



Universidad Michoacana
de
San Nicolás de Hidalgo



Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera

Maestría en Ciencias y Tecnología de la Madera

**Selección de aislados microbianos con actividad antifúngica
contra los hongos cromógenos de *Pinus* sp. y *Cupressus* sp.**

Tesis para obtener el título

Maestro en Ciencias en Tecnología de la Madera

Q.F.B. Jared Maya Alavez

Asesor: D.C. Crisanto Velázquez Becerra

Co-asesor: D.C. Mauro Manuel Martínez Pacheco

Febrero de 2023, Morelia Michoacán.



TABLA DE CONTENIDO

I. Resumen	8
I.I Abstract	9
II. Antecedentes	12
III MARCO TEÓRICO	13
III.I. La Madera	13
III.II. El uso de la madera	14
III.III. El aprovechamiento de los recursos maderables en México	14
III.IV. Déficit de la producción de la madera	15
III.V. Perdida de la madera por plagas y enfermedades	15
III.VI. Perdidas de la madera por hongos	16
III.VII. Los hongos cromógenos que afectan la madera	16
III.VIII. Control Químico y sus desventajas	18
III.IX. Antibiosis	18
III.X. Metabolómica	19
III.XI. Uso de microorganismos como agentes de control biológico	19
III.XII. Control biológico con bacterias	19
III.XIII. Características para el desarrollo de antagonistas	20
III.XIX. Ventajas del control biológico	20
III.XV. Desventajas del control biológico	20
IV. Justificación	22
V. Hipótesis	23
VI. Objetivo general	24
V.I. Objetivos Particulares	24



VII. Estrategia experimental	25
VIII. Materiales y métodos	26
VIII.I Hongos cromógenos de la madera.....	26
VIII.II. Recolección de muestras de madera con presencia de pigmentación en madera de <i>Cupressus</i> sp.	27
VIII.III. Morfología y crecimiento de los hongos cromógenos de la madera de <i>Pinus</i> sp.	27
VIII.IV. Descripción de la morfología macroscópica	27
VIII.V. Morfología microscópica de los aislados fúngicos de <i>Cupressus</i> sp.....	28
VIII.VI. Descripción morfológica macroscópica de los microorganismos aislados de <i>Cupressus</i> sp.	28
VIII.VIII. Aislados fúngicos candidatos a posibles Agentes de Control Biológico (ACB)	29
VIII.IX Posibles Agentes bacterianos con actividad antifúngica	30
VIII.X. Selección de aislados fúngicos con actividad antifúngica contra los hongos cromógenos.....	31
IX. Resultados	32
IX.I. Curso temporal del crecimiento de los hongos cromógenos de madera <i>Pinus</i> sp. ..	32
IX. II Descripción morfológica de los hongos cromógenos de madera de <i>Pinus</i> sp.	33
IX. IV. Morfología macroscópica de los aislados fúngicos de <i>Cupressus</i> sp.	35
IX.V. Descripción microscópica de la morfología de los hongos cromógenos de la madera de <i>Cupressus</i> sp.	38
.....	39
.....	40
XI.VI. Curso temporal del crecimiento de los hongos cromógenos de madera <i>Cupressus</i> sp.	40



IX.VII. Crecimiento de los aislados bacterianos en medio líquido con efecto antifúngico contras los hongos cromógenos de <i>Pinus</i> sp.	41
IX.VIII. Selección de los aislados microbianos con actividad antagonista contra hongos cromógenos de la madera <i>Pinus</i> sp.....	42
.....	43
Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS)	43
X. Discusión.....	44
XI. Conclusión.....	46
X. Bibliografía.....	47



CONTENIDO DE ILUSTACIÓN

Ilustración 1. Anatomía microscopia de la madera.....	14
Ilustración 2, Hongos que pigmentan la madera de azulado en madera. Azulado artificial de tablas de pino de <i>Phoma exigua</i> . B Detalle. C Hifas gruesas y marrones de <i>P. exigua</i> . D Clamidosporas (foto G. Koch). E Perithecia (A, B, C, E de Schmidt y Huckfeldt 2005).....	17
Ilustración 2. Probeta con hongos cromógenos aislados por Martínez Pacheco <i>et al.</i> , 2022	26



CONTENIDO DE LAS TABLAS

Tabla 1 Hongos cromógenos aislados de la madera <i>Pinus</i> sp. por Martínez Pacheco <i>et al.</i> , 2022	26
Tabla 2 Aislados fúngicos que se usaron en el escrutinio como agentes antagónicos	29
Tabla 3. Lista de aislados bacterianos que se utilizaron para la selección de microorganismos.	30
Tabla 4. Aislados cromógenos fúngicos de la madera <i>Pinus</i> sp. crecimiento rápido	32
Tabla 5. Aislados cromógenos fúngicos de la madera <i>Pinus</i> sp. de crecimiento lento.	33
Tabla 6. Descripción macroscópica de los hongos cromógenos de la madera de <i>Pinus</i> sp. .	34
Tabla 7. Hongos cromógenos Crecimiento rápido de la madera <i>Cupressus</i> sp. en medio DS.	40
Tabla 8. Hongos cromógenos crecimiento lento de la madera <i>Cupressus</i> sp. en medio DS.	41



GRAFICAS

Grafica 1 . Crecimiento de las bacterias en medio liquido MH con actividad antifúngica
contra los hongos cromógenos42



I. Resumen

La madera se constituye por tres macromoléculas que son; Celulosa, hemicelulosa y lignina y se dividen en maderas suaves y duras. Las maderas de *Pinus* sp. y *Cupressus* sp. se usan con mayor frecuencia en México para la construcción de casas, artesanías, papel, etc. La madera es susceptible al deterioro por causa de factores físicos que la predispone para la proliferación de hongos cromógenos. Los hongos que pigmentan la madera afectan su valor estético y comercial. Los métodos para el control de la enfermedad son, el físico como la reducción del porcentaje de humedad y el uso de fungicidas de origen químico, pero causan resistencia fúngica, efectos nocivos para el ambiente y la salud del técnico. La búsqueda del control biológico como una alternativa es una opción viable por secreción del metaboloma de microorganismo y se conocen los compuestos orgánicos en medio difusible y los compuestos orgánicos volátiles. El propósito del trabajo es la selección del metaboloma de aislados microbianos con actividad antagonista. Un escrutinio al enfrentar 19 bacterias y 35 aislados fúngicos contra seis aislados cromógenos de *Pinus* sp. que son; *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Geosmithia* sp., *Trichoderma* sp., dos cepas *Hypocrea* sp. y los 9 aislados de *Cupressus* sp. son sensibles al metaboloma de los aislados microbianos

Palabras clave: Control biológico, Hongos cromógenos, Metaboloma, Antagonistas, Metabolitos secundarios.



I.I Abstract

The wood consists of three macromolecules which are; Cellulose, hemicellulose and lignin and are divided into soft and hard woods. The woods of *Pinus* sp. and *Cupressus* sp. is most often used in Mexico for the construction of houses, handicrafts, paper, etc. Wood is susceptible to deterioration due to physical factors that predispose it to the attack of chromogenic fungi. Wood chromogenic fungi pigment wood, affecting its aesthetic and commercial value. Methods for the control of the disease are the physical as the reduction of the percentage of humidity and the chemical, the use of fungicides, but cause fungal resistance, harmful effects on the environment and the health of the applicator.

The search for biological control as an alternative is a viable option by secretion of the metabolome of microorganism and organic compounds in diffusible medium and volatile organic compounds are known. The purpose of the work is the selection of the metabolome of microbial isolates with antagonistic activity. A scan was conducted by pitting 19 bacteria and 35 fungal isolates against six chromogenic isolates of *Pine* sp. Are *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Geosmithia* sp., *Trichoderma* sp., isolates two *Hypocrea* sp. and nine isolates *Cupressus* sp.

Key words: Biological control, Chromogenic fungi, Metabolome, Antagonists, Secondary metabolites.



I. Introducción

La madera está compuesta principalmente por 3 grupos de macromoléculas: celulosa, hemicelulosa y lignina (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2015). La humedad de la madera es el factor más importante que influye en la descomposición de la madera por hongos y en consecuencia, también el factor más importante a tener en cuenta en términos de protección de la madera. (Schmidt, 2007) Ya que algunos organismos fúngicos tienen la capacidad para degradar estas macromoléculas que conforman la pared celular en plantas por la capacidad de secretar varias enzimas ligninolíticas y degradadoras de carbohidratos. (Solveig *et al.*, 2002)

Los hongos logran la despolimerización de las macromoléculas de la madera por diversas enzimas hidrolíticas, como las enzimas endo-1,4- β -glucanasas, exo-1,4- β -glucanasas y 1,4- β -glucosidasas que degradan la celulosa cristalina pero los organismos utilizan enzimas oxidasas y peroxidasas que catalizan las reacciones para la degradación del polímero lignina, que es complejo tridimensional por la unión de ácidos y alcoholes fenilpropílicos (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2015). En México ingresan \$ 10 176 millones 164 mil 210 pesos de la venta de madera con una cantidad de madera aserrada de 9 012 035 m³ rollo anuales de madera, de la cual Michoacán ocupa el cuarto lugar en la producción de madera con 368 489 m³ rollo pero la madera es susceptible a los factores de deterioro como humedad, radiación solar y la temperatura, así como, el ataque de insectos y los hongos que pueden causar una variedad de tipos de descomposición de la madera comúnmente clasificada como moho, podredumbre blanca, podredumbre parda, podredumbre blanda y la mancha azul o mancha de albura, que es provocada por la refracción de la luz de las hifas fúngicas que tiene presencia de melanina o por la secreción de material extracelular de los hongos es la tinción en la albura de la madera incluso colores como marrones, verde e incluso negro según el tipo de hongos involucrado o la especie de la madera y esto se debe por el contenido inadecuado de la humedad en la madera. (Daniel *et al.*, 2019; SEMARNAT, 2021) En el control de la enfermedad que ocasionan los hongos, se emplean métodos para preservación de la madera como el físico, que es la reducción del porcentaje de humedad.



El control integrado de la madera también es por compuestos químicos como ejemplo; oleosos, oleosolubles, hidrosolubles y sales múltiples estas últimas son las que implementan con mayor frecuencia, pero los efectos negativos en el ambiente y en la salud de los técnicos. La necesidad de alternativas centra la atención el control biológico que se definió por Baker y Cook en 1978 como, la reducción o inhibición del deterioro la madera por el uso de uno o más microorganismo como bacterias y hongos que tiene la capacidad de secretara compuestos con actividad antifúngica. En el presente trabajo nos centraremos en el mecanismo de la antibiosis que se define como la secreción de compuestos extracelulares que inhiben las funciones indispensables del patógeno por la secreción de compuestos secundarios antimicrobianos, secretan compuestos orgánicos en medio difusible y compuestos orgánicos volátiles (SEMARNAT 2010; Baker y Cook. 1978).



II. Antecedentes

Los hongos son organismos con la capacidad de degradar cualquier sustrato por esto, se usan compuestos de origen químico para el control de la enfermedad, pero los efectos negativos de los fungicidas químicos causan un rechazo en la sociedad.

Por ello, la búsqueda en el control biológico como una alternativa en el metaboloma de microorganismos con capacidad de inhibir las funciones esenciales de los hongos cromógenos en la madera.

El año 2015 Orozco-Mosqueda y colaboradores aislaron compuestos antibióticos orgánicos volátiles de la bacteria *Arthrobacter agilis* contra los hongos que causan la pudrición en la madera y se aislaron dos cepas; *Fusarium* sp. y *Hypocrea* sp. que fueron sensibles al compuesto dimetilhexadecilamina.

En el año 2020 Maya-Alavez, realizó una selección de una colección de 35 hongos que se aislaron en diferentes cultivos enfermos como frutas, verduras y plantas endémicas de México. Los aislados fúngicos se enfrentaron al fitopatógeno *B. cinerea* que afecta a cultivos económicamente importantes como: fresas, frambuesa, zarzamora, tomate, cebolla, así como, flores y plantas de ornamentación. Los aislados fúngicos fueron confrontados contra *B. cinerea* y se determinó que los hongos: *Fusarium* sp. y *Pestalotia* sp. *Diaporthe phaseolorum* 5120 y *Phomopsis viticola* tuvieron actividad antifúngica por la secreción de compuestos extracelulares por el mecanismo de antibiosis en medio difusible. Los hongos con actividad antifúngica son *Fusarium* sp. y *Pestalotia* sp., también tienen actividad antagonista por la secreción de compuestos orgánicos volátiles que inhibieron la formación de conidios del fitopatógeno.

En la investigación que realizó Hernández - Izquierdo en el 2021, seleccionó cuatro bacterias de la rizosfera de una planta del desierto y encontró que las bacterias *Bacillus* sp., *Bacillus armenchi*, *Bacillus* sp. tienen efecto antifúngico contra la cepa resistente de *Colletotrichum acutatum* 10 que se reporta como un hongo con resistencia a compuestos químicos que se implementan para el control de la enfermedad de la pudrición peduncular en el fruto de aguacate.



III MARCO TEÓRICO

III.I. La Madera

En el sistema terrestre, los bosques almacenan cerca del 80% de toda la biomasa en la Tierra, de la cual, el 50 al 65% del carbono orgánico terrestre y ocupan un tercio de la superficie vegetal terrestre (Reichstein y Carvalhais, 2019).

La madera es un material poroso con una compleja estructura celular, químicamente está compuesta por tres grupos macromoléculas: celulosa, poliosas (hemicelulosas) y lignina. La disposición en la pared celular que está compuesto por las microfibrillas de celulosa y que están en una envoltura de hemicelulosa que se incrustan a una matriz (Fuhr *et al* 2011; Orozco-Mosqueda *et al.*, 2015).

A escala macroscópica la madera es el producto del crecimiento secundario que se compone de anillos de crecimiento que corresponde al aumento anual del diámetro del tallo que se revela en los anillos de crecimiento y se conocen tres orientaciones de la madera que se indican como longitudinal (a lo largo del tronco), radial (desde la medula a la corteza) y tangencial (tangente a los anillos de crecimiento).

La madera es un tejido tridimensional complejo que se observa mejor en tres planos (Meylan y Butterfield, 1972). La sección transversal es perpendicular al eje longitudinal del tallo, la radial o también llamada longitudinal, es la superficie expuesta por una sección radial paralela al eje longitudinal y atraviesa el centro del vástago. La sección tangencial también es paralela al eje longitudinal, este plano permite visualizar los extremos de los rayos a media que va del centro al exterior. (Crang *et al.*, 2018).

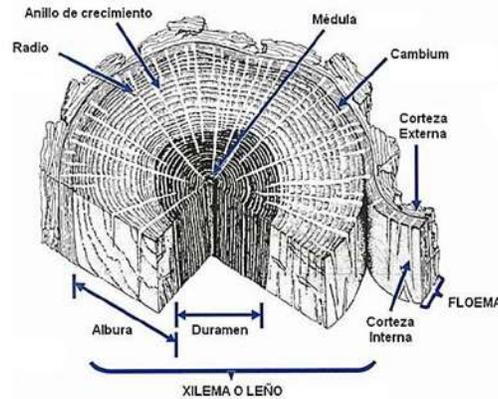


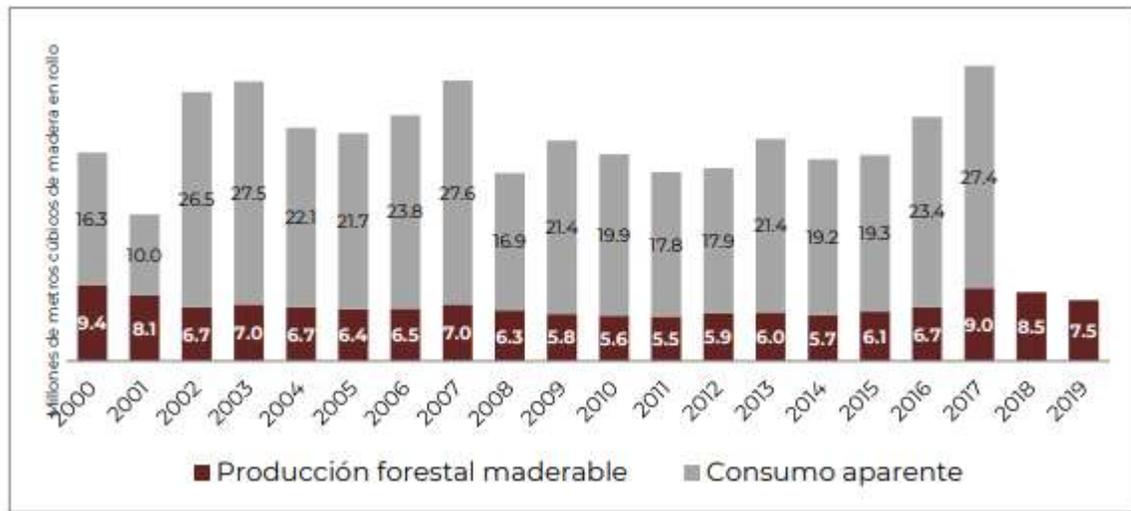
Ilustración 1. Anatomía macroscópica de la madera.

III.II. El uso de la madera

Los seres humanos utilizan la madera desde hace miles de años y en miles de aplicaciones ya que sostiene un rol crucial en sus ecosistemas que sostienen una multitud de especies, esto se debe a su posición en la base de pirámide trófica (Beech *et al.* 2017). La madera proporciona refugio, herramientas, muebles, calefacción, aditivos alimentarios y medicinas solo por nombrar algunas de sus muchas aplicaciones, así como los componentes importantes que aportan al ecosistema se pueden fabricar varios productos de papel a partir de fibras de madera. Los productos de papel liso y suave como servilletas, papel tisú y toallas absorbentes se producen típicamente a partir de árboles de madera dura descortezada son parte del patrimonio forestal mundial (FAO 2010; Beech *et al.*, 2017 Crang, 2018;). Tradicionalmente, la madera se utiliza para fabricación de instrumentos musicales (Schwarze *et al.*, 2008)

III.III. El aprovechamiento de los recursos maderables en México

En el periodo del 2013 al 2018, en promedio el valor de la producción forestal y no maderable alcanzó un valor de \$ 40 568 millones de pesos y contribuyó al 0.24% del PIB nacional. Sin embargo, los niveles de producción se mantienen muy por debajo del potencial de aprovechamiento, transformación y comercialización existente (SEMARNAT, 2021).



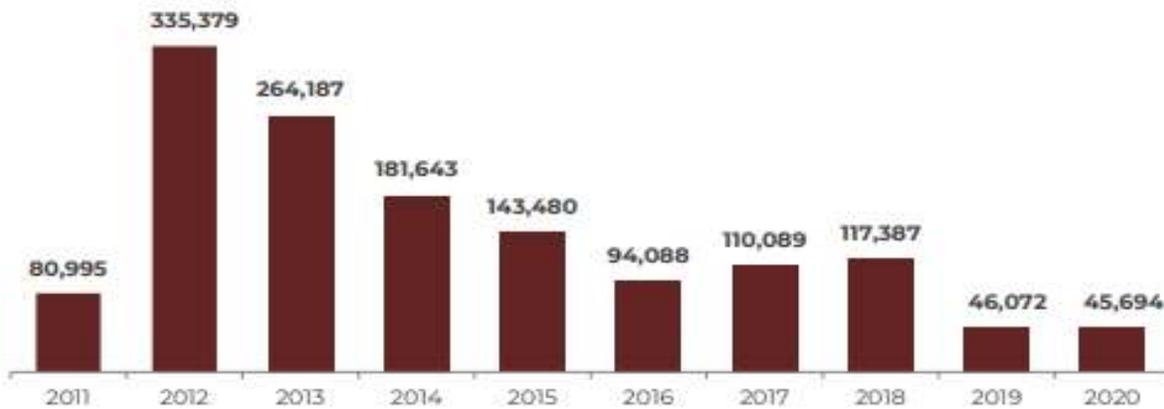
Gráfica 1 Producción de la madera en México en el periodo 2000 al 2019. SEMARNAT 2020 (SEMARNAT, 2021)

III.IV. Déficit de la producción de la madera

Entre los años 2000 y 2014, la producción forestal maderable presentó una tendencia a la baja. La producción se disminuyó año con año, de 8.1 millones de m³ en el (CONAFORT, 2021). La frecuencia, extensión e intensidad de las perturbaciones que resultan de la silvicultura industrial difieren dramáticamente en la perturbación natural de los ecosistemas forestales negativamente para la biodiversidad y los servicios de los ecosistemas (Lindenmayer y Franklin 2002; Secretaría del Convenio Sobre la Diversidad Biológica 2010).

III.V. Pérdida de la madera por plagas y enfermedades

Las plagas son una de las principales causas de degradación y pérdida de los ecosistemas forestales en México. En los últimos diez años, la superficie con afectaciones de plagas y enfermedades alcanzó un promedio de 144 901 mil hectáreas, principalmente en los estados de Durango. Oaxaca. Chihuahua, Guerrero, Jalisco y Nuevo León (SEMARNAT, 2021).



Gráfica 2. Producción maderable del 2011 al 2020. (SEMARNAT , 2021)

III.VI. Perdidas de la madera por hongos

El reino *Fungi* está representado por un diverso grupo de organismos que abarca entre 1.5 y 5 millones de especies entre las cuales se encuentran hongos filamentosos patógenos para plantas. Una gran cantidad de hongos son saprofitos, lo que les facilita la degradación de la materia orgánica y permite el reciclaje de nutrientes esencia para el desarrollo y el crecimiento de otros seres vivo. (Orozco-Mosquea *et al* 2015). La mayoría de los hongos obtienen los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo por absorción, liberan exoenzimas al medio para degradación de compuestos, intervienen directamente en los ciclos biogeoquímicos, el reciclaje de nutrientes y descomposición de la materia vegetal (Cepero *et al.*, 2012).

III.VII. Los hongos cromógenos que afectan la madera

Los hongos cromógenos producen pigmentaciones de la madera en color azul, azul-verdoso, gris o negro en la madera en rollo o madera acerrada con un porcentaje de humedad de 18%. La pigmentación de la madera la causan entre 100 a 250 hongos pertenecientes a los ascomicetos. Los hongos que se identifican con frecuencia en la pigmentación de la madera pertenecen a tres grupos de hongos cromógenos *Ceratocystis*, *Ophiostoma* y *Ceratocystiopsis*. También otros microorganismos como las lavaduras negras *Hormonema*



dematiodes, *Aureobasidium pullulans* y especies de *Phiolophora*, mohos oscuros como *Alternaria Alternata*, *Cladosporium* (Schmidt *et al.*, 2017; SEMARNAT, 2011).

Las hifas penetran en la madera del tallo desde las secciones transversales o radialmente a través de las fisuras de la corteza y se mueven a través de los rayos medulares. Los nutrientes de fácil acceso (azúcares, carbohidratos, almidón, proteínas, grasas, extractos) se absorben de las células del parénquima radial. Se han detectado xilanasa, mananasa, pectinasa y amilasa en varios hongos cromógenos (Schirp *et al.*, 2003).

Los hongos cromógenos y los mohos utilizan las reservas de los nutrientes de la madera, por ejemplo, en los radios y el parénquima axial, por lo general no causan deterioro significativo de la pared celular. La decoloración suele reflejarse en el color o pigmento de las hifas fúngicas mismas que producen la secreción de materiales extracelulares de color marrón debido a la melanina (Zink y Fengel, 1989). Algunas especies como *A. pullulans* desarrollan clamidosporas de paredes gruesas de color marrón oscuro. El color azul-negro de la madera se desarrolla como efecto óptico debido a la refracción de la luz. La madera con elevado grado de afección sí puede reducir su resistencia mecánica a tracción (tensión), compresión, cortante y flexión. El descenso de resistencia a tracción puede disminuir hasta 16%, el de compresión hasta el 25% y el de flexión hasta 17%.

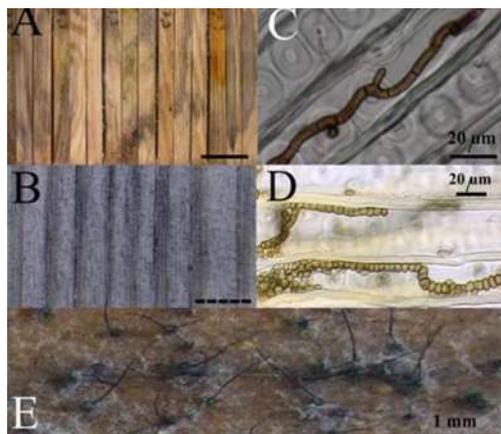


Ilustración 2. Hongos que pigmentan la madera de azulado en madera. Azulado artificial de tablas de pino de *Phoma exigua*. **B** Detalle. **C** Hifas gruesas y marrones de *P. exigua*. **D** Clamidosporas (foto G. Koch). **E** Perithecia (A, B, C, E de Schmidt y Huckfeldt 2005).



III.VIII. Control Químico y sus desventajas

En la protección de la madera se usan compuestos químicos que estas compuestas de boro y arsénico que se fijan a la madera y son efectivas para la protección de la madera (CONAFOR, 2010)

Los fungicidas inhiben o reducen el desarrollo a través de la actividad directa biológica que bloquea el desarrollo de funciones esenciales sobre del patógeno *in vitro* con actividad fungicida o fungistática y se aplican para prevenir la infección, solo una cantidad reducida de los fungicidas tiene actividad curativa y se dirigen específicamente a uno o múltiples sitios de acción (Temperli *et al.*, 1991).

Las infecciones por un patógeno en los tejidos de las plantas sin una interacción directa con el patógeno, otra es la interacción por competencia por espacio o nutrientes. Los agentes de control biológico interactuaran con el ambientes, huésped y patógeno.

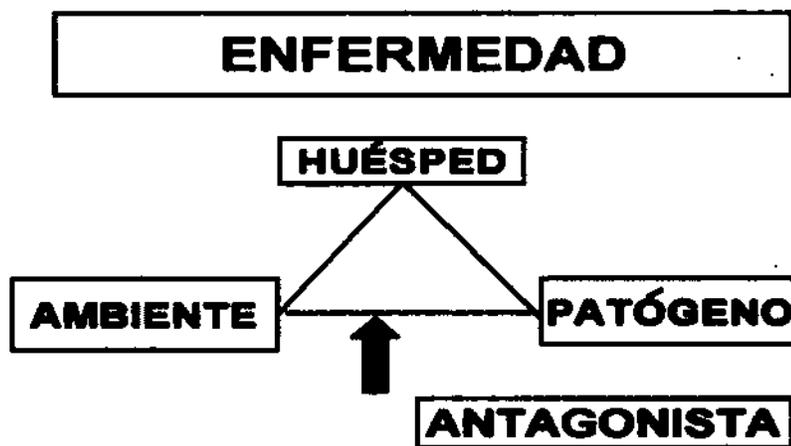


Figura 3. Interacción de los agentes que conforman el control biológico (Jacas *et al.*, 2005).

III.IX. Antibiosis

La antibiosis se considera un proceso biológico mediante el cual los antagonistas producen sustancias que inhiben o mata a los patógenos (Di Francesco *et al.*, 2016). Los metabolitos antimicrobianos son metabolitos secundarios de que pertenecen a grupos heterogéneos de compuestos orgánicos de bajo peso molecular que son productos metabólicos de microorganismos que son perjudiciales para otros microorganismos. Los



metabolitos secundarios a menudo se consideran como el modo de acción más potente de los microorganismos contra los competidores, lo que permite a los microorganismos productores de antibióticos ventajas competitivas en entornos con recursos limitados (Raaijmakers y Mazzola, 2012; Köhl *et al.*, 2015).

III.X. Metabolómica

Es una ciencia que ayuda a entender las interacciones entre el genoma de la célula y sus estímulos ambientales el reflejo del metaboloma que ayuda a analizar los metabolitos de bajo peso molecular, esto permite explorar las conexiones entre el metabolismo central y las vías metabólicas. La metabolómica especializada es una herramienta para descifrar los mecanismos reguladores de la biosíntesis (Richard-Forget *et al.*, 2021).

III.XI. Uso de microorganismos como agentes de control biológico

El uso del control biológico para la protección de la madera se emplea desde la década de 1960 (Sajitha *et al.*, 2018). Desde el origen de los hongos, se estima que hace entre 760 millones y 106 millones de años los hongos y las bacterias interactúan entre sí y han colonizado casi todos los nichos que se han explorado en la tierra, se incluyen los ambientes con pocos nutrientes. Aunque estos dos grupos microbianos interactúan en la naturaleza y forman consorcios microbianos por separado. Está bien aceptado que las interacciones entre hongos y bacterias tienen funciones esenciales en el funcionamiento del ecosistema, la salud (Schmidt *et al.*, 2017).

III.XII. Control biológico con bacterias

Las bacterias se usan con éxito como antagonistas biológicos y tienen efectos positivos en las plantas como promotoras de crecimiento. Desde 1990, los antagonistas bacterianos de *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. se aislaron de numerosos lugares que incluían, plantas, suelo y complementos del suelo, tales como abonos y composta (Kurniawan *et al.*, 2018). Las bacterias del suelo que tienen un efecto benéfico sobre la salud de las plantas se denominan



comúnmente rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) son útiles como agentes de control biológico al sintetizar y liberar diferentes compuestos antimicrobianos metabólicos tales como la surfactina, fengycin, ácido cianhídrico, pirrolnitrina, dimetilhexadecilamina, fenazinas y otros (García-Ortiz *et al.*, 2019).

III.XIII. Características para el desarrollo de antagonistas

- Genética estable
- Eficaz a bajas concentraciones
- No exigente en sus requerimientos nutrimentales
- Capacidad de sobrevivir a condiciones ambientales adversas
- Económico en la producción en medios de crecimiento económicos
- Formulación estable para una larga vida útil
- Fácil aplicación
- Resistente a los productos químicos que se utilizan en el ambiente de cosecha
- Compatible con procedimientos de procesos comerciales
- No es perjudicial para la salud humana (Droby *et al.*, 2009)

III.XIX. Ventajas del control biológico

- Modesto o sin ningún efecto colateral
- Raros de resistencia
- Eliminar por completo o sustancialmente el uso de químicos
- Relación beneficio/costo favorable
- Evita plagas secundarias
- Uso integrado del manejo de plagas

III.XV. Desventajas del control biológico

- Ignorancia sobre los principios del método
- Reducido apoyo económico



- Escaso personal especializado
- Poca disponibilidad
- Problemas de uso con umbrales económicos bajos
- Dificultada para aplicarlo en complejos de plagas
- Los agentes de control biológico son susceptibles a los plaguicidas
- Los enemigos naturales se incrementan con retraso en comparación a las plagas que atacan, por lo cual, no provee la supresión inmediata que se obtiene con los insecticidas
- Los resultados del control biológico no son tan eficaces en el corto plazo como los insecticidas y causan mermas (Summy y French, 1988; Tejada, 1981).



IV. Justificación

La presencia de hongos cromógenos que manchan la madera afecta la estética y causa rechazo en el consumidor. En la protección de la madera se utilizan compuestos químicos que afectan al ambiente, la salud y generan resistencia en los microorganismos. La búsqueda de una alternativa con compuestos antifúngicos del metaboloma de aislados microbianos es una opción para la preservación de la madera de *Pinus* sp. y *Cupressus* sp.



V. Hipótesis

El metaboloma de los aislados microbianos tiene efecto antifúngico para controlar los hongos cromógenos en madera de *Pinus* sp. y *Cupressus* sp.



VI. Objetivo general

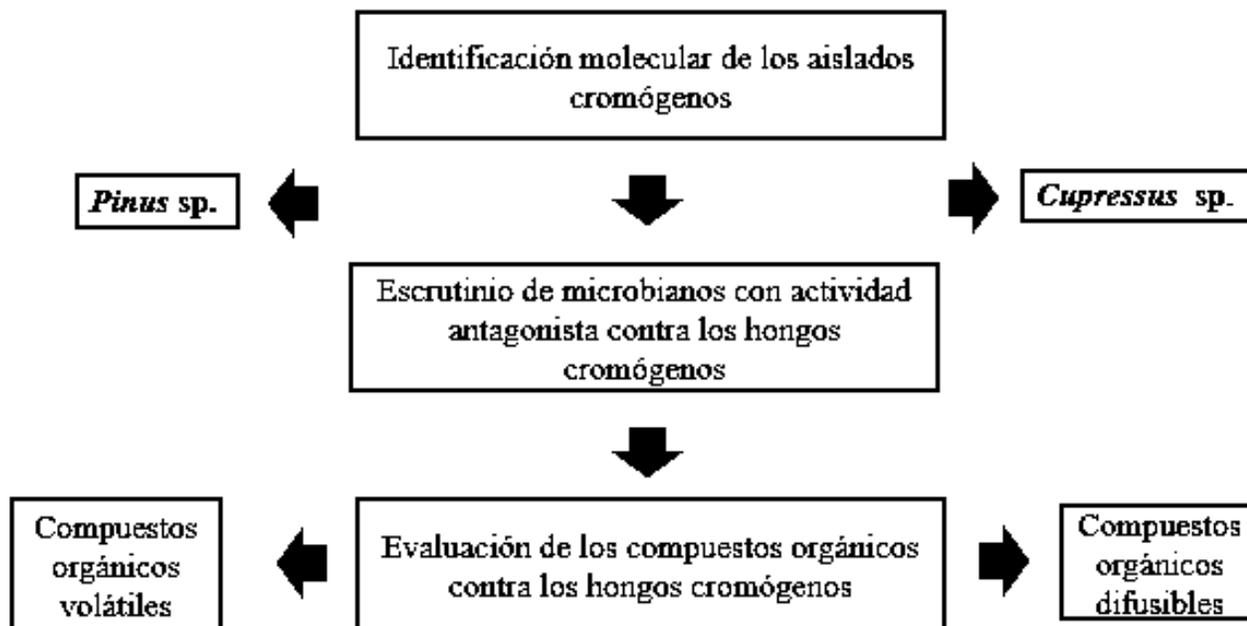
Seleccionar microorganismos con actividad antifúngica contra los hongos cromógenos en madera de *Pinus* sp. y *Cupressus* sp.

V.I. Objetivos Particulares

- 1) Identificación molecular de los aislados cromógenos
- 2) Escrutinio de aislados microbianos con actividad antifúngica contra los hongos cromógenos
- 3) Evaluar el metaboloma de los aislados con actividad antifúngica frente a los hongos cromógenos



VII. Estrategia experimental





VIII. Materiales y métodos

VIII.I Hongos cromógenos de la madera

Las cepas de los hongos cromógenos se obtuvieron del Laboratorio de Fisiología Celular del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas (IIQB) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Los hongos se aislaron de madera de pino con presencia de mancha y se aislaron por Martínez Pacheco *et al.*, 2022. Por métodos moleculares se identificaron hasta especie y se realizaron los árboles filogenéticos. El medio de cultivo agar dextrosa Sabouraud (Bioxon®) se utilizó para la propagación de los aislados fúngicos, por ello, se pesaron 39 g, después se disolvieron en un volumen de 1 000 mL de agua tridestilada, se esterilizó a 121 °C por 15 min en una autoclave ECOSHEL modelo CVQ-B50L y se vació en cajas de Petri de 90 x 15 mm se dejaron solidificar en campana de flujo laminar. Las cajas de Petri con el medio gelificado se inocularon con un propágulo que se cortó con una pipeta Pasteur de cinco milímetros de cada aislados fúngicos. Esto se realizó para cada aislado y se incubaron a 25 °C por 15 d y se reservaron hasta su uso.

Tabla 1 Hongos cromógenos aislados de la madera *Pinus* sp. por Martínez Pacheco *et al.*, 2022

Número de control	Especie
1.- E - 1	<i>Hypocrea</i> sp.
2.- E - 1 α	<i>Fusarium</i> sp.
3.- E - 1	<i>Alternaria</i> sp.
E - 2	<i>Trichoderma</i> sp.
E - 4	<i>Hypocrea</i> sp.
E - 5	<i>Geosmithia</i> sp.

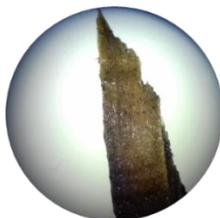


Ilustración 4. Probeta con hongos cromógenos aislados por Martínez Pacheco *et al.*, 2022.



VIII.II. Recolección de muestras de madera con presencia de pigmentación en madera de *Cupressus* sp.

La muestra de los hongos cromógenos de la madera *Cupressus* sp. se recolectó de la Universidad Michoacana de San Nicolás (UMSNH) de un árbol que presentó enfermedad con presencias de pigmento. Las astillas de madera se tomaron con unas pinzas y un bisturí. Las muestras se almacenaron en cajas de Petri con medio sólido DS (Bioxon®). Las cajas con las astillas de madera de *Cupressus* sp. se incubaron a 25 °C por siete días, después con una aguja de una jeringa y con ayuda de un estereoscopio (Optika SZM-LED2) se tomó una hifa de diferentes colonias. Los hongos cromógenos se sembraron de manera continua hasta observar que la colonia tenía un misma textura, color y forma uniforme. Los aislados se resguardaron hasta su uso en refrigeración.

VIII.III. Morfología y crecimiento de los hongos cromógenos de la madera de *Pinus* sp.

Los hongos cromógenos se propagaron en los medios sólidos agar dextrosa Sabouraud (DS) y agar papa dextrosa (PDA) de la marca Bioxon®. Los medios de cultivo se prepararon en volúmenes de 300 mL de agua tridestilada y se agregó 19.4 y 11.70 g de respectivamente de los medios de cultivo. El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min a 1.5 atm de presión. En cajas de Petri de 90 x 15 mm con medio gelificado se inocularon con propágulos de cinco milímetros de diámetro que se cortaron con una pipeta Pasteur y se colocaron en el centro de la caja. Los hongos se incubaron a 25 °C hasta cumplir el criterio de crecimiento que fue 80 mm y se clasificaron en dos grupos: Rápido y lento. El crecimiento se reportó cada 24 h y se tomaron fotografías para determinar el crecimiento con el programa Photoshop adobe CC 2019.

VIII.IV. Descripción de la morfología macroscópica

La morfología se describió con los siguientes criterios; forma, color, consistencia y superficie para cada aislado cromógeno de madera de *Pinus* sp. Las cajas de Petri con los aislados fúngicos se evaluaron hasta que el hongo cubrió la superficie del medio de cultivo y se



tomaron fotografías con un teléfono celular Iphone X, después se describió la morfología de acuerdo a su textura, forma de la colonia y color.

VIII.V. Morfología microscópica de los aislados fúngicos de *Cupressus* sp.

La descripción macroscópica de los aislados fúngicos se utilizaron de los medios sólidos, para lo cual, se pesaron 19.40 g de agar DS y agar PDA 11.70 g y se agregó 300 mL de agua tridestilada y se esterilizó en la autoclave por 15 min a 121 °C por 1.4 atm. El medio de cultivo se vació en las cajas de Petri en una campana de flujo laminar y se dejaron solidificar. Para observar la morfología de los hongos se utilizó la técnica de microcultivo que consta de cortar un cuadro de agar de un centímetro con ayuda de un bisturí y se colocó sobre el medio de cultivo, después se inoculó con una porción de micelio los cuatro lados del cuadro de medio de cultivo con una aguja de jeringa y se colocó un cubreobjetos sobre el cuadro de agar. Los microcultivo se incubaron por tres días a 25 °C y se observaron en el microscopio (Cxl Led Labomed) con el programa Optika Vison Lite 2.1 y se tomaron fotos con la cámara Optika a 40 X en medio de cultivo PDA y DS. La morfología se describió para cada aislados fúngico de *Cupressus* sp.

VIII.VI. Descripción morfológica macroscópica de los microorganismos aislados de *Cupressus* sp.

El medio de cultivo Agar dextrosa Sabouraud (DS) sólido se pesaron 19.40 g y de Agar Papa dextrosa (PDA), 11.70 g (Bioxon®). Los medios se agregaron 300 mL de agua tridestilada y se fundieron con un mechero de bunsen. Los matraces Erlenmeyer que contiene el medio de cultivo se esterilizó en la autoclave por 15 min a 121 °C por 1.5 atm depresión. El medio de cultivo se vació en la caja de Petri en campana de flujo laminar y se dejaron solidificar, después se inocularon las cajas de Petri con propágulo de los aislados que se cortaron con el reverso de una pipeta Pasteur. Los hongos cromógenos en cajas de Petri se incubaron hasta cubrir la caja de Petri a 25 °C. La morfología de los aislados se describió de acuerdo con la textura, color, forma de la colonia, presencia del micelio. La descripción morfológica se realizó para cada aislado fúngico. El reporte fotográfico se llevó a cabo con un teléfono celular Iphone X.



VIII.VIII. Aislados fúngicos candidatos a posibles Agentes de Control Biológico (ACB)

Los hongos que se ensayarán como posibles agentes antagonísticos son aislados de un ambiente perturbado en condiciones extremas para la vida. Los hongos fueron aislados de productos hortícolas y frutícolas por lo que resulta de interés en la investigación ya que están dotados por un organismo para sobrevivir a condiciones tóxicas.

Un grupo de 35 aislados fúngicos que proporcionó el Laboratorio de Fisiología celular del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas (IIQB) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Los aislados fúngicos se sembraron en agar papa dextrosa (PDA), Los aislados fúngicos se inocularon a 25 °C y se reservaron hasta su uso a temperatura ambiente.

Tabla 2 Aislados fúngicos que se usaron en el escrutinio como agentes antagonísticos

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo <i>acutatum</i>	Grupo México	Grupo 4
1.- <i>Curvilaria</i> sp.	9.-H.H. <i>P</i> <i>superior</i>	17.- <i>Diaporthe</i> p. 5185	22.-C. <i>acutatum</i> 5446	26.- <i>Fusarium</i> (FUSAC0901)	34.- <i>Rhizopus</i> sp.
2.- <i>Fusarium</i> sp.	10.- <i>Marcelino</i> <i>Córtez</i>	18.- <i>Diaporthe</i> p. 4461	23.-C. <i>acutatum</i> 10	27.- <i>Fusarium</i> (FUSAC0902)	35.- <i>Colletotrichum</i> sp.
3.- <i>Trichoderma</i> sp.	11.- <i>Roña de</i> <i>Aguacate</i>	19.- <i>Oligoporus</i> sp.	24.-C. <i>Acutatum</i> 21	28. <i>Rhizoctonia</i> (RIZOC0901)	36.- <i>Fusarium</i> sp
4.- <i>Pestalotia</i> sp.	12.- <i>Roña de</i> aguacate	20.- Phomopsis v. 5120	25.-C. <i>Acutatum</i> 25	29.- <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i>	37.- <i>Epicoccumstomat</i> <i>icum nigrum</i>



5.- <i>Alternaria</i> sp.	13.- <i>Epicoccum</i> <i>sorghinum</i>	21.- <i>Phomopsis</i> v. 5480		30.- <i>Fusarium</i> <i>solani</i>	
6.- <i>Colletotrichu</i> <i>m</i> sp.	14.- <i>Fusarium</i> sp.			31.- <i>Rhizoctonia</i> <i>solani</i>	
7.- <i>Phoma</i> sp.	15.-Raíz de <i>Macadamia</i>			32.- <i>Rhizoctonia</i> <i>binucleada</i>	
8.- <i>Fusarium</i> sp.					

VIII.IX Posibles Agentes bacterianos con actividad antifúngica

Una colección de 19 bacterias que se aislaron de la rizosfera de una planta del semi desierto de Durango que proporcionó el laboratorio de Fisiología celular del Instituto de Investigaciones Químico – biológicas (IIQB) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Las bacterias se sembraron en agar Müller Hinton (MH) se pesó 11.4 gr del medio cultivo y se disolvió en 300 mL de agua. El medio de cultivo se esterilizó y vació en la caja de Petri. La bacteria se resembró en el medio de cultivo MH con un asa bacteriológica y se incubaron por dos días a 35 °C. Las bacterias se reservaron hasta su uso en refrigeración.

Tabla 3. Lista de aislados bacterianos que se utilizaron para la selección de microorganismos.

Bacterias	
B - 1	B – 11
B – 2	B – 12
B – 3	B – 13
B – 4	B – 14
B – 5	B – 15



B – 6 B – 16
B – 7 B – 17
B - 8 B - 19
B – 9 B – 20
B – 10

VIII.X. Selección de aislados fúngicos con actividad antifúngica contra los hongos cromógenos

En cajas de Petri de 90 x 15 mm con nueve mililitros de agar Dextrosa Sabouraud por caja se inocularán con los cromógenos uno a uno en cajas de Petri y se enfrentaron a cinco diferentes aislados microbianos donde en el caso de los hongos se inoculará un propágulo de cinco milímetros. Para el escrutinio con las bacterias se realizó una línea de un centímetro y se colocaron a una distancia de un centímetro de los hongos de forma equidistante se colocaron a dos centímetros.

Los tratamientos se mantendrán a 25 °C por siete días y se determinará el antagonismo. Las cajas se incubaron en una cámara de incubación con las siguientes condiciones: 20 °C con una humedad relativa de 90%. El antagonismo se determinó por la fórmula del porcentaje de inhibición de los aislados frente a los hongos cromógenos y se comparó el crecimiento de los hongos cromógenos y determinó el porcentaje de inhibición de los hongos. Los criterios para la selección de los hongos son: que tuvieran un crecimiento rápido, el requerimiento nutritivo fuera económico, esporulación y que tuvieran actividad antagonista sobre dos aislados fúngicos.



Ilustración 5. Selección de aislados microbianos con actividad antifúngica contra los hongos cromógenos en madera de *Pinus* sp. **a)** Selección aislados fúngicos **b)** Selección de aislados bacterianos.

IX. Resultados

IX.I. Curso temporal del crecimiento de los hongos cromógenos de madera *Pinus* sp.

Los hongos cromógenos se propagaron en medio Dextrosa Sabouraud y se clasificaron en dos grupos de acuerdo con su crecimiento; En la siguiente **Tabla 1** se muestra las mediciones de los aislados fúngicos de crecimiento rápido (hasta cinco días) y en la **Tabla 2**. los hongos cromógenos de crecimiento lento (más de diez días).

Tabla 4. Aislados cromógenos fúngicos de la madera *Pinus* sp. crecimiento rápido

Tiempo (d)	Diámetro de crecimiento (mm)		
	<i>Hypocrea</i> sp. (E-1)	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Hypocrea</i> sp (E - 4)
1	15 ± 0.8	14 ± 0.5	15 ± 0
2	37 ± 0.5	36 ± 0	38 ± 0.5
3	61 ± 1.1	61 ± 0	66 ± 0
4	71 ± 0.5	76 ± 1.7	80 ± 0
5	80 ± 0	80 ± 0	



Tabla 5. Aislados cromógenos fúngicos de la madera *Pinus* sp. de crecimiento lento.

Diámetro de crecimiento (mm)			
Tiempo (d)	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Geosmithia</i> sp.
6	48 ± 1.1	48 ± 0.5	26 ± 0.5
7	54 ± 0.5	52 ± 0.5	29 ± 0.5
8	60 ± 1.5	56 ± 1	31 ± 1.1
9	66 ± 1.1	61 ± 0.5	35 ± 0.5
10	71 ± 0.5	67 ± 0.5	40 ± 1

Los datos son promedio de dos repeticiones con una n = 3, ± DE.

Donde, los hongos; *Hypocrea* sp. (E – 1), *Trichoderma* sp. crecieron 80 mm en menos de cinco días y *Hypocrea* sp. (E – 4) creció 80 mm a los cuatro días. Los hongos que tardaron más de seis días se clasificaron de lento crecimiento como: *Alternaria* sp. creció 67 mm. Los aislados *Fusarium* sp. y *Geosmithia* sp. crecieron 71 mm y 40 mm en diez días, respectivamente.

IX. II Descripción morfológica de los hongos cromógenos de madera de *Pinus* sp.

La descripción de la morfología de los aislados incluye su forma, superficie, consistencia y color, en el medio agar papa dextrosa (PDA) y Dextrosa Sabouraud (DS).

En medio DS, *Alternaria* sp. presentó micelio aéreo algodonoso, forma circular y de color café en el centro, en PDA presentó una morfología circular, algodonoso y color blanco. La cepa *Fusarium* sp. en PDA una colonia circular con una superficie suave sin presencia de micelio aéreo y en el anverso de la caja tiene una pigmentación de color rosa y en el medio DS tiene una colonia irregular con presencia de micelio aéreo de color blanco. El aislado *Geosmithia* sp. presentó una forma irregular en los bordes de la colonia en el medio DS con presencia de micelio aéreo blanco algodonoso de color blanco con algunos pigmentos de



color amarillo claro, en medio PDA tuvo una forma circular con presencia de micelio aéreo de color blanco en el centro y de bordes cafés y exudado de color amarillo en el centro.

El aislado *Trichoderma* sp. en PDA presentó micelio vegetal de color blanco en el centro. El micelio aéreo es escaso, de textura dura, en forma de esferas y de color a amarillo y verde en el medio PDA, tuvo un crecimiento similar en el medio DS, se observó que las cepas tuvieron crecimiento de hifas hialinas, micelio vegetativo y aéreo hialino algodonoso, la forma circular y la presencia de micelio aéreo fue escaso.

Tabla 6. Descripción macroscópica de los hogos cromógenos de la madera de *Pinus* sp.

	<i>Hypocrea</i> sp. (E-1)	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Hypocrea</i> sp. (E - 4)	<i>Geosmithia</i> sp.
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Irregular
Superficie	Algodonosa	Aterciopelada	Aterciopelada	Algodonosa	Algodonosa	Aterciopelada
Consistencia	Dura	Suave	Suave	Filamentosa	Suave	Suave
Color	Blanco	Blanco/Rosa	Gris/Café PDA	Blanco DS	Blanco	Blanco

Hypocrea sp.
(E-1)

Fusarium
sp.



Geosmithia sp.
Hypocrea sp. (E - 4)
Trichoderma sp.
Alternaria sp.



Ilustración 3. Morfología de los aislados de la mancha azul en agar DS y PDA; **a)** *Hypocrea* sp. (E - 1) **b)** *Fusarium* sp., **c)** *Alternaria* sp., **d)** *Trichoderma* sp., **e)** *Hypocrea* sp. (E - 4), **f)** *Geosmithia* sp.

IX. IV. Morfología macroscópica de los aislados fúngicos de *Cupressus* sp.

Los hongos cromógenos para la madera *Cupressus* sp. en los medios de cultivo de PDA y DS tuvieron diferencia textura y color. En la **ilustración 2** se observa la morfología macroscópica de los aislados. En la aislado - 1 en el medio PDA tiene una colonia circular



sin presencia de micelio aéreo y en el centro se observó una pigmentación de color blanco y en la periferia de color café, de textura dura y sin micelio aéreo, en el medio DS tiene una morfología circular irregular de textura dura y de color blanco sin micelio aéreo.

La aislado - 2 se observa la formación de una colonia irregular que cubrió la caja y presentó de micelio blanco grisáceo. La aislado - 3 tiene un crecimiento colonia circular y forma micelio de color amarillo que se acentúa con el paso del tiempo. La aislado - 4 en medio PDA presenta una colonia circular de micelio vegetal de color café en el centro y color blanco en las orillas sin presencia de micelio aéreo. En DS la cepa - 4 tiene una colonia circular de color blanco, en la orilla micelio vegetal hialina. La aislado - 5 en PDA tiene micelio vegetal circular hialino en las orillas y en el centro de color gris. En DS tiene una colonia circular con textura aterciopelada con presencia de micelio aéreo y color gris claro.

La aislado - 6 en PDA tiene una colonia de forma irregular de con presencia de micelio vegetal rugoso, color café y blanco sin presencia de micelio aéreo, En medio DS la colonia es irregular de color café con presencia de micelio aéreo de color blanco. La aislado - 7 en PDA tiene un morfológica circular con presencia de color blanco y micelio aéreo hialino. El hongo 7 en DS tiene una morfología circular, suave y sin presencia de micelio aéreo de color café y en las orillas de color blanco.

La aislado - 8 en medio PDA tiene una morfología de color hialino en los primeros días de crecimiento después de siete días el hongo cambió de color a negro con presencia de micelio aéreo esponjoso. En el medio DS tuvo un crecimiento de color café y con micelio aéreo esponjosos con diferentes tonos desde café oscuro a color claro. La aislado - 9 en medio PDA tuvo micelio de color verde y amarillo sin presencia de micelio vegetal y aéreo. En medio DS se observó que la aislado 9 tiene micelio vegetal hialino y micelio de color blanco.



Cepa 1 Cepa 2 Cepa 3 Cepa 4 Cepa 5 Cepa 6 Cepa 7 Cepa 8 Cepa 9





Ilustración 13. Morfología macroscópica de los hongos de la mancha *Cupressus* sp. en la primera columna se muestran el medio PDA y en la segunda DS.

IX.V. Descripción microscópica de la morfología de los hongos cromógenos de la madera de *Cupressus* sp.

Los aislados fúngico se observaron en el microscopio. El aislados 1 y 6 tienen hifas delgadas tiene presencia de hifas septadas, hialinas y se observan la formación de desarrollo blástico donde se encuentran los ápices que inician la formación de cadena en forma de cadena donde se encuentran a los conidios de forma circular. El aislado - 2 presenta hifas hialinas septadas, ramificadas con presencia de ascos donde se encuentran las ascosporas. La cepa - 3 tiene hifas septadas, ramificadas en forma de candelabro y presencia de basidios con esporas ovoides alargadas hacia un polo del conidio y tiene una formación del conidióforo en forma de cadena.

Los aislados 4 y 5 tienen hifas septadas ramificada con presencias de vacuolas y la formación de una estructura de resistencia que está constituida de micelio joven y se observan hifas jóvenes sin septos y septadas, presenta formación de conidióforos con conidios en forma de cadena de forma esférica

El aislado 7 tiene hifas septadas delgadas con formación de conidios. Los aislados 2 y 8 tiene hifas septadas, delgada hialinas en los primeros días y después se observa la formación de estructuras reproductivas de forma circular.

El aislado 9 hifas son delgadas, no presenta septos, se observó formación de ascos irregulares.

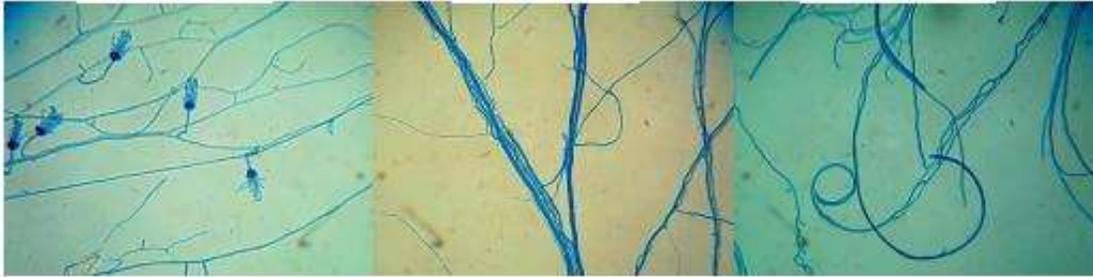


Medio agar Papa Dextrosa

Cepa 1

Cepa 2

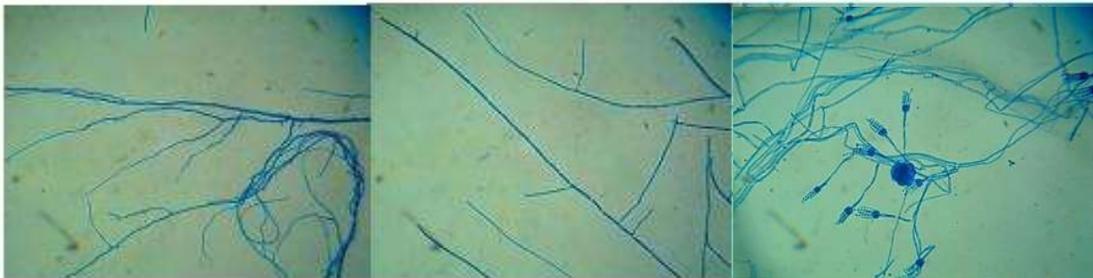
Cepa 3



Cepa 4

Cepa 5

Cepa 6



Cepa 7

Cepa 8

Cepa 9





XI.VI. Curso temporal del crecimiento de los hongos cromógenos de madera *Cupressus* sp.

Los hongos que se aislaron del árbol *Cupressus* sp. se clasificaron en dos grupos de acuerdo con su crecimiento Rápido que tardaron menos de cinco días y los de lento crecimiento que tardaron más de seis días de crecimiento.

En el grupo de rápido crecimiento agrupamos a los aislados C – 2, C – 3, C – 8 y *Trichoderma* sp. que tuvieron un crecimiento a los cinco días. Los de lento crecimiento donde, el aislados C - 4 creció un 50 mm. Las cepas *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. tuvieron crecimiento a diez días de 44.75 y 48. 5 mm y los aislados C - 4 y *Rhizopus* crecieron 40 y 40.5 mm de diámetro. En el medio PDA el crecimiento fue más lento y los aislados de rápido crecimiento no llenaron la caja. Apéndice (**Tabla número**).

Tabla 7. Hongos cromógenos Crecimiento rápido de la madera *Cupressus* sp. en medio DS.

Ilustración 14. Morfología microscópica de los hongos de la mancha de *Cupressus* sp. Los aislados fúngico se observaron a 40X en microscopio óptico.

Tiempo (d)	Diámetro de crecimiento (mm)			
	Cepa - 2	Cepa - 3	Cepa - 8	<i>Trichoderma</i>
1	17 ± 1.1	14 ± 0.5	15 ± 0	13.5 ± 1.0
2	42 ± 0.5	28.5 ± 1.75	30 ± 1.41	26.75 ± 0.5
3	68 ± 0.5	44.75 ± 0.5	49.25 ± 1.25	40.75 ± 0.5
4	71 ± 0.5	65 ± 0.5	68 ± 0.5	58 ± 0.25
5	80 ± 0	80 ± 0	80 ± 0.75	80 ± 0.25

Los datos son promedio de dos repeticiones con una n = 3, ± DE.



Tabla 8. Hongos cromógenos crecimiento lento de la madera *Cupressus* sp. en medio DS.

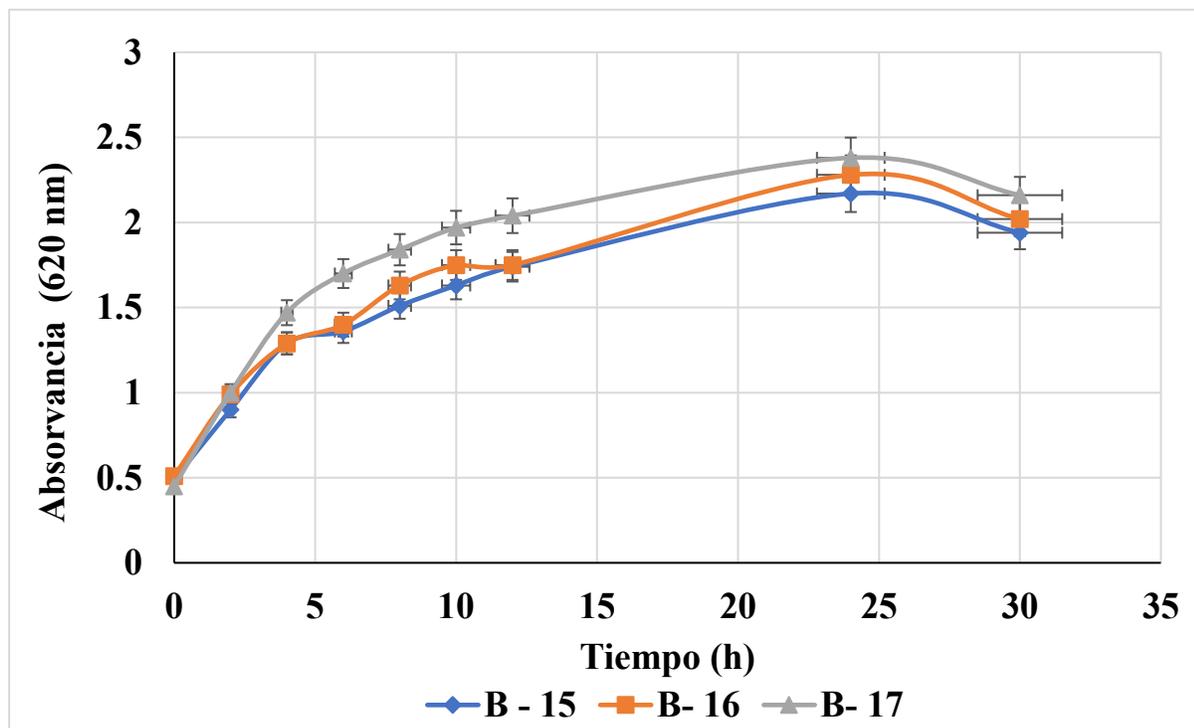
Tiempo (d)	Diámetro de crecimiento (mm)				
	<i>Aspergillus</i> sp.	cepa 4	cepa 5	<i>Penicillium</i> sp.	cepa 7
6	27.75 ± 0.5	16.75 ± 0.5	26 ± 0.5	29.75 ± 1.25	21.75 ± 0.95
7	33.75 ± 0.5	31.5 ± 1.0	29 ± 0.5	33 ± 1.82	28 ± 1.63
8	37.75 ± 0.5	36.5 ± 1.0	31 ± 1.1	37.5 ± 1.73	33 ± 3.16
9	41.75 ± 0.5	41.5 ± 1.0	35 ± 0.5	40.25 ± 17	37 ± 2.58
10	44.75 ± 0.5	50 ± 0	40 ± 1	48.5 ± 0.5	40.5 ± 2.38

Los datos son promedio de dos repeticiones con una n = 3, ± DE.

IX.VII. Crecimiento de los aislados bacterianos en medio liquido con efecto antifúngico contras los hongos cromógenos de *Pinus* sp.

Las bacterias se crecieron en el caldo de cultivo Müller Hinton. En los resultados se muestran tres bacterias representativas B - 15, B - 16 y B – 17. El crecimiento de la bacteria se reportó cada dos horas.

Donde, las bacterias se adaptaron al medio de cultivo con una concentración inicial de 0.5 de turbidez según la metodología. El crecimiento de las bacterias creció forma exponencial de las 4 a las 26 horas donde se observó un aumento logarítmico de la concentración de las bacterias (B – 15, B – 16 y B – 17). A las bacterias después de las 24 h de crecimiento hubo una disminución de la concentración por lo que indica que las bacterias comenzaron la fase de muerte.



Grafica 1. Crecimiento de las bacterias en medio liquido MH con actividad antifúngica contra los hongos cromógenos.

IX.VIII. Selección de los aislados microbianos con actividad antagonista contra hongos cromógenos de la madera *Pinus* sp.

Los hongos cromógenos de madera de *Pinus* sp. se enfrentaron a los aislados fúngicos que proporcionó el laboratorio de Fisiología celular donde se evaluaron hongos y aislados bacterianos como posibles candidatos con actividad antifúngica. Los aislados fúngicos con actividad antifúngica como (**Ilustración 4**) contra *Hypocrea* (E – 1) los aislados *Curvilaria* sp. y *Phoma* sp. El hongo *P. viticola* 5480 tuvo un efecto antagónico para el hongo *Fusarium* sp. se observó un halo de inhibición. El hongo cromógeno, *Trichoderma* sp. fue sensible a los hongos *P. viticola* 5480, *F. solani* y *R. solani*. los resultados del porcentaje de inhibición. El aislado fúngico *Hypocrea* (E- 4) fue sensible a al aislados fúngico *Epicoccum sorghinum*, al igual que el aislado *Geosmithia* sp. fue sensible a esté hongos donde el porcentaje de inhibición mostró una reducción de la colonia de los dos hongos cromógenos.



La cepa *Alternaria* sp. no fue sensible frente a los aislados fúngicos a los que se enfrentó. El hongo tuvo la capacidad de compartir el nicho biológico o degradar a los aislados como posibles ACB.

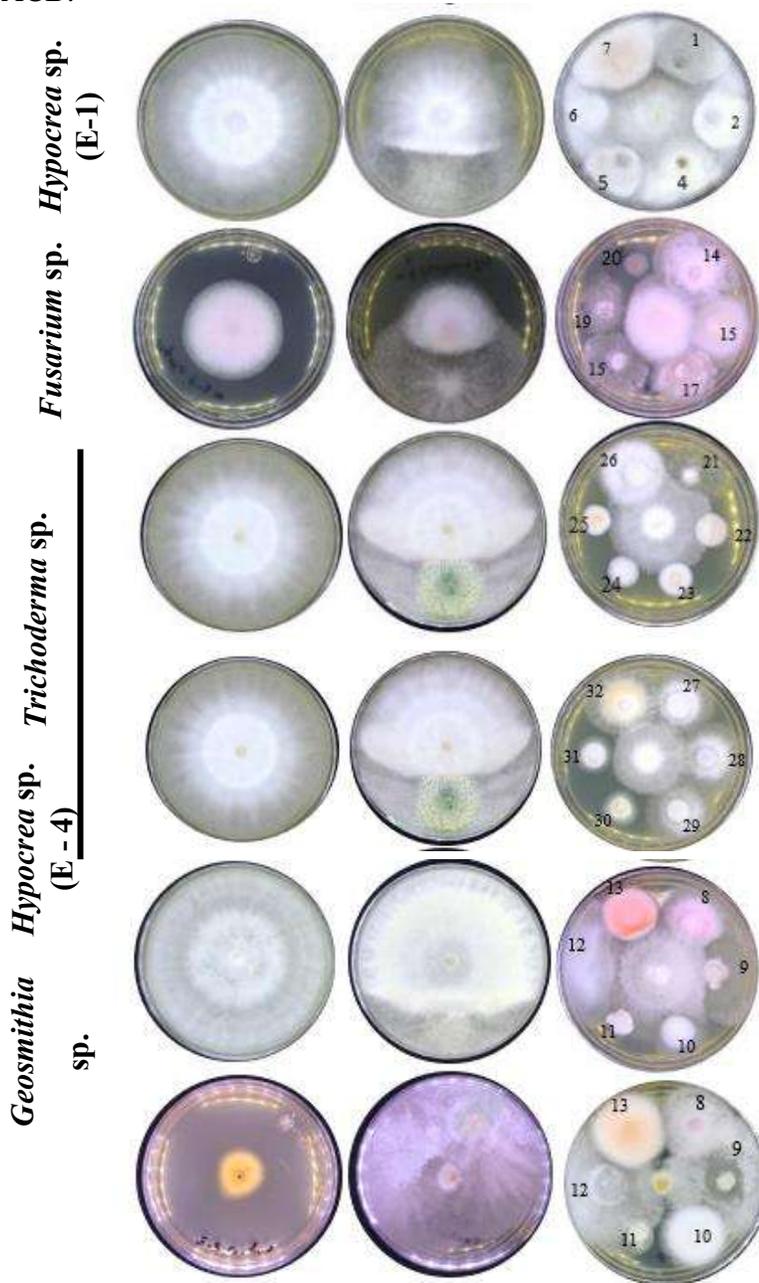


Ilustración 17. Selección de los aislados fúngicos con actividad antagonista contra los hongos cromógenos de *Pinus* spp. En la primera y columna se encuentra los controles, la segunda columna Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) rcerca

Ilustración 18. Selección de aislados antagonistas fúngicos para las cepas NMD: *Hypocrea* sp. (E - 1), *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Hypocrea* sp. (E - 4) y *Geosmithia* sp.



X. Discusión

Los hongos tienen una gran importancia en la industria alimentaria, la salud animal, humana y en la agricultura. Las infecciones causadas por dichos microorganismos pueden dañar varios cultivos agrícolas, forestales y madera procesada. Ellos se han convertido en una preocupación mundial para la salud pública debido al aumento de la resistencia microbiana a los fármacos antimicrobianos actuales. Por ello, nuevos o novedosos antifúngicos se buscan para establecerlos como alternativa para el control de hongos dañinos o inconvenientes.

En todos los ecosistemas, los organismos inevitablemente entran en contacto entre sí a medida que transcurre su ciclo biológico para establecerse en nichos específicos. Utilizan diferentes estrategias ecológicas y tienen diferentes atributos fisiológicos, lo que les permite competir contra otras especies en diferentes nichos nutricionalmente diversos. El resultado de tales interacciones y, por lo tanto, la estructura de la comunidad depende de factores como los patrones de utilización del carbono y los factores ambientales fluctuantes. La capacidad de crecer en un intervalo amplio de disponibilidad de agua le da una ventaja para dominar ciertos dominios ecológicos. La capacidad de producir metabolitos secundarios, volátiles o una batería de enzimas proporciona una ventaja competitiva a una especie de hongo específica para establecerse y mantener una ventaja competitiva. En este escenario de conflicto químico entre los integrantes de la comunidad microbiana es en el que buscamos antifúngicos para el control de los hongos pigmentados de la madera. El inicio es la obtención de microorganismos antagónicos candidatos para su control.

Para el control de otros microorganismos, en la investigación que realizó Maya-Alavez en 2020 donde seleccionó a *Fusarium* sp., *Pestalotia* sp., *D. phaseolorum* 5180 *P. Viticola* 4456 tuvieron efecto antifúngico contra *B. cinérea* que afecta cultivos hortícolas, frutícolas y plantas de interés económico. Los aislados fúngicos que se usaron se reportan como patógenos para algunos cultivos de interés económico, pero la capacidad de infección y la producción de metabolitos por la lucha biológica pueden tener capacidad de inhibición. Las 19 bacterias que se recolectaron de la rizosfera de la planta donde Hernández-izquierdo enfrentó a las bacterias contra hongos patógeno que causan la pudrición peduncular en el fruto de



aguacate. Los hongos que causan pigmentación en la madera con mayor incidencia son la especie *Ophistamoidea* se identifican más de 250 géneros en México, en el 2020. Reinoso-García aisló 6 hongos cromógenos que pigmentaron la madera de pino y con técnicas moleculares se identificaron; *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Geosmithia* sp., dos cepas *Hypocrea* sp., y *Trichoderma* sp. los cuales, son poco reportados en la literatura como hongos cromógenos, esto abre la posibilidad para la búsqueda de nuevos microorganismos como agentes causales de la pigmentación de la madera de *Pinus* sp. y *Cupressus* sp. En la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo se retiraron árboles con presencia de enfermedad, como la mancha azul en árboles de la especie sp. donde se aislaron astillas del árbol con presencia de enfermedad.

Entonces, un defecto estético de la madera de pino que provoca rechazo en el consumidor es la mancha de la madera (Sedliačiková, Moresová, Aláč, & Malá, 2021). Los agentes causales son consorcios de hongos en los que los miembros difieren debido al sitio de extracción de la madera, la historia de vida del árbol y la especie arbórea (Huang, Wang, Xu, Zhao y Wang, 2021). Los consorcios que causan manchas en la madera son moho en la madera (por ejemplo, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Trichoderma* sp.); Los hongos de descomposición colonizan la madera recién cortada y manchan los hongos (p. ej., *Alternaria* sp., *Botrydiplozia* sp. y *Fusarium* sp.). La presencia de estos microorganismos en la madera es por contaminación durante su procesamiento o que ya estén en la madera (endófitos del árbol) y se manifiesten al procesar la madera. En México, el procesamiento de la madera no controladas, lo frecuente es el secado al sol y es donde los microorganismos proliferan

En este trabajo se utilizaron hongos que pigmentan a la madera de la madera de pino (*Pinus* sp.) descritos por García-Reinoso y col (2022) y de ciprés (*Cupressus* sp.) aislados en esta investigación y buscamos antagonistas en un grupo de hongos y bacterias aisladas de la rizosfera de una planta del desierto, ambos grupos están en un cepario casero.

En la identificación molecular de los aislados de *Cupressus* sp. por el método de la polimerasa se identificaron a los hongos que se aislaron de este árbol, los cuales se les asigno los siguientes nombres.



XI. Conclusión

Los aislados fúngicos de *Pinus* sp., y *Cupressus* sp. son sensibles al metaboloma de los aislados microbianos.



X. Bibliografía

Bartnicki-Garcia, S. y Nickerson, W. J. (1962). *Nutrition, growth and morphogenesis of *Mucor rouxii**. Journal of bacteriology. Vol. 84, p, 841-858.

Cook, R. J. y Baker, K. F. (1983) *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. St. Paul, Minnesota. American Phytopathological Society. pp.

Crang R., Lyons-Sobaski S., Wise R. (2018) *Wood: Economics, Structure, and Composition*. In: Plant Anatomy. Springer, Cham.

[//doi.org/10.1007/978-3-319-77315-5_15](https://doi.org/10.1007/978-3-319-77315-5_15)

Daniel G. (2016). Fungal Degradation of Wood Cell Walls, Chapter 8 .Secondary Xylem Biology, Academic Press, Pages 131-167.g

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802185-9.00008-5>.

Droby S., Wisniewski M., Macarisin D., Wilson C, (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*. 52: 137-145

Hernández-Izquierdo, J (2021) Los microorganismos causantes de la pudrición peduncular del fruto de aguacate (*Persea americana* Mill)

Fuhr M.J., Schubert M., Schwarze F.W.M.R & Herrmann H.J. (2011) *Modelling the hyphal growth of the wood-decay fungus *Physisporinus vitreus**. Fungal Biology, Vol. 115, Issue 9, Pag 919-932.

Maya- Alavez. J (2020). Selección de aislados fúngicos con actividad anatgonista contra el fitopatógeno *B. cinera* .Tesis de licenciatura

Meylan y Butterfield 1972

H.B. Lee, A. Patriarca, N. Magan. (2015). *Alternaria* in food: ecophysiology, mycotoxin production and toxicology *Mycobiology*, 43 (2015), pp. 93-106

Orosco-Mosqueda M. del C., Valencia-Canteroa, E., López-Albarránb P, Martínez-Pacheco M. y Velázquez-Becerra C. (2015) *La bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 y*



diversas aminos inhiben el crecimiento in vitro de hongos destructores de madera.
REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA. Vol. 47, Número 3, Pp. 219-228

SEMARNAT. Manual para la protección contra el deterioro de la madera (2011). Cruz de León, J.

SEMARNAT. Anuarios Estadísticos Forestales. 2017

SEMARNAT 2021. Secretaria de medio ambiente y recursos naturales. Anuario estadístico de la producción forestal, 2018.

Schmidt R., Etalo DW., de Jager V., Gerards S., Zweers H., de Boer, W. (2016). *Commentary: Microbial Small Talk: Volatiles in Fungal–Bacterial Interactions.* Frontiers in Microbiology. Vol. 8. Pp. 1.

Solveig A., Seong H, K., Colette B. (2002). A molecular approach for early monitoring of decay basidiomycetes in wood chips, *FEMS Microbiology Letters* , volumen 211, número 1, , páginas 117–122

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11212.x>

Waewthongrak W., Pisuchpen S. & Leelasuphakul W. (2015). Effect of *Bacillus subtilis* and chitosan applications on green mold (*Penicillium digitatum* Sacc.) decay in citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology.* Vol 99. Pag 44-49

Kumar P., Dubey R.C. & Maheshwari D.K. (2012). *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research.* Volume 167. Pag 493-499.

Raaijmakers, J.M. y Mazzola, M. (2012). Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50, 403–424.

Schwarze F., Spycher M. y Fink S. (2008). Superior wood for violins – wood decay fungi as a substitute for cold climate. *New Phytologist foundation.* Volume 179, Issue 4 p. 1095-1104.

Schmidt, O. (2007). Indoor wood-decay basidiomycetes: damage, causal fungi, physiology, identification and characterization, prevention and control. *Mycol Progress* 6, 261–279.
<https://doi.org/10.1007/s11557-007-0534-0>



Summy, K. R., French, J. V (1988). Biological control of agricultural pest. Concepts every producer should understand, *J. Rio Grande valley Hort. Soc* 41: 119 - 133.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02524.x>

Reichstein, M., Carvalhais, N. Aspects of Forest Biomass in the Earth System: Its Role and Major Unknowns. *Surv Geophys* 40, 693–707 (2019).

<https://doi.org/10.1007/s10712-019-09551-x>

Hlaiem S., Yangui I., Gianni Della Rocca, Sara Barberini, Roberto Danti y Mohamed L. Ben Jamâa (2021) *Diplodia Species Causing Dieback on Pinus Pinea : Relationship between Disease Incidence, Dendrometric and Ecological Parameters*, *Journal of Sustainable Forestry*

DOI: 10.1080 /10549811.2021.1944879

A. Pascale, F. Vinale, G. Manganiello, M. Nigro, S. Lanzuise, M. Ruocco, R. Marra, N. Lombardi, S.L. Woo, M. Lorito (2017). *Trichoderma and its secondary metabolites improve yield and quality of grapes*, *Crop Protection. Volume 92, Pag. 176-181*

<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.11.010>.

Droby S., Wisniewski M., Macarisin D., Wilson C, (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*. 52: 137-145

Di Francesco Alessandra, Ugolini Luisa, Lazzeri Luca, Mari Marta(2015) Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. *Control biológico*. 81, pp. 8-14

Kurniawan O., Wilson K., Mohamed R. y Avis T.J. (2018). *Bacillus* and *Pseudomonas* sp. provide antifungal activity against gray mold and *Alternaria* rot on blueberry fruit. *Biological Control*, vol 126: 136 a 141

Temperli E., Roos Urs-P y R. H., Hans (1991). Germ tube growth and the microtubule cytoskeleton in *Phytophthora infestans*: Effects of antagonists of hyphal growth, microtubule inhibitors, and ionophores. *Mycological Research*. 95: 611-617



Tejada L. O. (1981). Apuntes del control biológico. ITESM. L. A Rodríguez del Bosque y R. Alatorre (eds), paginas 43- 46

Ozan, GN, Yılmaz, F., Çaplık, D. (2022). Primer informe de la muerte regresiva del pistacho y la enfermedad del cancro causada por *Paecilomyces maximus* en Turquía. *J Plant Pathol* 104, 1165.

<https://doi.org/10.1007/s42161-022-01142-x>

Nandika, D., Arinana, A., Salman, A. B. A., & Putri, J. Y. (2021). Morphological and molecular features of stain fungi infecting rubberwood (*Hevea brasiliensis*). *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(12).

Damm, U. ; Verkley, GJM ; Crous, PW ; Fourie, PH ; Haegi, A. ; Riccioni, L.

Fuente: *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* , volumen 20, junio de 2008, págs. 9-17(9)

Editorial: Centro de Biodiversidad Naturalis

DOI: <https://doi.org/10.3767/003158508X286842>