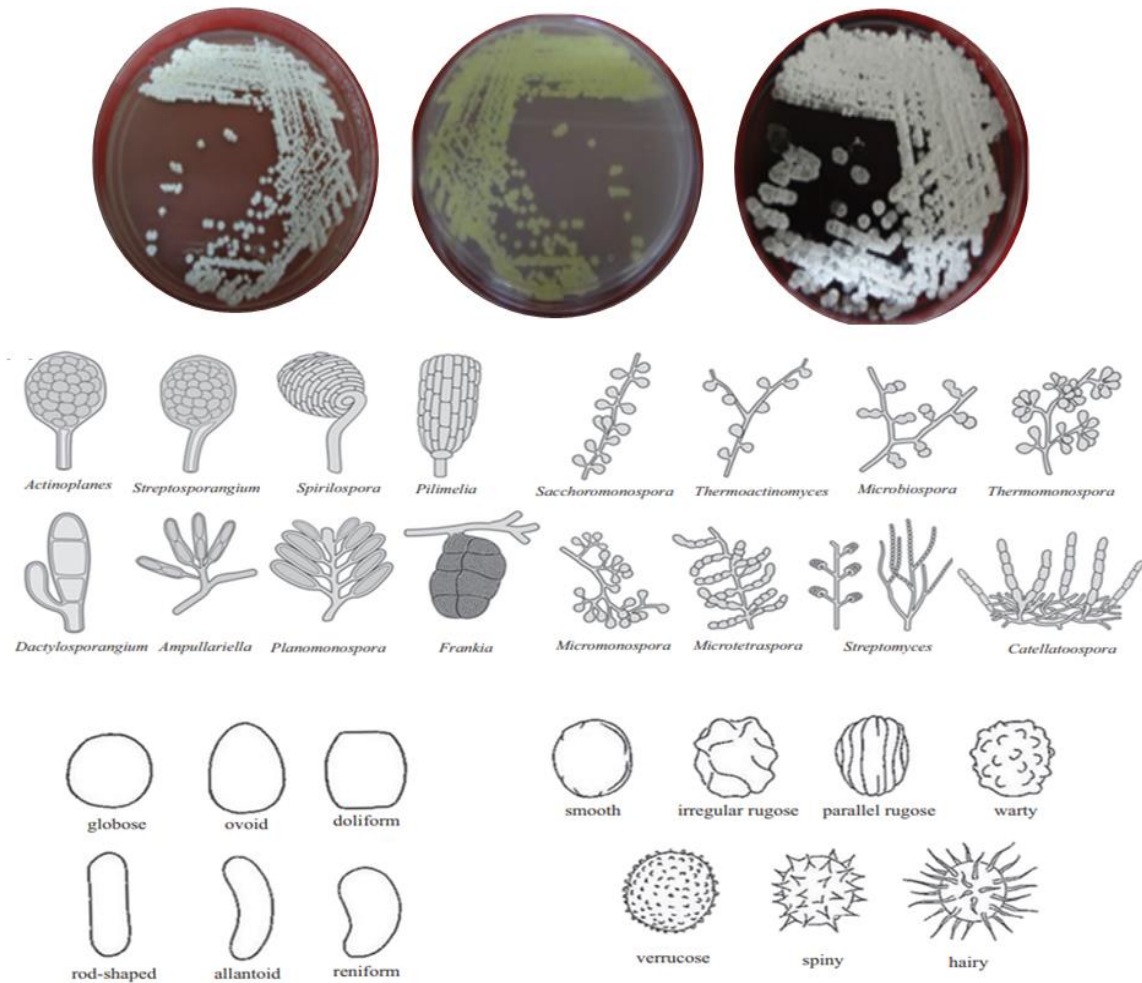


Figura 8. Diversidad morfológica de algunas Actinobacterias. Fuente: Hazarika y Takur, 2020.

### 3.3.2 Importancia agrícola

El hábitat más dominante de las actinobacterias es el suelo, desde la superficie hasta a una profundidad de 2 m (Goodfellow y Williams, 1983; Hazarika y Thakur, 2020), por lo que tiene sentido que la colonización sea de manera natural en la raíz de las plantas, siendo agentes probióticos potenciales de las mismas (Salwan y Sharma, 2018; Bulgarelli *et al.*, 2013), teniendo en cuenta que los “probióticos son considerados una mezcla de microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas proporcionan o generan efectos benéficos a la salud del huésped (FAO, 2001) y que no solo actúan en la “flora” intestinal de los humanos como coloquialmente se conoce.

A pesar de su capacidad aeróbica o anaeróbica y de su morfología variable, según sea el caso, las características de interés son que tienen la capacidad de producir ácidos orgánicos, fijar nitrógeno atmosférico, descomponer la materia orgánica y producir metabolitos secundarios entre otros beneficios (Bhatti *et al.*, 2017; Salwan y Sharma, 2018; Kunoh, 2002; Cao *et al.*, 2004; Sharma y Salwan, 2018).

Las actinobacterias producen una fitoestimulación que se ve reflejado en: 1) absorción de los nutrientes como C, H, N, O, P y algunos micronutrientes, 2) producción de fitohormonas (auxinas, citoquininas y giberelinas) y 3) producción de enzimas (por ejemplo, 1-aminociclopropano-1-carboxilasa) (Hazarika y Thakur, 2020).

Las características anteriormente mencionadas, contribuyen de forma benéfica a las plantas hospedantes, ayudando en la promoción de su crecimiento o como agente de control biológico de enfermedades al mostrar un efecto competitivo o biocida sobre los fitopatógenos destacando los géneros de *Kocuria*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Rhodococcus* y *Corynebacterium* (Hazarika y Thakur, 2020; Rodríguez-Villareal *et al.*, 2014). Lo anterior se debe a enzimas degradantes de la pared celular como glucanasa y quitinasa. No obstante, también es importante saber que algunas actinobacterias son fitopatógenas, es el caso de algunas especies de géneros como *Mycobacterium*, *Corynebacterium* o *Nocardia* spp (Hazarika y Thakur, 2020; Barka *et al.*, 2016).

Para los géneros que comparten una acción antagónica y una patogénica en las plantas, se explica considerando la alta especificidad de las actinobacterias, es decir, las especies que funcionan como antagónicas en un cultivo, pueden ser patogénicas para otros cultivos (Emmert y Handelsman, 1999; Glick, 1995), motivo por el cual es importante hacer una correcta identificación y estudio de las especies de actinobacterias, de este modo se puede aprovechar el potencial benéfico de los actinomicetos.

A continuación, se muestran algunos reportes de actividad antagónica de actinobacterias:

- En muestras de suelo cultivado y no cultivado de Guanajuato (en municipios de Apaseo el Grande, Celaya, Comonfort, Pénjamo, San Luis de la Paz, San Diego

de la Unión, San Miguel de Allende, Villagran y Xichú) se lograron identificar 82 cepas de actinobacterias, de las cuales tres de ellas (B21, B22 y B37) presentaron un efecto inhibitorio contra *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici* y *F. oxysporum*, con un porcentaje de inhibición radial promedio de 81.76 % (Sánchez-García *et al.*, 2019).

- Aislados de suelo del Cerro del Potosí (Nuevo León), mostraron actividad antagónica contra *Phytophthora capsici* y *Sclerotium rolfsii*; actividad inhibitoria en el crecimiento micelial de *P. capsici*, *R. solani* y *Macrophomina phaseolina* (Tassi) y teniendo posibilidad de que sea biocida contra *P. capsici*. El porcentaje de inhibición fue del 60 hasta el 100 % (Rodríguez-Villareal, 2014).
- En un estudio realizado en actinobacterias fueron aisladas 13 cepas de un agroecosistema tradicional de milpa, ubicada en El Boxo, Cardonal en el estado de Hidalgo. Se encontraron principalmente *Streptomyces* y *Amycolatopsis*, en particular este último la cepa BX17 mostró antagonismo *in vitro* hacia *Fusarium graminearum*, mientras que en el experimento *in vivo* la misma actinobacteria evitó la disminución en la respiración y tasas fotosintéticas netas de las plantas, producidas por la infección fúngica (Cabrera *et al.*, 2020).
- De acuerdo con Barka *et al.*, (2016), hay reportes de antagonismo en bacterias del género *Clavibacter*, *Streptomyces*, *Leifsonia* y *Rhodococcus*.

#### IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Los efectos sobre los que se realizó el estudio, fue en la calidad de semillas y sobre el crecimiento y desarrollo en plantas de trigo. En semilla se evaluaron a las actinobacterias como pretratamiento para prevenir el desarrollo de esporas contenidas en la testa y los efectos en la germinación de semillas después de una exposición prolongada a las actinobacterias.

En el caso de las plántulas, se evaluó el efecto que tienen las actinobacterias en el crecimiento y desarrollo de las plantas, de igual forma la capacidad de estos microorganismos para ayudar en el control de tres cepas de *Fusarium* spp. Sin embargo,

para realizar la selección de actinobacterias se trabajó en bioensayos preliminares. A continuación, se presentan los detalles de los experimentos.

## **4.1 Hongos**

### **4.1.1 Muestreo**

De acuerdo con Eyal *et al.*, (1987), la recolección de tejidos de los síntomas de interés, deben ser colocados en bolsas de papel y mantenerlos en un lugar fresco hasta ser llevados a las condiciones de laboratorio, para evitar la deshidratación del tejido.

Se procesaron 136 muestras obtenidas mediante recorridos de campo en los Valles Altos de México (Hidalgo, México, Morelos, Oaxaca, Puebla y Tlaxcala) en el 2017, además se realizaron dos muestreos en las localidades de Juchitepec, Estado de México y Nanacamilpa en el 2018, Tlaxcala, donde existen las condiciones que favorecen la presencia de *Septoria nodorum* y *Zymoseptoria tritici*, lo que permitió la obtención de muestras con síntomas y el posterior aislamiento de los patógenos.

### **4.1.2 Procesamiento de muestras**

Las hojas colectadas se mantuvieron en bolsas de glassine hasta ser procesadas en el laboratorio de fitopatología en las instalaciones del CEVAMEX-INIFAP.

Las muestras se observaron con microscopio estereoscópico marca LEICA Modelo EZ4D, posteriormente se seleccionaron segmentos de hoja con síntomas, se desinfestaron mediante tres lavados (hipoclorito de sodio al 1 %, alcohol al 70 % y agua estéril, cada uno por 1 min). Posteriormente, los segmentos de hoja se colocaron bajo condiciones de cámara húmeda durante 48 h, iniciando el monitoreo de signos a las 24 h (Consolo *et al.*, 2008; Gilchrist *et al.*, 2005).

### **4.1.3 Aislamiento e incremento del patógeno**

Los conidios obtenidos a partir de las hojas sometidas en cámaras húmedas, se dispersaron en placas de PDA, a las 24 h se revisaron bajo microscopio marca LEICA

Modelo EZ DM500 para extraer un conidio germinado y transferirlo a una nueva caja de PDA, logrando los cultivos monospóricos, lo que a su vez permitió identificar el género de los patógenos.

La verificación se realizó con diferentes medios de cultivos (PDA, PZA, Clavel, SNA) para promover el crecimiento de diferentes estructuras, mismas que fueron medidas, fotografiadas y comparadas con las respectivas claves morfológicas.

## **4.2 Actinobacterias**

Las actinobacterias fueron proporcionadas por el M.C. Raúl Asael Rodríguez Villareal de la Universidad Autónoma de Nuevo León, las cuales se aislaron de diferentes muestras de suelo provenientes de dos sitios ubicados en el municipio de Bustamante, Nuevo León: M1B (67 morfotipos) y M2B (77 morfotipos).

Cada cepa fue replicada para conservar la colonia de las bacterias en Agar nutritivo. No obstante, para las cepas seleccionadas (con base a ensayos) se utilizó como medio de cultivo caldo nutritivo (extracto de carne y pluripeptona, para incrementar la colonia, dicho caldo se mantuvo en movimiento por medio de un shaker marca Benchmark modelo ORBi-SHAKER™ a 120 rpm durante siete días.

### **4.2.1 Selección de actinobacterias**

Se realizó una primera prueba general con cinco hongos patógenos (*Alternaria* spp., una de *Bipolaris sorokiniana* y tres de *Fusarium* spp) aislados de las muestras de plantas versus 144 morfotipos de actinobacterias. La unidad experimenta fueron cajas Petri de 60 x 15 mm con agar nutritivo como medio de cultivo, se colocaron discos de inóculo en el centro (hongo) y en cuatro extremos de la caja (cuatro morfotipos de actinobacterias). El criterio de selección fue el porcentaje de inhibición mayor o igual a 20 % para cada hongo evaluado.

Los morfotipos seleccionados se confrontaron de manera dual, realizando evaluaciones cada 24 h durante siete días aproximadamente para observar el efecto inhibitorio de

crecimiento micelial, cabe mencionar que ese periodo estuvo en función de la velocidad de crecimiento de cada patógeno. Posteriormente se eligieron las actinobacterias que presentaron los valores más altos de porcentaje de inhibición para ser evaluadas en el experimento *in vivo*, como se explica más adelante.

El diseño experimental fue completamente al azar y se realizó un análisis de varianza con un nivel de significancia del 0.05 % y prueba de medias (Tukey  $p \leq 0.05$ ).

#### 4.2.2 Calidad de semilla: fitosanidad

Los patógenos asociados a la testa de las semillas es un problema recurrente, convencionalmente se hace uso de productos químicos para reducir la incidencia de los mismos. Se observó el potencial de las actinobacterias como pretratamiento para evitar la presencia de hongos al momento de la germinación. La unidad experimental fueron placas Petri con medio de cultivo Agar-agua con diez semillas por unidad y con cuatro repeticiones por tratamiento (Cuadro 1 y 2).

Cuadro 1. Especificación de los diferentes tratamientos.

Tratamiento	Detalle	Autor
1	Hipoclorito 2% 1 min	
2	Hipoclorito 2% 5 min	Rodríguez-García <i>et al.</i> , 2020.
3	Hipoclorito 5% 1 min	
4	Hipoclorito 5% 5 min	
5	Térmico agua 50° C 1 min	Romero-Bastidas <i>et al.</i> , 2016
6	Térmico agua 50° C 2 min	
7	Térmico agua 50° C 3 min	
8	Térmico agua 50 °C 1min + cloro sin diluir 1 min	
9	Térmico agua 50 °C 2min + cloro sin diluir 1 min	

Cuadro 2. Continuación de especificación de los diferentes tratamientos.

Tratamiento	Detalle	Autor
10	Térmico agua 50 °C 3min + cloro sin diluir 1 min	
11	Térmico agua 50 °C 1min + cloro al 2% 1 min	
12	Térmico agua 50 °C 2min + cloro al 2% 1 min	
13	Térmico agua 50 °C 3min + cloro al 2 %1 min	
14	Morfotipo 1M4 inmersión 1 min	
15	Morfotipo 1M4 inmersión 12 horas	
16	Testigo	

Las variables evaluadas corresponden al porcentaje de germinación y porcentaje de contaminación. El diseño experimental fue completamente al azar y se realizó un análisis de varianza con un nivel de significancia del 0.05 % y prueba de medias (Tukey  $p \leq 0.05$ ).

#### 4.2.3 Calidad de semilla: Germinación

La germinación al igual que otros procesos fisiológicos, está determinado por un conjunto de hormonas de crecimiento, mismas que se pueden presentar en las colonias de actinobacterias. Motivo por el cual se evaluó el efecto en la germinación de semillas en cuatro variedades de trigo, con diferentes tiempos de exposición a actinobacterias como se indica en el Cuadro 3 y 4. La unidad experimental fueron placas Petri con medio de cultivo agar-agua con diez semillas por unidad y con cuatro repeticiones por tratamiento.

Cuadro 3. Especificación de los diferentes tratamientos.

Tratamiento	Detalle
1	Var. Urbina + 12 horas de inmersión
2	Var. Urbina + 2 días de inmersión
3	Var. Urbina + 5 días de inmersión
4	Var. Urbina + 7 días de inmersión
5	Testigo Var. Urbina
6	Var. Borlaug + 12 horas de inmersión
7	Var. Borlaug + 2 días de inmersión
8	Var. Borlaug + 5 días de inmersión
9	Var. Borlaug + 7 días de inmersión

Cuadro 4. Continuación de especificación de los diferentes tratamientos.

Tratamiento	Detalle
10	Testigo Var. Borlaug
11	Var. Texcoco + 12 horas de inmersión
12	Var. Texcoco + 2 días de inmersión
13	Var. Texcoco + 5 días de inmersión
14	Var. Texcoco + 7 días de inmersión
15	Testigo Var. Texcoco
16	Var. Valles + 12 horas de inmersión
17	Var. Valles + 2 días de inmersión
18	Var. Valles + 5 días de inmersión
19	Var. Valles + 7 días de inmersión
20	Testigo Var. Valles

Las variables evaluadas corresponden al porcentaje de germinación. El diseño experimental fue completamente al azar y se realizó un análisis de varianza con un nivel de significancia del 0.05 % y prueba de medias (Tukey  $p \leq 0.05$ ).

#### 4.2.4 Efecto en el crecimiento y desarrollo de plantas

Retomando los resultados de la selección de actinobacterias se evaluaron los tres morfotipos con potencial de inhibición en el crecimiento micelial (mayor al 20 %), para determinar los efectos posibles en el crecimiento y desarrollo de plantas de trigo de cuatro variedades diferentes (Borlaug, Texcoco, Urbina y Valles). Para determinar el potencial como agentes controladores de *Fusarium* spp. se utilizó la combinación de tres cepas de *Fusarium* spp., siguiendo la recomendación de Leyva-Mir *et al.*, (2017), donde menciona que las infecciones que se dan en condiciones de campo ocurren por más de una especie de *Fusarium* spp.

La unidad experimental consistió de un vaso de unicel de un litro, con 10 plantas por cada vaso. Las variables evaluadas fueron peso seco de la planta, peso seco de raíz, peso seco foliar, altura de la planta, área foliar, el medidor de clorofila e índice de área foliar. Cabe mencionar que cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones (Cuadro 5).



Cuadro 5. Tratamientos por variedad de trigo y la interacción con microorganismos.

Trat.	Variedad	Organismo	Trat.	Variedad	Organismo
1	Urbina	Testigo	19	Texcoco	Mezclas de <i>Fusarium</i> spp.
2	Borlaug	Testigo	20	Valles	Mezclas de <i>Fusarium</i> spp.
3	Texcoco	Testigo	21	Urbina	M1B M4 + Mezcla de <i>Fusarium</i> spp.
4	Valles	Testigo	22	Borlaug	M1B M4 + Mezcla de <i>Fusarium</i> spp.
5	Urbina	M1B M4	23	Texcoco	M1B M4 + Mezcla de <i>Fusarium</i> spp.
6	Borlaug	M1B M5	24	Valles	M1B M4 + Mezcla de <i>Fusarium</i> spp.
7	Texcoco	M1B M6	25	Urbina	M1B M33 + Mezcla de <i>Fusarium</i> spp.
8	Valles	M1B M7	26	Borlaug	M1B M33 + Mezcla de <i>Fusarium</i> spp.
9	Urbina	M1B M33	27	Texcoco	M1B M33 + Mezcla de <i>Fusarium</i> spp.
10	Borlaug	M1B M34	28	Valles	M1B M33 + Mezcla de <i>Fusarium</i> spp.
11	Texcoco	M1B M35	29	Urbina	M2B M60 + Mezcla de <i>Fusarium</i> spp.
12	Valles	M1B M36	30	Borlaug	M2B M60 + Mezcla de <i>Fusarium</i> spp.
13	Urbina	M2B M60	31	Texcoco	M2B M60 + Mezcla de <i>Fusarium</i> spp.
14	Borlaug	M2B M61	32	Valles	M2B M60 + Mezcla de <i>Fusarium</i> spp.
15	Texcoco	M2B M62	33	Altiplano	Mezcla de <i>Fusarium</i> spp.
16	Valles	M2B M63	34	Borlaug	Mezcla de <i>Fusarium</i> spp.
17	Urbina	Mezcla de <i>Fusarium</i> spp.			
18	Borlaug	Mezcla de <i>Fusarium</i> spp.			

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar, tomando en consideración que sólo se evaluó un patógeno y se realizó el análisis de varianza (nivel de significancia del 0.05 %) y prueba de medias de Tukey.

## V. RESULTADOS

### 5.1 Aislamiento e identificación de patógenos

#### 5.1.1 Identificación morfológica

##### Género *Alternaria*

El principal síntoma de *Alternaria* spp. corresponde a la presencia de halos cloróticos que se van extendiendo a lo largo de la hoja, los segmentos con dichos halos fueron cortados y sometidos a cámara húmeda (Figura 9).

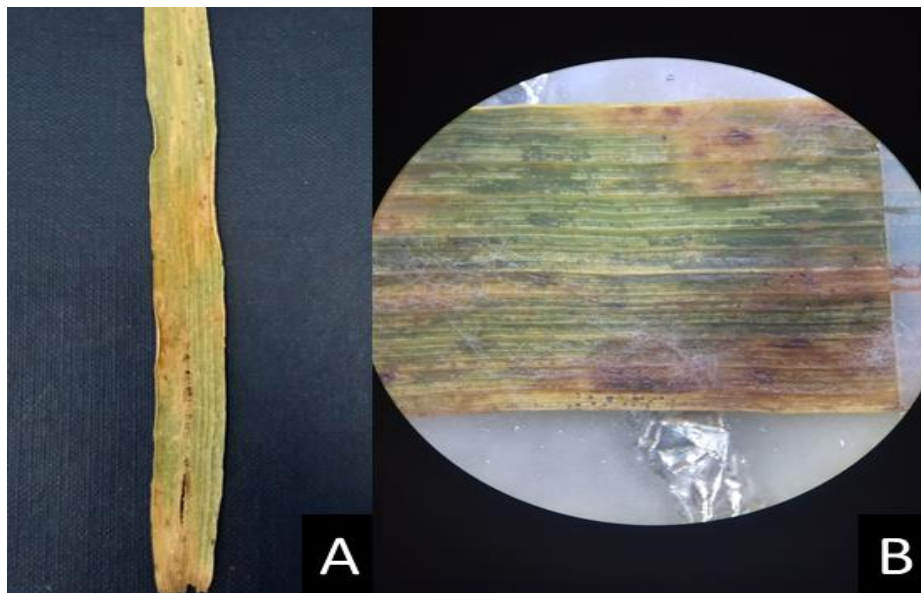


Figura 9. Atizonamiento en hoja de trigo causado por *Alternaria* spp. A) Síntoma de *Alternaria* spp. B) Micelio de *Alternaria* spp.

Los signos que se presentaron después de 24 h en cámara húmeda, consistieron en:

- Presencia de conidios en forma de clava y clava alargada, de color café oscuro, con septos transversales y en algunos casos longitudinales (clasificación dictiospora), la superficie es ligeramente ornamentada con rugosidad (Figura 10).

- Cadenas cortas de conidios de cuatro a siete unidades, de color café oscuro a oliváceo.
- Los conidios tienen un grosor aproximado de 3-6  $\mu\text{m}$  y longitudinalmente midieron 19-46.07 x 7.56-14.22  $\mu\text{m}$ .

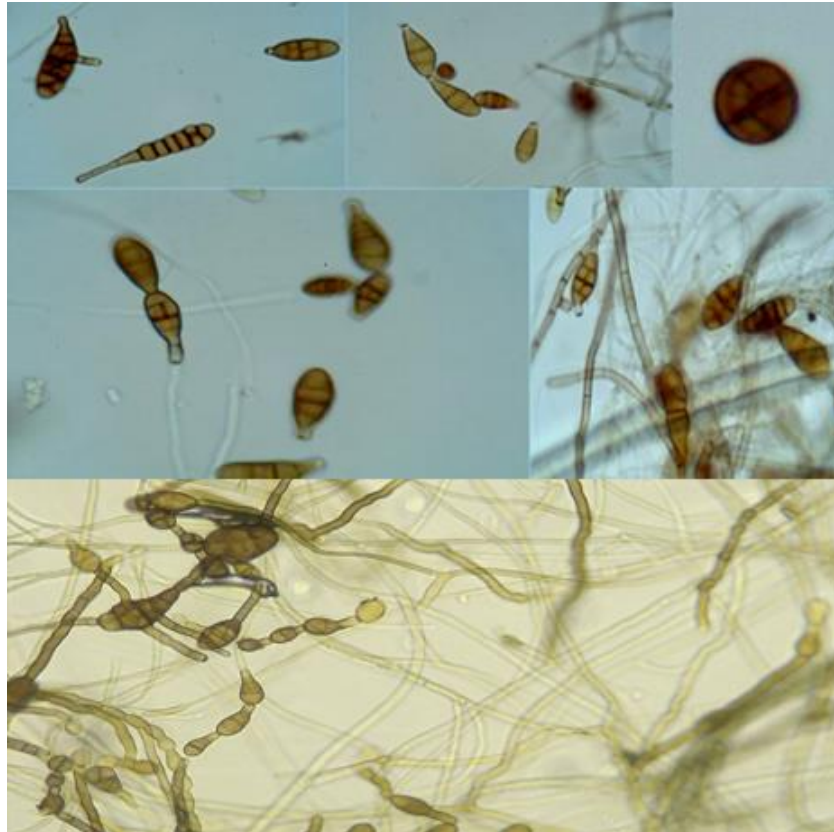


Figura 10. Conidios y micelio de *Alternaria* spp.

Las colonias de *Alternaria* spp. son de coloración verde oscuro en etapa madura, mientras que en pleno crecimiento presenta tonalidades blanquecinas y grisáceas, de forma circular, de superficie plana pero algodonosa y con bordes filamentosos (Figura 11).

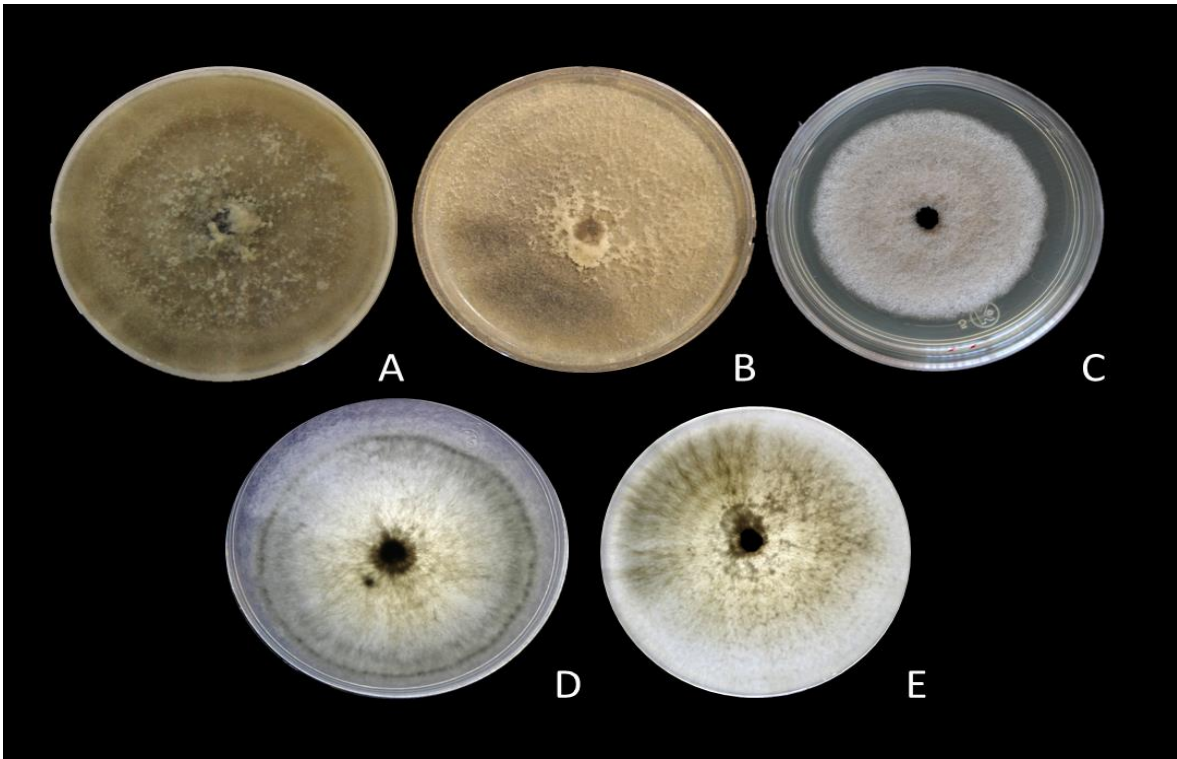


Figura 11. Colonias de *Alternaria* spp en diferentes medios de cultivos. A) Medio de cultivo PDA. B) Medio de cultivo APZ. C) Crecimiento micelial en etapa temprana en medio de cultivo PDA. D) Colonia en medio PDA con presencia de uno o dos anillos concéntricos observados a contra luz. E) Colonia en medio PZA con presencia de varios anillos concéntricos observados a contra luz.

### **Género *Bipolaris***

Los síntomas observados fueron lesiones necróticas de color café oscuro a lo largo de las hojas (Figura 12), en condiciones de cámara húmeda se detectó la formación de conidióforos de *Bipolaris sorokiniana* en la parte superficial de la hoja, al igual que micelio oscuro y denso. Para la identificación se utilizó medio de cultivo PZA y PDA.

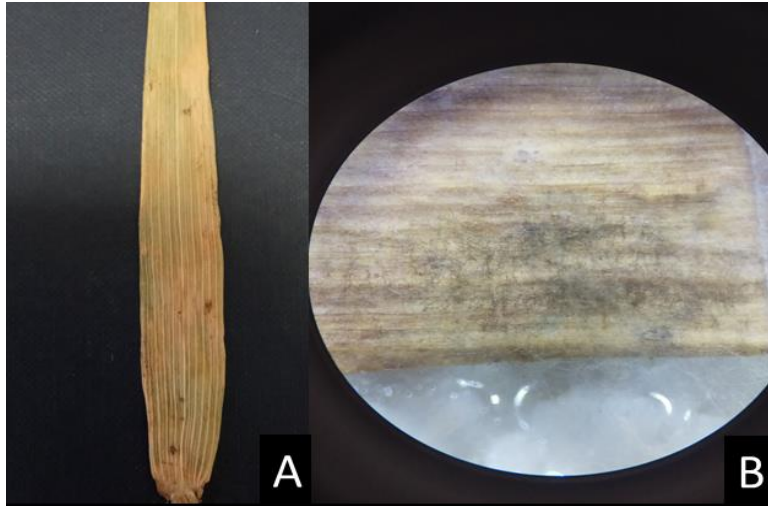


Figura 12. Tizón de la hoja de trigo. A) Síntoma de *Bipolaris sorokiniana* (syn. *Helminthosporium sativum*). B) Micelio y conidióforos formados en cámara húmeda.

Los conidios y conidióforos permiten una sencilla identificación del género que anteriormente se conocía como *Helminthosporium* spp., los conidios observados fueron oblongos de color café oliva, septados ligeramente curvos, con paredes lisas y una cicatriz basal prominente (Figura 13). Dependiendo de su tamaño es el número de septas que tienen, los conidios midieron aproximadamente de 34-63.12 x 10.06-18.5  $\mu\text{m}$ , por lo que presentaron de tres a nueve septas por conidio. Los conidióforos se desarrollaron individualmente con un tamaño promedio de 118.5 - 122 x 16.4-18.2  $\mu\text{m}$ .

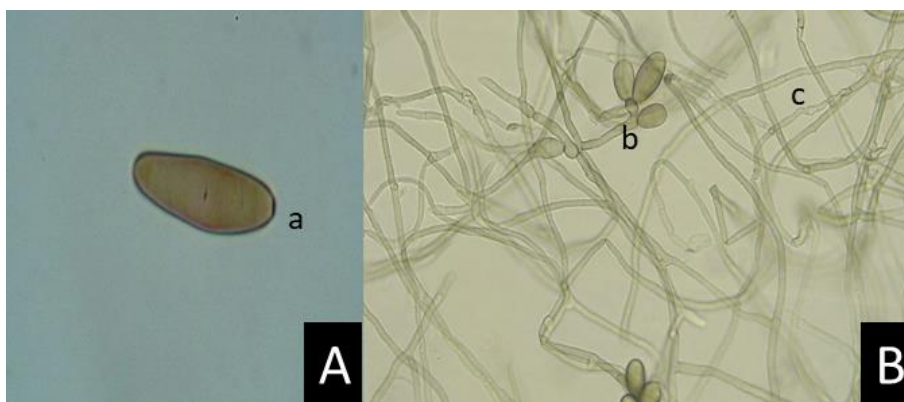


Figura 13. Estructuras de *Bipolaris* spp. A) Conidio con tres septos ligeramente marcados (a. cicatriz basal). B) Conidióforos (b) y micelio (c) de *Bipolaris* spp.

Las colonias fueron de coloración verde oscuro, de forma granular algodónoso, con elevación umbilicada y bordes lobulados (Figura 14).

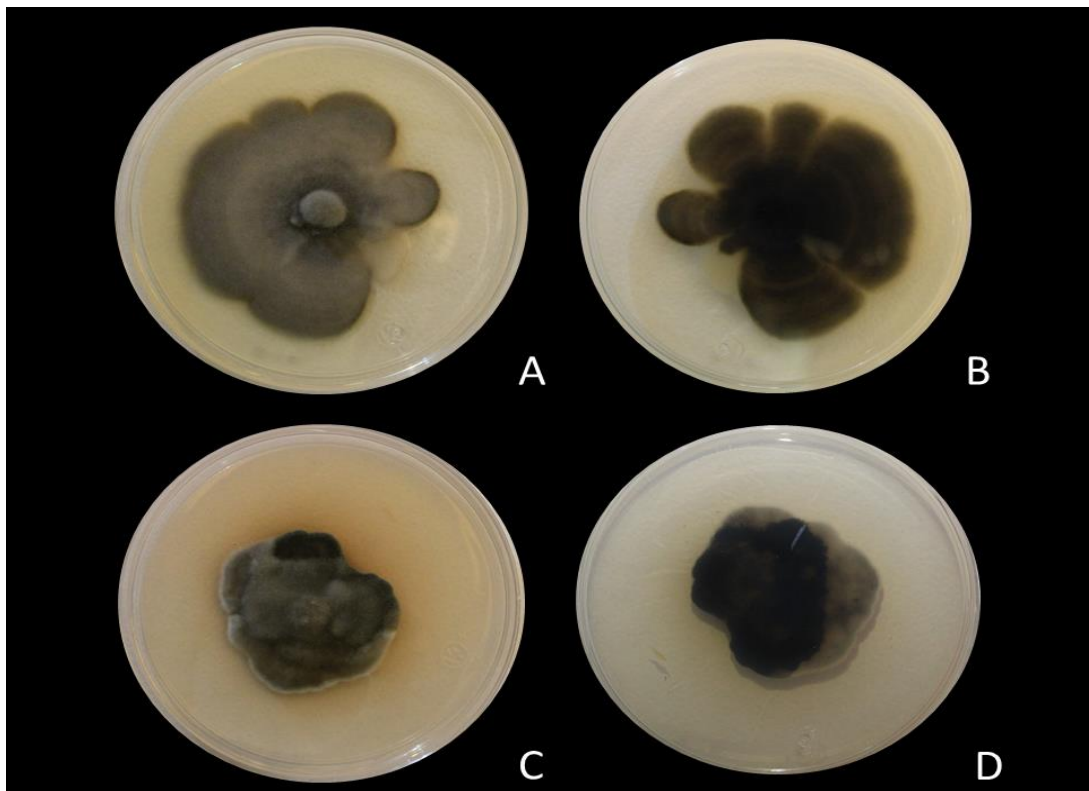


Figura 14. Colonias de *Bipolaris* spp. en diferentes medios de cultivos. A) Medio de cultivo PDA. B) Reverso de la placa Petri en medio de cultivo PDA. C) Colonia en medio PZA. E) Reverso de la placa Petri en medio de cultivo PZA.

### **Género *Fusarium***

El síntoma que se observó corresponde a manchas foliares de forma irregular (Figura 15); aunque hay registros de que, en estados tempranos de desarrollo, las manchas son de color verde grisáceo y en estados más avanzados las manchas se tornan ovaladas de color café grisáceo. No obstante, la masa de conidios de los que se logró hacer el aislamiento de *Fusarium* spp., se obtuvo de hojas considerablemente secas.



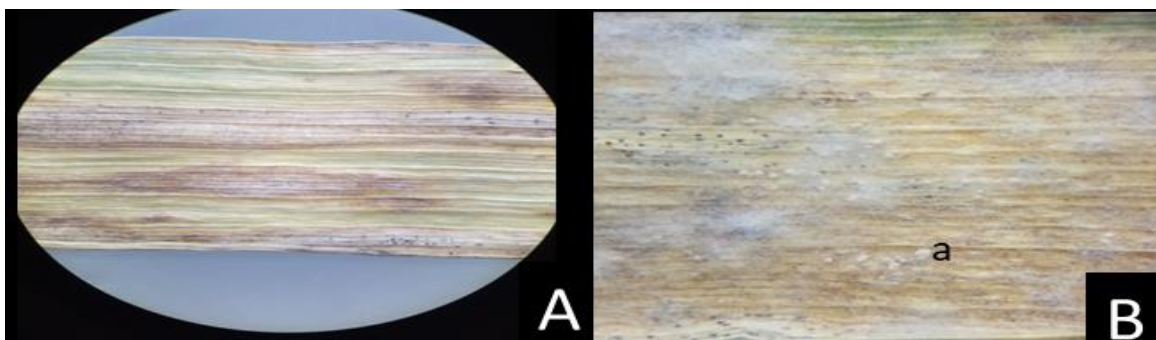


Figura 15. Características de *Fusarium* spp. A) Síntomas del género. B) Formación de micelio y masa de conidios (a) después de 48 h en cámara húmeda.

Por la morfología de las estructuras, se logró identificar el género por la presencia de macroesporas, microesporas, clamidiosporas y la forma de las fiálides (Figura 16 y 17, respectivamente). El tamaño de los microconidios fue de 5.55-11.2 x 1.73-3.79  $\mu\text{m}$ , de los macroconidios 21.01-53.14 x 3.08-4.85  $\mu\text{m}$ , fiálides de 26.4 x 182.6  $\mu\text{m}$  y clamidiosporas de 7.37 – 16.52  $\mu\text{m}$ .



Figura 16. Estructuras morfológicas de la primera cepa aislada. A) Macroconidio con septas ligeramente visibles. B) Microconidios. C) Clamidiosporas.



Figura 17. Estructuras morfológicas de la segunda cepa aislada. A) Microconidios. B) Microconidios, micelio y clamidiosporas (a). C) Microconidios y fiálides (b).

Se observaron al menos dos cepas de *Fusarium* spp., la primera colonia de color blanquecina, de forma circular, ligeramente anillada, superficialmente algodonosa y plana (Figura 17).

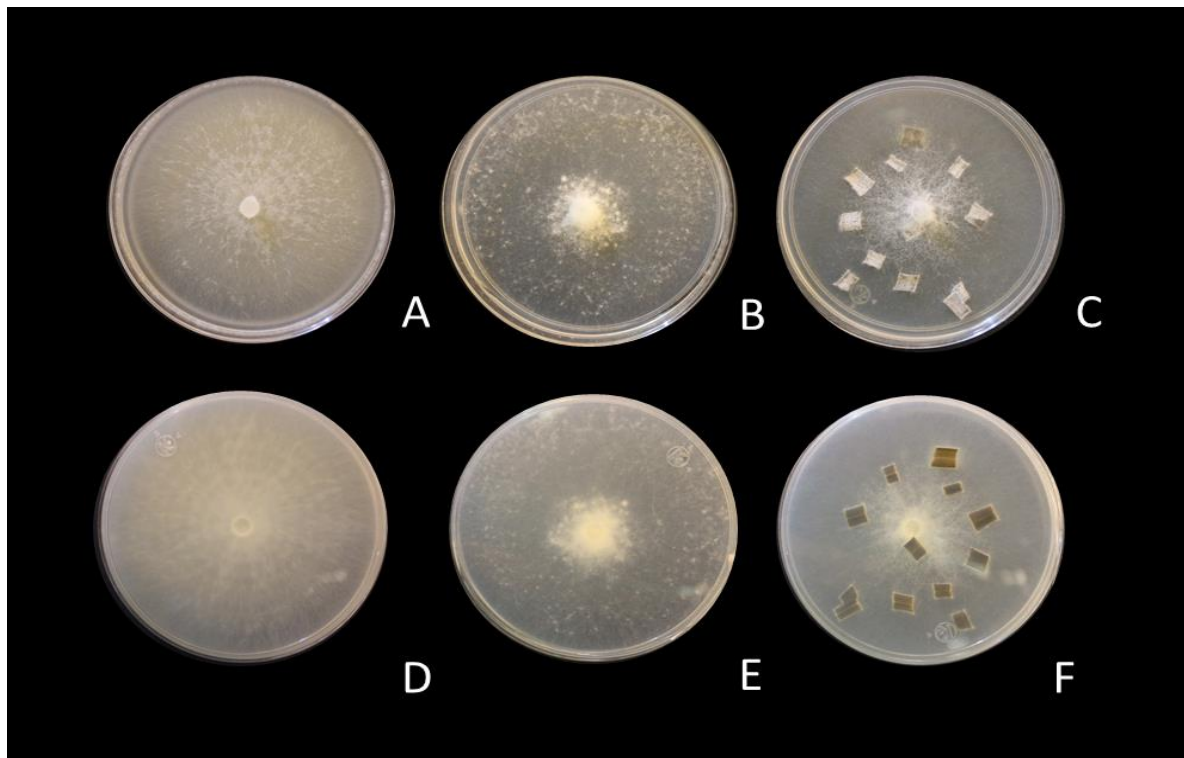


Figura 17. Colonias de *Fusarium* spp. en diferentes medios de cultivo. A) Vista frontal de la colonia en medio de cultivo PDA. B) Vista frontal de la colonia en medio de cultivo SNA. C) Vista frontal de la colonia en medio de cultivo CLA. D) Reverso de la colonia en medio de cultivo PDA. E) Reverso de la colonia en medio de cultivo SNA. F) Reverso de la colonia en medio de cultivo CLA.

La segunda colonia presentó coloraciones diferentes de acuerdo al medio de cultivo en el que se desarrolló. En el PDA el color de la colonia fue amarilla, en SNA fue de color rojiza y en medio de Clavel (*Dianthus caryophyllus*) fue un tono blanquecino con el centro rojizo. En cuanto al resto de características, el crecimiento fue circular, superficie plana pero algodonosa y bordes filamentosos (Figura 18).



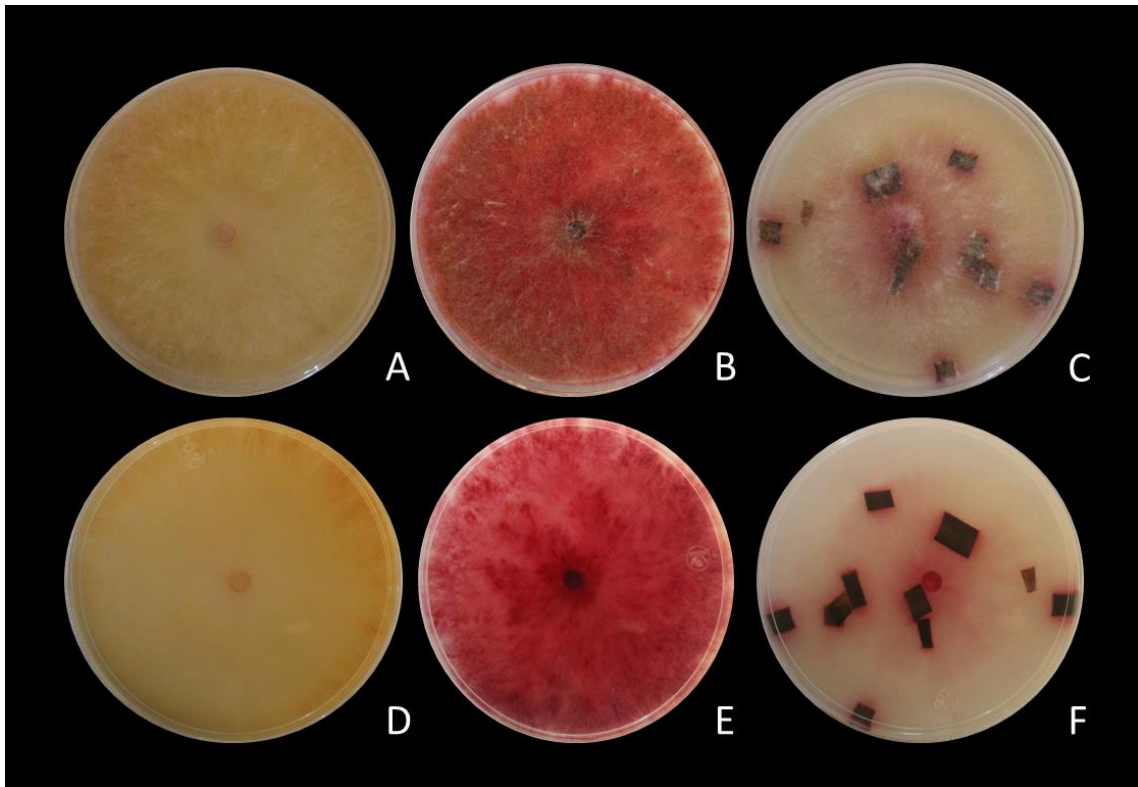


Figura 18. Colonias de *Fusarium* spp. en diferentes medios de cultivo. A) Vista frontal de la colonia en medio de cultivo PDA. B) Vista frontal de la colonia en medio de cultivo SNA. C) Vista frontal de la colonia en medio de cultivo CLA. D) Reverso de la colonia.

### **Género *Puccinia***

El síntoma corresponde a la presencia de pústulas que pueden contener dos tipos de esporas, urediosporas y teliosporas (Figura 19).

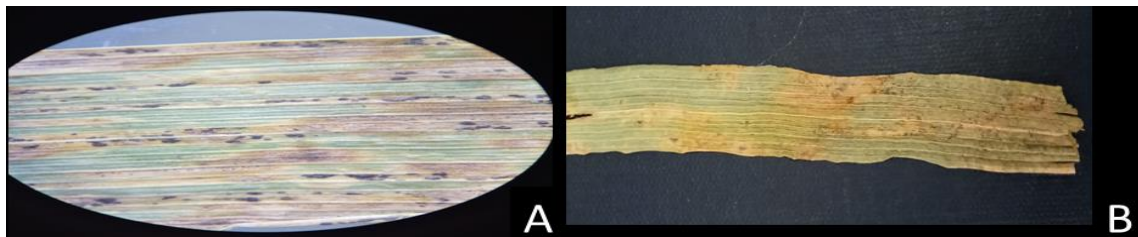


Figura 19. Pústulas de roya. A) Pústulas de teliosporas. B) Pústulas de urediosporas.

Se observaron dos especies de *Puccinia*, identificadas por su morfología, es decir, por las medidas, coloración y distribución que tienen las urediosporas y teliosporas en las hojas de trigo.

*Puccinia recondita*, las uredias son de color rojo anaranjado, esféricas y lisas en su superficie, con un diámetro de 22.53-28  $\mu\text{m}$  (Figura 20).

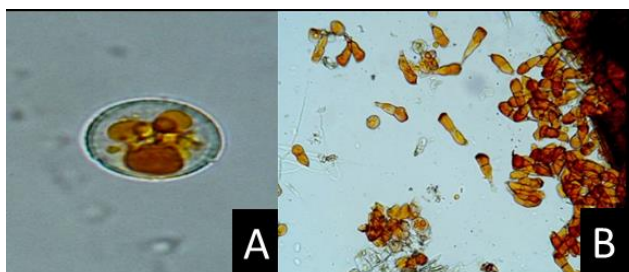


Figura 20. Esporas de *P. recondita*. A) Urediospora. B) Teliospora.

*Puccinia striiformis*, una de las características principales son la distribución de las uredias en forma lineal y de color amarillo, ligeramente esféricas, con un diámetro de 27.3-32.05  $\mu\text{m}$ . Las telias forman estrías negras y angostas en las hojas, tuvieron un tamaño aproximado de 42.94-88.2 x 11.5-18.18  $\mu\text{m}$  (Figura 21).

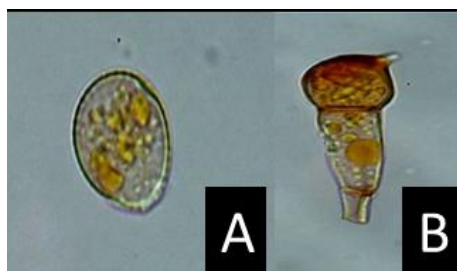


Figura 21. Esporas de *P. striiformis*. A) Urediospora. B) Teliospora.

### **Género *Septoria* y *Zymoseptoria***

Durante el muestreo se encontraron diversos grados de severidad de la septoriosis, tales como halos cloróticos y dentro de ellos picnidios distribuidos en todo el halo (Figura 22).

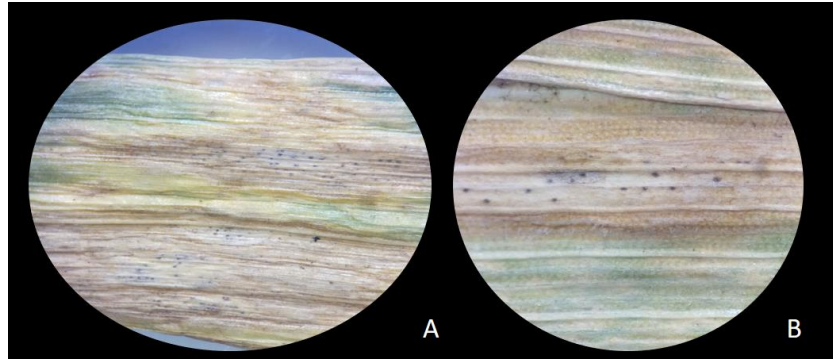


Figura 22. Síntomas del género *Zymoseptoria* spp. A) Halos cloróticos con picnidios. B) Picnidios.

A pesar de encontrar dos especies de *Zymoseptoria*, el síntoma es muy similar entre sí. En algunos casos se advierte una ligera diferencia en el color del picnidio, siendo *Zymoseptoria tritici* de color negro a un tono grisáceo y *Septoria nodorum* color negro a café oscuro.

Para la observación de los conidios o picnidiosporas de *Z. tritici* y *S. nodorum*, se colocaron las muestras en cámara húmeda, de esta forma se produjo el cirro que contiene las picnidiosporas.

Por otro lado, en la morfología de los conidios, las diferencias son muy notables y se especifica a continuación.

Los conidios de *S. nodorum* son del tipo didimospora ya que su forma es acortada y recta, sin ornamentaciones, subhialinas con color paja. El tamaño registrado de *S. nodorum* fue de aproximadamente 14.6- 20.2 x 2.86-3.48  $\mu\text{m}$ . Solo se observaron conidios con un solo septo.

Por otro lado, los conidios de *Z. tritici* son filiformes, sin ornamentación, hialinos, ligeramente curvados. El tamaño registrado fue de aproximadamente 40-77.3 x 1.6-2.84  $\mu\text{m}$  (Figura 23).



Figura 23. Muestra observada en microscopio estéreo a 25x. A) Conidios de *S. nodorum*. B) Conidios de *Z. tritici* observado en fase de contraste.

La forma de la colonia de *S. nodorum* es ligeramente circular con algunas irregularidades, su superficie es ligeramente convexa y sus orillas ligeramente filamentosas. En el caso de *Z. tritici* la colonia es ligeramente circular con algunas irregularidades, su superficie es lisa y presentan una elevación umbeliforme (Figura 24).

Cabe mencionar que la colonia de *Z. tritici* se desarrolló de dos formas, la primera en estadios tempranos con una consistencia semi-líquida o viscosa de color rosado, y la segunda, cuando la colonia maduró desarrolló micelio de color negro con partes blanquecinas.

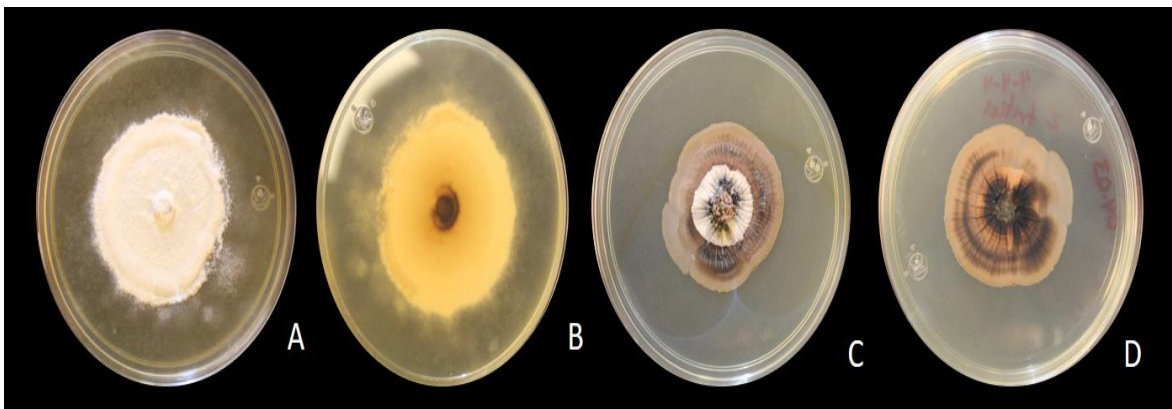


Figura 24. Colonias de *Septoria* spp. y *Zymoseptoria* spp. A) Vista frontal de la colonia *S. nodorum*. B) Reverso de la colonia *S. nodorum*. C) Vista frontal de la colonia de *Z. tritici*. D) Reverso de la colonia *Z. tritici*.

### 5.1.2 Incidencia de enfermedades

El procesamiento de las 136 muestras colectadas en diferentes estados pertenecientes a los Valles Altos de México, dio como resultado la identificación de cuatro géneros fungosos de importancia económica, además de algunos hongos saprófitos pero fueron descartados por no ser patógenos.

A continuación, se presenta un resumen de las regiones geográficas (Estados de la República Mexicana) (Cuadro 6), del origen de las muestras y los géneros de hongos que fueron identificados:

Cuadro 6. Frecuencia de los géneros fúngicos identificados en los Valles Altos de México.

Estado	Géneros identificados				No. de localidades visitadas
	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Bipolaris</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Puccinia</i> spp.	
Hidalgo	5	1	13	23	25
México	11	1	21	39	45
Morelos	0	0	0	1	1
Oaxaca	1	0	1	4	5
Puebla	2	0	9	12	15
Tlaxcala	4	0	16	40	45
TOTAL	22	2	60	119	136

El género con menor frecuencia en las muestras procesadas fue *Bipolaris*, seguido de *Alternaria*, sin embargo, el género *Puccinia* fue el que se presentó en la mayoría de las muestras provenientes de los seis estados.

Lo anterior, se comprobó con el porcentaje de incidencia, el género *Puccinia* fue el de mayor importancia e impacto al registrarse en al menos 87.92 % de las muestras (Cuadro 7).

El género *Fusarium* spp. fue el segundo patógeno que tuvo mayor incidencia con 35.70 %, posteriormente *Alternaria* spp. con 14.44 % y finalmente *Bipolaris* spp. con 1.03 %.

Cuadro 7. Porcentaje de incidencia de los géneros identificados por estado.

Estado	Géneros identificados			
	<i>Alternaria</i> spp. (%)	<i>Bipolaris</i> spp. (%)	<i>Fusarium</i> spp. (%)	<i>Puccinia</i> spp. (%)
Hidalgo	20	4	52	92
México	24.44	2.22	46.66	86.66
Morelos	0	0	0	100
Oaxaca	20	0	20	80
Puebla	13.33	0	60	80
Tlaxcala	8.88	0	35.55	88.88
Promedio	14.44	1.03	35.70	87.92

Se observa que el principal problema de patógenos en trigo producido en los Valles Altos de México, corresponde a la presencia del género *Puccinia* spp. (Figura 25), y en el caso del Estado de Morelos, fue el único patógeno identificado.

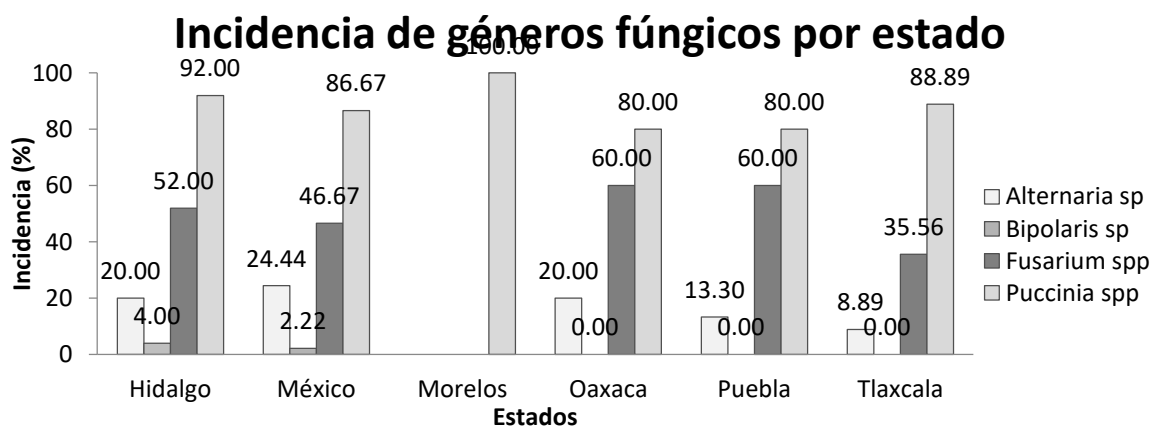


Figura 25. Porcentaje de incidencia de géneros fúngicos por estado.

## 5. 2 Efectos de actinobacterias

De acuerdo con lo observado durante la realización de ensayos previos, se detectó que la presencia de las actinobacterias tiene potencial para el manejo de patógenos desde semilla.

## 5.2.1 Selección de actinobacterias: Bioensayos preliminares

### 5.2.1.1 *Alternaria* spp. y *Bipolaris* spp.

a) Primer bioensayo preliminar: El testigo de *Alternaria* spp., tuvo un crecimiento radial de 1.9 cm en cinco días después de la inoculación. El crecimiento promedio del hongo en interacción con los morfotipos de actinobacterias del grupo M1B fue de 1.6 cm, dando como resultado un promedio de 15.55 % en el porcentaje de inhibición (Cuadro 8 y 9).

Cuadro 8. Crecimiento radial y porcentaje de inhibición de morfotipos del grupo M1B con *Alternaria* spp. de trigo a los 5 días después de la inoculación.

Morfotipo	Crecimiento radial (cm)	Porcentaje de inhibición (%)	Morfotipo	Crecimiento radial (cm)	Porcentaje de inhibición (%)	Morfotipo	Crecimiento radial (cm)	Porcentaje de inhibición (%)	Morfotipo	Crecimiento radial (cm)	Porcentaje de inhibición (%)
1	1	47.37	21	2.40	-26.32	41	0.90	52.63	61	1.30	31.58
2	1.3	31.58	22	2.10	-10.53	42	1.40	26.32	62	1.20	36.84
3	1.7	10.53	23	1.90	0.00	43	2.30	-21.05	63	2.00	-5.26
4	1.6	15.79	24	2.70	-42.11	44	1.90	0.00	64	1.30	31.58
5	1.7	10.53	25	1.70	10.53	45	1.80	5.26	65	1.40	26.32
6	1.6	15.79	26	1.00	47.37	46	2.30	-21.05	66	1.00	47.37
7	1.3	31.58	27	1.60	15.79	47	1.30	31.58	67	1.20	36.84
8	1.6	15.79	28	1.90	0.00	48	1.70	10.53	Testigo	1.90	
9	2	-5.26	29	1.00	47.37	49	1.00	47.37	Media	1.6	15.79
10	2.1	-10.53	30	1.30	31.58	50	1.40	26.32	Promedio	1.6	15.55
11	1.5	21.05	31	1.40	26.32	51	1.80	5.26	Mínimo	0.8	-42.11
12	1.5	21.05	32	1.50	21.05	52	1.80	5.26	Máximo	2.7	57.89
13	1.6	15.79	33	1.70	10.53	53	1.70	10.53			
14	1.9	0.00	34	1.40	26.32	54	1.80	5.26			
15	1.8	5.26	35	1.50	21.05	55	1.10	42.11			
16	1.2	36.84	36	2.00	-5.26	56	1.90	0.00			
17	2	-5.26	37	1.40	26.32	57	1.60	15.79			
18	2	-5.26	38	1.50	21.05	58	0.80	57.89			
19	2.1	-10.53	39	1.80	5.26	59	1.60	15.79			
20	1.4	26.32	40	1.90	0.00	60	1.40	26.32			

El segundo grupo el crecimiento micelial promedio fue de 1.33 cm, lo que es igual a un porcentaje de inhibición promedio del 30.12 %. En un primer análisis, se logra observar

que los morfotipos del segundo grupo tienen un mayor potencial de inhibición para el género *Alternaria* spp. Al menos 30 morfotipos provocaron inhibición en el crecimiento micelial, todos en un rango de 17.92 % y 57.93 %, sin embargo, se realizó su selección con porcentaje de inhibición a partir del 10 % y cuyas colonias no tuvieran contacto entre sí, obteniendo 20 morfotipos del M1B con potencial de inhibición.

Cuadro 9. Crecimiento radial y porcentaje de inhibición de morfotipos del grupo M2B con *Alternaria* spp. a los 5 días después de la inoculación.

Morfotipo	Crecimiento radial (cm)	Porcentaje de inhibición (%)	Morfotipo	Crecimiento radial (cm)	Porcentaje de inhibición (%)	Morfotipo	Crecimiento radial (cm)	Porcentaje de inhibición (%)	Morfotipo	Crecimiento radial (cm)	Porcentaje de inhibición (%)
1	1.8	5.26	21	1.0	47.37	41	1.0	47.37	61	1.3	31.58
2	1.4	26.32	22	1.5	21.05	42	0.9	52.63	62	1.5	21.05
3	0.8	57.89	23	1.7	10.53	43			63	2.0	-5.26
4	1.5	21.05	24	1.1	42.11	44	1.4	26.32	64	1.3	31.58
5	1.5	21.05	25	1.3	31.58	45	1.0	47.37	65	1.0	47.37
6	1.0	47.37	26	1.3	31.58	46	1.3	31.58	66	1.0	47.37
7	1.7	10.53	27	1.3	31.58	47	1.9	0.00	67	1.4	26.32
8	1.4	26.32	28	1.1	42.11	48	1.5	21.05	68	1.9	0.00
9	1.0	47.37	29	1.2	36.84	49	1.9	0.00	69	1.3	31.58
10	1.2	36.84	30	1.6	15.79	50	1.4	26.32	70	1.0	47.37
11	0.9	52.63	31	1.0	47.37	51	1.2	36.84	71	1.9	0.00
12	1.0	47.37	32	1.8	5.26	52	1.5	21.05	72	1.6	15.79
13	1.0	47.37	33	1.3	31.58	53	1.2	36.84	73	0.8	57.89
14	1.9	0.00	34	1.3	31.58	54	1.0	47.37	74	0.9	52.63
15	1.0	47.37	35	1.3	31.58	55	1.4	26.32	75	0.9	52.63
16	1.4	26.32	36	1.0	47.37	56	1.4	26.32	76	1.7	10.53
17	1.8	5.26	37	1.5	21.05	57	1.1	42.11	77	1.9	0.00
18	1.9	0.00	38	1.0	47.37	58	1.0	47.37	Testigo	1.9	0.00
19	1.8	5.26	39	1.0	47.37	59	1.3	31.58			
20	1.2	36.84	40	1.1	42.11	60	1.5	21.05	Mediana	1.3	31.58
									Promedio	1.33	30.12
									Mínimo	0.8	-5.26
									Máximo	2	57.89

Las muestras pertenecientes a M2B tuvieron un crecimiento promedio de 1.33 cm, sin embargo, el valor mínimo en el porcentaje de inhibición es considerablemente diferente al del primer grupo (-42.11 %). Lo que implica un mayor potencial para este segundo



grupo (M2B) sobretodo los morfotipos que tuvieron un porcentaje inhibición mayor al 50 %. Como resultado de este primer y único ensayo para *Alternaria* spp., se seleccionaron 32 morfotipos, 17 del primer grupo y 15 del segundo grupo (Cuadro 10).

Cuadro 10. Morfotipos con potencial al control de *Alternaria* spp.

Morfotipos de actinobacterias						
M1B				M2B		
M1	M29	M50	M64	M2	M34	M55
M7	M32	M55	M66	M12	M44	M59
M16	M33	M58		M27	M46	M61
M26	M41	M60		M28	M48	M67
M27	M49	M62		M29	M50	M74

En el caso de *Alternaria* spp. se mantuvo la investigación en el primer ensayo, por lo que queda una línea de investigación abierta, con el potencial para el control de éste género (Figura 26).



Figura 26. Colonia de *Alternaria* spp. A) Testigo de *Alternaria* spp. B y C) Efecto de los morfotipos de actinobacteria en el crecimiento de *Alternaria* spp.

Respecto a *B. sorokiniana*, el efecto de inhibición se observó al quinto día después de la inoculación. El crecimiento promedio del primer grupo corresponde a 1.7 cm, dando como resultado un porcentaje de inhibición de aproximadamente -1.84 %, no obstante, para el segundo grupo se obtuvo un promedio de 1.72 cm y un porcentaje de -1.01 (Cuadro 11). En este caso el efecto de las actinobacterias no destaca en alguno de los dos grupos evaluados.

Cuadro 11. Crecimiento radial y porcentaje de inhibición de morfotipos del grupo M1B con *B. sorokiniana* a los 5 días después de la inoculación.

Morfotipo	Crecimiento radial (cm)	Porcentaje de inhibición (%)	Morfotipo	Crecimiento radial (cm)	Porcentaje de inhibición (%)	Morfotipo	Crecimiento radial (cm)	Porcentaje de inhibición (%)	Morfotipo	Crecimiento radial (cm)	Porcentaje de inhibición (%)
<u>1</u>	<u>1</u>	<u>41.18</u>	21	2.7	-58.82	<u>41</u>	<u>1</u>	<u>41.18</u>	<u>61</u>	<u>1.2</u>	<u>29.41</u>
2	1.8	-5.88	22	1.8	-5.88	<u>42</u>	<u>0.7</u>	<u>58.82</u>	<u>62</u>	<u>1.3</u>	<u>23.53</u>
3	2.2	-29.41	23	2.6	-52.94	43	2.2	-29.41	63	2.5	-47.06
<u>4</u>	<u>1.2</u>	<u>29.41</u>	24	2.2	-29.41	44	1.7	0.00	<u>64</u>	<u>0.7</u>	<u>58.82</u>
5	2.6	-52.94	25	1.6	5.88	45	1.5	11.76	65	1.4	17.65
6	2.3	-35.29	26	2.4	-41.18	46	2.7	-58.82	<u>66</u>	<u>0.6</u>	<u>64.71</u>
<u>7</u>	<u>1</u>	<u>41.18</u>	27	2.1	-23.53	<u>47</u>	<u>1.1</u>	<u>35.29</u>	67	2	-17.65
<u>8</u>	<u>1.1</u>	<u>35.29</u>	28	2.6	-52.94	48	1.2	29.41	Testigo	1.7	0.00
9	2	-17.65	29	1.1	35.29	<u>49</u>	<u>1.3</u>	<u>23.53</u>			
10	1.9	-11.76	30	1.8	-5.88	50	1.7	0.00	Mediana	1.6	5.88
11	3.1	-82.35	31	1.4	17.65	51	1.4	17.65	Promedio	1.72	-1.40
12	1.9	-11.76	32	1.5	11.76	52	2	-17.65	Mínimo	0.6	-94.12
13	3.3	-94.12	<u>33</u>	<u>0.7</u>	<u>58.82</u>	53	1.4	17.65	Máximo	3.3	64.70
14	2	-17.65	34	1.5	11.76	54	1.2	29.41			
15	1.9	-11.76	35	1.1	35.29	<u>55</u>	<u>1</u>	<u>41.18</u>			
<u>16</u>	<u>1.2</u>	<u>29.41</u>	<u>36</u>	<u>0.7</u>	<u>58.82</u>	56	1.5	11.76			
17	2.8	-64.71	37	2	-17.65	<u>57</u>	<u>1.4</u>	<u>17.65</u>			
18	2.5	-47.06	38	1.5	11.76	58	1.8	-5.88			
19	2.8	-64.71	39	1.9	-11.76	59	1.4	17.65			
20	2	-17.65	40	2.8	-64.71	60	1.5	11.76			

Se detectaron 33 morfotipos con efecto de inhibición (1.21 a 64.75 %) en el primer grupo (M1B) y 35 morfotipos en el grupo M2B con un rango en el porcentaje de inhibición de 4.74 a 47.10 % (Cuadro 12). En contra parte, en el primer grupo se detectaron 34 cepas con efecto promotor ya que el crecimiento del hongo en presencia de esas actinobacterias creció más que el testigo; y 42 del segundo grupo con el mismo efecto.

Cuadro 12. Crecimiento radial y porcentaje de inhibición de morfotipos del grupo M2B, con *B. sorokiniana* a los 5 días después de la inoculación.

Morfotipo	Crecimiento radial (cm)	Porcentaje de inhibición (%)	Morfotipo	Crecimiento radial (cm)	Porcentaje de inhibición (%)	Morfotipo	Crecimiento radial (cm)	Porcentaje de inhibición (%)	Morfotipo	Crecimiento radial (cm)	Porcentaje de inhibición (%)
1	2.7	-58.82	21	1	41.18	41	1.5	11.76	61	1.7	0.00
2	2	-17.65	<u>22</u>	<u>1.3</u>	<u>23.53</u>	<u>42</u>	<u>1.3</u>	<u>23.53</u>	62	1.4	17.65
<u>3</u>	<u>1.3</u>	<u>23.53</u>	23	1.8	-5.88	43	--	--	63	2	-17.65
<u>4</u>	<u>1.7</u>	<u>0.00</u>	24	1.7	0.00	44	2.2	-29.41	64	1.6	5.88
5	2.3	-35.29	25	1.7	0.00	<u>45</u>	<u>0.9</u>	<u>47.06</u>	65	1.5	11.76
6	1.7	0.00	26	1.6	5.88	46	1.5	11.76	66	1.5	11.76
7	1.9	-11.76	<u>27</u>	<u>1.5</u>	<u>11.76</u>	47	2	-17.65	67	2.1	-23.53
<u>8</u>	<u>1.3</u>	<u>23.53</u>	<u>28</u>	<u>1.1</u>	<u>35.29</u>	48	1.8	-5.88	68	2.5	-47.06
9	1.6	5.88	29	2	-17.65	49	1.9	-11.76	69	1.5	11.76
10	1.2	29.41	30	1.8	-5.88	50	2.2	-29.41	<u>70</u>	<u>1.3</u>	<u>23.53</u>
11	1.5	11.76	31	1.5	11.76	51	1.5	11.76	71	1.8	-5.88
12	1.8	-5.88	32	2.7	-58.82	52	2.5	-47.06	72	1.6	5.88
13	1.7	0.00	33	1.6	5.88	<u>53</u>	<u>1.4</u>	<u>17.65</u>	<u>73</u>	<u>1</u>	<u>41.18</u>
14	1.9	-11.76	<u>34</u>	<u>1.3</u>	<u>23.53</u>	54	1.4	17.65	<u>74</u>	<u>1.1</u>	<u>35.29</u>
<u>15</u>	<u>1</u>	<u>41.18</u>	<u>35</u>	<u>1.7</u>	<u>0.00</u>	55	2.5	-47.06	75	1.3	23.53
16	1.9	-11.76	36	1.9	-11.76	56	2.5	-47.06	76	2.2	-29.41
17	2.7	-58.82	37	2	-17.65	57	2	-17.65	77	1.3	23.53
18	1.8	-5.88	38	1.9	-11.76	58	1.7	0.00	Testigo	1.7	
19	2	-17.65	39	1.5	11.76	59	1.5	11.76			
20	1.7	0.00	40	1.8	-5.88	<u>60</u>	<u>1.2</u>	<u>29.41</u>	Mediana	1.7	0
									Promedio	1.72	-1.01
									Mínimo	0.9	-58.82
									Máximo	2.7	47.05

Derivado de los criterios ya mencionados, se seleccionaron 17 morfotipos del grupo M1B y 16 del M2B, para realizar el segundo ensayo (Cuadro 13).

Cuadro 13. Morfotipos con potencial al control de *Bipolaris* spp.

Morfotipos de actinobacterias							
M1B				M2B			
M1	M33	M49	M64	M3	M27	M45	M74
M4	M36	M55	M66	M4	M28	M53	
M7	M41	M57		M8	M34	M60	
M8	M42	M61		M15	M35	M70	
M16	M47	M62		M22	M42	M73	

El efecto de inhibición se observa cuando la colonia del patógeno detiene su crecimiento en las áreas del PDA cercanas a la actinobacteria (Figura 27).



Figura 27. Colonia de *B. sorokiniana*. A) Testigo *B. sorokiniana*. B) Sin efecto inhibitor de diferentes morfotipos de actinobacterias. C) Efecto de los morfotipos de actinobacteria, con dos casos de inhibición de crecimiento micelial.

b) Segundo bioensayo preliminar: En el segundo ensayo se hace referencia sólo al patógeno *B. sorokiniana* y los morfotipos de actinobacterias que cumplieron los criterios de selección en el primer ensayo.

A pesar de ser un segundo ensayo, los resultados variaron del primero, sin embargo, se lograron destacar dos morfotipos, un biotipo por cada grupo. En ambos casos el porcentaje de inhibición fue del 50 %, siendo los valores más altos. En promedio hubo un 24.70 % de inhibición en el crecimiento micelial de *B. sorokiniana*, no obstante, de tener un promedio bajo, todos los morfotipos presentaron un valor positivo en el porcentaje de inhibición, el valor mínimo fue de un 5 % en ambos grupos (Cuadro 14).

Cuadro 14. Crecimiento micelial y porcentaje de inhibición de *B. sorokiniana* con morfotipos seleccionados.

Morfotipo	M1B		Morfotipo	M2B	
	Crecimiento radial (cm)	PICM(%)		Crecimiento radial (cm)	PICM(%)
M1	1.3	35	M 3	1.7	15
M 4	1.1	45	M 4	1.8	10
M 7	1.4	30	M 8	1.9	5
M 8	1.9	5	M 15	1.4	30
M 16	1.4	30	M 22	1.5	25
<u>M 33</u>	<u>1</u>	<u>50</u>	M 27	1.4	30
M 36	1.7	15	M 28	1.7	15
M 41	1.2	40	M 34	1.7	15
M 42	1.9	5	M 35	1.9	5
M 47	1.7	15	M 42	1.6	20
M 49	1.7	15	M 45	1.4	30
M 55	1.8	10	M 55	1.7	15
M 57	1.4	30	M 60	1.3	35
M 61	1.8	10	M 70	1.7	15
M 62	1.2	40	M 73	1.6	20
M 64	1.2	40	<u>M 74</u>	<u>1</u>	<u>50</u>
			Testigo	2	

Los efectos observados en los bioensayos con *B. sorokiniana* (Figura 28), llevaron a considerar a los morfotipos M1B M33 y M2B M74, del grupo uno y dos respectivamente.

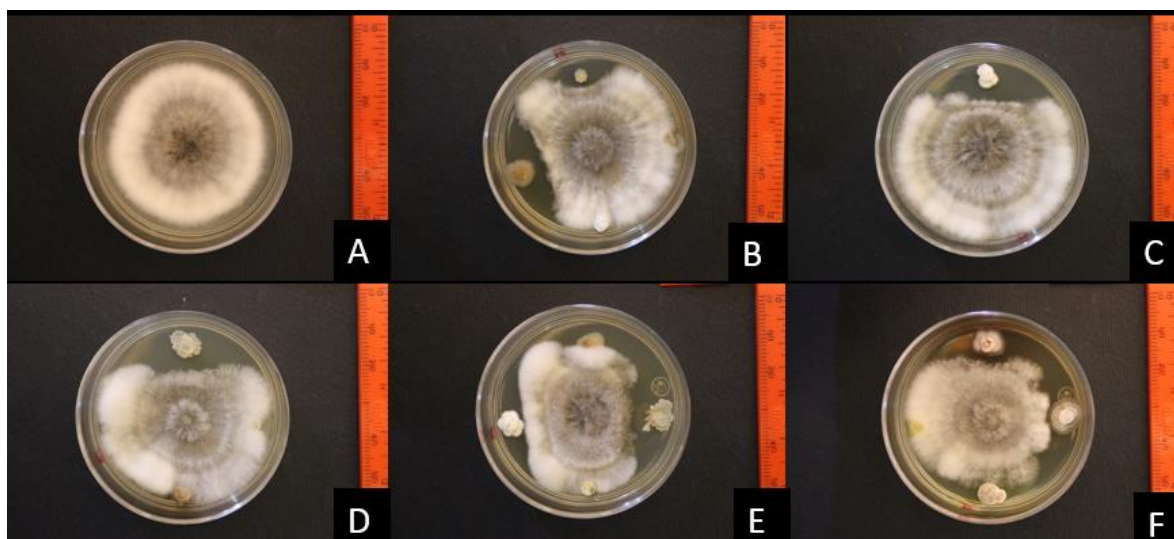


Figura 28. Colonia de *B. sorokiniana*. A) Testigo *B. sorokiniana*. B, C, D, E y F) Efecto de los morfotipos de actinobacteria, con cinco casos de inhibición de crecimiento micelial.

### 5.2.1.2 *Fusarium* spp.

En el caso de *Fusarium* spp. su crecimiento fue más rápido que el crecimiento de los dos patógenos anteriores y de las actinobacterias evaluadas, sin embargo, se pudo obtener morfotipos potenciales para su inhibición.

a) Primer bioensayo preliminar: En su mayoría para los morfotipos alcanzaron el máximo crecimiento al tercer día (2.2 cm), es decir, 87.5 % de los morfotipos de los dos grupos evaluados no lograron inhibir el crecimiento del hongo. El promedio del crecimiento micelial del primer grupo fue de 2.08 cm y su porcentaje de inhibición promedio fue de 5.43 %, dicho resultado se debe a que la mayoría presentó 0 % de inhibición. El segundo grupo tuvo un crecimiento promedio de 2.10 cm y su porcentaje de inhibición de 4.55 %, similar al primer grupo (Cuadro 15).

Cuadro 15. Crecimiento radial y porcentaje de inhibición de morfotipos por grupo.

Morfotipo	Crecimiento radial	PICM(%)	Morfotipo	Crecimiento radial	PICM(%)	Morfotipo	Crecimiento radial	PICM(%)	Morfotipo	Crecimiento radial	PICM (%)
1	1.2	45.45	21	2.2	0.00	41	1.1	50.00	61	2.2	0.00
2	2.2	0.00	22	2.2	0.00	42	2.2	0.00	62	2.2	0.00
3	2.2	0.00	23	2.2	0.00	43	2.2	0.00	63	2.2	0.00
4	1.3	40.91	24	2.2	0.00	44	2.2	0.00	64	2.2	0.00
5	2.2	0.00	25	2.2	0.00	45	2.2	0.00	65	2.2	0.00
6	2.2	0.00	26	2.2	0.00	46	2.2	0.00	66	2.2	0.00
7	2.2	0.00	27	2.2	0.00	47	2.2	0.00	67	2.2	0.00
8	2.2	0.00	28	2.2	0.00	48	2.2	0.00	Testigo	2.2	0.00
9	2.2	0.00	29	2.2	0.00	49	2.2	0.00			
10	2.2	0.00	30	2.2	0.00	50	2.2	0.00	Media	2.2	0.00
11	2.2	0.00	31	2.2	0.00	51	2.2	0.00	Promedio	2.08	5.43
12	1.3	40.91	32	2.2	0.00	52	2.2	0.00	Mínimo	1.10	0.00
13	2.2	0.00	33	1.3	40.91	53	2.2	0.00	Máximo	2.2	50
14	1.3	40.91	34	2.2	0.00	54	2.2	0.00			
15	2.2	0.00	35	2.2	0.00	55	1.4	36.36			
16	1.4	36.36	36	2.2	0.00	56	2.2	0.00			
17	2.2	0.00	37	2.2	0.00	57	1.5	31.82			

18	2.2	0.00	38	2.2	0.00	58	2.2	0.00
19	2.2	0.00	39	2.2	0.00	59	2.2	0.00
20	2.2	0.00	40	2.2	0.00	60	2.2	0.00

Los resultados obtenidos para *Fusarium* spp. no se observaron diferencias en los grupos, los valores de promedio (como ya se mencionó anteriormente), los mínimos, los máximos e incluso el rango de variación fueron similares (Cuadro 16).

Cuadro 16. Crecimiento radial y porcentaje de inhibición de morfotipos del grupo M2B con *Fusarium* spp. de trigo a los 3 días después de la inoculación.

Morfotipo	Crecimiento radial (cm)	Porcentaje de inhibición (%)	Morfotipo	Crecimiento radial (cm)	Porcentaje de inhibición (%)	Morfotipo	Crecimiento radial (cm)	Porcentaje de inhibición (%)	Morfotipo	Crecimiento radial (cm)	Porcentaje de inhibición (%)
1	2.2	0.00	21	2.2	0.00	41	2.2	0.00	61	2.2	0.00
2	2.2	0.00	22	2.2	0.00	42	2.2	0.00	62	2.2	0.00
3	<u>1.1</u>	<u>50.0</u>	23	2.2	0.00	43	2.2	0.00	63	2.2	0.00
4	2.2	0.00	24	2.2	0.00	44	2.2	0.00	64	2.2	0.00
5	2.2	0.00	25	2.2	0.00	45	<u>1</u>	<u>54.5</u>	65	2.2	0.00
6	2.2	0.00	26	2.2	0.00	46	2.2	0.00	66	2.2	0.00
7	2.2	0.00	<u>27</u>	<u>1.5</u>	<u>31.82</u>	47	2.2	0.00	67	1.5	31.82
8	2.2	0.00	28	2.2	0.00	48	2.2	0.00	68	2.2	0.00
9	2.2	0.00	29	2.2	0.00	49	2.2	0.00	69	2.2	0.00
10	2.2	0.00	30	2.2	0.00	50	2.2	0.00	<u>70</u>	<u>1.5</u>	<u>31.82</u>
11	2.2	0.00	31	2.2	0.00	51	2.2	0.00	71	2.2	0.00
12	2.2	0.00	32	2.2	0.00	52	2.2	0.00	72	2.2	0.00
13	2.2	0.00	33	2.2	0.00	53	2.2	0.00	<u>73</u>	<u>1.3</u>	<u>40.91</u>
14	2.2	0.00	34	2.2	0.00	54	2.2	0.00	<u>74</u>	<u>0.9</u>	<u>59.09</u>
<u>15</u>	<u>1.1</u>	<u>50.0</u>	35	2.2	0.00	55	2.2	0.00	75	2.2	0.00
16	2.2	0.00	36	2.2	0.00	56	2.2	0.00	76	2.2	0.00
17	2.2	0.00	37	2.2	0.00	57	2.2	0.00	77	2.2	0.00
18	2.2	0.00	38	2.2	0.00	58	2.2	0.00	Testigo	2.2	

19	2.2	0.00	39	2.2	0.00	59	2.2	0.00			
20	2.2	0.00	40	2.2	0.00	<u>60</u>	<u>2.2</u>	<u>0.00</u>	Media	2.2	0
									Promedio	2.10	4.55
									Mínimo	0.90	0.00
									Máximo	2.2	59.09

Cabe destacar que los resultados fueron muy contundentes, ya que los morfotipos seleccionados fueron los únicos que presentaron un porcentaje de inhibición positivo, desde un 31.82 % hasta el 50 % en el primer grupo; en el segundo, los porcentajes positivos oscilaron entre 31.82 % y 59.09 %, los resultados de inhibición también se observan a simple vista (Figura 29).

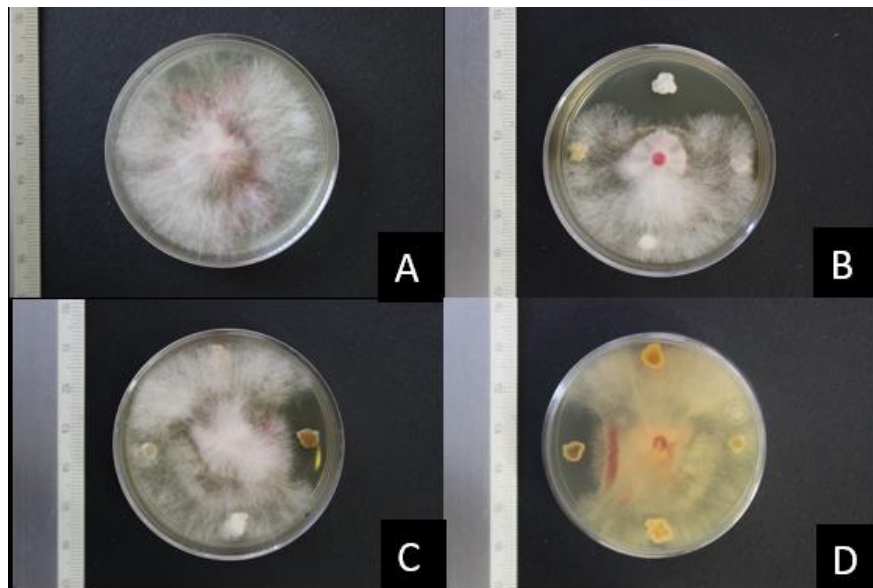


Figura 29. Colonia de *Fusarium* spp. A) Testigo de *Fusarium* spp. B) Efecto de inhibición en el crecimiento colonia. C) Ligero efecto de inhibición. D) Cambio de coloración en la colonia al entrar en contacto con los compuestos producidos por la actinobacteria.

A lo largo del primer ensayo de *Fusarium* spp., se observó que la velocidad de crecimiento micelial fue más acelerado en comparación con los primeros dos hongos, por lo que se realizó una modificación en la metodología para realizar el segundo ensayo; consistió en inocular las actinobacterias con dos días de anticipación.



A continuación, se resume los morfotipos seleccionados del primer bioensayo preliminar (Cuadro 17).

Cuadro 17. Actinobacterias seleccionadas en el ensayo de *Fusarium* spp.

Morfotipo de actinobacterias			
M1B		M2B	
M1	M33	M3	M70
M4	M41	M15	M73
M12	M55	M27	M74
M14	M57	M45	
M16		M60	

b) Segundo bioensayo preliminar: De igual forma, se observó variación en los resultados en relación al primer ensayo, sin embargo, algunos morfotipos mantuvieron su efecto de inhibición. A pesar de tener altos porcentajes de inhibición, se registraron tres casos en los que el efecto fue inverso, es decir, el hongo en presencia de actinobacterias, creció más que el testigo de *Fusarium* spp. (Cuadro 18).

El rango del porcentaje de inhibición fue de -15.78 a 63.15 % en el primer grupo y en el segundo, -5.26 a 68.42 %.

Cuadro 18. Crecimiento micelial y PICM de los diferentes morfotipos de acuerdo a su grupo de evaluación.

Morfotipo	M1B		Morfotipo	M2B	
	Crecimiento radial (cm)	PICM (%)		Crecimiento radial (cm)	PICM (%)
M1	1	47.36	M3	2	-5.26
M4	0.7	63.15	M15	1.8	5.26
M12	0.9	52.63	M27	2	-5.26
M14	1.2	36.84	M45	1.2	36.84
M16	1	47.36	M60	0.9	52.63
M33	0.8	57.89	M70	1.5	21.05
M41	0.8	57.89	M73	1.5	21.05
M55	1.5	21.05	M74	0.6	68.42
M57	2.2	-15.78	Testigo	1.9	

Con las altas probabilidades de detener el crecimiento de las colonias de *Fusarium* spp., se procedió a la confrontación dual de los morfotipos M1, M4, M16, M33, M41, M60 y

M74 del primer grupo (M1B), del segundo (M2B) se optó por los morfotipos M60 y M74 (Figura 30).

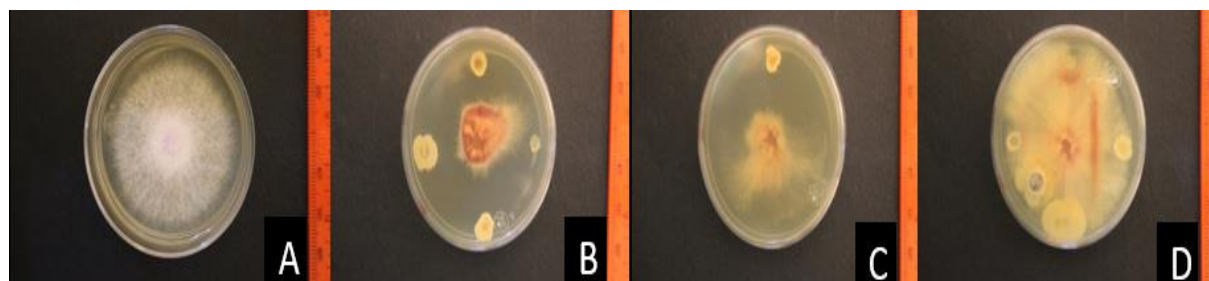


Figura 30. Colonia de *Fusarium* spp.

## 5.2.2 Selección de actinobacterias: Confrontación dual

Como se mencionó en materiales y métodos, la confrontación dual se realizó considerando tres cepas de *Fusarium* spp., por lo que a continuación se presenta la información por cada cepa con su respectiva variable.

### 5.2.2.1 *Fusarium* spp. clave 31b

#### Tasa de crecimiento micelial

La tasa de crecimiento de *Fusarium* spp. indica que el segundo y tercer día fueron de mayor crecimiento del hongo, seguido por un declive, que en algunos casos es muy marcado, como es el caso del crecimiento que tuvo el hongo en interacción con el morfotipo 4, M33, M41 y M2B M60, en los que se reduce su crecimiento a partir del cuarto día (Cuadro 19).

Cuadro 19. Tasa de crecimiento micelial de *Fusarium* spp. Clave 31 b.

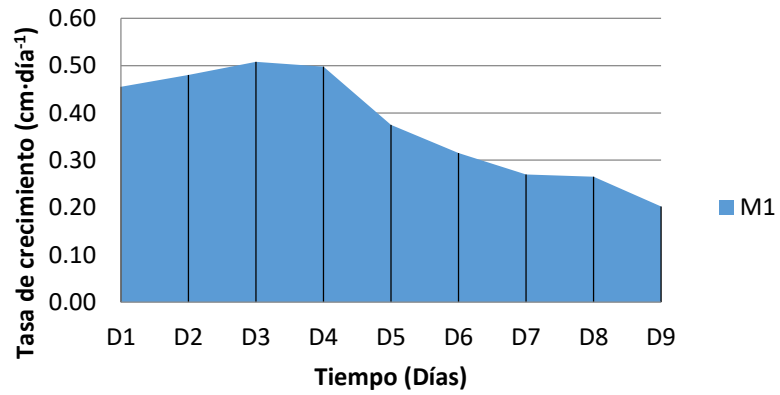
Morfotipo	Tasa de crecimiento (cm·día <sup>-1</sup> )								
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9
M1B M1	0.46	0.48	<u>0.51</u>	0.50	0.38	0.32	0.27	0.27	0.20
M1B M4	0.47	0.46	<u>0.50</u>	0.41	0.15	0.07	0.03	0.07	0.00

M1B M16	0.49	0.49	<u>0.52</u>	0.51	0.36	0.34	0.22	0.20	0.13
M1B M33	0.50	<u>0.52</u>	0.39	0.27	0.08	0.05	0.09	0.06	0.04
M1B M41	0.51	<u>0.53</u>	0.46	0.37	0.18	0.14	0.13	0.10	0.11
M2B M60	<u>0.49</u>	0.48	0.44	0.41	0.25	0.20	0.12	0.14	0.14
M2B M74	<u>0.52</u>	0.51	0.43	0.40	0.31	0.27	0.25	0.22	0.21
Testigo	0.51	0.52	<u>0.53</u>	0.44	0.39	0.33	0.28	0.29	0.28

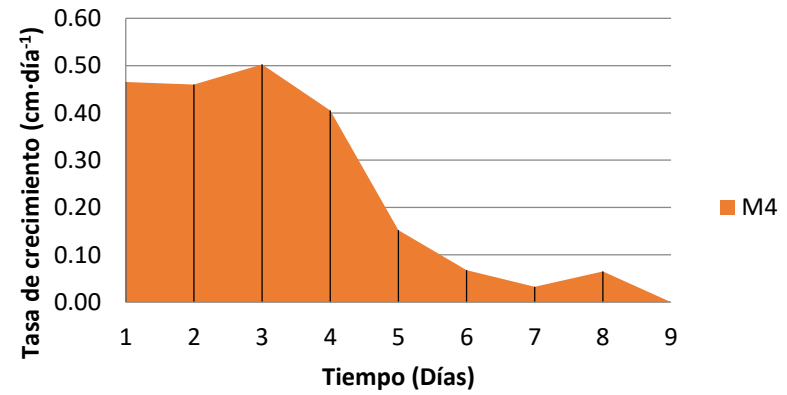
---

En las gráficas de las tasas, se observaron una tendencia ligeramente creciente desde el primer día, no obstante, el declive del crecimiento se acentúa a partir del día cuatro, en los morfotipos M1B M4, M1B M33, M1B M41 y M2B M60.

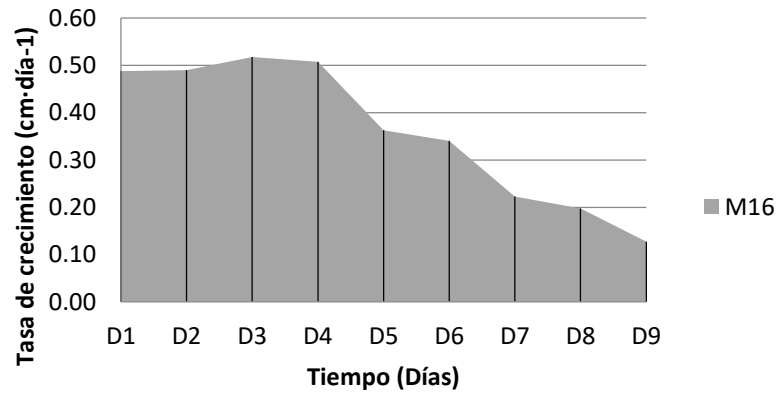
### Tasa de crecimiento



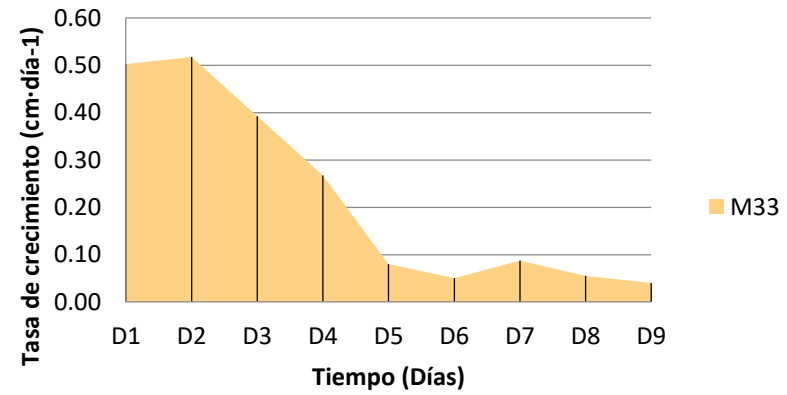
### Tasa de crecimiento



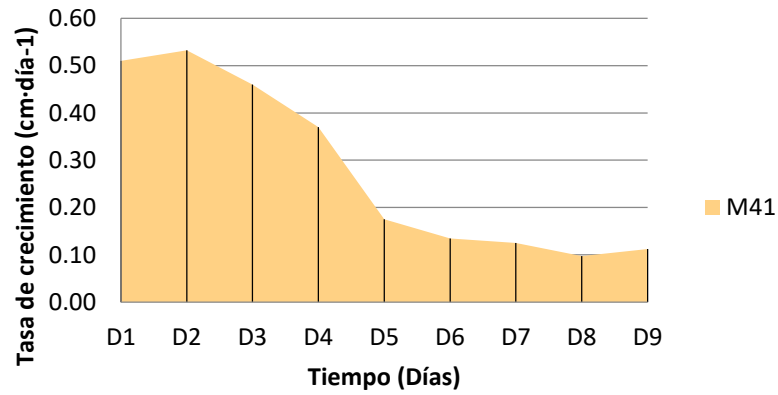
### Tasa de crecimiento



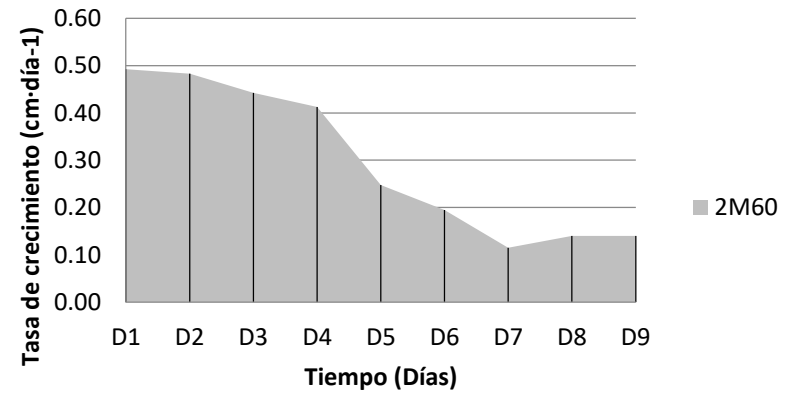
### Tasa de crecimiento



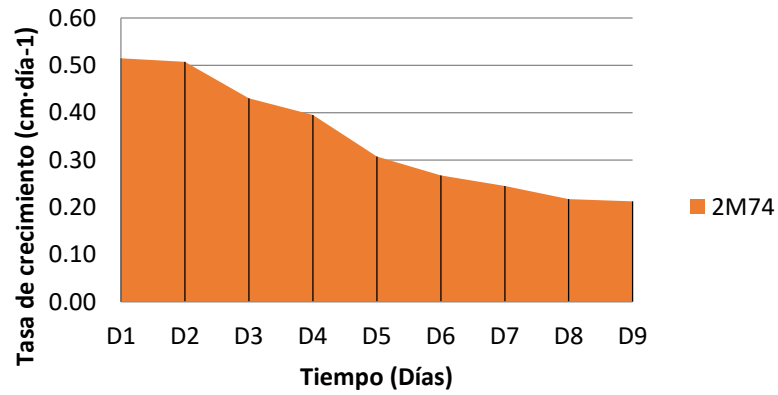
### Tasa de crecimiento



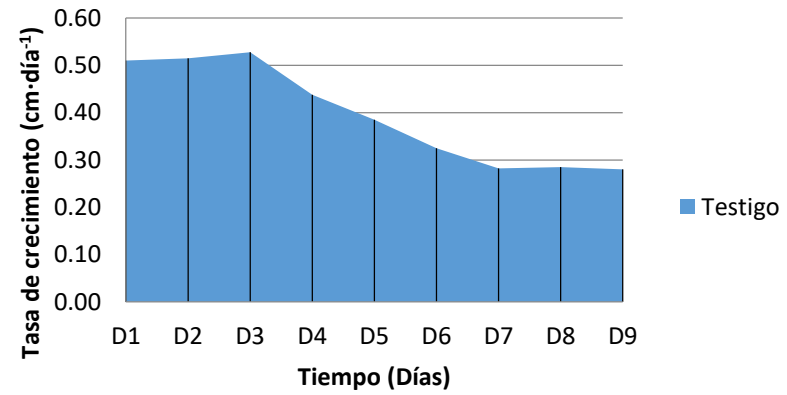
### Tasa de crecimiento



### Tasa de crecimiento



### Tasa de crecimiento



## Área bajo la curva

El área bajo la curva mostró el efecto en el crecimiento micelial del hongo con independencia de la velocidad de crecimiento (tasa de crecimiento), por lo que se detectaron los morfotipos que no tuvieron efecto inhibitor del crecimiento, descalificando a M1B M1, M1B M 16 y M2B M 74 considerando que el área fue similar al del testigo (Cuadro 20).

Cuadro 20. Área bajo la curva del crecimiento micelial de *Fusarium* spp. clave 31 b.

Morfotipo	Área bajo la curva (cm <sup>2</sup> )									Total
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	
M1B M1	0.23	0.70	1.19	1.69	2.13	2.47	2.77	3.03	3.27	15.29
M1B M4	0.23	0.70	1.18	1.63	1.91	2.02	2.07	2.12	2.15	10.46
M1B M16	0.24	0.71	1.19	1.70	2.16	2.52	2.82	3.03	3.20	15.10
M1B M33	0.25	0.76	1.22	1.55	1.72	1.79	1.85	1.93	1.97	9.98
M1B M41	0.26	0.78	1.27	1.69	1.96	2.12	2.25	2.36	2.46	12.11
M2B M60	0.25	0.73	1.20	1.62	1.95	2.18	2.33	2.46	2.60	12.64
M2B M74	0.26	0.77	1.24	1.65	2.00	2.29	2.55	2.78	2.99	14.45
Testigo	0.26	0.77	1.29	1.77	2.18	2.54	2.84	3.13	3.41	16.23

Por otro lado, el morfotipo que registró el menor crecimiento fue el M1B M33 con 9.98 cm<sup>2</sup>, mientras que el testigo presentó un crecimiento de 16.23 cm<sup>2</sup>.

## Porcentaje de inhibición

El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, corrobora los resultados observados en la tasa de crecimiento, el área bajo la curva, es decir, los morfotipos M1B M4 y M1B M33, son los tratamientos con mayor porcentaje de inhibición y estadísticamente fueron los mejores tratamientos, identificados como el grupo “a”, sin embargo, en el caso de M1B M4 comparte la clasificación con el grupo “b”, siendo el único del mismo grupo (Cuadro 21).

Cuadro 21. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium* spp.

Grupo	Morfotipo	<i>F. 31 b</i>	
		PICM (%)	
M1B	M1	6.17	e
	M4	42.5	a b
	M16	11.44	d
	M33	47.15	a
	M41	31.27	c
M2B	M60	29.1	c
	M74	16.31	d

Se puede observar el crecimiento colonial de testigo y de las colonias del hongo que estuvieron en interacción con alguno de los morfotipos previamente seleccionados (Figura 31).

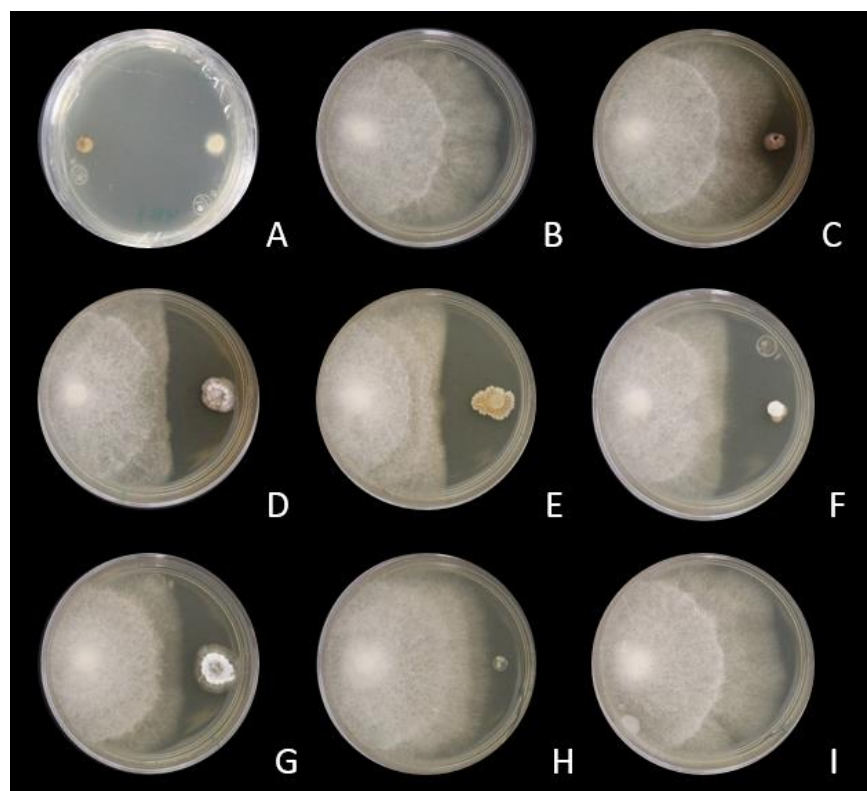


Figura 31. Colonia de *Fusarium* spp. clave 31b. A) Distribución de los discos de inóculo. B) Crecimiento de la colonia testigo de *Fusarium* spp. clave 31b. C) *Fusarium* spp. clave 31b y morfotipo M1B M1. D) *Fusarium* spp. clave 31b y morfotipo M1B M4. E) *Fusarium* spp. clave 31b y morfotipo M1B M33. F) *Fusarium* spp. clave 31b y morfotipo M1B M41. G) *Fusarium* spp. clave 31b y morfotipo M2B M60. H) *Fusarium* spp. clave 31b y morfotipo M2B M74. I). Crecimiento colonial de testigo *Fusarium* spp. clave 31b.

### 5.2.2.2 *Fusarium* spp. clave 62 b

#### Tasa de crecimiento

La tasa de crecimiento demuestra que tuvo su mayor crecimiento los días tres y cuatro, a excepción de los morfotipos M1B M1 y M1B M16 cuyo crecimiento lo tuvo el día 5. Sin embargo, el patrón de crecimiento es el mismo que de la cepa anterior, después de los días de mayor crecimiento, se presentó un declive hasta llegar a su crecimiento mínimo o casi nulo en el séptimo día (Cuadro 22).

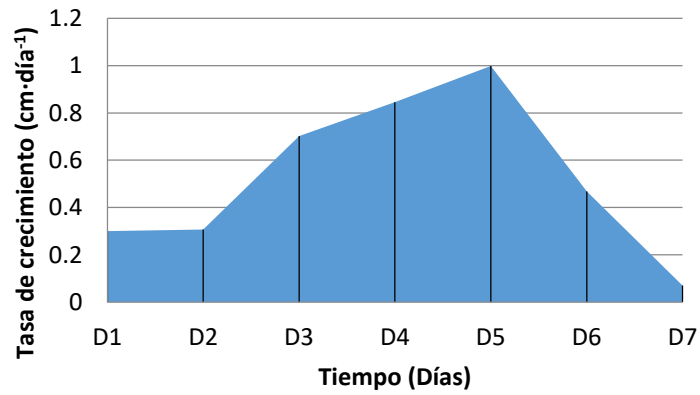
Cuadro 22. Tasa de crecimiento de la cepa de *Fusarium* spp. clave 62 b.

Morfotipo	Tasa de crecimiento (cm·día <sup>-1</sup> )						
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
M1B M1	0.3	0.31	0.70	0.85	1.00	0.47	0.07
M1B M 4	0.3	0.31	0.57	0.43	0.37	0.20	0.03
M1B M 16	0.3	0.39	0.59	0.84	0.95	0.28	0.01
M1B M 33	0.3	0.38	0.58	0.52	0.43	0.08	0.02
M1B M 41	0.3	0.35	0.46	0.66	0.55	0.21	0.01
M2B M 60	0.3	0.32	0.35	0.38	0.32	0.14	0.02
M2B M 74	0.3	0.33	0.87	0.89	0.62	0.26	0.09
Testigo	0.3	0.30	0.95	0.95	0.74	0.39	0.37

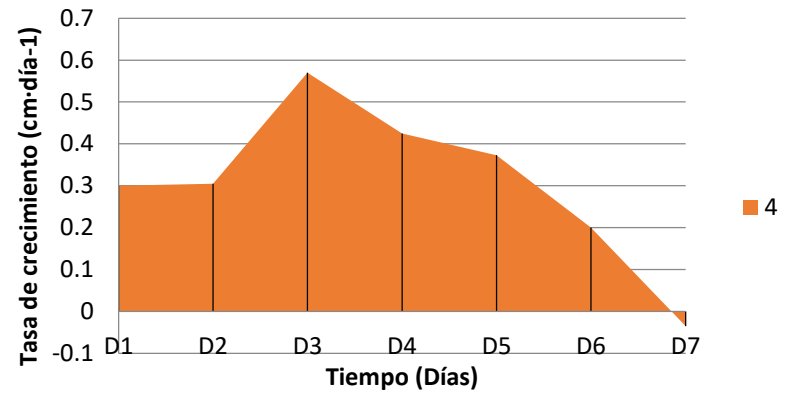
Las tasas de crecimiento presentaron una tendencia Gaussiana teniendo punto de crecimiento máximo en el día 3, 4 y 5 de acuerdo con cada morfotipo.



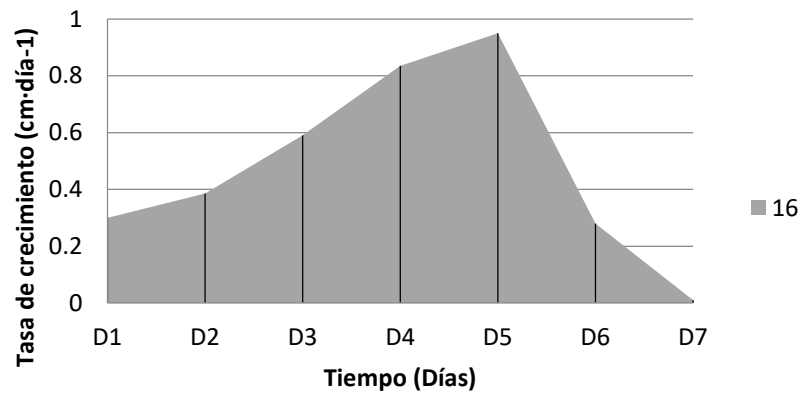
### Tasa de crecimiento



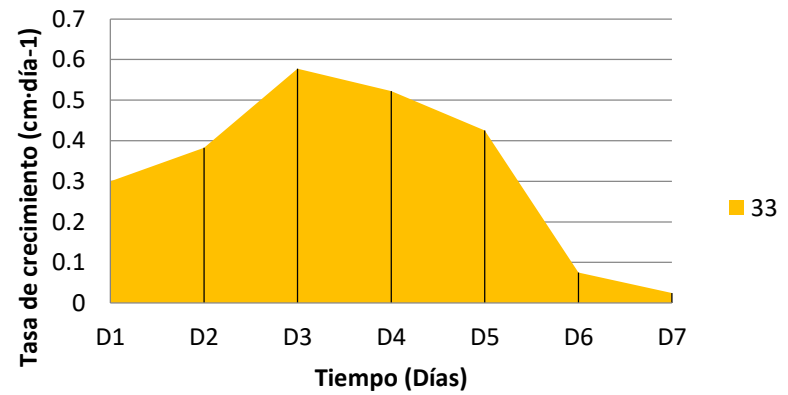
### Tasa de crecimiento



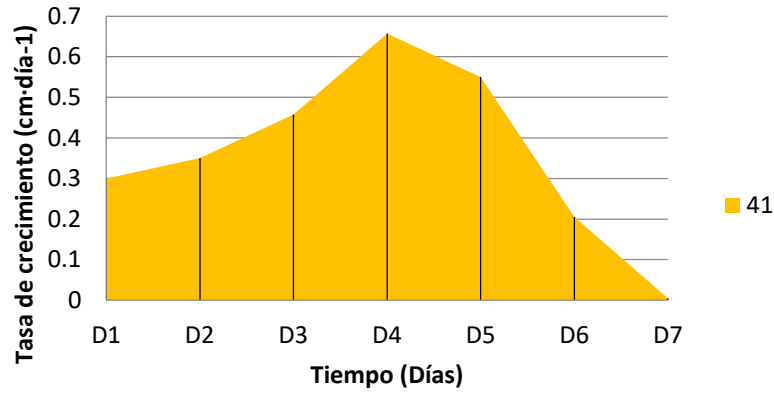
### Tasa de crecimiento



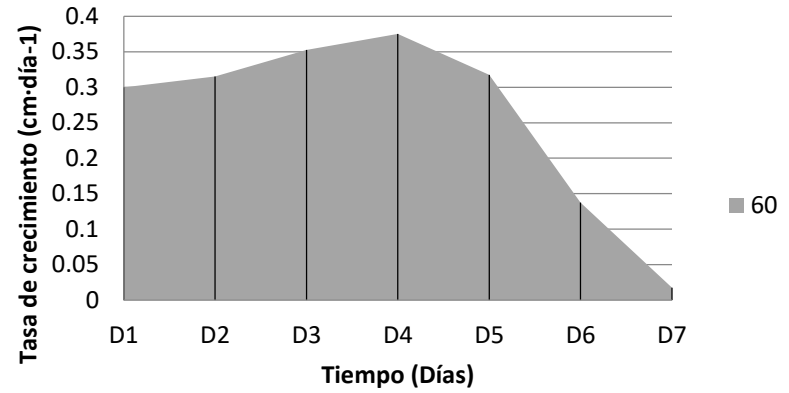
### Tasa de crecimiento



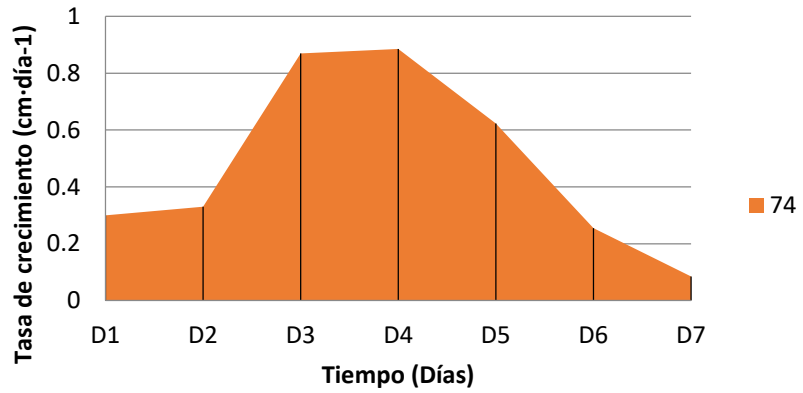
### Tasa de crecimiento



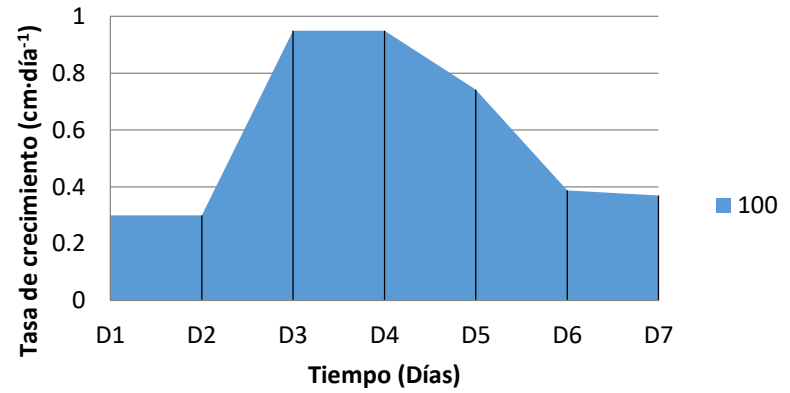
### Tasa de crecimiento



### Tasa de crecimiento



### Tasa de crecimiento



## Área bajo la curva

Los morfotipos que registraron el menor crecimiento fueron M1B M4 y M1B M33, con 7.31 y 7.82 cm<sup>2</sup>, lo que representó una diferencia considerable al área del testigo con 12.90 cm<sup>2</sup> (Cuadro 23).

Cuadro 23. Área bajo la curva del crecimiento micelial de *Fusarium* spp. 62 b.

Morfotipo	Área bajo la curva (cm <sup>2</sup> )							Total
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	
M1B M1	0.15	0.45	0.96	1.73	<u>2.65</u>	<u>3.39</u>	<u>3.66</u>	11.97
M1B M 4	0.15	0.45	0.89	1.39	1.79	2.07	2.16	<u>7.31</u>
M1B M 16	0.15	0.45	0.92	1.64	<u>2.53</u>	<u>3.20</u>	<u>3.38</u>	10.95
M1B M 33	0.15	0.49	0.97	1.52	2.00	2.25	2.30	<u>7.82</u>
M1B M 41	0.15	0.48	0.88	1.44	2.04	2.42	2.52	8.48
M2B M 60	0.15	0.46	0.79	1.16	1.50	1.73	1.81	6.35
M2B M 74	0.15	0.47	1.07	<u>1.94</u>	<u>2.70</u>	<u>3.14</u>	<u>3.31</u>	10.94
Testigo	0.15	0.45	1.08	<u>2.03</u>	<u>2.87</u>	<u>3.44</u>	<u>3.82</u>	12.90

Los morfotipos que tuvieron un crecimiento similar al testigo, corresponden a los morfotipos M1B M1, M1B M16 y M2B M74, quedando descartados como agentes antagonicos para *Fusarium* spp.

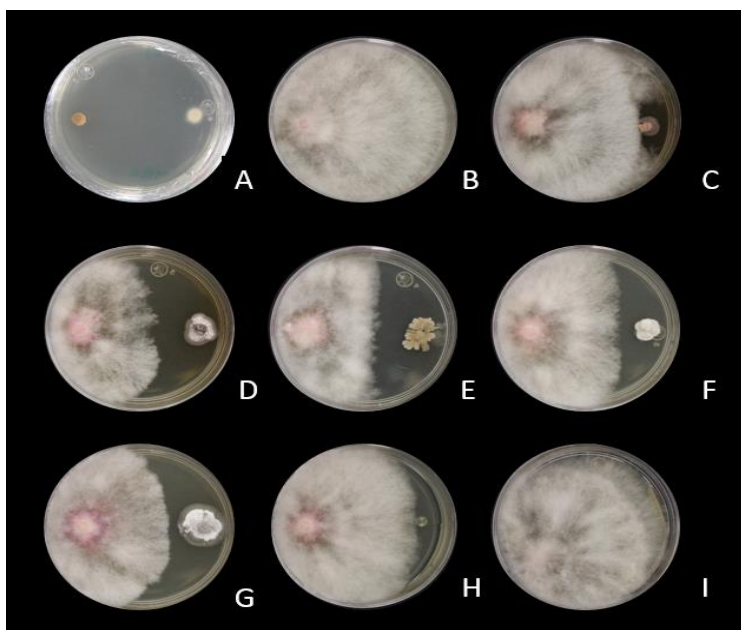
## Porcentaje de inhibición

El porcentaje de inhibición indica la eficiencia de la actinobacteria para inhibir el crecimiento de *Fusarium* spp. 62 b. Estadísticamente se destacó al morfotipo M2B M60 como el mejor tratamiento para inhibir en un 59.75 % el crecimiento micelial del hongo en cuestión, seguido de M1B M33 con 48.75 % etiquetado con la categoría b, al igual que el morfotipo M1B M4 con 43.75 % (Cuadro 24).

Cuadro 24. Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de siete morfotipos.

Morfotipo	Porcentaje de inhibición (%)
M1B M1	8 e
M1B M4	43.75 b c
M1B M16	17.16 d
M1B M33	48.75 a b
M1B M41	38.33 c
M2B M60	59.75 a
M2B M74	18.75 d

Los morfotipos que no tuvieron efecto en el crecimiento colonial de hongo, en el que el disco de inóculo de la actinobacteria fue invadido por completo con el micelio del hongo evaluado. No obstante, se muestran aquellos morfotipos que presentaron un efecto de inhibición alto, logrando detener el crecimiento colonial del hongo sin alcanzar el disco de la actinobacteria (Figura 32).



**Figura 32.** Colonia de *Fusarium* spp. clave 62b. A) Distribución de los discos de inóculo. B) Crecimiento de la colonia testigo de *Fusarium* spp. clave 62b. C) *Fusarium* spp. clave 62b y morfotipo M1BM1. D) *Fusarium* spp. clave 62b y morfotipo M1B4. E) *Fusarium* spp. clave 62b y morfotipo M1B33. F) *Fusarium* spp. clave 62b y morfotipo M1B41. G) *Fusarium* spp. clave 62b y morfotipo M2B60. H) *Fusarium* spp. clave 62b y morfotipo M2B74. I). Crecimiento colonial de tesgigo *Fusarium* spp. clave 62b.

### 5.2.2.3 *Fusarium proliferatum*

#### Tasa de crecimiento

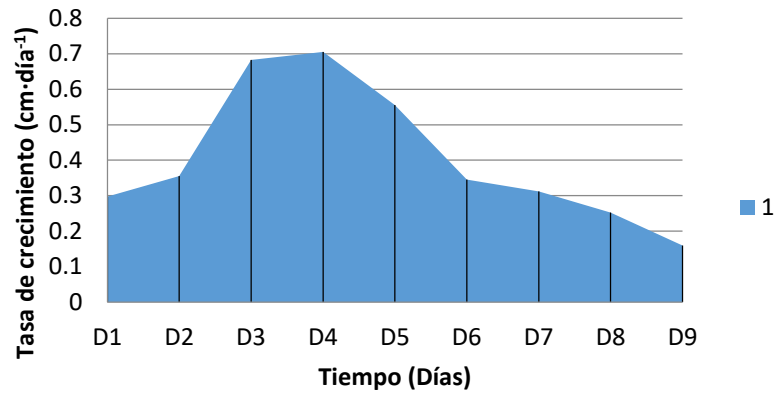
La tasa de crecimiento de la especie *F. proliferatum* en interacción con los diferentes morfotipos, mostró una tendencia en la disminución de crecimiento a partir del quinto día después de la inoculación. Sin embargo, se puede destacar que el morfotipo M2B M60 promueve la disminución del crecimiento a partir del cuarto día, no obstante, después del séptimo día el morfotipo M1B M4 produjo un efecto de inhibición disminuyendo el crecimiento micelial de *F. proliferatum* (Cuadro 25).

Cuadro 25. Tasa de crecimiento del hongo *F. proliferatum* con siete actinobacterias.

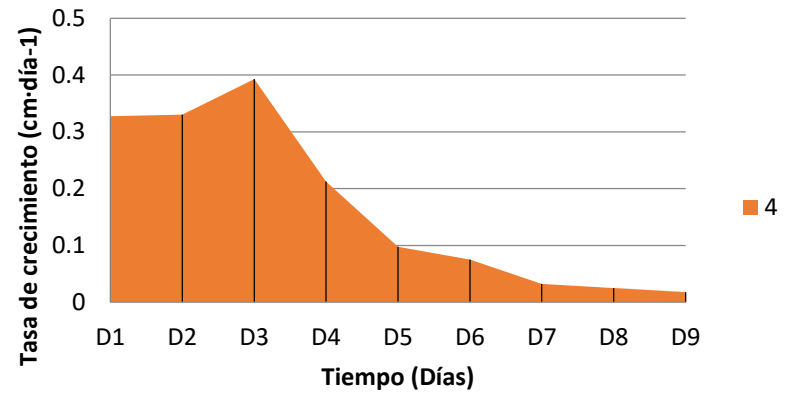
Morfotipo	Tasa de crecimiento (cm·día <sup>-1</sup> )								
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9
M1B M1	<u>0.297</u>	0.355	0.682	0.705	0.555	0.345	0.312	0.252	0.16
M1B M4	0.327	<u>0.33</u>	<u>0.392</u>	<u>0.212</u>	0.097	0.075	<u>0.032</u>	<u>0.025</u>	<u>0.017</u>
M1B M16	0.382	0.432	0.632	0.612	0.465	0.337	0.312	0.315	0.05
M1B M33	0.345	0.41	0.68	<u>0.275</u>	0.172	0.092	0.097	0.057	0.032
M1B M41	0.322	0.46	0.612	0.342	0.307	0.162	0.067	0.037	0.045
M2B M60	0.382	0.38	0.572	<u>0.075</u>	<u>0.067</u>	<u>0.042</u>	0.05	0.05	0.295
M2B M74	0.337	0.44	0.675	0.445	0.272	0.265	0.295	0.232	0.105
Testigo	0.36	0.38	0.66	0.7	0.487	0.512	0.462	0.162	0.115

En general, la tasa de crecimiento indica que los tratamientos con menor crecimiento en relación al tiempo, fue el morfotipo M1B M4 y M2B M60.

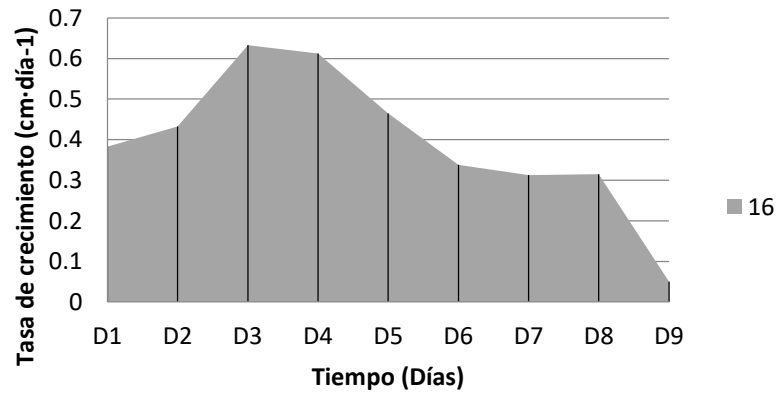
### Tasa de crecimiento



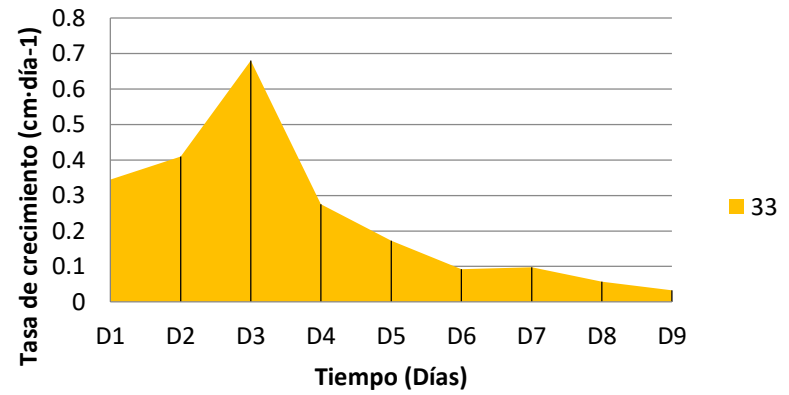
### Tasa de crecimiento



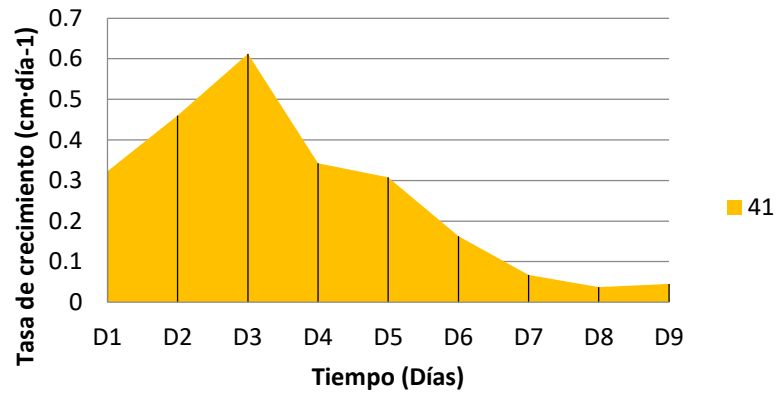
### Tasa de crecimiento



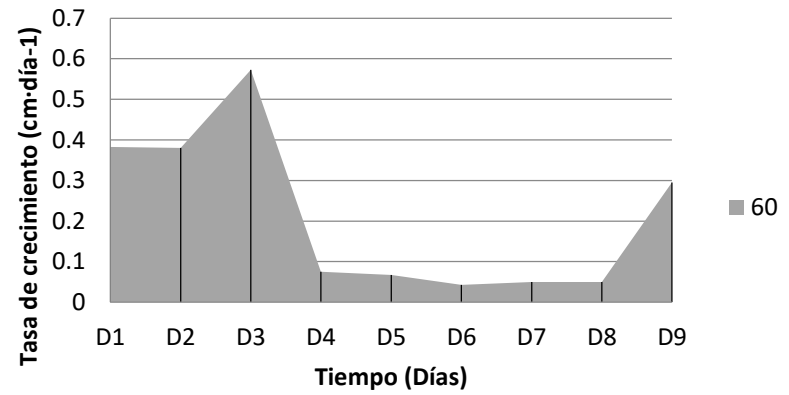
### Tasa de crecimiento



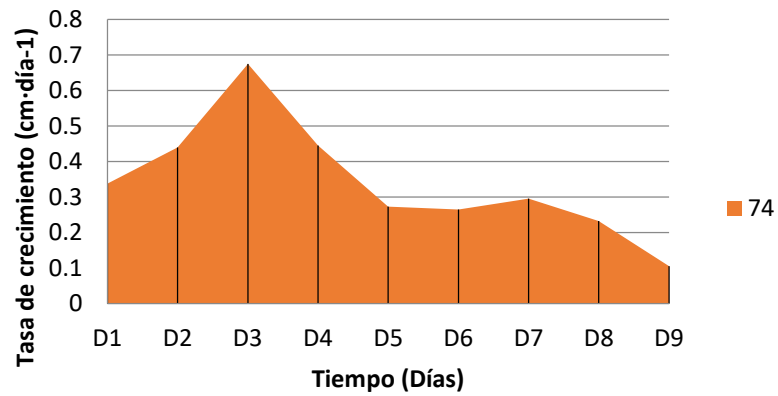
### Tasa de crecimiento



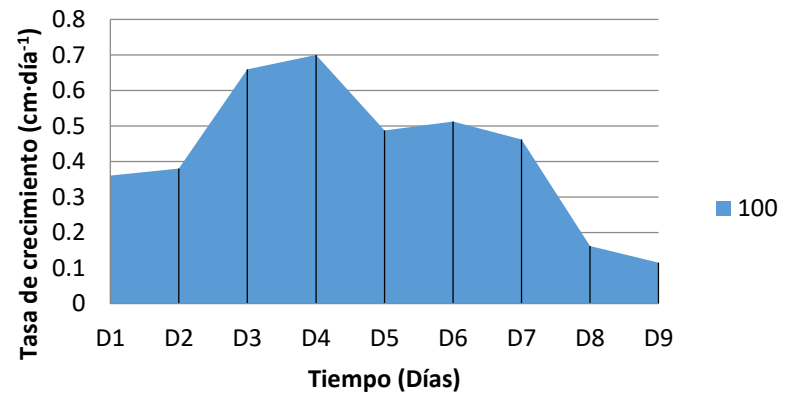
### Tasa de crecimiento



### Tasa de crecimiento



### Tasa de crecimiento



## Área debajo de la curva

El área bajo la curva de la tasa de crecimiento de *F. proliferatum*, muestra que los morfotipos M1B M1, M1B M16 y M2B M74 no tuvieron efecto de inhibición en el crecimiento micelial ya que los valores son cercanos al crecimiento del testigo (Cuadro 26).

Cuadro 26. Área bajo de la curva de la tasa de crecimiento de *F. proliferatum*.

Morfotipo	Área bajo la curva (cm <sup>2</sup> )									
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Total
M1B M1	0.15	0.48	0.99	<u>1.69</u>	<u>2.32</u>	<u>2.77</u>	<u>3.10</u>	<u>3.38</u>	<u>3.59</u>	<u>15.85</u>
M1B M4	0.16	0.49	0.85	1.16	1.31	1.40	1.45	1.48	1.50	7.35
M1B M16	0.19	0.47	0.97	1.65	<u>2.32</u>	<u>2.80</u>	<u>3.19</u>	<u>3.52</u>	<u>3.76</u>	<u>16.46</u>
M1B M33	0.17	<u>0.55</u>	<u>1.10</u>	1.57	1.80	1.93	<u>2.02</u>	2.10	2.15	10.03
M1B M41	0.16	<u>0.55</u>	<u>1.09</u>	1.57	1.89	<u>2.13</u>	<u>2.24</u>	2.29	2.34	10.72
M2B M60	0.19	<u>0.57</u>	<u>1.05</u>	1.37	1.44	1.50	1.55	1.60	1.77	9.19
M2B M74	0.17	<u>0.56</u>	<u>1.12</u>	<u>1.68</u>	<u>2.03</u>	<u>2.30</u>	<u>2.58</u>	2.85	<u>3.02</u>	<u>13.62</u>
Testigo	0.18	<u>0.55</u>	<u>1.07</u>	<u>1.75</u>	<u>2.34</u>	<u>2.84</u>	<u>3.33</u>	<u>3.64</u>	<u>3.78</u>	<u>16.80</u>

Por otro lado, los morfotipos M1B M4 y M2B M60, presentaron los valores más bajos del crecimiento, por lo que se observa el efecto de inhibición en el resultado.

## Porcentaje de inhibición

En el caso de *F. proliferatum* se detectaron dos morfotipos considerados como los mejores tratamientos para tener un efecto de inhibición, M1B M4 y M2B M60, ya que estadísticamente fueron etiquetados en el grupo a con el mayor PICM, con valores de 66.87 % y 59.75 %, respectivamente (Cuadro 27).



Cuadro 27. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de morfotipos seleccionados en los bioensayos.

Morfotipo	PICM (%)	
M1B M1	8.75	d
M1B M4	66.87	a
M1B M16	4.88	e
M1B M33	47.87	b
M1B M41	43.35	b
M2B M60	59.75	a
M2B M74	22.98	c

Por otro lado, el morfotipo M1B M16 presentó el menor PICM con 4.88 %, descartándolo como agente antagonista de *F. proliferatum*, los efectos fueron visibles (Figura 33).

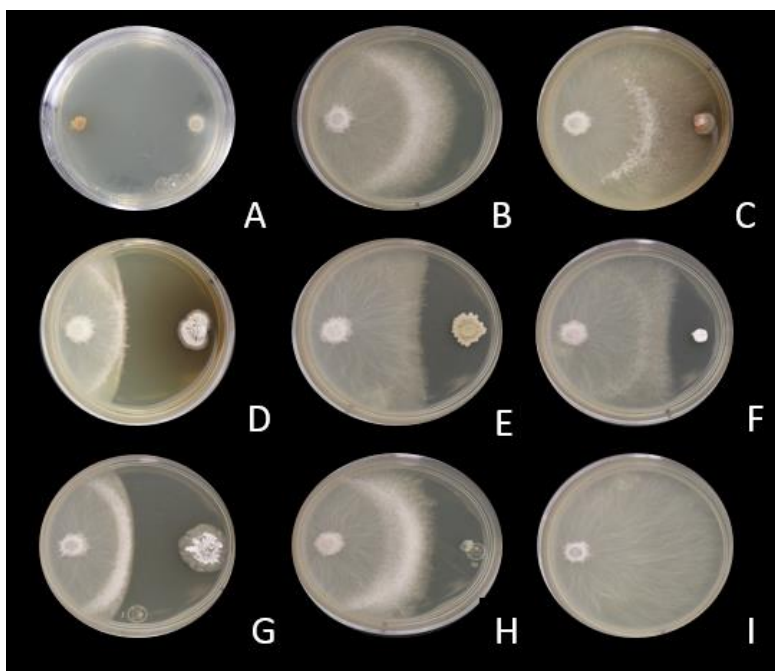


Figura 33. Colonia de *F. proliferatum*. A) Distribución de los discos de inóculo. B) Crecimiento de la colonia testigo de *F. proliferatum*. C) *F. proliferatum* y morfotipo M1BM1. D) *F. proliferatum* y morfotipo M1B4. E) *F. proliferatum* y morfotipo M1B33. F) *F. proliferatum* y morfotipo M1B41. G) *F. proliferatum* y morfotipo M2B60. H) *F. proliferatum* y morfotipo M2B74. I) Crecimiento colonial de testigo *F. proliferatum*.

### 5.2.3 Calidad de semilla: fitosanidad

El éxito de un sistema de producción inicia desde la selección de semillas, tanto de la variedad como de la calidad de la misma, por lo que se realizaron ensayos en condiciones *in vitro* en semilla.

Al inicio de las pruebas se detectó un problema de hongos en semillas de las seis variedades de trigo (Altiplano, Borlaug, Temporalera, Texcoco, Urbina y Valles), aún después de ser sometidas a un proceso de desinfestación con hipoclorito de sodio al 5 %. El problema de hongos se vio reflejado en un rango del 60 al 100 % de las semillas sembradas en medio de cultivo agar-agua. El principal hongo encontrado fue *Alternaria* spp., seguido de casos aislados de *Fusarium* spp (Figura 34).

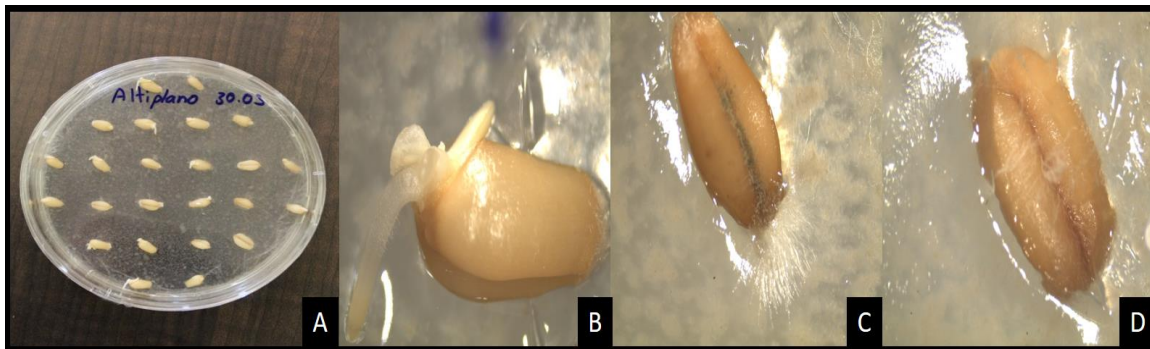


Figura 34. Semillas contaminadas. A) Siembra de semillas en medio de cultivo Agar-agua. B) Semilla germinada sana. C) Semilla sin germinar contaminada de *Alternaria* spp. D) Semilla sin germinar contaminada de *Fusarium* spp.

Por lo anterior se propuso modificaciones a la desinfestación de semillas (Variedad Altiplano) mediante el incremento en la concentración de hipoclorito de sodio, el tiempo de inmersión, el uso con agua tibia (50 °C) para un lavado y, finalmente, la exposición de una de las actinobacterias seleccionadas anteriormente (M1B M4), lo anterior para disminuir el desarrollo de hongos saprófitos y fitopatógenos, los cuales tuvieron los siguientes resultados (Cuadro 28).

Cuadro 28. Porcentaje de contaminación y el efecto en el porcentaje de germinación.

Tratamiento	Porcentaje de Germinación (%)	Porcentaje de Contaminación (%)
Hipoclorito 2% 1 min	82.5 a b	95 a
Hipoclorito 2% 5 min	70 b c	95 a
Hipoclorito 5% 1 min	80 a b	92.5 a
Hipoclorito 5% 5 min	82.5 a b	90 a
Térmico agua 50° C 1 min	82.5 a b	90 a
Térmico agua 50° C 2 min	62.5 c d	90 a
Térmico agua 50° C 3 min	52.5 d	90 a
Térmico agua 50 °C 1min + cloro 1 min	72.5 b c	92.5 a
Térmico agua 50 °C 2min + cloro 1 min	82.5 a b	87.5 a
Térmico agua 50 °C 3min + cloro 1 min	52.5 d	95 a
Térmico agua 50 °C 1min + cloro 2% 1 min	72.5 b c	90 a
Térmico agua 50 °C 2min + cloro 2% 1 min	80 a b	90 a
Térmico agua 50 °C 3min + cloro 2 %1 min	75 a b c	87.5 a
M1B M4 inmersión 1 min	60 c d	37.5 b
M1B M4 inmersión 12 horas	90 a	5 c
Testigo	75 a b c	100 a

El mejor tratamiento para lograr el menor porcentaje de contaminación (PC) por *Alternaria* spp. y *Fusarium* spp. fue la inmersión de semillas en caldo nutritivo del morfotipo M1B M4 durante 12 horas, con un PC del 5 %, el segundo morfotipo con menor PC fue el de inmersión de las semillas en el caldo nutritivo del morfotipo M1B M4 durante un minuto con 37.5 %.

Por otro lado, el mejor tratamiento tuvo una diferencia significativa con relación a los tratamientos de desinfección con hipoclorito o con agua a 50 °C, ya que el rango de PC en esos tratamientos fue de 87.5 – 100 % (Figura 35).

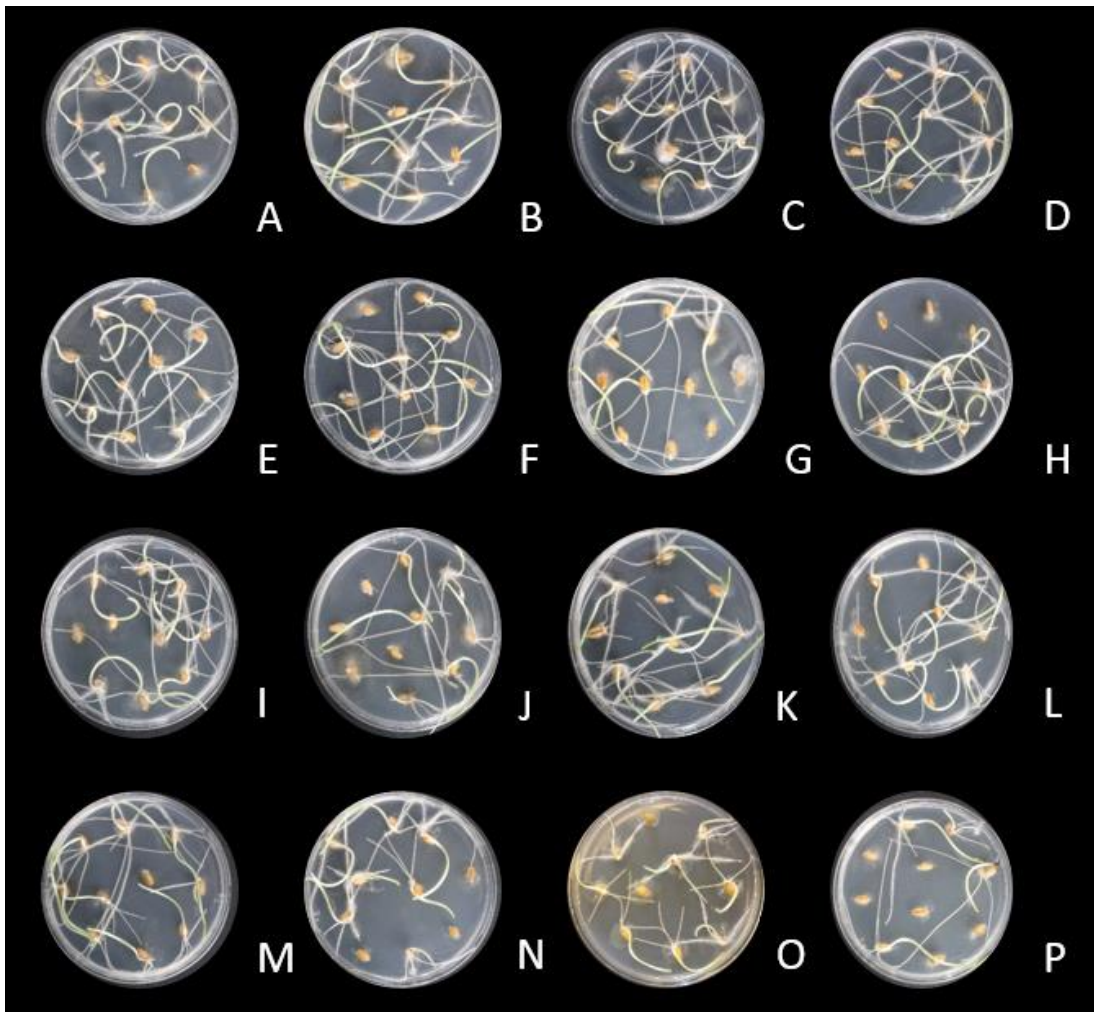


Figura 35. Efectividad de técnicas de desinfestación de semillas de trigo. A) Tratamiento de hipoclorito de sodio al 2 % durante un minuto. B) Tratamiento de hipoclorito de sodio al 2 % durante cinco minutos. C) Tratamiento de hipoclorito de sodio al 5 % durante un minuto. D) Tratamiento de hipoclorito de sodio al 5 % durante cinco minutos. E) Tratamiento térmico, agua a 50 ° C durante un minuto. F) Tratamiento térmico, agua a 50 ° C durante dos minutos. G) Tratamiento térmico, agua a 50 ° C durante tres minutos. H) Tratamiento térmico, agua a 50 ° C durante un minuto y un lavado durante un minuto con cloro sin diluir. I) Tratamiento térmico, agua a 50 ° C durante dos minutos y un lavado durante un minuto con cloro sin diluir. J) Tratamiento térmico, agua a 50 ° C durante tres minutos y un lavado durante un minuto con cloro sin diluir. K) Tratamiento térmico, agua a 50 ° C durante un minuto y un lavado durante un minuto con cloro al 2 %. L) Tratamiento térmico, agua a 50 ° C durante dos minutos y un lavado durante un minuto con cloro al 2 %. M) Tratamiento térmico, agua a 50 ° C durante tres minutos y un lavado durante un minuto con cloro al 2 %. N) Tratamiento con actinobacteria morfotipo M1BM4 durante un minuto. O) Tratamiento con actinobacteria morfotipo M1BM4 durante 12 h. P) Testigo.

Se logra observar a simple vista las diferencias entre el mejor tratamiento (semillas inmersas en M1B M4, es decir, tratamiento 16) y el testigo, ya que en este último hay

desarrollo de micelio en todas las semillas, mientras que en el tratamiento 16 sólo se ve el desarrollo de la actinobacteria (Figura 36).

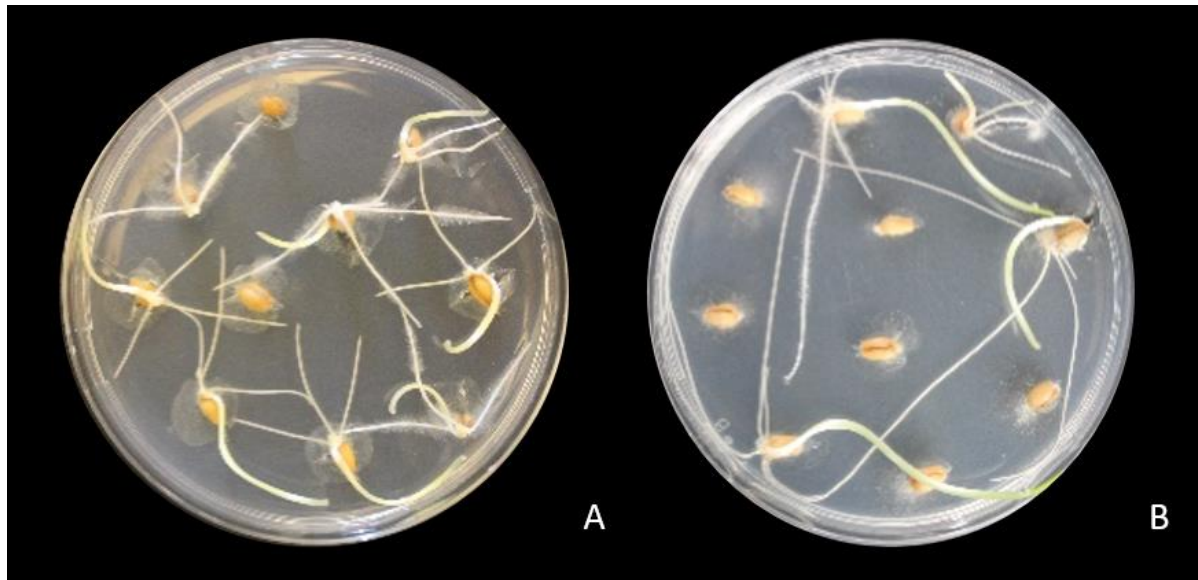


Figura 36. Comparación del tratamiento más efectivo y el testigo. A) Tratamiento de actinobacteria morfotipo M1B M4, crecimiento de la colonia bacteriana. B) Testigo con crecimiento colonia de hongos.

#### 5.2.4 Calidad de semilla: Germinación

Se observó que el tiempo es un factor importante que determina el efecto sobre las semillas. A continuación se presentan los resultados (Cuadro 29).

Cuadro 29. Efecto en la germinación de semillas de trigo de acuerdo al tiempo de exposición.

	Tratamiento	% Germinación
1	Var. Urbina + 12 horas de inmersión	95 a b
2	Var. Urbina + 2 días de inmersión	0 e
3	Var. Urbina + 5 días de inmersión	0 e
4	Var. Urbina + 7 días de inmersión	0 e
5	Var. Urbina	95 a b
6	Var. Borlaug + 12 horas de inmersión	92.5 a b
7	Var. Borlaug + 2 días de inmersión	0 e
8	Var. Borlaug + 5 días de inmersión	0 e
9	Var. Borlaug + 7 días de inmersión	27.5 d
10	Var. Borlaug	27.5 d
11	Var. Texcoco + 12 horas de inmersión	40 c
12	Var. Texcoco + 2 días de inmersión	40 c
13	Var. Texcoco + 5 días de inmersión	0 e
14	Var. Texcoco + 7 días de inmersión	0 e
15	Var. Texcoco	100 a
16	Var. Valles + 12 horas de inmersión	87.5 b
17	Var. Valles + 2 días de inmersión	0 e
18	Var. Valles + 5 días de inmersión	10 e
19	Var. Valles + 7 días de inmersión	10 e
20	Var. Valles	90 a b

La germinación se vio drásticamente afectada con la exposición prolongada del caldo nutritivo de la actinobacteria. Estadísticamente el mejor tratamiento corresponde al testigo de la variedad Texcoco, sin embargo, su categoría es acompañado por los tratamientos testigo de Urbina y Valles, así como las semillas de Urbina, Borlaug y Valles expuestas al morfotipo M1B M4 durante 12 h.

En su mayoría, las semillas expuestas durante 12 h al morfotipo M1B M4, permitieron una germinación normal o igual a los testigos de las respectivas semillas con un rango de PG del 87.5 -100. Mientras que las semillas expuestas por mayor tiempo, disminuyeron considerablemente su PG, ya que el rango de esta variable fue de 0 -40 % (Figura 37).



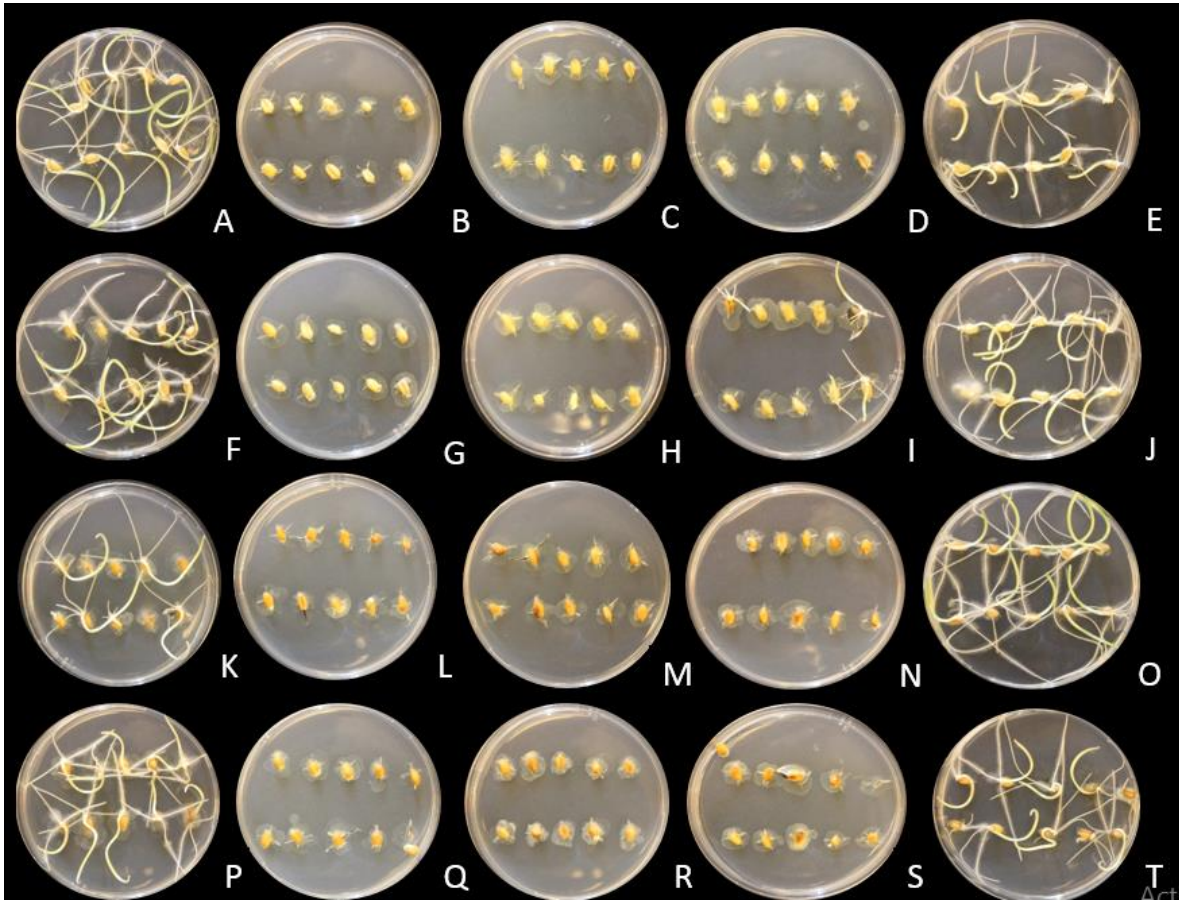


Figura 37. Efecto en semilla de trigo al estar expuestas a M1B M4 en diferentes periodos. A) Semillas germinadas de la variedad Urbina, expuestas durante 12 h. B) Semillas no germinadas de la variedad Urbina, expuestas durante dos días. C) Semillas no germinadas variedad Urbina, expuestas durante cinco días. D) Semillas no germinadas variedad Urbina, expuestas durante siete días. E) Semillas germinadas variedad Urbina, sin exposición al morfotipo M1B M4. F) Semillas germinadas de la variedad Borlaug, expuestas durante 12 h. G) Semillas no germinadas de la variedad Borlaug, expuestas durante dos días. H) Semillas no germinadas variedad Borlaug, expuestas durante cinco días. I) Semillas no germinadas variedad Borlaug, expuestas durante siete días. J) Semillas germinadas variedad Borlaug, sin exposición al morfotipo M1B M4. K) Semillas germinadas de la variedad Texcoco, expuestas durante 12 h. L) Semillas no germinadas de la variedad Texcoco, expuestas durante dos días. M) Semillas no germinadas variedad Texcoco, expuestas durante cinco días. N) Semillas no germinadas variedad Texcoco, expuestas durante siete días. O) Semillas germinadas variedad Texcoco, sin exposición al morfo tipo M1B M4. P) Semillas germinadas de la variedad Valles, expuestas durante 12 h. Q) Semillas no germinadas de la variedad Valles, expuestas durante dos días. R) Semillas no germinadas variedad Borlaug Valles, expuestas durante cinco días. S) Semillas no germinadas variedad Valles, expuestas durante siete días. T) Semillas germinadas variedad Valles, sin exposición al morfotipo M1B M4.

### 5.2.5 Efecto en el crecimiento de plantas

Los resultados mostraron que existe una interacción entre los organismos presentes considerando cada tratamiento y variedad, se observa que la variedad Texcoco en interacción con el morfotipo M33, tuvo el mayor peso seco de la planta y raíz, sin embargo, en el peso seco de la raíz, no hubo diferencia entre Var. Texcoco con M3 y Var. Borlaug con M33 (Cuadro 30).

Cuadro 30. Peso seco de la planta, raíz y foliar de acuerdo a la variedad y al organismo inoculado.

Var.	Tratamiento	Peso seco (g)		
		Planta	Raíz	Foliar
Borlaug	Testigo	0.25	0.13	0.13
	M1B M4	0.25	0.11	0.14
	M1B M33	0.31	<u>0.14</u>	0.16
	M2B M60	0.25	0.08	0.17
	<i>Fusarium</i> spp.	0.20	0.08	0.13
	M1B M4- <i>Fusarium</i> spp.	0.32	0.13	0.15
	M1B M33- <i>Fusarium</i> spp.	0.29	0.11	<u>0.18</u>
	M2B M60- <i>Fusarium</i> spp.	0.26	0.10	0.17
Texcoco	Testigo	0.23	0.11	0.11
	M1B M4	0.23	0.08	0.14
	M1B M33	<u>0.34</u>	<u>0.14</u>	0.16
	M2B M60	0.26	0.07	0.17
	<i>Fusarium</i> spp.	0.19	0.08	0.12
	M1B M4- <i>Fusarium</i> spp.	0.23	0.06	0.13
	M1B M33- <i>Fusarium</i> spp.	0.27	0.08	0.16
	M2B M60- <i>Fusarium</i> spp.	0.25	0.08	0.15
Urbina	Testigo	0.21	0.08	0.11
	M1B M4	0.23	0.09	0.11
	M1B M33	0.26	0.09	0.13
	M2B M60	0.25	0.06	0.14
	<i>Fusarium</i> spp.	0.23	0.08	0.12
	M1B M4- <i>Fusarium</i> spp.	0.26	0.08	0.14
	M1B M33- <i>Fusarium</i> spp.	0.27	0.10	0.12
	M2B M60- <i>Fusarium</i> spp.	0.29	0.07	0.15
Valles	Testigo	0.21	0.07	0.11
	M1B M4	0.24	0.08	0.11
	M1B M33	0.31	0.09	0.15
	M2B M60	0.33	0.08	0.19
	<i>Fusarium</i> spp.	0.22	0.09	0.12
	M1B M4- <i>Fusarium</i> spp.	0.19	0.06	0.12
	M1B M33- <i>Fusarium</i> spp.	0.32	0.08	0.18
	M2B M60- <i>Fusarium</i> spp.	0.27	0.07	0.15



Al analizar los pesos secos por variedad, se mostró estadísticamente que Borlaug presentó el mayor peso seco de raíz (0.11 g), hoja (0.15 g) y de toda la planta (0.26 g), siendo el único integrante del grupo a, de acuerdo con la prueba de Tuckey. En el caso del peso seco por planta, por otro lado, entre las variedades Texcoco, Urbina y Valles no se detectó una diferencia significativa. No obstante, el peso seco de raíz se agrupó en tres, posicionando a la variedad Texcoco el segundo grupo (0.09 g), siendo diferente significativamente de las otras variedades. No así, para el peso seco foliar (0.14 g), en el que se encuentran en el segundo grupo pero acompañado por la variedad Valles (0.14 g) (Cuadro 31).

Cuadro 31. Peso seco de la planta, raíz y hojas por variedad.

Variedad	Peso seco (g)		
	Planta	Raíz	Foliar
Borlaug	<u>0.26 a</u>	<u>0.11 a</u>	<u>0.15 a</u>
Texcoco	0.25 b	0.09 b	0.14 b
Urbina	0.25 b	0.08 c	0.13 c
Valles	0.26 a b	0.08 c	0.14 b

La variedad Borlaug presenta mayor consistencia por registrar el valor más alto de los tres pesos secos. En el caso de Texcoco, Urbina y Valles, se puede observar que no tienen el mismo comportamiento, que puede deberse a que alguna de las interacciones tuvo mayor efecto en una estructura de las dos estructuras de la planta (Figura 38).

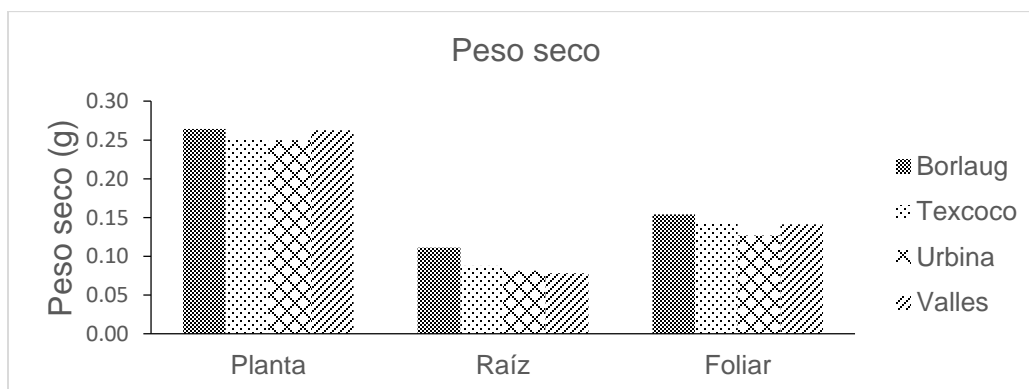


Figura 38. Peso seco de la planta, raíz y hojas.

En cuanto a los tratamientos, en el peso seco por planta se observó que la interacción entre el morfotipo M1B M33 y *Fusarium* spp. tuvieron el mejor resultado (0.29 g), pero en el peso seco de raíz, el mejor tratamiento fue el morfotipo M1B M33 (0.12 g).

Por otro lado, el tratamiento del morfotipo M2B M60 fue el más alto en el peso seco foliar (0.17 g) pero no fue significativamente diferente a los tratamientos de la interacción de M1B M33-*Fusarium* spp. (0.16 g) y la interacción del morfotipo M2B M60-*Fusarium* spp (0.15 g) (Cuadro 32).

A pesar de no expresar síntomas *Fusarium* spp, como la pudrición de tallos, si afectó el crecimiento de las plantas ya que presentó menor peso seco que los testigos, aunque sólo significativamente en el peso de raíz.

Además de *Fusarium* spp., la interacción que tuvieron un resultado menor de peso seco de la planta y hojas, fueron los testigos y el morfotipo M1B M4. En raíz, la mayoría de los tratamientos que involucraron la inoculación con *Fusarium* spp.

Cuadro 32. Pesos secos de planta, raíz y hojas de trigo por morfotipo inoculado.

Tratamiento	Peso seco (g)		
	Planta	Raíz	Foliar
Testigo	0.23 d e	0.10 b	0.12 e
M1B M4	0.24 d e	0.09 b c d	0.12 d e
M1B M33	0.31 a	<u>0.12</u> a	0.15 b c
M2B M60	0.27 b	0.07 e	<u>0.17</u> a
<i>Fusarium</i> spp.	0.21 e	0.08 c d e	0.12 d e
M1B M4- <i>Fusarium</i> spp.	0.25 b	0.08 c d e	0.14 c d
M1B M33- <i>Fusarium</i> spp.	<u>0.29</u> a b	0.09 b c	<u>0.16</u> a b
M2B M60- <i>Fusarium</i> spp.	0.27 b c	0.08 d e	<u>0.15</u> a b

El peso seco de la planta, raíz y hoja, tienen la misma tendencia para los tratamientos que involucran la inoculación de *Fusarium* spp. Sin embargo, se observa que el morfotipo M2B M60 afecta negativamente el crecimiento de la raíz, aunque promovió el crecimiento foliar (Figura 39).

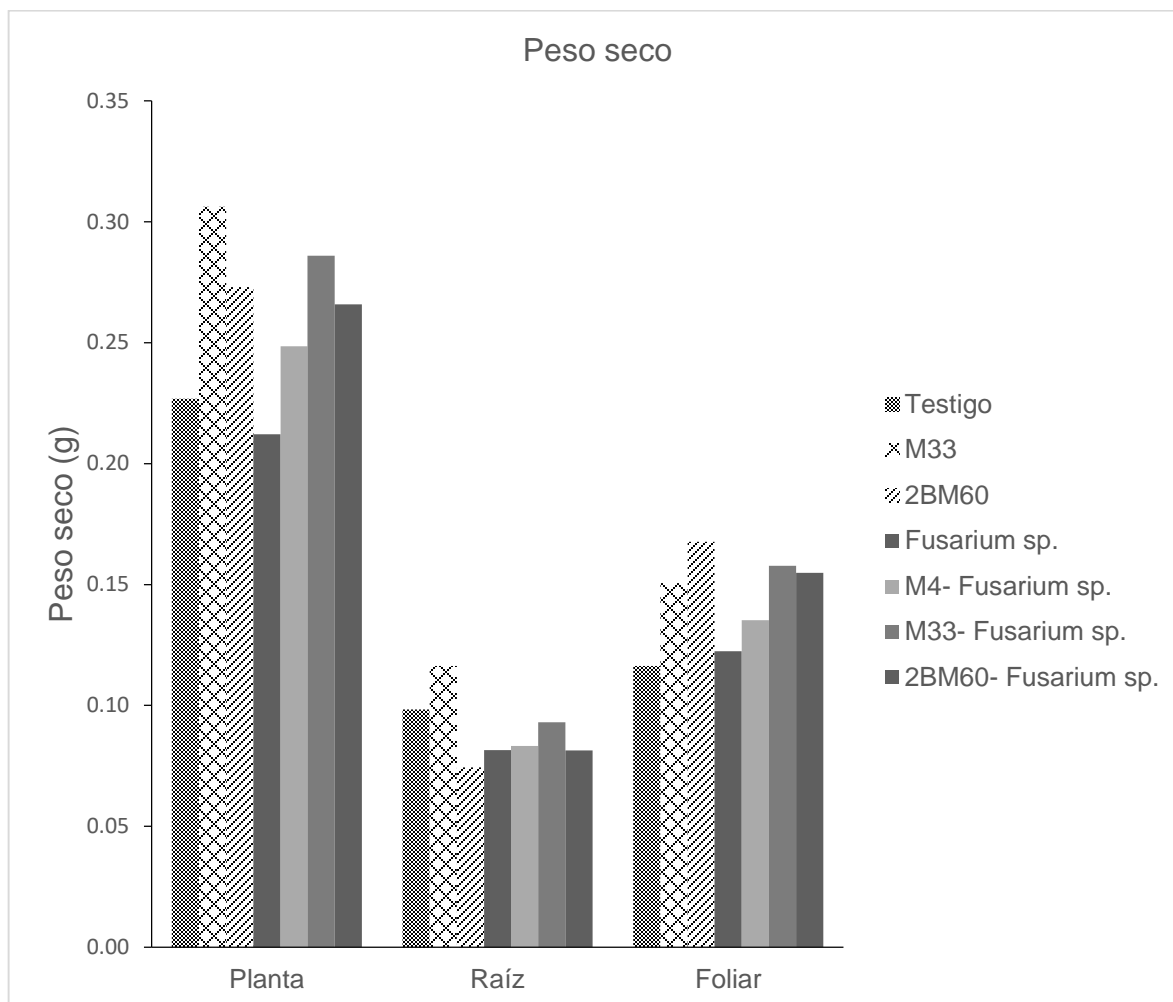


Figura 39. Pesos secos de planta, raíz y hojas por tratamientos.

Los efectos de la interacción de los diferentes organismos también se observaron en las variables de altura, clorofila, área foliar e índice de área foliar. Las plantas más altas fueron de la variedad Valles en interacción con el morfotipo M1B M33 con *Fusarium* spp. (45.13 cm) (Cuadro 33).

Respecto a la clorofila, el valor máximo lo obtuvieron las plantas de la variedad Borlaug en interacción con el morfotipo M1B M4, con 32 unidades SPAD.

Cuadro 33. Altura, medición de clorofila y área foliar de acuerdo con la variedad y el organismo con el que fue inoculado.

Variedad	Tratamiento	Altura (cm)	Clorofila (unidad SPAD)	Área foliar (cm <sup>2</sup> )
Borlaug	Testigo	32.75	24.83	29.73
	M1B M4	29.73	<u>32.00</u>	32.60
	M1B M33	31.30	14.18	43.72
	M2B M60	29.98	25.88	47.86
	<i>Fusarium</i> spp.	28.13	25.78	22.48
	M1B M4- <i>Fusarium</i> spp.	34.30	22.43	35.82
	M1B M33- <i>Fusarium</i> spp.	31.40	34.70	36.05
	M2B M60- <i>Fusarium</i> spp.	32.33	26.20	51.63
Texcoco	Testigo	34.75	28.70	21.29
	M1B M4	37.08	28.30	28.12
	M1B M33	40.40	25.47	34.53
	M2B M60	41.53	26.50	48.37
	<i>Fusarium</i> spp.	34.63	27.33	15.53
	M1B M4- <i>Fusarium</i> spp.	40.03	28.83	30.05
	M1B M33- <i>Fusarium</i> spp.	43.70	25.13	45.38
	M2B M60- <i>Fusarium</i> spp.	42.08	31.90	36.00
Urbina	Testigo	37.30	19.09	18.86
	M1B M4	35.60	27.60	22.25
	M1B M33	36.03	24.65	21.08
	M2B M60	41.18	28.75	38.68
	<i>Fusarium</i> spp.	35.80	19.08	11.21
	M1B M4- <i>Fusarium</i> spp.	36.08	23.83	15.78
	M1B M33- <i>Fusarium</i> spp.	39.40	23.73	18.21
	M2B M60- <i>Fusarium</i> spp.	41.75	27.88	32.14
Valles	Testigo	34.75	23.23	20.88
	M1B M4	37.65	25.28	33.69
	M1B M33	42.98	21.10	36.57
	M2B M60	40.40	27.50	46.58
	<i>Fusarium</i> spp.	33.93	20.98	14.03
	M1B M4- <i>Fusarium</i> spp.	37.88	24.29	30.36
	M1B M33- <i>Fusarium</i> spp.	45.13	24.10	36.68
	M2B M60- <i>Fusarium</i> spp.	42.13	25.28	36.50

La altura de las plantas en relación a la variedad fue diferente significativamente entre Borlaug (31.24 cm) y las variedades de Texcoco, Urbina y Valles (39.27, 37.89 y 39.35 cm, respectivamente).

El área foliar fue mayor en la variedad Borlaug (37.49 cm<sup>2</sup>), lo que podría corresponder a hojas más anchas, mientras que Urbina fue la variedad que tuvo el valor más bajo de área foliar (31.91 cm<sup>2</sup>).

La variedad Borlaug tuvo un menor crecimiento pero la eficiencia de las hojas fue de los mejores, considerando tener el máximo valor en área foliar y el segundo lugar en el contenido de clorofila (Cuadro 34).

Cuadro 34. Altura, medición de clorofila y área foliar de acuerdo con la variedad.

Variedad	Altura (cm)	Clorofila (unidad SPAD)	Área foliar (cm <sup>2</sup> )
Borlaug	31.24 b	25.75 b	<u>37.49 a</u>
Texcoco	<u>39.27 a</u>	27.77 a	32.41 b
Urbina	<u>37.89 a</u>	24.32 c	22.28 c
Valles	<u>39.35 a</u>	23.97 c	31.91 b

No se observan tendencias en las variables de altura, clorofila y área foliar (Figura 40).

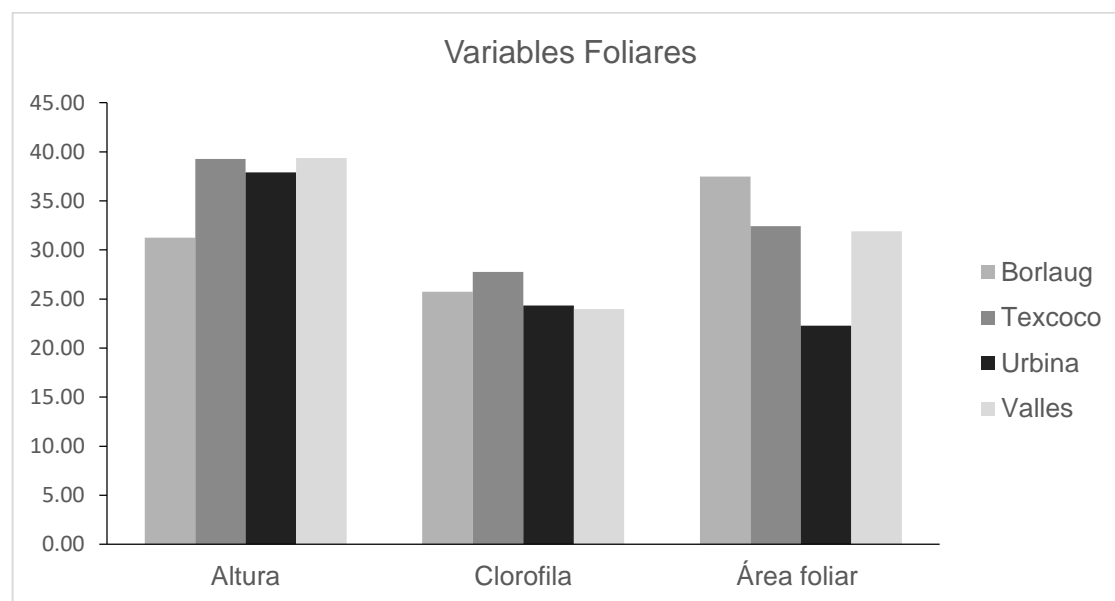


Figura 40. Variables foliares de altura, clorofila y área foliar de acuerdo a la variedad.

La interacción de los diferentes organismos alteró significativamente el crecimiento y desarrollo de la planta, por lo que no se logró observar una relación entre las variedades y las variables antes mencionadas.

Se detectó que los morfotipos promovieron el crecimiento en las plantas, ya que a excepción del morfotipo M1B M4, las plantas crecieron más que los testigos y *Fusarium* spp., de hecho, estos dos tratamientos presentaron el menor crecimiento en altura y área foliar (Cuadro 35).

Los morfotipos que favorecieron el crecimiento de altura fueron M1B M33 y M2B M60, al igual que la interacción de esos morfotipos con la inoculación de *Fusarium* spp. En cuanto al área foliar el morfotipo M2B M60 fue el mejor.

El único tratamiento ubicado en el grupo a, fue la interacción de M1B M33-*Fusarium* spp.

Cuadro 35. Variables foliares de acuerdo a los organismos inoculados.

Tratamiento	Altura (cm)	Clorofila (SPAD)	Área foliar (cm <sup>2</sup> )
Testigo	34.89 d e	23.96 a	22.69 e
M1B M4	35.01 c d e	28.29 a	29.16 d
M1B M33	<u>37.68 a b c</u>	21.35 a	33.97 c
M2B M60	<u>38.27 a b</u>	27.15 a	<u>45.37 a</u>
<i>Fusarium</i> spp.	33.12 e	23.28 a	15.81 f
M1B M4- <i>Fusarium</i> spp.	37.07 b c d	24.84 a	28.00 d
M1B M33- <i>Fusarium</i> spp.	<u>39.91 a</u>	26.91 a	34.08 c
M2B M60- <i>Fusarium</i> spp.	<u>39.57 a b</u>	27.81 a	39.07 b

Se observó una relación entre la altura, el contenido de clorofila y el área foliar, en los organismos de M2B M60, *Fusarium* spp., la interacción de M1B M4-*Fusarium* spp. y M1B M33-*Fusarium* spp., sin embargo, no se logró detectar estadísticamente por la diferencia en las dimensiones (Figura 41).

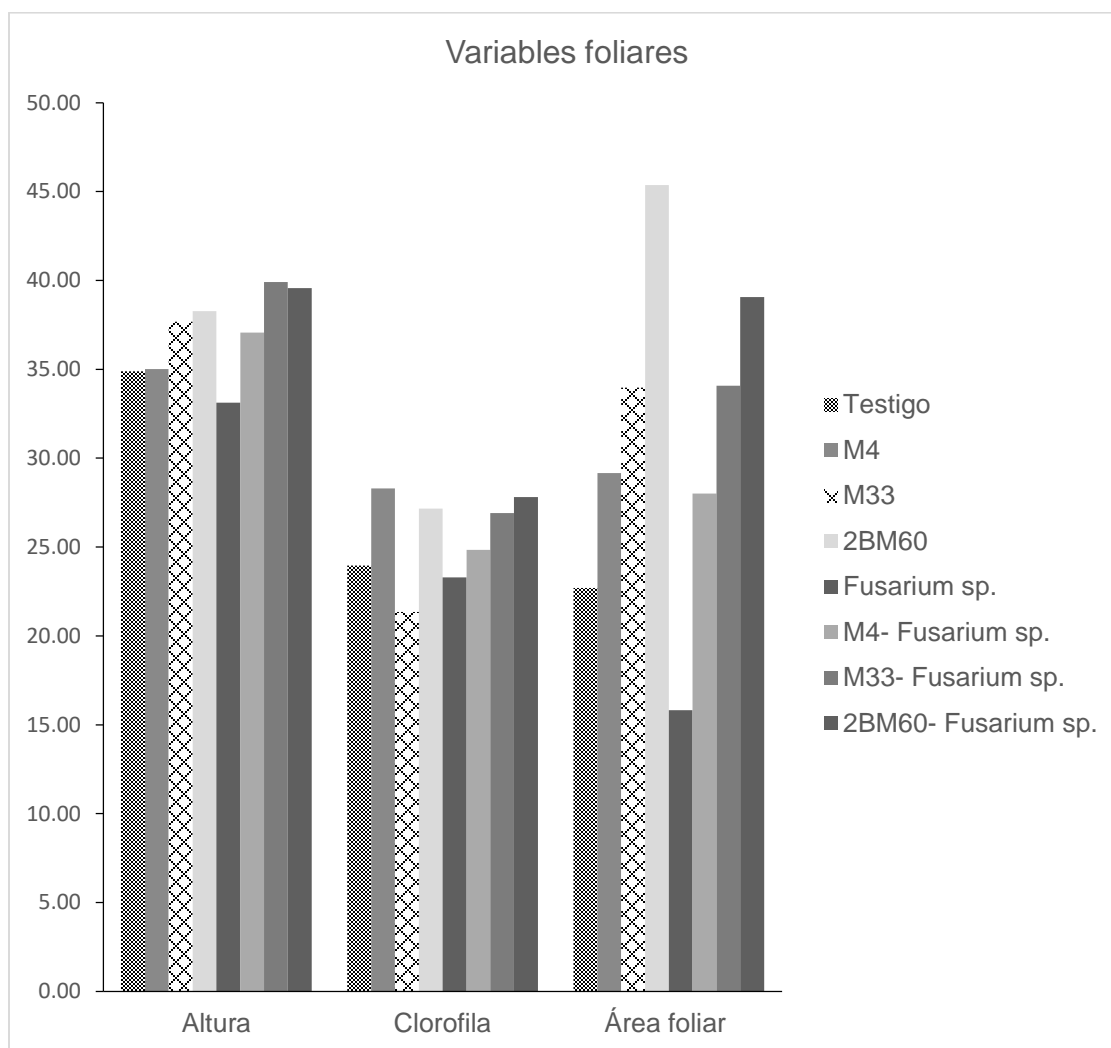


Figura 41. Variables foliares de acuerdo a los organismos inoculados.

El índice de área foliar mostró la interacción entre los tratamientos aplicados y las variedades de trigo, el valor máximo del IAF fue diferente en cada toma de dato; a los 10 días después de siembra el mejor tratamiento fue el de la variedad Urbina con la inoculación del morfotipo M1B M4-*Fusarium* spp. (0.78), luego Valles con el morfotipo M2B M60 con *Fusarium* spp. (1.69), Valles con el morfotipo M2B M60 (3.17), Valles inoculado con el tratamiento M1B M33-*Fusarium* spp. (6.86), y por último, Borlaug inoculados con M2B M60- *Fusarium* spp (3.03) (Cuadro 36).

Cuadro 36. Índice del área foliar de cinco registros de datos durante 49 dds de acuerdo a la variedad y tratamiento aplicado.

Variedad	Tratamiento	IAF 1	IAF 2	IAF 3	IAF 4	IAF 5
Borlaug	Testigo	0.45	1.01	2.22	2.97	1.74
	M1B M4	0.48	1.16	3.51	5.55	1.91
	M1B M33	0.50	1.84	3.06	4.81	2.56
	M2B M60	0.48	1.23	3.11	3.31	2.81
	<i>Fusarium</i> spp.	0.44	0.99	2.07	2.39	1.32
	M1B M4- <i>Fusarium</i> spp.	0.45	1.05	2.44	2.97	2.10
	M33- <i>Fusarium</i> spp.	0.46	1.45	2.26	4.69	2.11
	2BM60- <i>Fusarium</i> spp.	0.49	1.50	2.48	4.04	<u>3.03</u>
Texcoco	Testigo	0.37	0.96	1.96	3.61	1.25
	M4	0.49	1.35	2.29	4.06	1.65
	M33	0.46	1.14	3.00	4.45	2.02
	2BM60	0.45	1.20	2.53	4.06	2.84
	<i>Fusarium</i> spp.	0.44	0.87	1.97	2.06	0.91
	M4- <i>Fusarium</i> spp.	0.45	1.06	2.44	3.73	1.76
	M33- <i>Fusarium</i> spp.	0.43	1.09	3.04	5.62	2.66
	2BM60- <i>Fusarium</i> spp.	0.51	1.08	2.60	3.97	2.11
Urbina	Testigo	0.45	1.23	1.81	1.61	1.11
	M4	0.44	1.62	2.54	3.41	1.30
	M33	0.46	1.45	2.45	2.66	1.24
	2BM60	0.50	1.67	2.78	4.00	2.27
	<i>Fusarium</i> spp.	0.49	1.26	2.26	2.55	0.66
	M4- <i>Fusarium</i> spp.	<u>0.78</u>	1.28	2.74	3.27	0.93
	M33- <i>Fusarium</i> spp.	0.53	1.54	2.60	3.06	1.07
	2BM60- <i>Fusarium</i> spp.	0.58	1.47	2.82	4.14	1.88
Valles	Testigo	0.38	0.96	1.90	2.86	1.22
	M4	0.40	1.36	2.71	3.47	1.98
	M33	0.46	1.11	3.13	4.26	2.14
	2BM60	0.48	1.43	<u>3.17</u>	4.96	2.73
	<i>Fusarium</i> spp.	0.43	0.85	1.84	2.20	0.82
	M4- <i>Fusarium</i> spp.	0.41	1.28	2.90	3.61	1.78
	M33- <i>Fusarium</i> spp.	0.61	1.20	2.70	<u>6.86</u>	2.15
	2BM60- <i>Fusarium</i> spp.	0.55	<u>1.69</u>	2.62	2.74	2.14

Las diferencias mínimas significativas se observaron en los diversos días de evaluación a excepción de los 30 dds, ya que no hay diferencia significativa entre variedades.



Urbina fue la variedad que tuvo mejor resultado en el IAF a los 10 y 20 dds. En el día 40 dds, las variedades que tuvieron mejor respuesta fueron Borlaug, Texcoco y Valles. En el día 49 la variedad que tuvo mejor respuesta fue Borlaug con 2.20 (Cuadro37).

Cuadro 37. Índice de área foliar de 49 dds de acuerdo con la variedad.

Variedad	Índice de área foliar				
	10 dds	20 dds	30 dds	40 dds	49 dds
Borlaug	0.47 b	1.28 b	2.65 a	3.84 a	2.20 a
Texcoco	0.45 b	1.09 c	2.48 a	3.94 a	1.90 b
Urbina	0.53 a	1.44 a	2.50 a	3.09 b	1.31 c
Valles	0.46 b	1.24 b	2.62 a	3.87 a	1.87 b

El índice de área foliar mostró una curva de crecimiento cuyo punto máximo corresponde a los 40 días después de la siembra, posterior a ello hay un declive en la variable y lo anterior se debe por la senilidad de las primeras hojas (Figura 42).

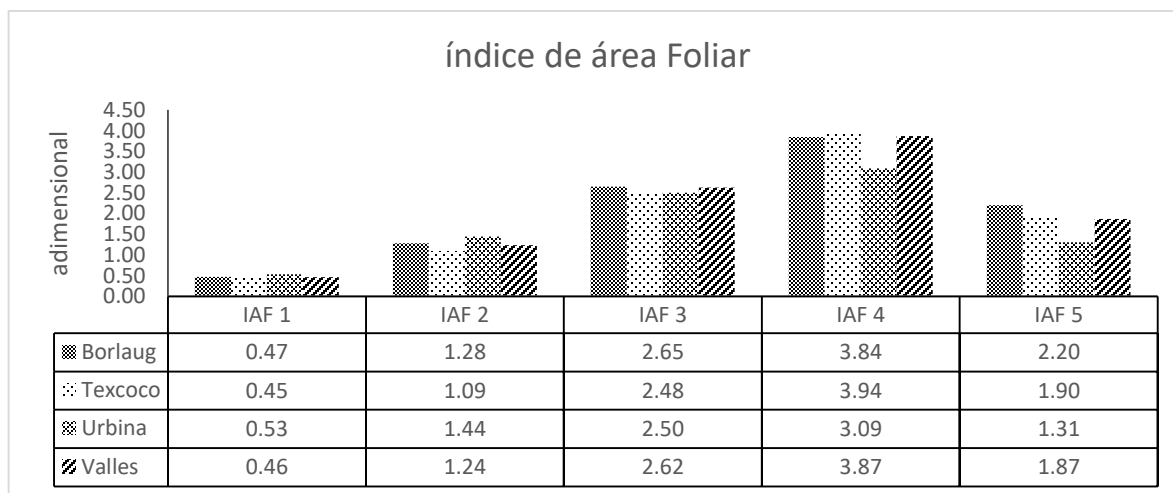


Figura 42. Índice de Área Foliar de 49 dds por variedad.

En cuanto a los tratamientos, se encontró diferencias significativas, después de los 20 días después de la siembra, empezando por el tratamiento de M2B M60-*Fusarium* spp. (1.44), luego los morfotipos M1B M4 (2.76), M1B M33 (2.92) y M2B M60 (2.90), luego en el IAF de 40 dds el mejor tratamiento fue M1B M33-*Fusarium* spp. (5.06) y a los 49 dds el tratamiento de M2B M60 (2.66) (Cuadro 38).

Cuadro 38. Índice de Área Foliar de 49 dds.

Tratamiento	IAF				
	10 dds	20 dds	30 dds	40 dds	50 dss
Testigo	0.41 a	1.04 a b	1.97 b	2.76 b	1.33 d e
M4	0.45 a	1.37 a b	<u>2.76 a</u>	4.12 a b	1.71 b c d
M33	0.47 a	1.39 a b	<u>2.91 a</u>	4.05 a b	1.99 b c
2BM60	0.48 a	1.38 a b	<u>2.90 a</u>	4.08 a b	<u>2.66 a</u>
<i>Fusarium</i> spp.	0.45 a	0.99 b	2.03 b	2.30 b	0.93 e
M4- <i>Fusarium</i> spp.	0.52 a	1.17 a b	2.63 a b	3.40 a b	1.64 c d
M33- <i>Fusarium</i> spp.	0.50 a	1.32 a b	2.65 a b	<u>5.06 a</u>	2.00 b c
2BM60- <i>Fusarium</i> spp.	0.53 a	<u>1.44 a</u>	2.63 a b	3.72 a b	2.29 a b

Se observó una curva de crecimiento con el punto máximo a los días 40 al igual que en los resultados de IAF por variedad, por lo que el decrecimiento corresponde a la naturaleza del cultivo, no de la variedad o del tratamiento. En otro sentido, se detectó un valor máximo en el IAF de 5 puntos en las plantas inoculadas con el morfotipo M1B M33 y con *Fusarium* spp (Figura 43).

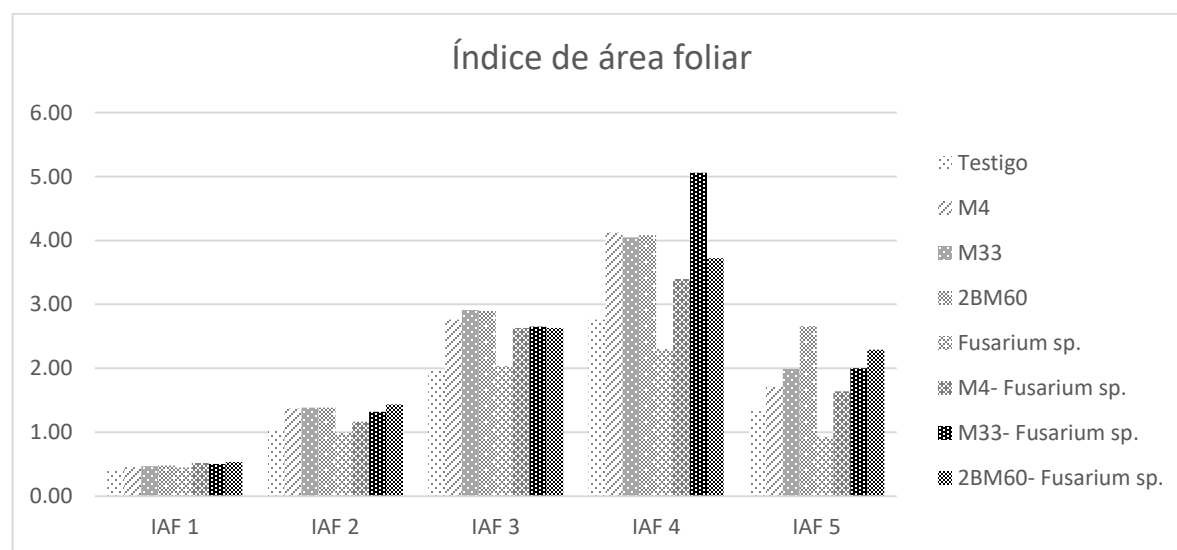


Figura 43. Índice de Área Foliar durante 49 dds por tratamiento.

## VI. DISCUSIÓN

### 6.1 Discusión Aislamiento e identificación de patógenos

El aislamiento de patógenos derivó en la identificación de los géneros *Alternaria* spp., *Bipolaris* spp., *Fusarium* spp., *Septoria* sp. y *Zymoseptoria* sp., hongos que se ha identificado anteriormente en la misma región por Gilchrist-Saavedra (2000) y Mata-Santoyo *et al.* (2018). Cabe mencionar que los géneros *Septoria* y *Zymoseptoria* fueron aislados en un segundo muestreo, ya que en el primer procesamiento se observaron síntomas, pero no fue posible su aislamiento.

Las muestras fueron procesadas al año y medio de ser recolectadas, lo que pudo comprometer la viabilidad de los conidios, Eyal (1987) menciona que la viabilidad de las picnidiosporas de *Septoria* pueden mantenerse viables durante varios años bajo ciertas condiciones, sin embargo, lo más probablemente es que la viabilidad sólo dure un año o menos, este periodo también es reconocido por el Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural (2012), aunque precisa que se mantiene la viabilidad de 6 a 24 meses.

Por otro lado, uno de los patógenos observados e identificados no se pudo aislar considerando que es un parásito obligado, pero por su grado de incidencia en las muestras analizadas se determinó que el género *Puccinia* spp. es el más importante (80-100 %), como lo menciona Huerta-Espino y Singh (2000), específicamente *Puccinia triticina*, distribuida en condiciones de temporal en la misma región del presente estudio. Desafortunadamente a 20 años de la anterior aseveración, y a pesar del uso de variedades resistentes, el problema sigue siendo vigente. La principal causa, es por la diversificación de las razas fisiológicas que ha permitido la adaptación a climas más templados, por lo que se requiere de un continuo mejoramiento de variedades que tengan resistencia a dicho patógeno (Villaseñor *et al.*, 2003; Kolmer, 2005) (Cuadro 39).

Cuadro 39. Comparación de los patógenos aislados y lo reportado en la literatura.

Género	Claves	Descripción	Medidas obtenidas
<i>Alternaria</i> spp.	Barnett y Hunter, 2006; García-León <i>et al.</i> , 2013; Zillinsky, 1984.	Micelio color gris verdoso y algodonoso. Conidios con septos transversales y longitudinales. El conidióforo es redondo, mientras que se estrecha hacia el ápice. Medidas 20-90 µm x 8-20 µm.	Largo 19-46.07 x 7.56-14.22 µm. Ancho 3-6 µm.
<i>Bipolaris</i> spp.	Barnett y Hunter, 2006; Zillinsky, 1984.	Los conidióforos se desarrollan individualmente o en pequeños racimos. No ramificados. Superficie lisa. Medidas 60-120 µm x 12-20 µ.	Conidióforo (118.5 - 122 x 16.4-18.2 µm) Conidios 34-63.12 x 10.06-18.
<i>Fusarium</i> spp.	Leslie y Summerell, 2006; Zillinsky, 1984.	Macroconidios distintivos, delgados y ligeramente curvos, con tres o siete septos. Macroconidios con medidas aproximadas de 25-50 µm x 2.5-5 µm.	Macroconidios 21.01-53.14 x 3.08-4.85 µm
<i>Septoria</i> spp. y <i>Zymoseptoria</i> spp.	Eyal <i>et al.</i> , 1987, Zillinsky, 1984.	<i>S. nodorum</i> : Conidios cortos, septados, oscuros conforme maduran. Medidas entre 15-24 µm x 2.5-4 µm. <i>Z. tritici</i> : Conidios alargados, curvados, medida entre 40-80 µm x 1.7-3 µm en estados maduros.	<i>S. nodorum</i> : Medidas 14.6-20.2 x 2.86-3.48 µm <i>Z. tritici</i> : Medidas 40-77.3 x 1.6-2.84 µm
<i>Puccinia</i> spp.	Zillinsky, 1984	<i>Puccinia striiformis</i> : uredias conspicuos, amarillos. Ligeramente esféricas. Medidas 28-34 µm. <i>Puccinia recóndita</i> : uredias ovaladas, rojizas. Medidas 20-28 µm.	<i>Puccinia striiformis</i> : Diámetro 27.3-32.05 µm <i>Puccinia recóndita</i> : Diámetro de 22.53-28 µm

## 6.2 Discusión de efectos de actinobacterias

En los bioensayos preliminares y la confrontación dual, se observó una disminución en el PICM entre bioensayos en los mismos morfotipos, lo anterior puede deberse a una interacción entre las actinobacterias que se encontraban dentro de la caja Petri. Se sabe que existe un complejo proceso de señalización entre organismos, como es el caso de bacterias fitopatógenas y las plantas, sin embargo, las bacterias como parte de un proceso evolutivo ha desarrollado diferentes mecanismos para combatir las defensas naturales de la planta al igual que el detectar la presencia de bacterias congéneres con la finalidad de colaborar mutuamente para lograr la expresión de una infección (Gudesblat, 2007). Las actinobacterias pueden ser benéficas para algunas especies vegetales pero patógenas para otras (Emmert y Hadelsman, 1999), como se ha reportado con los géneros *Mycobacterium*, *Corynebacterium* o *Nocardia* (Hazarika y Thakur, 2020; Barka *et al.*, 2016), por lo que las actinobacterias comparten el comportamiento de bacterias fitopatógenas. Así, la detección de otras actinobacterias afines en la misma unidad experimental, pudo favorecer la inhibición del crecimiento del hongo en cuestión. No obstante, al cambiar las actinobacterias involucradas en la segunda prueba preliminar, la afinidad de las mismas pudo no ser la correcta por lo que ya no hubo una potencialización del efecto de inhibición en el hongo.

Otra explicación es el efecto de la distancia entre los discos inoculantes (de hongo y actinobacteria), en las confrontaciones duales se duplicó la distancia entre discos en comparación con los bioensayos preliminares. La distancia puede ser un factor si se considera la concentración de compuestos no volátiles segregados por la actinobacteria en el medio de cultivo (Rodríguez-Villareal *et al.*, 2014), dicho de otra forma, la actividad antagonica es mayor a distancias cortas y menor a distancias más largas.

Desde el punto de vista bioquímico, la inhibición del crecimiento micelial está relacionado con la capacidad de producir ciertas enzimas que permiten la degradación de la pared celular de diversos hongos (Evangelista, 2017). Dichos metabolitos se dispersan tanto en la colonia como a su alrededor de la misma incluso mediante la volatilización de compuestos, lo que explica porque en los morfotipos más eficientes, la colonia del hongo y de la actinobacteria no tienen contacto entre sí (Rodríguez-Villareal *et al.*, 2014).

Las actinobacterias demostraron tener un alto grado de especificidad ya que los morfotipos no tuvieron la misma eficiencia con las diferentes especies de *Fusarium* spp. De acuerdo con (Emmert y Hadelman, 1999) las actinobacterias si poseen un alto grado de especificidad, sin embargo, esta referencia se hace en relación a la capacidad de producir enfermar o proteger a algunas plantas, es decir, por ahora se desconoce el origen de dicha especificidad, sin embargo, se puede relacionar con los procesos de señalización entre el hongo y la bacteria. La señalización puede ser diferente no sólo por la actinobacteria, si no por los compuestos segregados por el hongo.

El género *Fusarium* spp. presenta una característica en cuanto a los compuestos que segrega denominadas micotoxinas, mismas que son producidas en mayor cantidad por determinadas especies como *F. roseum*, *F. moniliforme* y *F. tricinctum* (Bauza, 2007), lo que indica que a pesar ser del mismo género, si hay una diferenciación en los compuestos que producen y por tanto esa variación puede afectar en la interacción con las actinobacterias.

### **6.3 Discusión de calidad semilla**

En cuanto a la calidad de la semilla, durante los diferentes experimentos se detectó la presencia de *Alternaria* sp. y *Fusarium* spp. en diferentes variedades, lo cual corresponde con los reportes de Bautista *et al.*(2011), ya que identificó siete especies del género *Fusarium*, dos del género Bipolaris (syn. *Helminthosporium* sp.) y diferentes hongos saprófitos, entre ellos *Alternaria* sp.

El uso de tratamientos térmicos e hipoclorito de sodio, se han usado como tratamientos de desinfestación de semilla pero no fue eficiente en el caso de trigo (87.5 - 100 % de contaminación), mientras que el morfotipo M1BM4 presentó los con valores más bajos en el porcentaje de contaminación (5 al 37.5). De acuerdo, con Moore *et al.* (1995), la exposición de esporas a temperaturas de 45 °C (aproximadamente), retrasa la germinación de esporas pero no el porcentaje de germinación de las mismas, Maeso y Walasek (2012), recomiendan aumentar la temperatura y con una exposición mayor para el proceso de desinfestación, no obstante, aumentar la temperatura o la duración del

este proceso de desinfestación puede comprometer la germinación de la semilla como se observó en el tratamiento térmico con duración de tres minutos.

Los metabolitos secundarios de las actinobacterias poseen la capacidad de degradar la pared celular de las estructuras fúngicas (Evangelista, 2017) y el hipoclorito de sodio tiene la capacidad penetrar la pared celular (Caballo, 2006), para luego destruir algunas membranas. Sin embargo, existe otro mecanismo de acción de los agentes antagonistas contra patógenos además de la lisis enzimática, como lo es la competencia por el espacio (Fernández-Larrea, 2001), por ello, las actinobacterias tuvieron un menor porcentaje de contaminación. Se puede utilizar las actinobacterias como tratamiento para disminuir la germinación de esporas, ya que no afectó en el porcentaje de germinación.

La germinación no se ve afectada al exponer las semillas en caldo nutritivo con el morfotipo M1B M4 durante 12 horas, sin embargo, la exposición si es prolongada por más de 12 h, se presenta un efecto de inhibición en la germinación.

Las actinobacterias son capaces de producir hormonas de crecimiento como el ácido giberélico, ácido indol acético y citoquininas (Condori *et al.*, 2019; Lino *et al.*, 2020). Considerando los efectos de inhibición que tuvo en las semillas, podría expresar la presencia de inhibidores de germinación como el ácido abscísico como lo indica Molina-Romero *et al.* (2015) o afectar la regulación de germinación a través del ácido jasmónico. Otra posibilidad es que tengan la capacidad de producir fitotoxinas como el ácido cianhídrico (compuesto volátil que afecta negativamente el metabolismo y crecimiento radical) como lo hacen algunas bacterias o rizobacterias (Pacheco-Hernández *et al.*, 2015), cabe mencionar que en algunos casos las actinobacterias son catalogadas como rizobacterias por compartir actividades similares en las plantas, sobretodo de crecimiento (Sánchez-García *et al.*, 2019). De esta forma, las semillas al pasar más de 12 horas expuestas a una fitotoxina o a un inhibidor de germinación, permite que el efecto se exprese a diferencia de una exposición temporal.

En cuanto a los efectos en las plantas de trigo de diferentes edades, se encontró que si hay una interacción fisiológica entre el morfotipo de actinobacteria, el patógeno y la planta hospedera (Cuadro 39).

Cuadro 40. Resumen de los resultados más altos de acuerdo con la variable evaluada y analizada considerando la variedad y los tratamientos aplicados

Variable	Variedades y tratamientos	Variedad	Tratamientos
PSP	Var. Texcoco Morfotipo M33	Borlaug	M33- <i>Fusarium</i> spp
PSR	Var. Texcoco Morfotipo M33 y Var. Borlaug Morfotipo 33	Borlaug	M33
PSF	Var. Borlaug Morfotipo M33- <i>Fusarium</i> spp.	Borlaug	2BM60 M33- <i>Fusarium</i> spp. 2BM60- <i>Fusarium</i> spp.
Altura	Var. Valles M33- <i>Fusarium</i> spp.	Texcoco Urbina Valles	M33 2BM60 M33- <i>Fusarium</i> spp. 2BM60- <i>Fusarium</i> spp.
Clorofila	Var. Borlaug M4		
Área foliar	Var. Borlaug 2BM60- <i>Fusarium</i> spp.	Borlaug	2BM- <i>Fusarium</i> spp.
DAF	Var. Valles M33- <i>Fusarium</i> spp.	Borlaug Texcoco Valles	M33- <i>Fusarium</i> spp.
IAF (10 dds)	Var. Urbina M4- <i>Fusarium</i> spp.	Urbina	No hubo diferencia significativa
IAF (20 dds)	Var. Valles 2BM60- <i>Fusarium</i> spp.	Urbina	2BM60- <i>Fusarium</i> spp.
IAF (30 dds)	Var. Valles 2BM60	No hubo diferencia significativa	M40 M33 2BM60
IAF (40 dds)	Var. Valles M33- <i>Fusarium</i> spp	Borlaug Texcoco Valles	M33- <i>Fusarium</i> spp.
IAF (49 dds)	Var. Texcoco 2bm60- <i>Fusarium</i> spp.	Borlaug	2BM60

Se observó variación en los efectos de los morfotipos respecto a cada variable evaluada, sin embargo, en general, los morfotipos tuvieron un mejor crecimiento que las plantas inoculadas con *Fusarium* spp., o bien, aquellas que funcionaron como testigos.

Al evaluarse por tratamiento aplicado, M1B M33 tuvo función como promotor de crecimiento en la producción de biomasa, reflejado en el peso seco de la planta, al igual que en la altura y en ciertos momentos del índice del área foliar. El tratamiento 2BM60 tuvo un efecto promotor de crecimiento, reflejado en el peso seco foliar, la altura de la planta y en el índice de área foliar.



Lo anterior indica que los morfotipos evaluados contienen biomoléculas promotoras del crecimiento vegetal, tales como: auxinas (formación y elongación de tallos, producción de raíces adventicias y aumento de la dominancia apical), giberelinas (aumenta el desarrollo de tejidos, elongación de raíces, hojas jóvenes, floración, índice a la germinación de semillas), etileno (regulador de madurez de diferentes estructuras), citoquininas (elongación de raíces, activa la senescencia de hojas, estimulan el desarrollo fotomogénico vegetal y estimula la creación de brotes axilares) y ácido abscísico (regula y mantiene la dormancia de semillas, estimula la maduración de semillas, inhibe la germinación y regula la respiración celular) (Alcantara *et al.*, 2019; Moreno *et al.*, 2018; Sánchez- García *et al.*, 2020; Lino *et al.*, 2019).

Antes de abordar el efecto promotor de crecimiento que tuvo *Fusarium* spp., se debe mencionar que no se expresaron síntomas del patógeno, lo anterior se considera fue por la temperatura del ambiente en el invernadero, ya que se recomienda que la temperatura oscile entre los 18 y 24 °C para favorecer el desarrollo del hongo y la humedad relativa del 95 % los primeros 5 días, o bien de 74 a 80 % en general. (Navarrete-Maya *et al.*, 2009; Leyva-Mir *et al.*, 2017), sin embargo, la temperatura oscilo de 12.63 a 31.81°C y la humedad del ambiente se mantuvo en un rango de 24.10 a 98 %. Dando una temperatura promedio de 21.19 °C y 62.58 % de humedad. Por lo que al comprometerse la temperatura por arriba de los 25 °C, es afectado el crecimiento del patógeno.

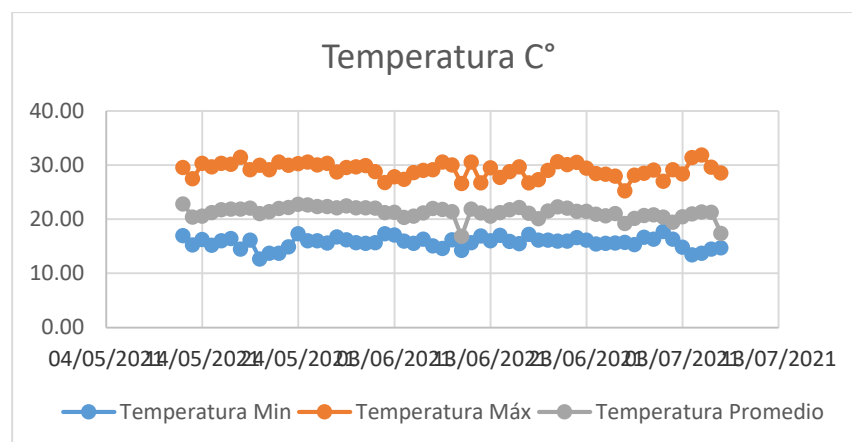


Figura 44. Temperatura máxima, promedio y mínima registrados durante la realización del experimento en invernadero.

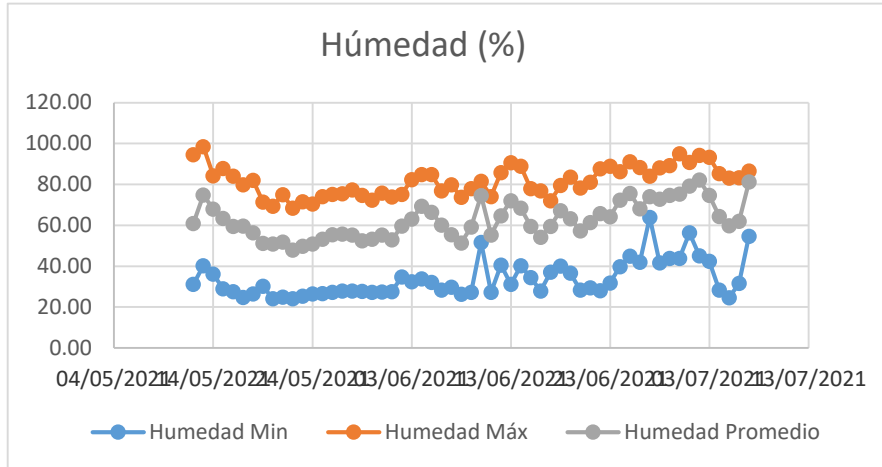


Figura 45. Humedad máxima, promedio y mínima registrados durante la realización del experimento en invernadero.

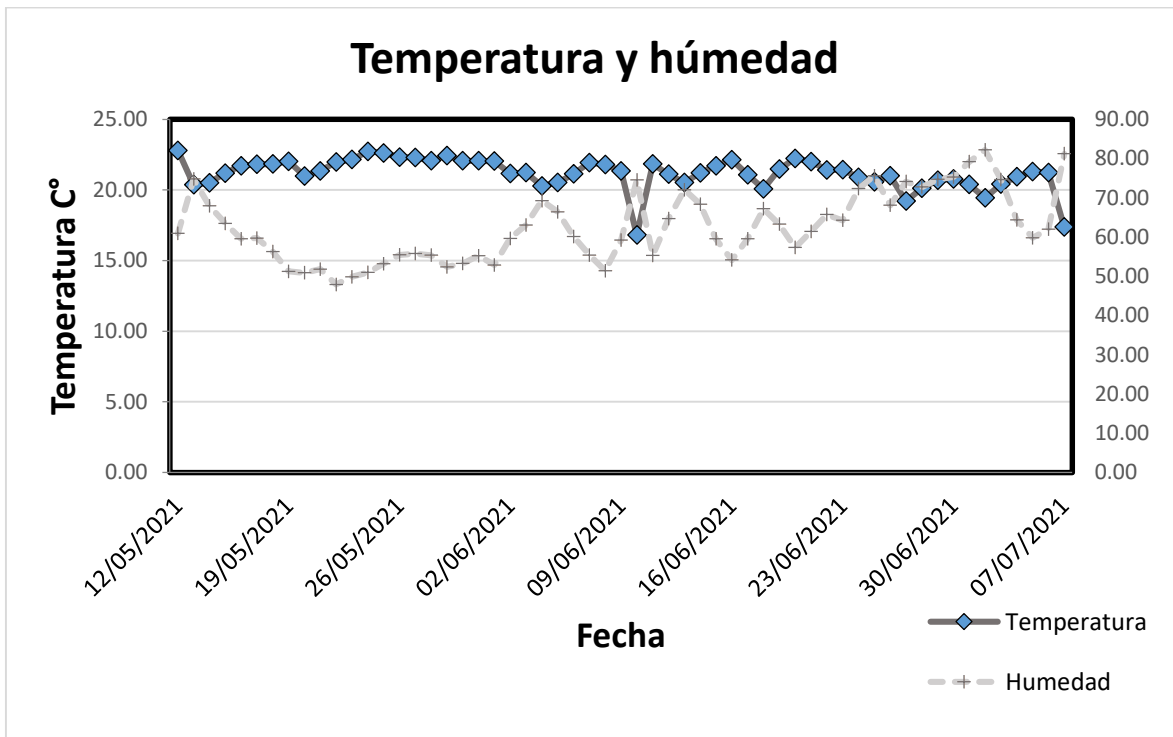


Figura 46. Referencia de temperatura y humedad registrada durante la realización del experimento en invernadero.

## VII. CONCLUSIONES

Se logró identificar siete géneros de patógeno que afectan severamente la producción de trigo en los Valles Altos de México.

Se detectaron actinobacterias que tienen potencial como agentes antagónicos en al menos uno de los patógenos identificados.

Los morfotipos evaluados en condiciones de invernadero, poseen la capacidad de promover el crecimiento vegetal en variedades de trigo cultivados en los Valles Altos de México.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 1996. Fitopatología. Segunda edición. México. 838 p.
- Alcantara C., J. S., J. Acero G., J. D. Alcántara C. y R. M. Sánchez M. 2019. Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. NOVA. 17 (32): 108-129.
- Andrade V., O. y E. Contreras. 2007. La mancha foliar o Septoriosis de la hoja del trigo. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro regional de Investigación Carillanca, Ministerio de Agricultura. Temuco, Chile.
- Barceló C., J., G. Nicolás R., B. Sabater G. y R. Sánchez T. 2001. Fisiología vegetal. Pirámide. 568
- Barka, E. A., P. Vatsa., L. Sánchez, N. Gaveaeu-Vallant, C. Jacquard, K. Hans-Peter, C. Clément, Y. Oucdouch y G. P. van Wezel. 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacterias. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 80 (1) : 1- 43.
- Barrera, J., D. Suárez y L. M. Melgarejo. 2010. Análisis de crecimiento en plantas. Universidad Nacional de Colombia. 25-38.
- Bautista E., M. E., S. G. Leyva M., H. E. Villaseñor M., J. Huerta E. y L. A. Marisacal A. 2011. Hongos Asociados al grano de trigo sembrado en áreas del Centro de México. Rev. Mex. Fitopatología. 29 (2): 175-177.
- Bauza, R. 2007. Las micotoxinas, una amenaza constante en la alimentación animal. *In: Innovación y Desarrollo de Tecnologías Apropriadas para la Producción Animal. IX Encuentro de Nutrición y Producción de Animales Monogástricos. Curso Pre-Evento. Montevideo. 21-28.*
- Bhatti, A. A., S. Haq y R. A. Bhat. 2017. *Actinomycetes* benefaction role in soil and plant health. Microbial Pathogenesis. 11: 458-467.
- Bulgarelli, D., K. Schlaeppi, S. Spaepen , T. E. Ver Loren, P. Schulze-Leferte. 2013. Structure and fuctions of the bacterial microbiota of plants. Ann. Rev. Plant Biol. 64 : 807 - 838.
- Cao, L., Z. Qiu, J. You, H. Tam y S. Zhou. 2004. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-seterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. Lett. Appl. Microbiol. 39 : 425-430.

- Cabrera, R., H. García-López, E. Aguirre-von-Wobeser, J. A. Orozco-Ávitia y A. H. Gutiérrez-Saldaña. 2020. Amycolatopsis BX17: An actinobacterial strain isolated from soil of a traditional milpa agroecosystem with potential biocontrol against *Fusarium graminearum*. *Biological Control*. 147 : 1- 12.
- Condori-Pacsi, S. I., P. R. Fernández-Guzman y M. R. Valderrama-Valencia. 2019. Aislamiento y caracterización de *Streptomyces* spp. rizosféricos promotores del crecimiento vegetal. *IDESIA*. Chile. 37 (2): 109-116.
- Consolo, V. F., C. Albani, C. Berón, G. Salerno y C. A. Cordo. 2008. Test de PCR para la detección de *Septoria tritici* en semilla de trigo: eficaz por sobre otras técnicas de rutina. *INTA*. 1-6.
- Cook, L. C. y M. J. Federle. 2014. Peptide pheromone signaling in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Rev. Microbiol.* 38 : 473-492.
- Emmert, E.A.B., and Handelsman, J. (1999) Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol Lett* 171: 1–9.
- Evangelista M., Z., E. E. Quiñones A. y G. Rincón E. 2017. Potencial biotecnológico de las actinobacterias aisladas de suelos de México como fuente natural de moléculas bioactivas: compuestos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas. *Temas de Ciencia y Tecnología*. 21(63): 39-51.
- Eyal, Z., A.L. Scharen, J.M. Prescott y M. van Ginkel. 1987. Enfermedades del trigo causadas por *Septoria*: Conceptos y métodos relacionados con el manejo de estas enfermedades. México, D.F.: CIMMYT. 54 p.
- FAO. 2001. El estado mundial de la agricultura y la alimentación: efectos económicos de las plagas y enfermedades transfronterizas. *Food And Agriculture*. Departamento económico y social. Versión en línea: <http://www.fao.org/docrep/003/x9800s/x9800s16.htm>. Consultado el 1 de febrero del 2020.
- Fernández-Larrea V., O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas*. 62: 96-100.
- Figuroa-Rivera, M G., R. Rodríguez-Guerra, B. Z. Guerrero-Aguilar, M. M. González-Chavira, J. L. Pons-Hernández, J. F. Jiménez-Bremont, J. G. Ramírez-Pimental, E. Adrio-Enríquez y M. Mendoza-Elos. 2010. Caracterización de especies de *Fusarium* Asociadas a la Pudrición de Raíz de Maíz en Guanajuato, México. *Rev. Mex. Fitopatología*. 28 (2): 124-134.
- García-León, E., S. G. Leyva-Mir, H. E. Villaseñor-Mir, M. F. Rodríguez-García y J. M. Tovar-Pedraza. 2013. Identificación e incidencia de tres hongos fitopatógenos, de reporte nuevo, en avena (*Avena sativa* L.) en la meseta central de México. *Rev. Agrociencia*.47: 815-827.
- Getha, K., S. Vikineswary, W. Wong, T. Seki, A. Ward y M. Goodfellow. 2005. Evaluation of *Streptomyces* sp. Strain g10 for suppression of *Fusarium* wilt and

- rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. *J. Ind Microbiol Biotechnol.* 32 : 24-32.
- Gilchrist-Saavedra, L. I. 2000. Problemas Fitosanitarios de los Cereales de Grano Pequeño en los Valles Altos de México. *Rev. Mex. Fitopatología.* 18 (2): 132-17.
- Gilchrist-Saavedra, L., G. Fuentes-Dávila, C. Martínez-Cano, R. M. López-Atilano, E. Duveiller R. P. Singh, M. Henry e I. García A. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Segunda edición. México. 75 p.
- Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J. Microbiol* 41:109 –117.
- Gudesblat, G. E. 2007. Señalización en la interacción entre bacterias fitopatógenas y su hospedador. *Rev. Química Viva.* Buenos Aires, Argentina. (2): 70-81.
- Guillen-Cruz, R., F. D. Hernández-Castillo, G. Gallegos-Morales, R. Rodríguez-Herrera, C. N. Aguilar-González, E. Padron-Corrales y M. H. Reyes-Valdés. 2006. *Bacillus* spp como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile (*Capsicum annum* L.). *Revista de Fitopatología* 24-105-114.
- Goodfellow, M. 1983. Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* 37 : 189-216.
- Hazarika, S. N. y D. Thakur. 2020. Actinobacteria. *Beneficial Microbes in Agro-Ecology.* 443-476.
- Huerta-Espino, J., y R. P. Singh. 2000. Las royas de trigo. In: Villaseñor M. H. E., y R. E. Espitia (eds). *El Trigo de Temporal en México.* Chapingo, Estado de México, México, SAGAR, INIFAP, CIRCE, CEVAMEX. Libro Técnico Núm. 1. pp: 231–249.
- Kolmer, J. A. 2005. Tracking wheat rust on a continental scale. *Current Opinion in Plant Biology.* 8: 441-449.
- Kunoh, H. 2002. Endophytic Actinomycetes: Attractive Biocontrol Agents. *Journal of General Plant Pathology.* 68 (3): 249-252.
- Labeda, D. 1987. Actinomycete taxonomy: generic characterization. *Dev. Ind. Microbiol.* 28 : 115-121.
- Leslie, J. F. y B. A. Summerell. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual.* Blackwell Publishing, Iowa. USA. 369.
- Leyva-Mir, S. G., H. E. Vega-Portillo, H. E. Villaseñor-Mir, B. Tlapal-Bolaños, M. Vargas-Hernández, M. Camacho-Tapia, J. M. Tovar-Pedraza. 2017. Caracterización de especies de *Fusarium* causantes de pudrición de raíz del trigo en el Bajío, México.

- Lino N., M., E. Morales T., P. Acosta R. y M. Soberon L. 2020. Respuesta antifúngica y propiedades PGPB de actinomicetos aislados de cultivos de “vid” *Vitis vinifera* (*Vitaceae*). *Arnaldoa*. 27 (2): 571-586.
- Lozano-Ramírez, N., M. Mezzalama, A. Carballo-Carballo, A. Hernández-Livera. 2006. Efectos de fungicidas en la calidad fisiológica de la semilla de trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) y su eficacia en el control de *Fusarium graminearum* Schwabe [*Gibberella zeae* (Schwein.) Petch] y *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker Chochliobolus sativus S. Ito y Kurib.]. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 24 (2) : 115-121.
- Ma, L. J., D. M. Geiger, R. H. Proctor, A. P. Rooney, K. Ó'Donnell, F. Trail y K. Kazan. 2013. *Fusarium* Pathogenomics. *Annu. Rev. Microbiology*. 67 : 399-416.
- Macagnan, D., R. da S. Romeiro, J. T. de Souza y A. W. V. Pomella. 2006. Isolation of actinomycetes and endospore-forming bacteria from the cacao pod surface and their antagonistic activity against the “Witches” Broom and black pod pathogens. *Phytoparasitica*. 34 (2) : 122-132.
- Maeso, D. y W. Walasek. 2012. Evaluación de métodos para desinfectar semillas de tomate contra cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). *Agrocienia Uruguay*. 16 : 134-141.
- Mata-Santoyo, C. I., S. G. Leyva-Mir y M. Camacho-Tapia. 2018. Agresividad de aislados de *Bipolaris sorokiniana* y *Alternaria alternata* en variedades de trigo en México. *Rev. Mexicana de Fitopatología*. 432 – 443.
- Mohr H., Schopfer P. 1995. *Plant Physiology*. Springer-Verlag, Berlin. 284.
- Molina-Romero, D., M. Bustillos-Cristales, O. Rodríguez-Andrade, Y. E. Morales-García, Y. Santiago-Saenz, M. Castañeda-Lucio y J. Muñoz-Rojas. 2015. Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas* 17: 24-34.
- Moore, D., R. P. Bateman, M. Carey, C. Prior. 1995. Long-term storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in oil formulations for the control of locusts and grasshoppers. *Biocontrol Sci. Techn.* 5:193-199.
- Moreno R., A., V. García M., J. L. Reyes C., J. Vásquez A. y P. Cano R. 2018. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para a agricultura sustentable. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 20 (1): 68-83.
- Navarrete-Maya, R., E. Trejo-Albarrán, J. Navarrete-Maya, J. M. Prudencia-Sains y J. A. Acosta G. 2009. Reacción de genotipos de frijol a *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia solani* bajo condiciones de campo e invernadero. *Agricultura Técnica en México*. 35 (4):455-466.
- Pacheco-Hernández, X. J., A. Rodríguez-Dorantes, R. González-Rivera, E. Amora-Lazcano, L. A. Guerrero-Zúñiga y A. V. Rodríguez-Tovar. 2015. Evaluación del efecto fitotóxico de rizobacterias deletéreas sobre el crecimiento radical del

- Axonopus affinis* (Chase) y *Lens Esculenta* (Moench). Rev. Polibotánica. México. 40 (9): 137-152.
- Pascual. C. B., A. K. S. Barcos, J. A. L. Mandap y E. T. M. Ocampo. 2016. Fumonisin-Producing *Fusarium* Species Causing Ear Rot of Corn in the Philippines. Crop Science Society of the Philippines. 41 (1): 12-21.
- Pereyra, S. y R. Dill-Macky. 2010. *Fusarium* Species Recovered from Wheat and Barley Grains in Uruguay, Pathogenicity and Deoxynivalenol Content. Agrociencia Uruguay. 14: 33-44.
- Rodríguez G., M. P. 2001. Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. Acta Zool. Mex. 1: 53-78.
- Rodríguez-Guerra, R., F. Castillo-Reyes, B. Ledesma-Bravo, A. Calderón-Ruíz, L. F. Armijo-Martínez, C. J. Ruiz-Amaro. 2020. Diversidad en suelo y antagonismo de actinobacterias contra *Sclerotium rolfsii*. Biotecnología y Sustentabilidad. 5 : 19-36.
- Rodríguez-García, M. F., J. Huerta-Espino, H. E. Villaseñor-Mir, P. Rivas-Valencia, M. González-González, R. Hortelano-Santa Rosa, L. Robles-Yerena y S. Aranda-Ocampo. 2020. Tratamiento químico en a semilla de trigo para disminuir la incidencia de bacterias. Rev. Mex. Fitopatología. 38 (2): 239-249.
- Rodríguez-Villareal, R. A., K. I. Peña-Carrillo, E. Fernández-Cruz, I. H. Almeyda-León, I. Hernández-Torres, E. Acosta-Díaz y R. Rodríguez-Guerra. 2014. Antagonismo e identificación genética de un actinomiceto con potencial para el biocontrol de *Phytophthora capsici* Leonian (PERONOSPORALES: PYTHIACEAE) biocontrol. Rev. Vedralia (1): 1-15.
- Romero-Bastidas, M., A. Nieto-Garibay, L. G. Hernández-Montiel, E. Troyo-Diéguez, R. Ramírez-Serrano y B. Murillo-Amdor. 2016. Acondicionamiento térmico de semillas en la germinación, emergencia, vigor y etapa vegetativa de albahaca (*Ocimum basilicum* L.). Revista Electrónica Nova Scientia. 8 (1): 181-212.
- Quaedvlieg, W., G. H. J. Kema, J. Z. Groenewald, G. J. M. Verkley, S. Seifbargi, M. Razavi, A. Mirzadi Gohari, R. Menhrabi y P. W. Crous. 2011. *Zymoseptoria* gen. Nov.: a new genus to accommodate Septoria-like species occurring on graminicolous hosts. Persoonia. 26: 57-69.
- Salazar-Moreno, R. y A. Rojano-Aguilar. 2014. La eficiencia en el uso del agua en la agricultura controlada. Tecnología y Ciencias del agua. 5 (2): 177-183.
- Salwan, R. y V. Sharma. 2018. Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. Microbiological Research. 231: 1- 18.
- Sánchez-García, B. M., J. G. Ramírez-Pimentel, L. P. Guevara-Acevedo, J. C. Raya-Pérez, J. Covarrubias-Prieto y M. A. Mora-Áviles. 2019. Actinobacterias con potencial antagónico *in vitro* a hongos fitopatógenos y promoción del crecimiento en plantas de Chile. Rev. Mexicana de Ciencias Agrícolas. 339-344.

- SIAP. 2020. Avance de Siembras y Cosechas: Resumen agrícola por cultivo. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Versión en línea: <[http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do)>. Consultado el 17 de abril del 2020.
- Taiz, L. y E. Zeiger. 2006. Fisiología vegetal. Universidad Jaume I. Publicacions ed. III. 656p.
- Vázquez-Ramírez, L. M. y J. Castaño-Zapata. 2017. Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (SACC.) W. C. Snyder & H. N. Hansen]: una revisión. Rev. U. D. C. A. Act. & Div. Cient. 20 (2): 363-374.
- Velázquez, P. D. y A. N. Fromento. 2012. Efecto de la fusariosis de la espiga (*Fusarium graminearum* y *Fusarium* spp.) sobre dos genotipos de trigo. INTA. 14.
- Villaseñor M., H. E., E. Espitia R. 2000. Características de las áreas productoras de trigo de temporal. Problemática y condiciones de producción. In: Villaseñor, M. H. E y Espitia, R. E. (Eds.). El trigo de temporal en México. SAGAR-INIFAP-CIRCE-CEVAMEX. México. 85-98 pp.
- Villaseñor M H E, E R Espitia, J Huerta E, C Ortiz (2003) Variedades de trigo F2000, una opción para las siembras de temporal en el Estado de México. Folleto Técnico No. 15. SAGARPA, INIFAP, CEVAMEX. Chapingo, México. 36 p.
- Zadoks, J. C. y R. D. Schein. 1979. Epidemiology and plant disease management. Oxford University Prees. 427.