

11821
24



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**PRUEBAS DE PATOGENICIDAD Y DE SEGURIDAD DE *Alternaria tenuis*
Need., EN LIRIO ACUÁTICO (*Eichhornia crassipes* Mart.)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA AGRÍCOLA

PRESENTA:

MARIBEL REYES OSORNIO

**ASESOR: DR. JESÚS JAIME GUERRA SANTOS
COASESOR: BIÓL MARCOS ESPADAS RESENDIZ**

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX.

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACIÓN DISCONTINUA



SECRETARÍA NACIONAL
DE EDUCACIÓN
MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Pruebas de Patogenicidad y de Seguridad de Alternaria tenuis
Necel. en Lirio Acuático (Eichhornia crassipes Mart.)

que presenta la pasante: Maribel Reyes Osornio
con número de cuenta: 9756218-0 para obtener el título de:
Ingeniera Agrícola

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 13 de Mayo de 2003

PRESIDENTE	<u>M.en E. José L. Sánchez González</u>	
VOCAL	<u>Dr. Alejandro Espinosa Calderón</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. Jesús Jaime Guerra Santos</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>M.en C. Margarita Tadeo Robledo</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Ing. Gustavo Mercado Mancera</u>	

RECONOCIMIENTOS

Al M.C. Jorge Valdez Carrasco por su apoyo en el manejo de los programas PHOTOSHOP 6. e IMAGE TOLL, ya que sin su orientación no hubiera sido posible concluir una de las partes más importantes contenidas en el siguiente trabajo para la elaboración de los diagramas de severidad.

Al Dr. Arturo Aguirre Gómez por haber tenido interés en mi trabajo.

Al Biólogo Marcos Espadas Reséndiz, Al Dr. Jesús Jaime Guerra Santos, Al Dr. Alejandro Espinosa Calderón, A la M. en C. Margarita Tadeo Robledo, Al Ing. Gustavo Mercado Mancera y Al M en E. José Leonides Sánchez González por su apoyo y esfuerzo en la revisión de este trabajo, que hicieron posible.

A todos los profesores que intervinieron en mi formación académica.

AGRADECIMIENTOS

A mi Papa Maurilio Reyes Valdez por su confianza, apoyo y cariño, sé que siempre podré contigo .

A mi madre Francisca Osornio Becerril por que fue el pilar que me sostuvo hasta ahora, aunque ya no este con migo.

A Israel Arias Jaimes por su apoyo y tolerancia en todo momento desde que lo conozco y por ser el impulso más fuerte para terminar este trabajo.

A mis Hermanas y Hermanos por su cariño, apoyo y comprensión.

A mis amigos que mostraron interés e impulsaron para que mi trabajo saliera adelante.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS.....	Vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	Vii
RESUMEN.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivo general.....	2
1.2. Objetivos particulares.....	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Lirio Acuático.....	3
2.1.1. Clasificación taxonómica.....	3
2.1.2. Reproducción.....	3
2.1.3. Crecimiento y producción de biomasa.....	4
2.1.4. Efectos de la temperatura.....	4
2.1.5. Nutrición.....	4
2.2. Crecimiento de los hongos.....	5
2.2.1. Condiciones que influyen en el crecimiento.....	5
2.2.2. Nutrición.....	5
2.2.3. Las fuentes de Carbono.....	6
2.2.4. Las fuentes de Nitrógeno.....	6
2.2.5. Otros nutrientes importantes.....	7
2.2.6. Fases de Crecimiento.....	7
2.2.7. Luz.....	8
2.2.8. Temperatura.....	9
2.3. Agentes naturales controladores del lirio acuático.....	9
2.4. Sustancias fitotóxicas de los hongos.....	13
2.5. Postulados de Koch.....	13
2.6. Enfermedades.....	14
2.6.1. Evaluación de enfermedades.....	14
2.6.2. Tiempo y frecuencia de la evaluación.....	14
2.6.3. Procedimiento para la evaluación.....	14
2.6.4. Diagramas y escalas.....	15
2.6.5. Factores que influyen en la evaluación.....	15
2.7. Inoculación de las hojas.....	17
2.8. Modelo logístico.....	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1. Localización del área de estudio.....	20
3.2. Colecta de material vegetal.....	20
3.3. Manejo del material enfermo.....	21
3.4. Microcultivo ó método de Riddell.....	22
3.5. Identificación de los hongos.....	24
3.6. Pruebas de severidad mediante la inoculación del lirio acuático sano con <i>Alternaria tenuis</i>	24
3.7. Uso de la cámara de contaje de French y Teddy (1980).....	25
3.8. Valoración del tercer postulado de Koch para <i>Alternaria tenuis</i>	26
3.9. Aplicación del modelo logístico.....	26

3.10. Métodos de Wilcox <i>et al.</i> , (1997) para la discriminación de áreas sanas y afectadas en photoshop (Knoll <i>et al.</i> , 2000) para la elaboración de las escalas de severidad.....	27
3.11. Cálculo de áreas sanas y afectadas en porcentajes por Image Tool (Wilcox <i>et al.</i> , 1997)	28
3.12. Calibración para el cálculo de áreas sanas y afectadas en unidades métricas.....	29
3.13. Preparación para el cálculo de áreas.....	29
3.13.1 Cálculo de áreas.....	29
3.14. Pruebas de seguridad mediante la inoculación de plantas cultivadas y malezas, con <i>Alternaria tenuis</i>	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4.1. Colectas de lirio por síntoma y patógeno	32
4.1.1. Colecta realizada el 21 de junio del 2001.....	32
4.1.2. Colecta realizada el 12 de julio del 2001.....	33
4.1.3. Colecta realizada el 21 de julio del 2001.....	34
4.1.4. Colecta del 23 de Agosto del 2001.....	35
4.1.5. Colecta del 18 de Octubre del 2001.....	35
4.2. Descripción de los géneros de patógenos asociados al lirio acuático.....	39
4.2.1. <i>Fusarium</i> sp.....	39
4.2.2. <i>Alternaria</i> sp.....	39
4.2.2.1. <i>Alternaria tenuis</i> Need.....	39
4.2.2.2. <i>Alternaria tenuissima</i>	39
4.2.3. <i>Rhizoctonia</i> sp.....	40
4.2.4. <i>Stemphyllium</i> sp.....	40
4.3. Inoculación del lirio acuático.....	42
4.4. Pruebas de severidad.....	42
4.5. Pruebas de seguridad.....	47
4.6. Escalas de severidad.....	49
4.7. Diagramas de severidad.....	49
5. CONCLUSIONES.....	52
6. BIBLIOGRAFÍA.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
2.1.	Desarrollo y síntomas de las enfermedades producida por <i>Alternaria</i> sp. tomada de (Agris, 1995).....	17
3.1.	Localización de la Laguna de Zumpango. En el Municipio de Teoloyucan, Edo. de México.....	20
3.2.	Caja de petri para microcultivo.....	23
4.1.	Daños en hojas de Lirio (<i>Eichhornia crassipes</i> Mart) ocasionados por hongos.....	37
4.2.	Cajas de PDA con cepas puras de hongos.....	38
4.3.	Micelio y conidios de los hongos asociados al lirio acuático.....	41
4.4.	Curvas de desarrollo de la enfermedad de acuerdo al modelo logístico linearizado que muestra los valores de Y y YL ajustada de los tratamientos de T1 y T2 de la severidad con respecto al tiempo.....	45
4.5.	Curvas de desarrollo de la enfermedad de acuerdo al modelo logístico linearizado que muestra los valores de Y y YL ajustada de los tratamientos de T3 y T4 de la severidad con respecto al tiempo.....	46
4.6.	Pruebas de seguridad en A) Malva. B) Brotes Maiz. C) Daño en frijol. D) Brotes de frijol sanos. E) Daño en Maiz.....	48
4.7.	Diagramas de severidad. Equivalentes al porcentaje exacto del área dañada de las hojas de lirio acuático por <i>Alternaria tenuis</i> Need, por el método de Wilcox, et al. (1997).....	50

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
4.1.	Resumen de los análisis de regresión lineal para determinar la precisión y exactitud de los diferentes diagramas de severidad, generados a partir de regresión lineal.....	44
4.2.	Escalas de severidad de <i>A. Tenus</i> Need Para lirio acuático. Por el método de H.B. y ajustado por Horsfall-Barratt, 1945.....	49

RESUMEN.

Con la intención de identificar algunos patógenos del lirio acuático que pudieran ser utilizados para el control biológico, en la Laguna de Zumpango se hicieron cuatro colectas de material enfermo de lirio acuático; de las plantas con diferentes síntomas de patógenos, se obtuvieron las cepas puras y se identificaron usando microcultivos y claves de identificación. Se encontraron los géneros de hongos de *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Stemphyllium* sp., *Alternaria* sp. y las especies de *Alternaria tenuis* y *A. tenuissima*. Por sus características de agresividad y siendo considerado como un saprobio de residuos de cultivos, se eligió a *A. tenuis* Need. para la elaboración de un micoherbicida. Se realizaron las pruebas de severidad utilizando 4 tratamientos y el testigo, se aplicaron T1 (1500 conidios/ml), T2 (2000 conidios/ml), T3 (2500 conidios/ml), T4 (3000 conidios/ml) y el testigo sin conidios. El que resultó ser más agresivo fue el T1 ya que a los 34 días después de la inoculación (ddi) la planta detuvo su reproducción. De acuerdo a los análisis estadísticos el T4 es el más adecuado puesto que presenta un índice de confiabilidad del 96.69%. El T1, fue el más agresivo para la planta y se usó para las pruebas de seguridad en plantas cultivadas de la zona como el frijol (*Phaseolus vulgaris*), maíz (*Zea mays*), y las malezas: malva (*Malva silvestre*), bidens (*Bidens pilosa*) y kikullo (*Penisetum clandestinum*) haciendo una aspersión de la suspensión de *Alternaria tenuis*, en una concentración de 1500 conidios por mililitro y se cubrieron con una bolsa de polietileno durante 72 hrs. El hongo no afectó a las malezas ni a las plantas cultivadas, el daño que se encontró no perjudicó su crecimiento ya que las hojas nuevas estaban sanas. En frijol se encontró *Mucor* sp., *Penicillium* sp y *Alternaria* sp. y en maíz se encontró *Penicillium* sp. y *Alternaria tenuis*. Se hicieron las escalas de severidad ajustadas al método de Horsfall y Barrat, (1945) y los diagramas de severidad por el programa Image Tool ajustados al método de Wilcox, (1997), usando el programa de Photoshop de Thomas Knoll, (2000), para preparar la hoja y ser analizada con la ayuda del programa Image Tool, en el que se determina el daño de las hojas con una confiabilidad del 100% para las mediciones en campo, que sirven para determinar el daño que produce *A. tenuis* al inocularse en lirio acuático.

1. INTRODUCCIÓN

La descarga de aguas negras de la Ciudad de México y área metropolitana que se utilizan para riego, en su mayoría se encuentran afectados por malezas acuáticas entre las que destaca el lirio acuático (*Eichhornia crassipes*). Lo anterior considera a los diferentes cuerpos de agua, principalmente en Xochimilco, el Lago de Guadalupe y la Laguna de Zumpango, también son importantes las de algunas ciudades de la República Mexicana como son las presas Requena y Endho en Hidalgo, la Laguna de Yuriria en Guanajuato, Trigomil y Miraplanes en Jalisco (Gutiérrez, 1994; Fernández, 1995), Chapala en Guadalajara, Cuitzeo en Michoacán, entre muchas otras zonas

Los métodos para controlar el lirio acuático no han tenido grandes resultados, generalmente resultan caros, algunos contaminan el agua como el control químico (Templeton y TeBeest, 1979), el método de control mecánico, sacando el lirio, o como alimento de ganado; otra forma de control que se ha utilizado es el biológico en el que se nombran 70 especies de artrópodos, los coleópteros, los ortópteros, 32 hongos, 6 bacterias y peces (Mariaca, 1984). Sin embargo, no son los más adecuados debido a que la reproducción del lirio es muy rápida (Riemer, 1984; Gallagher, 1989; Thayer *et al.*, 1986; Pérez, *et al.*, 1995).

Los primeros microherbicidas registrados son el "De Vine" y Collego ambos usados para malezas, para *Eichhornia crassipes* Mart, otros patógenos utilizados son *Alternaria eichhorniae*, *Cercospora piaropi*, *C. rodmanii*, *Myrothecium roridum* y *Rhizoctonia* sp., entre otros (TeBeest, 1991). De lo anterior se muestra que los medios que se han utilizado para el control de lirio acuático han funcionado poco, por lo que se decidió estudiar a *Eichhornia crassipes* Mart, haciendo un estudio de los hongos que lo atacan para elaborar un microherbicida como una alternativa más de control, se realizó un muestreo de lirio en la Laguna de Zumpango. Se colectaron muestras de lirio que presentaron síntomas de patógenos para su posterior identificación y selección como posibles microherbicidas, para lo cual se plantearon los siguientes objetivos.

1.1 Objetivo general.

- **Determinar a través del aislamiento e identificación de los hongos presentes en lirio acuático (*Eichhornia crassipes* Mart.) los posibles agentes para su uso como microherbicidas.**

1.1.1. Objetivos particulares

- **Evaluar la severidad de *Alternaria tenuis* Need a través de pruebas de patogenicidad, en Lirio acuático.**
- **Evaluar el efecto de *Alternaria tenuis* Need. sobre los cultivos de la zona: *Zea mays*, *Phaseolus vulgaris*, *Malva silvestre*, *Bidens pilosa* y *Penisetum clandestinum*, mediante la realización de las pruebas de seguridad.**

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Lirio Acuático (*Eichhornia crassipes* Mart.)

El lirio acuático es considerado como una maleza potencial en algunos cuerpos de agua sobretodo, en los que han sido afectados por las descargas de los drenajes de las grandes ciudades. Tal es el caso de la Laguna de Zumpango afectada principalmente por las descargas de la ciudad de México y área metropolitana.

2.1.1. Clasificación taxonómica

El lirio acuático pertenece a la subclase Liliidae, al orden Liliales y a la familia Pontederiaceae, la familia se distribuye principalmente de las regiones tropicales a las subtropicales, con algunas especies en la zona templada norte; pertenece al género *Eichhornia* y la especie *E. crassipes*, comúnmente conocido como "jacinto de agua" (Lallana, 1989). La familia está representada por 7 géneros y 30 especies (Stevens *et al.*, 1979).

2.1.2. Reproducción

Eichhornia crassipes se propaga vegetativamente y por semilla. Pueden germinar muy pronto o quedar latentes por muchos años. La germinación es propiciada por las condiciones aeróbicas y las temperaturas variadas. Las poblaciones de plántulas se establecen en el fango de los bordes de ríos cuando los niveles del agua bajan, pero llegan a soltarse para flotar en ascendentes ondulaciones cuando tiende a subir el nivel del agua. Las yemas axilares de los lirios viejos de las plántulas son capaces de desenvolverse en estolones los cuales crecen horizontalmente, desarrollando las plantas hijas. La floración del lirio es estacional en algunos países. Claramente existe poca o ninguna respuesta al fotoperiodo, pero hay evidencia considerable de que la floración puede ser inducida por una nutrición deficiente (Barrett, 1989).

2.1.3. Crecimiento y producción de biomasa

El lirio acuático tiene características anatómicas de las plantas C3 pero en el proceso fotosintético muestra características más productivas como las plantas C4. Estas características producen una alta eficiencia en la planta, sugieren que es capaz de aumentar en biomasa en un 12-20 % al día. El tiempo requerido para duplicar su biomasa es relativamente variable y puede ser de 6 a 15 días. La productividad también puede ser expresada en función de 100-500g peso fresco/m² por día, 1000-5000 kg/ha por día o 400-1700 t/ha por año. La biomasa total puede ascender a 42 kg/m² ó 420 t de peso fresco/ha. Como el peso seco es normalmente cerca de 5 a 7% del peso fresco, representa cerca del 2.5 del peso seco por kg/m² o 25 t de la materia seca/ha (Gopal, 1987).

2.1.4. Efectos de la temperatura

La temperatura óptima para el crecimiento de *E. crassipes* es de 25-30°C y se detiene cuando la temperatura está por arriba de los 40°C o debajo de los 10°C. Puede tolerar los períodos breves de heladas (Barrett, 1989).

2.1.5. Nutrición

El lirio acuático responde bien a los nutrientes especialmente al nitrógeno y al fósforo y las razones de su rápida reproducción están asociadas siempre con el eutrofismo, condiciones ricas en nutrientes (Body y Sacarbrook, 1975). La reproducción es mayor donde el contenido nutritivo tiene 52 mg/l de nutrientes, comparado con 8 mg/l de nutrientes (Lugo *et al.*, 1979). La concentración de calcio es importante, pero con un umbral observado de 5 mg/l se puede detener el crecimiento (Barrett, 1989).

2.2.Crecimiento de los hongos

2.2.1. Condiciones que influyen en el crecimiento

El manejo de los hongos bajo condiciones de laboratorio es de gran importancia ya que es de forma artificial y dependen en gran medida de los factores ambientales y su efecto (Romero, 1988; Moore-Landecker, 1990), el medio ambiente influir por la variación en la concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno (Burnett, 1976).

Para pruebas de patogenicidad se requiere de abundante esporulación, por lo que se deben tomar en cuenta la temperatura, nutrientes, el pH y la luz, entre otros factores, (Romero, 1988), con mayor atención que en campo, de lo contrario los resultados obtenidos pueden no ser los esperados, si las necesidades de crecimiento varían de acuerdo a la fase de cada hongo. Las condiciones culturales, algunas veces, afectan a la morfología por causas de un cambio en el medio, en la forma, en la septación, o la pigmentación de las estructuras reproductivas (Moore-Landecker, 1990).

2.2.2. Nutrición.

El medio de cultivo que favorece la reproducción es a menudo formulado para proveer una concentración nutritiva débil que soporte un escaso crecimiento de micelio, particularmente para hongos tales como Basidiomicetos que presentan los esporocarpos grandes y es favorecido relativamente por grandes cantidades de medio diluido. En algunos casos, el crecimiento denso de un hongo en un medio de cultivo inducirá a una esporulación temprana debido a que los nutrientes serán utilizados más rápidamente (Moore-Landecker, 1990).

Las divisiones mitóticas se realizan en presencia de glucosa. La utilización del acetato o el etanol son esenciales para la esporogénesis y para inducir la meiosis, como la adición de una pequeña cantidad de glucosa en este punto, causa una reversión para la fermentación y el crecimiento vegetativo (Moore-Landecker, 1990).

2.2.3. Las fuentes de Carbono

El carbono es parte fundamental para la fase reproductiva del hongo. los minerales sintetizados son transportados a las estructuras reproductivas en desarrollo. Los compuestos que están en el micelio y que pueden servir como fuente de energía incluye a las proteínas y los carbohidratos como la tetralosa, glicógeno, que se acumulan en el citoplasma y el glicón, que se almacena en la pared celular (Moore-Landecker, 1990; Burnett, 1976).

La glucosa favorece el crecimiento micelial, por lo que la producción de esporas puede ser reprimida (Burnett, 1976). La fuente y la concentración de Carbono pueden afectar el comportamiento y morfología de las estructuras reproductivas. Las zoosporas de *Chytromyces hyalinus* son mas largas al crecer en celobiosa que en fructuosa (Hasija y Miller, 1971). Del mismo modo, un incremento en Carbono provoca disminución en el tamaño de los picnidios de algunos deuteromicetos y es posible que haya mayor longitud y curvatura de las esporas (Nitimargi, 1973).

2.2.4. Las fuentes de Nitrógeno.

El Nitrógeno (N) es utilizado por los hongos para fines funcionales y estructurales. La pared celular de muchas especies, excepto oomicetos y levaduras, contienen quitina, que es un polímero lineal de la D-glucosamina. Las proteínas (base del protoplasma) las purinas, las pirimidinas, las enzimas y algunas vitaminas son también fuente de nitrógeno (Romero, 1988).

La concentración de N en el medio es sumamente importante, el crecimiento vegetativo y la esporulación son normales sólo cuando la cantidad de N es apropiada, la ausencia de N ocasiona que el crecimiento micelial sea raquítico y esporulación nula, mientras que un ligero exceso da como resultado abundante micelio, pero poca esporulación. Esto último puede deberse a cambios en el pH o acumulación de subproductos (Romero, 1988).

Los hongos difieren en su habilidad para utilizar las distintas fuentes de Nitrógeno, las cuales varían en función de la etapa en que se encuentre el microorganismo, los compuestos de asparagina y amonio son buenas fuentes de Nitrógeno durante el crecimiento micelial pero por lo general suprime la reproducción. El efecto inhibitorio de dichos compuestos probablemente se deba a la acumulación de amoníaco en la fase vegetativa, por lo que se alcaliniza el medio e impide la reproducción, o a que el amoníaco puede estar como gas tóxico (Moore-Landecker, 1990).

El nitrato, la urea y los aminoácidos favorecen la esporulación, pero los diversos géneros de hongos muestran preferencia por fuentes de Nitrógeno en especial, como es el caso de algunas especies de *Sporomiella* que son capaces de utilizar nitratos y ciertos aminoácidos para la maduración de peritecios (Hasija y Miller, 1971).

2.2.5. Otros nutrientes importantes

La formación de estructuras reproductivas requiere concentraciones de minerales y vitaminas mayores que las que permiten el crecimiento micelial. *Sordaria firmicola* crece vegetativamente en medios libres de biotina, pero es indispensable que sea adicionada para la formación de peritecios. El nivel de deficiencia de vitaminas puede ser determinado por la concentración de otros nutrientes disponibles o por el tipo de carbohidratos como la hexosa y los fosfolípidos (Burnett, 1976). La cantidad de tiamina requerida para el desarrollo de peritecios de *Ceratostomella fimbriata* aumenta conforme al incremento de los carbohidratos (Moore-Landecker, 1990).

La reproducción también es impulsada por la adición al medio de cultivo de factores de crecimiento. Ciertas especies de *Phytophthora* y *Pythium* requieren esteroides, tanto para la reproducción sexual como para la asexual (Hendrix, 1970).

2.2.6. Fases de crecimiento

En situaciones adecuadas de crecimiento "*in vitro*", es posible diferenciar las etapas de desarrollo por zonas. Detrás de ella está la zona productiva, en la que ocurre el mayor,

crecimiento de biomasa. En la zona fructífera las esporas se forman sobre hifas que salen de la superficie del medio de cultivo y por último, la zona improductiva que corresponde a la fase de envejecimiento de la cepa. En cultivos donde la inoculación se hizo en la parte central, el consumo de nutrientes es heterogéneo, por lo que la zona de fructificación puede ser limitada nutricionalmente. La producción de esporas requiere rutas metabólicas y actividades biosintéticas distintas a las de las células miceliales por diferir en estructura, composición y algunas veces en demandas de nutrientes. Por ello, al distribuir de manera homogénea el inóculo se tiene una superficie de cultivo uniforme, otorgando condiciones satisfactorias a ambos procesos, al crecimiento y a la esporulación (Carlile y Watkinson, 1994).

2.2.7. Luz

En los microorganismos, la necesidad de luz es amplia, por lo que se dividen en 5 grupos: A) aquellos que son aparentemente indiferentes a la luz, B) los que ven impedida o reducida la esporulación cuando son expuestos a la luz, C) los que requieren luz y oscuridad alternas para esporular, D) los capaces de producir esporas viables en completa oscuridad pero esporulan abundantemente al exponerlos a la luz y E) los que requieren luz para formar estructuras reproductivas y esporas (Moore-Landecker, 1990).

En ciertos fitopatógenos la exposición a la luz o bajas intensidades, por pocos segundos es suficiente para estimular la esporulación, mientras que otros requieren de periodos prolongados a altas intensidades. En los Deuteromicetos, *Botrytis cinerea* y *Helmithosporium* sp. su esporulación es promovida por la luz cercana a UV, pero puede ser inhibida por la azul (Carlile y Watkinson, 1994; Cooke y Whipps, 1993). Otros hongos, por ejemplo *Cercospora rodmanii* en medio de cultivo V-8 esporuló bien, pero al combinar ciclos de 12 horas de oscuridad aumentó la esporulación (Conway, 1975).

Stemphylium botryosum produce esporas copiosamente al alternar la luz y la oscuridad, pero si está en constante oscuridad formará pocas esporas o no esporulará, y en la luz

continua, los conidióforos serán estériles y se dice que es un "esporulado diurno" porque la luz ultravioleta es necesaria para la producción de conidióforos, mientras que la oscuridad es la adecuada para la producción de conidios (Moore-Landecker, 1990). Los ciclos de luz u oscuridad estimulan la producción de cuerpos fructíferos en *Corprinus macrorrhizus* y *Gelatinospora reticulospora* (Cartile y Watkinson, 1994; Cooke y Whipps, 1993).

2.2.8. Temperatura

La temperatura es uno de los factores físicos más importantes que afectan la reproducción por influir en diversos procesos fisiológicos y metabólicos (Viswanath-Reedy y Turian, 1995). Para la reproducción de la mayoría de los hongos el rango es de 20 a 25°C, teniendo un límite de $\pm 5-10^\circ\text{C}$, aunque algunos poseen una temperatura óptima de 10 a 15°C para la formación de estructuras, como *Monilinia* que produce apotecios bajo estas condiciones. Las especies de *Thelebolus* son tolerantes al frío por lo que puede tener apotecios fértiles a 0°C a pesar de que la temperatura óptima sea entre 15 y 20°C (Wicklow y Malloch, 1971). Algunos hongos no sólo sobreviven a temperaturas bajas, sino que son capaces de vivir normalmente (Romero, 1988).

Dentro de ciertos límites, la temperatura puede inhibir la esporulación, determinar el tipo de fructificación o modificar algunas características de ciertas estructuras reproductivas (Romero, 1988). En caso de existir competencia entre los organismos, la temperatura también tiene un efecto controlador de las poblaciones mesófilas (Cooke y Whipps, 1993).

2.3. Agentes naturales controladores del lirio acuático

Inmensas extensiones de tierra y agua están cubiertas por plantas nocivas que no ceden a la aplicación de agentes químicos. Sin embargo, la aplicación de insectos y patógenos ha tenido un éxito impresionante. La función de los enemigos naturales de parásitos, depredadores y patógenos en la disminución de alguna especie vegetal se conoce con el nombre de control biológico. El objetivo del control biológico jamás es la,

erradicación, sino que es la disminución de la población de plantas nocivas, esto se puede usar por medio de una acción directa o indirecta (Rodríguez, 1982)

Los cuerpos de agua son afectados por el acelerado crecimiento demográfico, el incremento de las industrias y los contaminantes potenciales que son desechados como: nutrientes nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), una gran cantidad de metales pesados entre los que destacan, el Zinc (Zn), cromo (Cr), plomo (Pb), cobre (Cu) y cadmio (Cd), entre otros, lo que los convierte en un medio ideal para las malezas acuáticas (Lallana, 1989; Mitchell, 1978). El lirio (*Eichhornia crassipes* Mart.) es una maleza acuática potencialmente destructiva en algunas áreas de producción, en las zonas navegables y en los ríos; debido a que tiene una tasa de reproducción alta (DeBach, 1981). Puede causar obstrucción en los canales de riego, la pérdida de agua por evapotranspiración, la interferencia en la pesca comercial y deportiva, la limitación en la penetración de luz y una menor oxigenación del agua (Gopal, 1987).

Los métodos para controlar el lirio acuático no han tenido grandes resultados, generalmente resultan caros, algunos contaminan el agua como el control químico, que es el mas usado pero que puede llegar a matar peces (Templeton y TeBeest, 1979). Algunos de los herbicidas menos perjudiciales al agua y al ambiente son la Amitrina y la Amitrole-T (Blackburn *et al.* 1981), el Diquat (Widyanto, 1975), el Clorodan 500 (Ashton y Steyn, 1981), el Paracuat y el 2,4-D (Gopal, 1987). El método de control mecánico, sacando el lirio o como alimento de ganado. Otra forma de control que se ha utilizado es el biológico en el que se nombran 70 especies de artrópodos dentro de los que destacan *Cornops aquaticum*, *C. scudderi*, *C. songicorne*; los coleópteros *Neochetina bruchi* y *Neochetina eichhorniae*; de los ortóptero se utilizó *Dyscinetus* sp. y *Chalepides*. 32 hongos, 6 bacterias y peces, principalmente carpas que se alimentan del lirio (Mariaca, 1984); sin embargo, no son los más adecuados debido a que la reproducción del lirio es muy rápida, la realiza por medio de estolones y semillas que pueden durar viables por mucho tiempo (Riemer, 1984; Gallagher, 1989; Thayer y Ramey, 1986; Pérez *et al.*, 1995).

Los primeros micoherbicidas registrados son el "De Vine" formulado por los laboratorios de Abbott, consiste en una concentración líquida de clamidosporas de *Phytophthora palmivora* y Collego a base de *Colletotrichum gloeosporioides* ambos usados para malezas, para *Eichhornia crassipes* se sugiere *Alternaria eichhorniae*, *Cercospora piaropi*, *C. rodmanii*, *Myrothecium roridum* y *Rhizoctonia* sp., entre otros (Rice, 1995).

En la última década han cobrado auge los componentes orgánicos para el control de malezas, plagas y enfermedades; sin embargo, se cuenta todavía con poca información. Hace algunos años se aplicó *Alternaria eichhorniae* en lirio acuático obteniendo una reducción en su población (NagRaj y Pannoppa, 1970). En una comparación de *Uredo eichhorniae* y *Uromices pontederiae* en jacinto de agua rustico se obtuvo buenos resultados en ambos (Charudatan y Conway, 1975). Por otra parte se probó *Cercospora rodmanii* como control biológico para lirio, logró no sólo bajar su población sino que también evitó la producción de vástagos y pecíolos sólo estacionalmente (Conway 1976).

Casi 100 especies de insectos diferentes y un número comparable de patógenos han sido determinados como depredadores de *E. crassipes*. Algunas especies de insectos y hongos han sido desarrollados para su uso como agentes de control biológico, con diferente éxito (Barrett, 1989). Una de las especies de hongos utilizados es *Cercospora rodmanii*, con éxito variado ya que reduce la producción de biomasa, del lirio pero tiene que aplicarse como herbicida (Conway y Cullen, 1978; Templeton y TeBeest, 1979). Otro hongo que se ha utilizado es *Alternaria eichhorniae* que por ser un patógeno específico del lirio no causa problemas a plantas cultivadas. (NagRaj y Pannoppa, 1970). Existe investigación encaminada a conocer los enemigos naturales de las malezas acuáticas, así como determinar su biología con base en la potencialidad de los patógenos para ser usados como micoherbicidas para el control de *E. crassipes* como son: *Alternaria* sp, *Bipolaris* sp, *Cladosporium* sp. y *Cyclocladium* sp (Zita et al., 2002).

En ensayos realizados con el lirio acuático para la producción de energía y la depuración terciaria de purinas de cerdo, se comprobó que cuando la solución de cultivo superaba un pH de 8, la planta se necrosa y muere. La sintomatología iniciaba con la aparición de clorosis en las hojas apicales extendiéndose posteriormente por el resto de la planta, al mismo tiempo que las raíces se iban oscureciendo (Delgado *et al.*, 1994).

Los enemigos naturales del lirio acuático, incluyendo aquellos que han de ser utilizados como agentes de control biológico y también algunos organismos que pueden de ser determinados causales de algún daño significativo en el campo donde el lirio acuático ha sido introducido (Julien y Griffiths, 1992). Para encontrar un control biológico apropiado y efectivo para el lirio acuático, el cual está representado por siete géneros y treinta especies, teniendo una gran distribución en el mundo, se ha investigado los efectos fitotóxicos de diferentes hongos en el lirio acuático y encontrando en *Alternaria eichhorniae* el Bostrycin que son unos cristales rojos, que al parecer tienen un efecto herbicida contra el lirio (Stevens *et al.*, 1979).

La empresa productora y comercializadora de agroquímicos Aventis descubrió y desarrolló en Alemania el Finale Pro15, a partir de un metabolito de los hongos *Streptomyces viridichromogenes* y *S. higrscopicus* denominado glufosinato de amonio. Se recomienda para el control de malezas de hoja ancha y de hoja angosta, para plantas anuales y perennes. En el 2000 se probó en lirio acuático obteniendo excelentes resultados. Una prueba hecha en Culiacan-Humaya-San Lorenzo, en Sinaloa con los coleópteros *Neochetina bruchi* y *N. eichhorniae* y el lepidóptero *Sameodes algiguttalis*, mostraron ser biocontroladores efectivos del lirio acuático y tener capacidad de adaptarse a condiciones físicas, químicas y biológicas prevalecientes en la zona (Pérez, *et al.*, 1995).

2.4. Sustancias fitotóxicas de los hongos

La forma en que los hongos matan a las plantas varía como: en la destrucción celular, la penetración del micelio y la reproducción de esporas, la producción de micotoxinas, entre otros, a través de las sustancias citotóxicas para las plantas, como es el caso de *Alternaria eichhornia* que produce el bostrycin, antraquinones reducidos que se han aislado de *Alternaria sp.* y *Alternaria solani* el altersolanol la producción del metabolito rojo por el micelio de *A. eichhorniae* (Stevens *et al.*, 1979).

2.5. Postulados de Koch

Cuando un patógeno se encuentra en una planta enferma, puede ser fácilmente identificado utilizando manuales especializados; en caso de no tener certeza de que el patógeno sea el causante de la enfermedad y que no exista registros anteriores que apoyen esa suposición, tendrán que considerarse los siguientes puntos para comprobar la hipótesis de que el patógeno es el causante de esa enfermedad (Agrios, 1995):

1. El patógeno debe encontrarse asociado con la enfermedad en todas las plantas enfermas que se examinen.
2. El patógeno debe aislarse y desarrollarse en un cultivo puro en medios nutritivos y se deben describir sus características -parásito no obligado-, o bien debe permitirse que se desarrolle sobre una planta hospedante susceptible -parásito obligado- y registrar su presencia y los efectos que produzca.
3. El patógeno que se desarrolle en un cultivo puro debe ser inoculado en plantas sanas de la misma variedad o especie en que apareció la enfermedad y debe producir la misma enfermedad en las plantas inoculadas.
4. El patógeno debe aislarse una vez más en un cultivo puro y sus características deben corresponder a las anotadas en el segundo punto.

En caso de que los puntos mencionados se cumplan, se tendrá la certeza de que el patógeno aislado es la causa de la enfermedad (Agrios, 1995).

2.6. Enfermedades

2.6.1. Evaluación de enfermedades

La intensidad de una enfermedad se expresa como incidencia y severidad. La severidad puede ser medida y expresada en porcentaje como el área u órgano total de las plantas dañadas. La incidencia es la proporción enferma de plantas con respecto al total de las plantas sanas a evaluar, expresada en porcentaje, independientemente del grado de severidad que presenta (Campbell y Madden, 1990).

2.5.1. Tiempo y frecuencia de la evaluación

El tiempo y frecuencia de la evaluación está determinada por los patógenos sistémicos y la evaluación de los objetivos. El tiempo de evaluación puede estar influenciado para que sea una epidemia completa o específica. Basada en una escala calendarizada, una escala del medio ambiente fisiológico o la escala de crecimiento en campo. Las escalas de tiempo son usadas en la cuantificación del medio ambiente o combinación de cantidades importantes para el estado fisiológico de los hospedantes. Las escalas están basadas en los conceptos de ciertos números de las unidades del medio ambiente, más son acumulados en orden para claves de procesos fisiológicos a ocurrir. Estos tipos de escalas requieren monitoreos continuos de las variables usadas del medio ambiente. Pueden dictar más observaciones en una porción o en un sitio, sin embargo, es mejor menos observaciones en muchas porciones en muchos sitios (Campbell y Madden, 1990; French y Teddy, 1980).

2.6.3. Procedimiento para la evaluación

Un sistema hecho para la evaluación de enfermedades aplicado en los resultados debe ser correcto, preciso y reproducible y a su vez descriptible, eficiente y apropiado para la tarea asignada, estas características deben ser esenciales para los estudios preliminares, el gasto de tiempo debe ser el adecuado para prevenir fallas en la adquisición de datos que ya no podrían obtenerse al momento de analizar la información (Campbell y Madden, 1990).

2.6.4. Diagramas y escalas

Las claves fotográficas o claves descriptivas pueden basarse en la combinación hospedante-patógeno, estas claves son una representación de una parte de planta a evaluar (Parry, 1990). La costumbre de la evaluación de las enfermedades puede desarrollarse usando la misma imagen tecnológica de video para cuantificar el crecimiento del hospedante (Lindow y Webb, 1983). El programa Image Tool para Windows permite evaluar exactamente por medio del conteo de píxeles el área total dañada de la hoja, para establecer las escalas de severidad para la enfermedad que se desea evaluar, para cada clase y se recomienda hacerlas adecuadas para cada síntoma. También pueden evaluarse frutos y semillas aplanándolas y digitalizando, apoyado en el programa de Adobe Photoshop 6.0, donde se digitalizan y preparan para su análisis por Image Tool (Wilcox *et al.*, 1997).

Una escala de enfermedades debe ser conveniente para su uso y tener suficientes clases para proveer las adecuadas resoluciones de las diferencias en la intensidad de la enfermedad. Si el número de clases es pequeño por ejemplo 2 ó 3 la escala puede no ser de resolución; si el número es grande mayor de 20, el tiempo es perdido para decidir cual clase es apropiada (Zadoks y Schein, 1979). La norma de Weber-Fechner dice que el estado de la agudeza visual es proporcional a los estímulos logarítmicos, esto es el incremento de estímulos, discriminación y decrecimiento. Una escala de aproximación logarítmica, no lineal, basada en las clases de enfermedades, en la que también se debe de agudizar el ojo del que interpreta enfermedades bajo el 50% de tejido enfermo y sobre el 50 % de tejido sano. Así las clases de enfermedades son cerca del 50, 75 y 100 % simétricas (Horsfall y Barratt, 1945).

2.6.5. Factores que influyen en la evaluación

La calidad y cantidad de inóculo influye en la reacción del hospedante. Para la inoculación foliar con inducción a la marchitez por patógenos, es deseable una inoculación de esporas; sin embargo, la inoculación de micelio puede ser sustituida. El inóculo de esporas puede ser cuantificado, para la aplicación de un número mínimo

de los propágulos infectivos para el desarrollo satisfactorio de la enfermedad, un nivel alto de inóculo puede compensarse si las condiciones del medio ambiente son las óptimas lo que reduce el tiempo requerido, para el desarrollo del síntoma. Para estudios comparativos, la cantidad del inóculo debe ser unificado y del mismo modo la cantidad aplicada a cada una de las plantas, la viabilidad de la espora debe ser determinada antes de la aplicación, aunque una alta germinación observada no indica un potencial infectivo alto. La colecta de esporas de cultivos jóvenes tiene un potencial infectivo más alto que aquellos viejos (Dhingra y Sinclair, 1987).

El medio acostumbrado para aumentar el inóculo de hongos puede influir en su potencial infectivo. Generalmente, los hongos crecen en un medio rico más vigoroso que aquellos que crecen en una nutrición pobre, no debe olvidarse que el patógeno debe mantenerse virulento y agresivo. Las condiciones del medio ambiente antes de la inoculación influyen en la relación hospedante-patógenos (French y Teddy, 1980). La edad fisiológica tiene una mayor influencia en la expresión de la susceptibilidad del hospedante que la edad cronológica, las pruebas deben ser hechas para determinar el estado más susceptible de una planta. Algunas plantas pueden ser susceptibles en plántula y cerca del estado de madurez y son resistentes durante el período vegetativo. En general, la susceptibilidad o la dominancia del patógeno a las enfermedades es mayor durante el crecimiento. En los campos de crecimiento fijo de algunas partes de las plantas pueden ser más susceptibles que otras partes. La incubación de las plantas después de la inoculación es el factor más importante e influye para que la inoculación tenga éxito. Las condiciones de la incubación deben ser las óptimas para la germinación de esporas y un microorganismo provee la formación de tubos u otra estructura de penetración. Si la penetración es por estomas, éstos deben estar abiertos durante el período de la penetración. Las plantas inoculadas con la mayoría de los patógenos son puestas en una atmósfera saturada de humedad (Dhingra y Sinclair, 1987).

2.7. Inoculación de Hojas

Las manchas, las pústulas y la necrosis de venas son los síntomas presentados por patógenos de hoja, lo que puede también presentar los síntomas en los vástagos. La mayoría de los hongos patógenos de las hojas no requieren de heridas para la infección, la mayoría penetra por los estomas, directamente por las células de la epidermis o en las uniones entre las células de la epidermis. Cuando la infección entra por los estomas, el inóculo debe ser aplicado y adaptado en la superficie, utilizando al máximo las resistencias de los estomas. La incubación bajo estas condiciones permite a los estomas quedar abiertos y permite la penetración de las esporas para germinar y penetrar en las células (Dhingra y Sinclair, 1987) (Fig. 2.1).

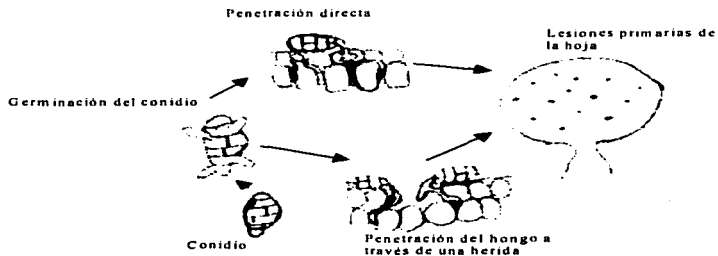


Fig. 2.1 Desarrollo y síntomas de las enfermedades producida por *Alternaria* tomada de (Agrios, 1995).

Una forma simple para inocular las hojas es atomizar las suspensiones de esporas en agua esterilizada, con fluoroquímicos, aceite o talco en la superficie de la hoja. Cuando se usa agua, se adiciona un surfactante tal como tween 20 o tween 80 (0.5 %), el oleato de sodio (0.05 %) o jabón suave al 0.1 %. La germinación de la espora en estas soluciones debe ser de antemano probado. La adición de los surfactantes aumenta el

número de las hojas infectadas por planta. Cuando la suspensión de agua es atomizada hacia una superficie cerosa de la hoja o en las flores como las de cereales y son incubados en una cámara nebulizadora, la humedad libre reunida en la hoja forman una caída, se juntan las esporas en el borde o ápice de la hoja. Como resultado las infecciones son pocas y concentradas en un punto. Otra forma de romper la tensión de la superficie es froto suavemente la hoja entre un dedo y el pulgar húmedo (French y Teddy, 1980).

Las suspensiones acuosas de esporas son esparcidas en gotas finas hasta un punto de rocío. Un pulverizador apto para una fuente de presión cerca de 1 a 1.5 kg/cm² provee una fina niebla propia para la inoculación de un gran número de plantas en invernadero o en campo, un pulverizador de pintura apto para una fuente de presión con un tubo de caucho largo alimentado bajo el depósito del inóculo (Dhingra y Sinclair, 1987).

2.8 Modelo logístico

El progreso de una enfermedad se puede analizar cuantitativamente de distintas maneras. El modelo logístico es probablemente el más importante para el análisis temporal de una aplicación extensa y apropiada para la descripción de muchas epidemias. El modelo es algunas veces referido como el modelo autocatalítico puede ser usado para describir el tipo de reacciones químicas (Cambell y Madden, 1990).

La ecuación diferencial para el modelo logístico puede escribirse como:

$$\frac{dy}{dt} = rLy(1-y)$$

Donde rL es la evaluación del parámetro con las unidades de tiempo⁻¹ y máxima igual a 1. El parámetro es conocido en la evaluación intrínseca en ecología. No es posible observar la cantidad total del tejido enfermo visual, porque no todo el tejido infectado puede haber pasado por un período de incubación, el tiempo desde la infección hasta la expresión del síntoma. Si el período de incubación es constante generalmente se puede

ignorar el cálculo de rL , así como el inóculo del inicio y la infección secundaria, es considerada el principal factor determinante en la epidemia. Cuando rL es constante la división de dy/dt versus t inicia el incremento, alcanza el máximo y declina a cero. La evaluación absoluta máxima donde ocurre el punto de inflexión en $y = 0.5$ o 50 % de la enfermedad. La división de dy/dt versus t es simétrica pero el punto es inflexible. La integración de la ecuación anterior resulta en

$$y = \frac{1}{1 + \exp[-(B + rLt)]}$$

Donde B es la integración de la constante. En este caso, B puede escribirse como $\ln [y_0/(1 - y_0)]$. Una expresión alternativa puede escribirse como:

$$y = \frac{1}{1 + \exp(-rLt)}$$

En donde B es entonces $(1 - y_0)/y_0$. El punto de y versus t es una forma de S o curva sigmoideal esto es simétrico cerca de $y = 0.5$ el tiempo en el que ocurre la infección es $-\ln [y_0/(1 - y_0)]/rL$. Para demostrar esto, dy/dt y y versus t son puntos. El máximo de dy/dt esta cerca de 0.062 y ocurre cerca de $t = 20$. En este tiempo y equivale a 0.5. La ecuación anterior puede ser linearizada para

$$\ln (y / (1 - y)) = \ln (y_0 / (1 - y_0)) + rLt$$

Los valores de $\ln [y/(1 - y)]$ son de aproximación negativa y de infinito positivo como el valor de y aproximados a 0 y 1, respectivamente. Para $y = 0.5$, $\ln [y/(1 - y)]$ es 0 (Cambell y Madden, 1990).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización del área de estudio

La presente investigación se realizó dentro de la Laguna de Zumpango en la parte correspondiente al Municipio de Teoloyucan, Edo. de México, comprendida entre los 19° 45' de Latitud Norte, 99° 11' 35" de Longitud Oeste. Con una altura promedio de 2285 m. s. n. m. Se caracteriza por presentar un clima templado subhúmedo con una temperatura mínima de 12.1°C, la media de 15.5°C y la máxima de 18.0°C. Presentando una precipitación anual de 632 mm (Fig. 3.1) (García, 1987).

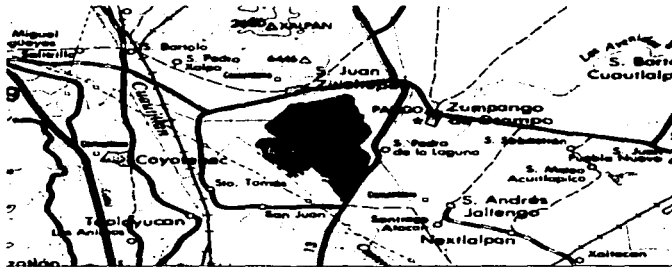


Fig. 3.1. Localización de la Laguna de Zumpango.
En el Municipio de Teoloyucan, Edo. de Méx.

3.2. Colecta de material vegetal

El punto de colecta se localiza en Teoloyucan Edo. de México, en los canales y la Laguna de Zumpango, en la zona donde desemboca el canal de aguas negras, ya que actualmente presenta una fuerte incidencia de maleza acuática principalmente lirio acuático y lentejilla, entre otras.

La identificación de las cepas fungosas asociadas con maleza acuática así como la

descripción de la sintomatología se realizó en material colectado a partir del 21-06-01, 12-07-01, 23-08-01 y 18-10-01, usándose como criterio la sintomatología presentada por la maleza. Las colectas se realizaron tomándose en cada una, de 2 a 10 muestras de material enfermo durante el período de investigación, dependiendo del número de muestras, la presencia de las enfermedades y de material enfermo en los cuerpos de agua, estos criterios se evaluaron de acuerdo a la apreciación de nuevos síntomas en campo.

3.3. Manejo para el material enfermo

- En el laboratorio se lavaron las hojas para evitar que saprobios u otros microorganismos pudieran confundirse con las muestras de hongos que se deban obtener.
- Se clasificaron los lirios por tipo de síntoma presentado.
- Se tomaron fotos de los síntomas encontrados en cada colecta.
- Se prensaron hojas con los diferentes síntomas para tener muestras del material colectado.
- De cada uno de los síntomas o manchas diferentes se sacaron dos muestras de 1 cm² de hoja dañada para poner en cámara húmeda con el método propuesto por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMyT) por 24 y 48 h. y otras muestras se sometieron a desinfección con solución de cloro al 1% por 3 minutos y se tomaron muestras a las 48 y 72 h. para determinar la presencia de patógenos que se presentaron por síntoma.
- El método de CIMMyT consiste en cortar material foliar enfermo para acomodar en cajas de petri previamente preparada con papel filtro y algodón, se humedece con agua esterilizada en papel filtro y se escurre el exceso de agua, las muestras se incuban de 24 a 48 h. a temperatura ambiente dentro de una bolsa de polietileno que actúa como cámara húmeda y usualmente los hongos patógenos esporularán a las siguientes 48 h. (Zillinsky, 1984).
- Cuando se obtuvo el crecimiento de los hongos en las cámaras húmedas se pasaron a cajas de petri con Papa Dextrosa Agar (PDA) para obtener el

crecimiento de las cepas de hongos.

- Al crecer las cepas de hongos se aislaron para obtener cepas puras de cada uno y hacer la descripción del síntoma y los hongos que ocasionan dicho daño, de las que se obtuvieron las muestras que se describen en los resultados, del presente trabajo.
- Se hicieron preparaciones de microcultivo para obtener las muestras fijas y facilitar la identificación de los patógenos aislados.

3.4. Microcultivo ó método de Riddell

- En un matraz de 250 ml se preparó medio litro de agua con 300 gr. de PDA.
- Con un mechero se calentó hasta obtener una mezcla homogénea.
- Se llenaron tubos de ensaye con agua corriente de 10 ml por tubo y se taparon con una borra de algodón forrada con gasa y sellada con cinta adhesiva, colocándolos en un vaso de precipitado, cubriéndolos con papel periódico y sellados con cinta adhesiva.
- En las cajas de petri se colocó un trozo de vidrio curvado, sobre este se colocaron un porta objeto y un cubre objeto, las cajas tapadas y preparadas se colocaron en porciones de 4 y se envolvieron en papel periódico, posteriormente se metieron a la autoclave con el matraz de la mezcla de PDA y los tubos con el agua, a una presión de 1.5 kg/cm² .
- Se vació en las cajas de petri el PDA con una capa aproximadamente de 1 cm para la preparación del microcultivo o método de Riddell .
- Cuando esta solidificando el PDA, se puso sobre el cubre objetos un cuadrito de 1 cm² (Figura. 3.2).
- Con una aguja de disección se tomó una porción del hongo de una caja con una colonia pura y debidamente etiquetado y se impregnó con esporas y micelio alrededor del cuadro de PDA, por arriba y por debajo.
- Se colocó el cubre objeto y se le puso el agua del tubo de ensaye esterilizada como se mencionó anteriormente.
- Preparandose un mínimo de 3 cajas para detener su crecimiento a las 12, 48 y

72 hs., y determinar a las cuantas horas ya esporuló el hongo.

- Cuando se detiene el crecimiento se prepara con azul de algodón Mezcla de lactofenol 67 mm, agua destilada 20ml y azul de algodón 0.1 g (López, 1979). Se coloca una gota, para que el microcultivo dure por mas tiempo y se pueda observar mejor el crecimiento del hongo.
- Al cumplirse el tiempo se destapó la caja de petri, se quitó con mucho cuidado el cubre objeto, se puso un porta objeto nuevo con una gota de la mezcla de lactofenol con el azul de algodón y se colocó el cubre objeto con el crecimiento del hongo hacia abajo y se sella con barniz de uñas alrededor del cubre objeto.
- Para el porta objeto igual se separó con mucho cuidado el PDA para no llevarse el crecimiento del hongo. Se puso una gota de lactofenol en el centro del crecimiento y se colocó un cubre objeto nuevo sellándose por último con barniz para uñas.

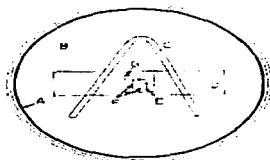


Fig. 3.2. Caja de petri para microcultivo; A) caja de petri; B, Agua; C, barra de cristal doblado; D) porta objeto; E) P. D. A.; F) inoculo; G) cubre objeto.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.5. Identificación de los hongos

Se utilizaron las descripciones de los hongos del Commonwealth Mycological Institute (C. M. I.). 1968, IMI. (1991) . Los libros de (Romero, 1988), (Barnett y Hunter. 1999) y (Neergaard, 1945) un microscopio compuesto y los microcultivos.

3.6. Pruebas de severidad mediante la inoculación del lirio acuático sano, con *Alternaria tenuis*

La inoculación del lirio acuático se hizo con base en los resultados obtenidos, se utilizó la técnica de inoculación de *Alternaria helianthi* en girasol, para probar la susceptibilidad al hongo, en el que probaron 1.5×10^3 conidios/ml (Asdrúbal *et al.*, 1988).

- Se colectaron 5 charolas de plantas de lirio acuático con más de 30 hojas sanas cada una, el 25 de julio del 2002
- Se dejó en el laboratorio por 5 días para observación, por si se desarrollaba algún patógeno.
- Se tomó una cepa pura de *Alternaria tenuis*, del 16 de Junio del 2002 y se le agregó 7 ml de agua para desprender los conidios.
- Con la cámara de Neubauer se midieron los conidios por mililitro que tenía la suspensión (ver uso de la cámara de conteo en el punto 3.8.).
- Escogiendo las hojas sanas para cada tratamiento, poniendo una etiqueta en cada hoja indicando el tratamiento y la repetición haciendo un total de 8 repeticiones por tratamiento.
- Se seleccionaron las hojas de lirio de los tratamientos con las mismas características de color, tamaño y edad, en cada repetición para tener mejor confiabilidad.
- De la suspensión se prepararon 4 diluciones de 1,500 (T1), 2,000 (T2), 2,500 (T3), 3,000 (T4) conidios/ml y el testigo con agua y el jabón Tween 20 al 0.5%, misma que se fue ajustando después de cada inoculación para la concentración adecuada de cada tratamiento.
- Las plantas se colocaron en el laboratorio que se desinfectó anteriormente con

cloro para evitar la contaminación o alteración de los resultados por otros factores no considerados. En el laboratorio la temperatura fue menos variable y menor que la del invernadero para obtener los resultados deseados, considerando que este hongo se presentó mayormente en las épocas de más frío de noviembre a febrero.

3.7. Uso de la cámara de conteo de French y Teddy (1980).

- Se preparó en agua una suspensión de los propágulos a contar, de mayor concentración que la deseada. Para evitar que los propágulos tiendan a permanecer unidos o aglomerados, se le agregó "Tween 20" a razón de 0.5% mezclado sin agitar. El volumen total original de concentración de conidios por ml fue considerado en el cálculo final.
- Se limpiaron las superficies de la cámara entre cada observación; enjuagándose con agua esterilizada, se limpió con un trozo de algodón impregnado de alcohol y se secó por contacto con papel absorbente y por último con papel limpiantes.
- Se tomó una alícuota pequeña del inóculo y se agregó un tinte vital concentrado (cotton blue) que tiñe las células vivas. El tinte facilita también la observación de células poco refractivas.
- Se colocó el cubre objetos especial sobre los rieles paralelos a ambos lados de la cámara, frotando ligeramente para conseguir buen contacto.
- Con una pipeta delgada se tomó una muestra de la suspensión y se aplicó a la ranura al centro del margen de una de las cámaras donde fue rápidamente absorbida por la fuerza capilar, se quitó a tiempo para que no entrara un exceso y rebasara en los bordes, lo que introduciría un factor de error.
- Se vació la pipeta y se repitió el proceso anterior para la cámara opuesta; se montó al microscopio y se ubicó el rayado de una de las cámaras con el objetivo de menor aumento, girando luego el revolver para mayores aumentos, se dejó transcurrir 2 minutos para que los propágulos se asentaran en el fondo de la cámara.
- Los propágulos fueron grandes, se usó el Cuadrado Principal (C. P.) central que está dividido en 25 cuadrados secundarios (C. S.) de 0.2 mm por lado, cada

uno de los cuales está dividido en 16 cuadrados menores de 0.05 mm por lado. Entonces la concentración se calculó de la siguiente manera

Número en el C. P. Central x 10,000 = número de conidios por ml.

- Se calculó el volumen final necesario para llevar la suspensión de propágulos a la concentración deseada en la forma siguiente.

Propágulos/(conidios/ml).

----- x volumen total original conidios/ml. = volumen final conidios/ml.
Propágulos/(conidios/ml) deseado.

3.8. Valoración del tercer postulado de Koch para *Alternaria tenuis*

- Del material enfermo que resultó de la inoculación se tomaron dos hojas por síntoma, se cortaron en cuadritos de 1 cm² y se pusieron en solución de cloro al 1% por tres minutos y se pasaron a papel secante previamente esterilizado.
- Se prepararon dos cajas de petri con PDA esterilizadas por cada síntoma y se colocaron tres cuadritos del tejido enfermo de 1cm² cada uno, por caja.
- Se sacaron los hongos que estaban presentes en cada cuadrito y se pusieron en cajas de petri con PDA para cada uno de los hongos encontrados y obtener la cepa pura.
- Posteriormente se prepararon cajas de microcultivo con cada hongo para su identificación.
- Con ayuda del microscopio compuesto y las claves de identificación se obtuvo el hongo que se inoculó en el PDA y que podría ser el causante del daño descrito en los resultados.

3.9. Aplicación del modelo logístico

La ecuación linealizada que se ocupó para el modelo es:

$$\ln (y / 1 - y) = \ln (y_0 / 1 - y_0) + rLt$$

Los valores de $\ln [y/(1 - y)]$ son de aproximación negativa y de infinito positivo como el valor de y aproximados a 0 y 1, respectivamente. Para $y = 0.5$, $\ln [y/(1 - y_0)]$ es 0.₂₆

Donde r_L es la evaluación del parámetro con las unidades de tiempo⁻¹ y y máxima igual a 1. Si el período de incubación es constante generalmente se puede ignorar el cálculo de r_L .

dy/dt se incrementan al incrementar y . Cuando r_L es constante la división de dy/dt versus t inicia el incremento, alcanza el máximo y declina a cero. La evaluación absoluta máxima donde ocurre el punto de inflexión en $y = 0.5$ o 50 % de la enfermedad. La división de dy/dt versus t es simétrica pero el punto es inflexible (Cambell y Madden, 1990).

3.10. Métodos de Wilcox *et al.*, (1997), para la discriminación de áreas sanas y afectadas en Photoshop (Knoll *et al.*, 2000) para la elaboración de las escalas de severidad

- Se digitalizó la imagen de la hoja en formato TIF, de la siguiente manera.
- En el procesador de imágenes se abre la imagen de la hoja.
- Se llena el fondo con color blanco puro.
- Con el pincel borrar la escala de medida.
- Reducir colores de la imagen con "Image - Adjust - Posterize."
- Con la imagen aumentada, seleccionar por rango de color, los colores que representan el área dañada.
- Llenar el área seleccionada de color blanco, con "Edit - Fill."
- Copiar el área seleccionada con "Edit - Copy."
- Deshacer la selección con "Control - D", y seleccionar todo con "Control - A."
- Llenar toda el área de color azul con "Edit - Fill", y deshacer la selección.
- Pegar la imagen de la hoja y manchas con "Control - V."
- Aplanar la imagen con "Layer - Flatten Image."
- Seleccionar el color blanco con selección por rango de color.
- Deseleccionar el fondo con "Magic Wand" y la tecla "Alt."
- Llenar las manchas seleccionadas con color rojo.
- Grabar la imagen en formato TIF, con nombre diferente al original.

3.11. Cálculo de áreas sanas y afectadas en porcentajes por Image Tool (Wilcox et al., 1997)

- Abrir la imagen con las áreas discriminadas en Image Tool.
- Transformar la imagen a blanco y negro con "Processing - Color to Grayscale." Se creará una imagen en grises. Se puede cerrar la imagen a color.
- Crear imagen que representa la totalidad de la hoja con "Processing - Treshold - Manual." Deslizar hacia la izquierda el manejador de rango que está sobre el número 255 para seleccionar en rojo toda la hoja. Elegir "OK" y se creará un archivo nuevo con una silueta (100%) de la hoja.
- Regresar a la imagen en grises para crear una imagen nueva que represente el área afectada, con "Processing - Treshold -Manual." Deslizar hacia la izquierda el manejador de rango que está sobre el número 255 para seleccionar en rojo toda la hoja. Luego deslizar hacia la derecha el manejador de rango que está sobre el cero para seleccionar en rojo las manchas. Elegir "OK" y se creará un archivo nuevo con las siluetas de las manchas. Se puede cerrar la imagen en grises.
- Abrir con el primer icono la ventana de resultados que está abajo a la izquierda y ajustar su tamaño para que permita ver las dos imágenes. No maximizaría, porque ocuparía toda el área de trabajo.
- Situarse en la imagen que representa a la hoja completa y contar su número de píxeles con "Analysis - Count Black/White Pixeles." En la línea 1 de la ventana de resultados, bajo "Black Count" aparece el número que representa al 100% de la hoja.
- Situarse en la imagen que representa a las manchas y contar su número de píxeles con "Analysis - Count Black/White Pixeles." En la línea 2 de la ventana de resultados, bajo "Black Count" aparece el número que representa al porcentaje del área afectada. Ignorar los valores que aparecen en las otras columnas de la tabla de resultados.
- Antes de repetir el procedimiento para otra hoja, anotar los datos y limpiar la tabla de resultados con "Edit - Clear Results."

3.12. Calibración para el cálculo de áreas sanas y afectadas en unidades métricas

- Para calibrar el software, abrir en Image Tool la imagen original, que contiene la escala de referencia de medida.
- Elegir "Settings - Calibrate Spatial Measurements," y dibujar sobre la escala de referencia una línea de longitud conocida. En la ventana que pregunta "How long is the line?" indicar las unidades que se están usando y la longitud de la línea de referencia. Terminar con "OK."
- Grabar la calibración con "Settings - Save Spatial Calibration."
- Cargar la calibración con "Settings - Load Spatial Calibration," y elegir "yes" en la ventana que pregunta "Do you wish to make this the default calibration?" Cerrar la imagen de la hoja.

3.13. Preparación para el cálculo de áreas

- En "Settings - Preferences - Object Analysis," marcar la caja que indica "Área" y quitar las marcas a todas las demás. Aceptar.
- En "Settings - Preferences - Find Object," marcar las opciones "Search Entire Image", "Manually Select Objects", "Show object count in a message box" y "Show object outlines on original image". Maximum # of objects: 100000. Quitar todas las otras marcas.
- Abrir con el primer icono la ventana de resultados que está abajo a la izquierda y ajustar su tamaño para que permita ver las imágenes que se van a trabajar. No maximizarla, porque ocuparía toda el área de trabajo.

3.13.1. Cálculo de áreas

- Abrir la imagen con las áreas discriminadas.
- Transformar la imagen a blanco y negro con "Processing - Color to Grayscale." Se creará una imagen en grises. Se puede cerrar la imagen a color.
- Seleccionar la totalidad de la hoja con: "Analysis - Object Analysis - Find

Objects - Manual - OK." Aparecerá el ajuste de Threshold. Deslizar hacia la izquierda el manejador de rango que está sobre el número 255 para seleccionar en rojo toda la hoja. Elegir "OK." En la siguiente ventana elegir "Select All" y luego "Done". Aparecerá una ventana indicando que se ha encontrado un objeto. Aceptar.

- Medir el área de la hoja con "Analysis - Object Analysis -." En la ventana de resultados aparecerán dos columnas; una indicando el número de objeto y la otra el área en cm, mm, etc. Anotar los datos, limpiar la tabla de resultados con "Edit - Clear Results," y situarse de nuevo en la imagen.
- Seleccionar las manchas en la hoja con: "Analysis - Object Analysis - Find Objects - Manual - OK." Aparecerá el ajuste de Threshold. Deslizar hacia la izquierda el manejador de rango que está sobre el número 255 para seleccionar en rojo toda la hoja. Luego deslizar hacia la derecha el manejador de rango que está sobre el cero para seleccionar en rojo las manchas. Elegir "OK." En la siguiente ventana elegir "Select All" y luego "Done". Aparecerá una ventana indicando el número de manchas encontradas. Aceptar.
- Medir el área de las manchas con "Analysis - Object Analysis -." En la ventana de resultados aparecerán dos columnas; una indicando los números de las manchas y la otra el área de cada una en cm, mm, etc. Anotar los datos, grabarlos o copiarlos. Limpiar la tabla de resultados con "Edit - Clear Results," cerrar la imagen y abrir la siguiente. Esta operación se hizo para todas las hojas que se evaluó el porcentaje de severidad siendo un total de 6 hojas.

3.14. Pruebas de seguridad mediante la inoculación de plantas cultivadas y malezas con *Alternaria tenuis*

- En un semillero se pusieron a germinar el 4 de Septiembre del 2002, 14 semillas por plantas de; frijol (*Phaseolus vulgaris*), Maíz (*Zea mays*) y las malezas malva (*Malva silvestre*), bidens (*Bidens pilosa*) y kicullo (*Penisetum clandestinum*).
- A los 20 días después de su siembra, cuando las plantas contaban ya con dos pares de hojas verdaderas se procedió a inocular.
- En el laboratorio se preparó el material para inocular, previamente esterilizado en

la autoclave por 15 min.

- Se preparó una caja con inóculo puro, a la que se le adicionó 7 ml de agua, pasándolo entonces a un matraz balón de fondo plano.
- Se hizo el conteo en la cámara de Neubauer para obtener la suspensión de 1500 conidios/ml para inocular, con jabón adherente Tween 20 al 0.5%.
- Se inocularon todas las plantas al mismo tiempo y se taparon con bolsas de polietileno por 4 días para dar las condiciones para que las esporas germinaran.
- Se dejaron las plantas en el laboratorio, sólo se les mantuvo el riego para evitar que se deshidrataran.
- A los 14 días después de la inoculación (ddi) se tomaron las plantas (maíz y frijol) que presentó algún signo de enfermedad, se pusieron en solución de cloro al 1% por tres minutos y se enjuagaron con agua esterilizada para quitar el exceso de cloro.
- Se pasaron a papel secante esterilizado y se colocaron en una caja con medio de cultivo PDA, tres cuadritos de 1 cm² cada uno por caja.
- Se separaron los hongos que se obtuvieron de cada cuadrito.
- Se prepararon en cajas de microcultivo, para obtener las muestras fijas.
- Con ayuda del microscopio compuesto se identificaron los hongos resultantes de estos síntomas, que se describen en los resultados.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Colectas de lirio por síntoma y patógeno causal

Se realizaron 5 colectas en las que se describieron los daños encontrados en cada una, por los diferentes síntomas y patógenos causales, se nombran por separado con las siguientes especificaciones:

4.1.1. Colecta realizada el 21 de junio del 2001

Mancha rayada en coloración café rojiza que se va extendiendo por las nervaduras hacia toda la hoja y en la parte del pedúnculo, asociada con *Alternaria tenuis* y *Fusarium sp.* (Figura 4.1-A).

De este síntoma se encontró muy poco material, sólo se colectaron dos hojas en el muestreo, no encontrando el daño en las siguientes colectas y podría decirse que es el mismo síntoma que describe Fernández, (1995) como puntos café rojizos ocasionados por *Cephalosporium sp.*

Tizón foliar de color café claro seguida por un halo café rojizo que a su vez está rodeado por un halo en tonalidades verde seco, terminando en café rojizo, con puntos café oscuro hundidos en la parte de la mancha en el pedúnculo, donde se une con la hoja, inicia en el borde y se extiende por las nervaduras llegando hasta el pedúnculo, extendiéndose hasta matar el tejido de la hoja, se pueden presentar una ó más manchas que se juntan, asociado con *Stemphyllium sp.* y *Alternaria tenuis* (Figura 4.1-B).

Tizón foliar de color verde seco al inicio y conforme avanza se torna en coloración café rojiza, que a su vez presenta puntos de color café en el centro y puntos negros abultados, la mancha se extiende en el borde de la hoja, asociado con *Alternaria tenuis* y *Fusarium sp.* (Figura 4.1-C).

Mancha ovalada o principalmente en forma de media luna. Presenta una coloración rojiza-anaranjada que se extiende a lo largo de la hoja por la nervadura con un halo amarillo bien definido. Se presentó como manchas alargadas o en franjas que se presentan en sentido de la nervadura de la hoja, iniciando en el ápice de la misma y culminando a la altura en donde se inserta con el peciolo. A medida que la mancha aumenta de tamaño, la coloración se vuelve más oscura (café oscuro). En ocasiones se puede llegar a romper el centro de la mancha. Sobre la hoja pueden ocurrir de 1 a 5 manchas que culminan con un amarillamiento total de la hoja. De este síntoma también se encontró muy poco en este tiempo, asociada a *Alternaria tenuis*, sin embargo, al inocular este hongo el daño son las manchas necróticas (Figura 4.1-D).

Este fue uno de los síntomas que se encontraron en menor cantidad en los meses de septiembre a octubre pero se encontró más de Noviembre a Febrero. Anteriormente se reporta el síntoma sin encontrar el patógeno causal y puede ser que el patógeno que se aisló sea el mismo que causa las manchas necróticas (Fernández, 1995).

Manchas irregulares o circulares de color café oscuro a casi negro hundidos con un halo amarillo se presentan cubriendo la lamina de la hoja, conforme la hoja envejece ocurre una coalescencia de manchas, se presentan en hojas jóvenes pero principalmente en adultas, asociada a *Alternaria tenuissima* (Figura 4.1-E). La mancha irregular o circular se presentó con mayor frecuencia pues en todas las colectas lo encontramos, un síntoma similar fue reportado por quienes lo determinaron como un daño causado por *Alternaria eichhorniae* (Naj Raj y Pannoppa, 1970) y la asociación del mismo síntoma a *Bipolaris* sp. y *Cylindrocladium* sp. (Zita et al., 2002).

4.1.2. Colecta realizada el día 12 de Julio del 2001

Tizón foliar dorado, café claro que rodea el borde de la hoja puede comenzar en cualquier parte del borde de la hoja, pero principalmente en el centro y se extiende hacia los lados y el centro hasta el pedúnculo, conforme avanza el tizón se va enroscando la hoja. Presenta puntos café más oscuros en toda la mancha y demás

partes de la hoja y pedúnculo, rodeado por una coloración café más oscura, asociado con *Alternaria tenuis*, *Pellicularia* sp, *Rhizoctonia* sp, *Fusarium*, *Stemphyllium* (Figura 4.1-F).

El tizón foliar dorado fue uno de los síntomas que más se encontraron en el transcurso de las colectas, sin embargo, en revisiones de los microorganismos que atacan al lirio no encontramos alguna descripción de este síntoma.

Manchas necróticas que están dispersas por toda la hoja. Comienzan con puntos de redondos a ovalados que van creciendo y a su vez se van juntando conforme avanza. La mancha se vuelve más oscura (negra), en algunas partes de la hoja presenta coloraciones amarillentas a café claro y provoca desgarre de tejido, asociada con *Alternaria* sp., *Alternaria tenuis* y *Rhizoctonia* (Figura 4.1-G).

Este síntoma se encontró en todas las colectas, los patógenos parecen ser muy agresivos puesto que en todo el año se presentan, es similar al punteado negro pero en este caso provoca un desgarre de tejido lo que puede diferenciarlo, Fernández (1995) ha reportado síntomas similares pero no se menciona el desgarre del tejido.

4.1.3. Colecta realizada el 21 de julio del 2001

Mancha necrótica se presentó en toda la hoja con puntos hundidos que fueron del café oscuro a negro, miden 0.5 mm a 1 mm tanto de largo como ancho. Este tipo de manchas normalmente esta asociado con la media luna, es ocasionado por *Alternaria tenuis* (Fig.4.1-H.).

Estos síntomas se encontraron en mayor cantidad en los meses de Noviembre a Febrero, meses que se visitó la laguna para evaluar si se seguían manteniendo los mismos síntomas. Fernández (1995) lo asocia al daño ocasionado por *Bipolaris* sp., también describe el síntoma sin amarillamiento de la hoja cuando el síntoma esta muy avanzado y lo asocia con *Cylindrocladium* sp., sin embargo, al inocular por tres veces el patógeno a lirio sano dos veces en invernadero y una en laboratorio se encontró que el

patógeno causal es *Alternaria tenuis*, podría decirse que puede deberse a una mala identificación del hongo en el caso de *Cylindrocladium* sp. Otro síntoma que se describe de puntos pequeños de café a negro que se presenta en hojas y peciolas ocasionado por *Cercospora rodmanii* (Arnold et al., 1990).

También se encontró el Tizón foliar asociado a *Stemphyllium* sp. y *A. tenuis*, la mancha de media luna asociado a *A. tenuissima* y el tizón foliar dorado *A. tenuis* y *Fusarium* sp. de la colecta realizada el 21-06-2002.

Tizón foliar que presenta una coloración dorada a café claro con un halo café oscuro casi negro, se presenta tanto en hoja como en el pedúnculo, pudiendo presentarse una o varias al mismo tiempo; se juntan hasta formar una coalescencia. A los 11 días el tizón ya había cubierto la mitad de la hoja, asociado con *Alternaria* sp., *Alternaria tenuis* y *Fusarium* sp. (Figura 4.1-1).

4.1.4. Colecta del 23 de Agosto del 2001

En esta colecta se encontraron los síntomas iguales al anterior, pero los síntomas que más se encontraron fueron las manchas necróticas asociadas con *Alternaria* sp., *Alternaria tenuis* y *Rhizoctonia*, siendo el hongo que provoca desgarre de tejido. Sólo se tomaron los síntomas pues el material se seco muy rápido por falta de luz y no se pudieron hacer muestras para determinar los patógenos.

4.1.5. Colecta del 18 de Octubre del 2001

Los síntomas de esta colecta se describieron previamente en la colecta del 21 de junio del 2001 y corresponden a: las manchas necróticas que provocan el desgarre del tejido asociada a *Alternaria* sp. *A. tenuis* y *Rhizoctonia* sp., mancha rayada asociada a *A. tenuis* y *Fusarium* sp., Mancha necrótica ocasionada por *A. tenuis*. De todas las anteriores los que presentaron una mayor incidencia fueron las manchas necróticas asociadas a *Alternaria* sp., *A. tenuis* y *Rhizoctonia* sp., de la colecta del 12 de julio del 2001 y las manchas irregulares asociadas a *A. tenuissima* de la colecta realizada el día

21 de junio del 2001 ya que se presentaron en todas las muestras de la Laguna de Zumpango y los canales. En éste caso la colecta se realizó en los canales debido al difícil acceso que se tenía a la Laguna de Zumpango, ya que fue destapado el canal de aguas negras llenándose más la Laguna.

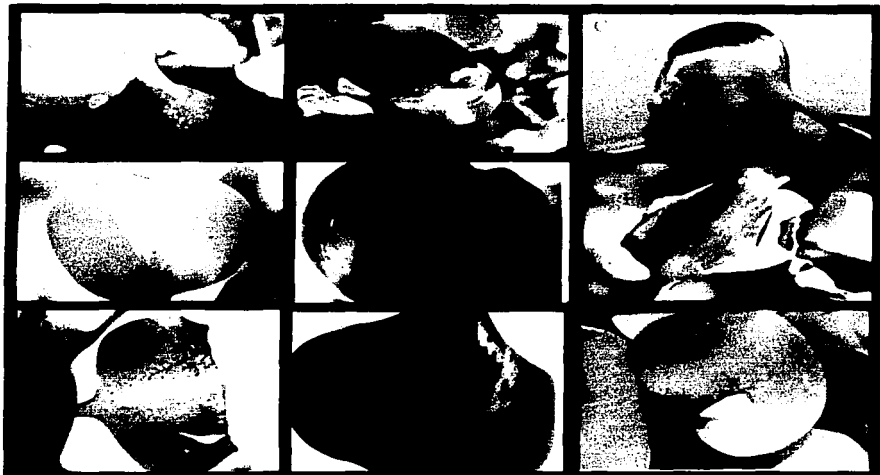
De cada género de hongo que se obtuvo, se analizó la posibilidad de ser utilizado como micoherbicida para el Lirio Acuático, sin que se causen problemas a otras plantas cultivadas, así como a la fauna de la Laguna, por la producción de alguna sustancia tóxica.

Dentro de los géneros que causan más daño a las plantas son *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Alternaria* sp. y en menor cantidad *Pellicularia* sp. y *Stemphyllium* sp. (Agrios, 1995; Romero, 1988; Finch, 1981; Smith et al., 1992; Barnett y Hunter 1999; Parry, 1990).

Sin embargo, se describen a *A. tenuis* y *A. tenuissima* como saprobios y se encuentran en materia orgánica y ocasionalmente puede causar daño en geranio y rosal (Barnett y Hunter, 1999). Pero el daño que ocasiona al lirio acuático es muy severo, por estos motivos se decidió usar a *A. tenuis*.

De los patógenos que se han utilizado como micoherbicidas son *Alternaria eichhorniae*, *Bipolaris stenospila*, *Cercospora rodmanii*, *C. piaropi*, *Acremonium* sp., *Fusarium roseum*, *Rhizoctonia* spp. (Freeman, 1976). *Puccinia chondrillina*, *Cercospora agaratinae*, *C. adenophorum* (Templeton y TeBeest, 1979). *Acremonium zonatum*, *Alternaria alternata*, *Bipolaris oryzae*, *Cercospora papiori*, *Marasmiellus inoderma*, *Mycrothecium roridum*, *Uredo eichhorniae* (Arnold et al., 1990). Sin embargo, del daño ocasionado por *Alternaria tenuis* no se encontraron referencias, tampoco se considera como agente de control biológico, por los resultados de este trabajo permiten considerarlo como un nuevo patógeno de lirio acuático con potencial micoherbicida.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



(Fig. 4.1). Daños en hojas de Lirio (*Eichhornia crassipes*) ocasionados por hongos A) Mancha rayada asociada a *Alternaria tenuis* y *Fusarium* sp.; B) Tizón foliar asociado a *Stemphylium* y *Alternaria tenuis*; C) Tizón foliar asociado con *Alternaria tenuis* y *Fusarium* sp.; D) Mancha ovalada o en forma de media luna asociada a *Alternaria tenuissima*; E) Mancha irregular daño asociado a *Alternaria tenuissima*; F) Tizón foliar dorado asociado a *Alternaria tenuis*, *Peltularia* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* y *Stemphylium*; G) Mancha necrótica asociada a *Alternaria* sp., *Alternaria tenuis* y *Rhizoctonia*; H) Mancha o puntado necrótico ocasionado por *Alternaria tenuis*; I) Tizón foliar asociado a *Alternaria* sp., *Alternaria tenuis* y *Fusarium* sp.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

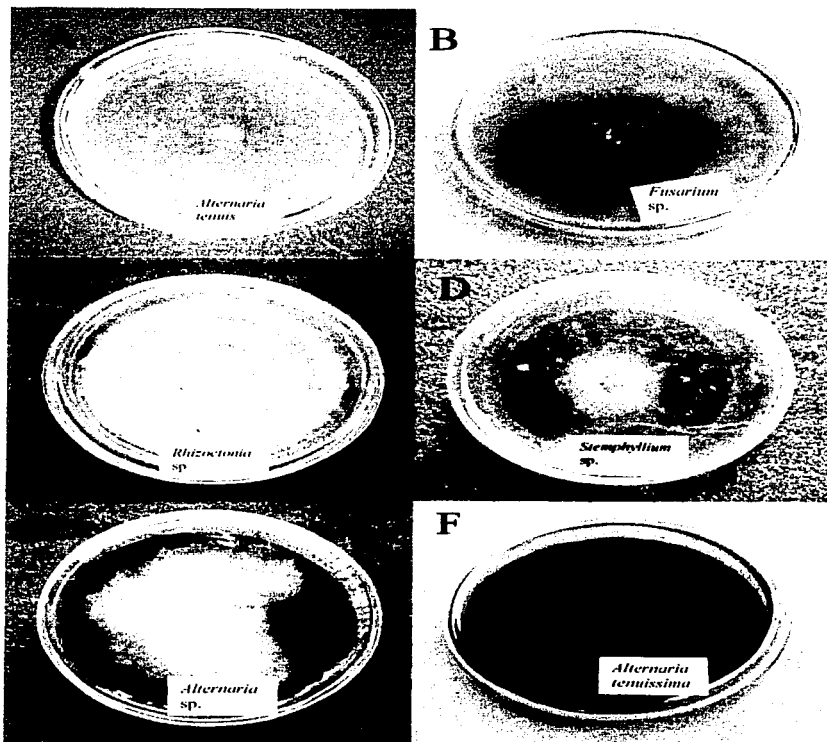


Fig. 4.2. Cajas de PDA con cepas puras de hongos: A) *Alternaria tenuis*, B) *Fusarium* sp., C) *Rhizoctonia* sp., D) *Stemphylium* sp., E) *Alternaria* sp., F) *Alternaria tenuissima*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.2. Descripción de los géneros de patógenos asociados al lirio acuático

En todos los casos las características de los hongos descritos, corresponden a los hongos aislados del lirio acuático e identificados de acuerdo a la siguiente morfología

4.2.1. *Fusarium* sp.

El género *Fusarium* sp. fue descrito usando las siguientes características: Conidióforos alargados en forma de botella, con ramas a intervalos regulares y verticiladas, septados, individuales y agrupados en esporodocios; conidios de dos tipos; 1) microconidios piriformes, unicelulares y bicelulares, no curvados, en cabezuelas y en cadenas; 2) macroconidios falcados, en forma de media luna, dos a nueve septos, ápice puntiagudo, roma en forma de gotero, base puntiaguda, roma en forma de pié; clamidosporas (Figura 4.2-B) (Romero, 1988).

4.2.2. *Alternaria* sp.

Esporas de color oscuro, con pico, obclaviformes, aunque pueden ser notablemente polimórficas, en cadenas, con pico, ramificados, según la especie; los conidióforos simples y ramificados, individuales y agrupados (Figura 4.2-E) (Romero, 1988).

4.2.2.1. *Alternaria tenuis*

Conidios en forma de cadenas largas (de 6 a 10 ó más conidios /cadena), con pico y sin pico. Conidios polimórficos, la mayoría con pico corto y septos longitudinales; saprófito obicuo o parásito benigno (Figura 4.2-A) (Romero, 1988).

4.2.2.2. *Alternaria tenuissima*

Conidios formados por la mayoría de las especies (5/7) en cadenas cortas (de 3 a 5 esporas por cadena); con pico relativamente corto. Conidios cónicos a ovales; el pico de tamaño casi igual al del cuerpo principal y frecuentemente con un hinchamiento terminal; saprófito obicuo (Figura 4.2-F) (Romero, 1988).

4.2.3. Rhizoctonia sp.

Fructificaciones asexuales y esporas sexuales ausentes; esclerocios café o negro, de forma variable, frecuentemente pequeños y no muy compactos, formados por filamentos miceliales y conectados a ellos; hifas del micelio cafés, con células grandes y ramas saliendo aproximadamente en ángulo recto (Figura 4.2-C) (Romero, 1988).

4.2.6. Stemphyllium sp.

Conidióforos oscuros, generalmente ensanchados en la parte terminal, cortos o largos, soportando un conidio terminal o un conidio con nuevos crecimientos, los conidióforos generalmente proliferan a través de una vieja marca conidial, conidios oscuros (porosporas), oblongos, esféricos, generalmente con tres septos transversales y de 1-3 septos longitudinales, granuloso y equinulado, de tamaño variable generalmente son parásitos o saprobios (Figura 4.2-D) (Barnett y Hunter 1999).

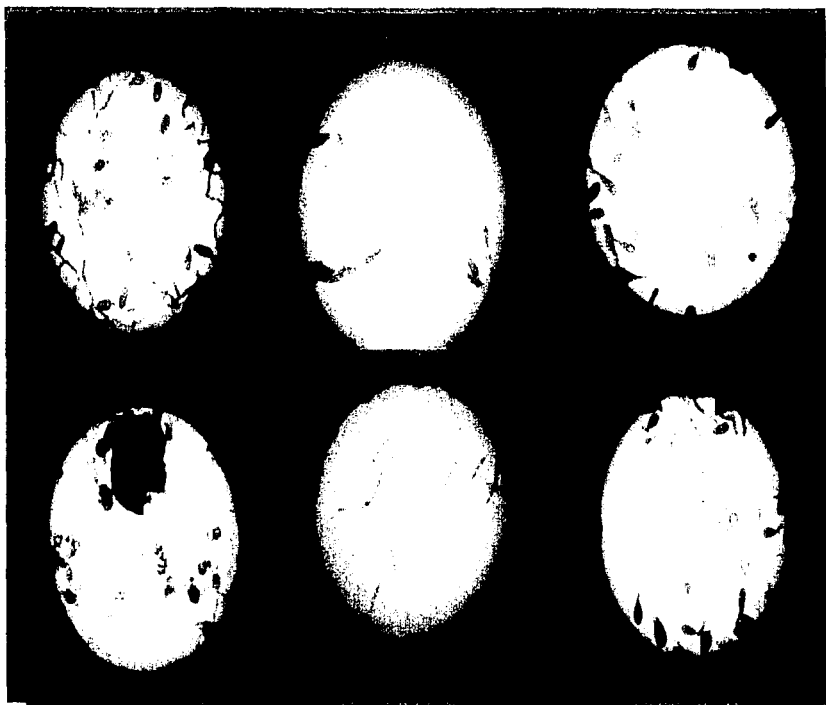


Fig. 4.3 Micelio y conidios de los hongos asociados al lirio acuático: A) *Stemphyllium* sp. B) *Alternaria tenuissima*. C) *Alternaria tenuis*. D) *Rhizoctonia* sp. E) *Fusarium* sp. F) *Alternaria* sp.

4.3. Inoculación del lirio acuático

Al inocular *Alternaria tenuis*, se obtuvieron los resultados deseados, pequeñas manchas necróticas o puntos negros que se presentaron en toda la hoja, iguales a los colectados en campo el 21 de Junio del 2001, que con el tiempo se juntan provocando un amarillamiento en la hoja y la posterior muerte del tejido. El hongo se presenta al cuarto día de haber sido inoculado y fue avanzando hasta los 38 días que la hoja se veía casi muerta.

Al hacer la comprobación del tercer postulado de Koch se determinó que el hongo que fue inoculado fue el mismo que se aisló.

4.4. Pruebas de severidad.

Debido a que no se encontró información sobre inoculación de *Alternaria tenuis*, se decidió hacer las pruebas de severidad con diferentes concentraciones de esporas basadas en el estudio realizado de las pruebas de patogenicidad en Girasol con *Alternaria helianthi* con una concentración de 1.5×10^3 conidios/ml (Asdrúbal *et al.*, 1988). En el caso de inoculación puede haber métodos que resulten inciertos puesto que no se sabe la cantidad de inóculo debido a que lo maceran en mortero y mezclan el micelio y los conidios se agrega un volumen 1:10 masa conidial/agua, pero no indica mucho para usar como referencia (Fernández, 1995). Otro caso, es el peso del inóculo con el medio de cultivo y con base en esto se sacó su dosis para inocular *Cercospora rodmanii* de 48 gm/m² y 6.34 gr/m² (Conway y Cullen, 1978).

Se inocularon esporas de *Alternaria tenuis* en hojas de lirio en una concentración de 1500 c/ml (T1), se seleccionaron las hojas que tuvieran las mismas características para cada repetición y con una saturación de humedad para asegurar la germinación de las esporas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las pruebas de severidad realizadas de *A. tenuis* en lirio acuático mostraron ser más agresivo el T1 ya que a los 32 días después de la inoculación (ddi) la planta detuvo su crecimiento al presentar el 60% de severidad y reproducción de biomasa, al hacer el análisis estadístico para ver el comportamiento de la epidemia en el T1 se definió a una R^2 de 87.07% lo cual es un nivel adecuado de confiabilidad, sin embargo, el modelo no se adapta a este tratamiento, por lo que se necesita aplicar otro análisis estadístico para este tratamiento, sin embargo, la mancha foliar del lirio avanza 0.14 punto porcentuales por cada dos días, a partir de la presencia de la enfermedad, siendo el más alto (figura 4.1). De los otros tratamientos, el T4 fue más confiable a este modelo puesto que presenta un índice de confiabilidad del 96.70% y la mancha foliar del lirio avanza 0.060 puntos porcentuales de incidencia por cada día, a partir de la presencia de la enfermedad, así como, el T2 que presentó un valor de R^2 de 97.31% y la mancha foliar del lirio avanza 0.10 puntos porcentuales de incidencia por cada dos días, a partir de la presencia de la enfermedad, el menos confiable fue el T1 ya que su porcentaje de confiabilidad fue de 87.07%. Sin embargo, aún en este nivel de confiabilidad podría considerarse adecuado (Figura 4.4 y 4.5).

Un aspecto importante es el tiempo en que el hongo detiene el crecimiento y reproducción del lirio, ya que a los 34 ddi y una cobertura del 60% de las manchas necróticas, la planta comienza a morir sin recuperación. Con lo anterior se podría asumir que se propicia un control adecuado, siendo factible el uso de *Alternaria tenuis* como microherbicida, sin embargo, sería conveniente verificar las pruebas de severidad para confirmar el mejor tratamiento en campo. En la utilización de *Cercospora rodmanii* y la combinación de *Neochetina* spp., se observó un control de 99% después de 7 meses en campo, lo que nos da una interrogante para probar *Alternaria tenuis* en campo y verificar el tiempo en el que detiene el crecimiento y producción en biomasa del Lirio acuático, puesto que en laboratorio es muy rápido (Arnold, 1990). Otra forma de controlar el lirio es el pH en un experimento para depurar purines de cerdo observó que con el pH arriba de 8 la planta necosaba y moría (Delgado, 1994). Se probó a *Neochetina bruchi* en Dique los Sauces,

Argentina en 80 has se logro un control de Lirio acuático del 95% en 6 años (Loach y Cardo, 1983). Las pruebas realizadas con *Neochetina eichhorniae* en la pera Hebbol, India en 20 has y en 30 meses tenía un control del 95% (Jayanth 1988).

En cuánto a incidencia, se obtuvo el 100% en las hojas inoculadas de lirio acuático, por lo que no se tuvo la necesidad de cuantificar.

Cuádro 4.1 Resumen de los análisis de regresión lineal para determinar la precisión y exactitud de los diferentes diagramas de severidad, generados a partir de regresión lineal.

Patosisistema	Modelo	R ² Signif.	Signif.	b0b1	Error STD b1
Epidemia1	YL=-3.91+0.14t	0.8707	0.0001	0.0001; 0.0001	0.01465
Epidemia2	YL=-4.34+0.10t	0.9089	0.0001	0.0001; 0.0001	0.00892
Epidemia3	YL=-4.01+0.06t	0.8897	0.0001	0.0001; 0.0001	0.00993
Epidemia4	TL=-4.01+0.06t	0.9670	0.0001	0.0001; 0.0003	0.00327

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

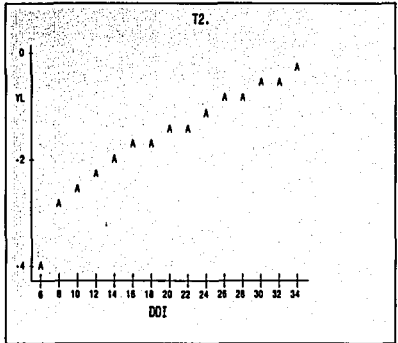
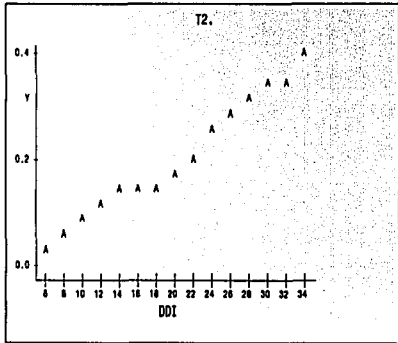
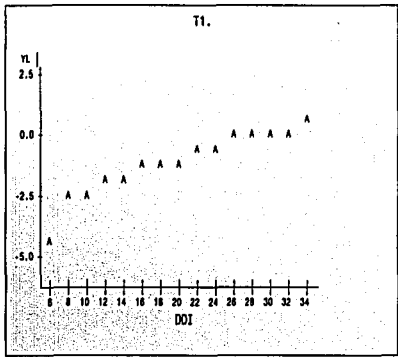
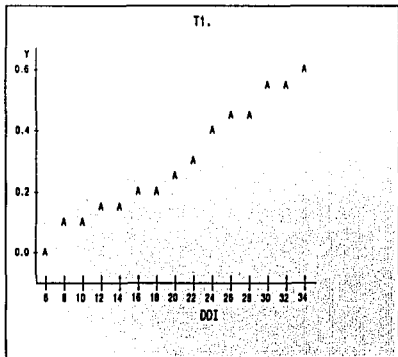
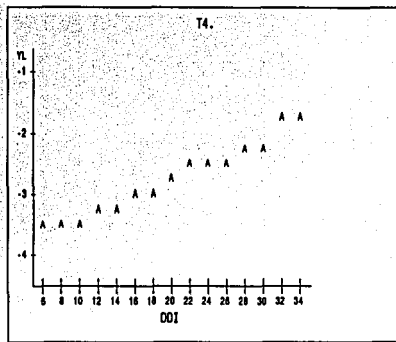
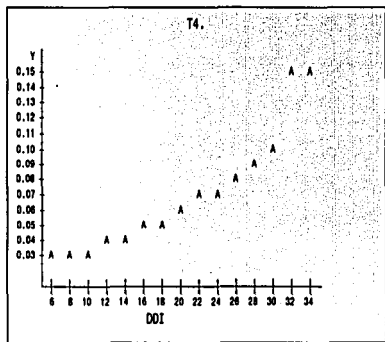
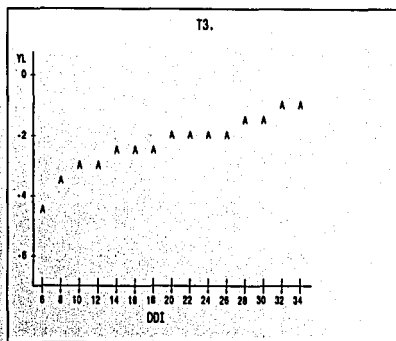
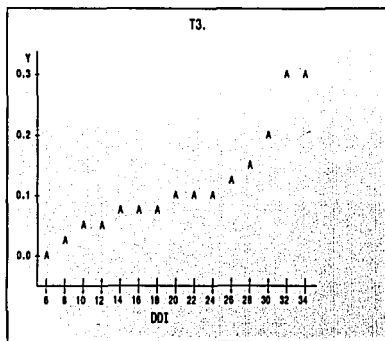


FIG. 4.4. Curvas de desarrollo de la enfermedad de acuerdo al modelo logístico linealizado que muestra los valores de Y y YL ajustada de los tratamientos T1 y T2 de la severidad con respecto al tiempo.



Gráficas 4.5. Curvas de desarrollo de la enfermedad de acuerdo al modelo logístico linealizado que muestra los valores de Y y YL ajustada de los tratamientos T3 y T4 de la severidad con respecto al tiempo.

4.5. Pruebas de Seguridad

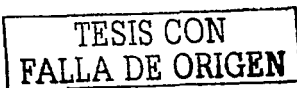
En la región se siembran cultivos de riego y temporal como son el maíz, frijol, calabaza, alfalfa, avena, cebada entre otros y las principales malezas los pastos, malva, quelites, bidens entre otros, por lo que se realizaron las pruebas de seguridad en los cultivos que se siembran en mayor cantidad y en las malezas que se encuentran con mayor frecuencia en las Zonas que se riegan con agua de la Laguna de Zumpango.

Las hojas de maíz presentaron el daño de una mancha de amarilla a café después que se inoculó *Alternaria tenuis*, pero las hojas que brotaron después no presentaron ningún daño, su crecimiento fue normal y vigoroso. Las hojas de frijol, presentaron una mancha blanca y la hoja se marchitó, pero los brotes de las nuevas hojas fue sano y vigoroso, no afectando su crecimiento normal. Las hojas de malva no presentaron ningún daño, su crecimiento fue normal en todo momento. En las hojas del Kicullo no se obtuvo ningún daño, los pastos crecieron, sin alteración alguna. Las plantas de bidens tampoco presentaron ningún daño.

Al realizar las pruebas de seguridad se pueden observar que los hongos no afectan al tejido joven de las plantas, sin embargo, en maíz se desarrollaron en las primeras hojas un tizón café dorado que se extendió por las nervaduras de las hojas en las que se inoculó, las hojas nuevas brotan sanas, el tizón está asociado con *Penicillium* sp. y de *A. tenuis*. Sin hacer la determinación del patógeno causal del tizón en las hojas inoculadas.

En el caso del frijol se presentaron manchas circulares hundidas de coloración blanco parduzco, están asociadas a *Mucor* sp. y *Penicillium* sp. y *A. tenuis*. Sin determinar el patógeno causal de las manchas circulares en las hojas inoculadas.

Las pruebas de seguridad realizadas por Conway y Freeman (1977), de *Cercospora rodmanii* en pepino, calabaza y espinaca, hasta la tercer aplicación y 3 semanas después se quemaron las hojas viejas de las plantas, al parecer la que presentó



más daño fue el pepino y se inoculó a parte con el lirio acuático fuera del invernadero y después de 3 semanas que se inoculó, solo el lirio acuático presentaba síntomas.



Fig. 4.6. Pruebas de seguridad en A) Brotes de frijol sanos. B) Daño en frijol. C) Brotes maíz. D) Daño en maíz. E) Alfalfa sana.

4.6. Escalas de severidad

Las escalas de severidad fueron elaboradas con base a la fórmula $K = 1 + 322 \log(n)$ y considerando el 60% como daño máximo, ya que el lirio acuático detiene su crecimiento y producción de biomasa, cuando el hongo ya abarcó dicho porcentaje Cuadro 4.2.

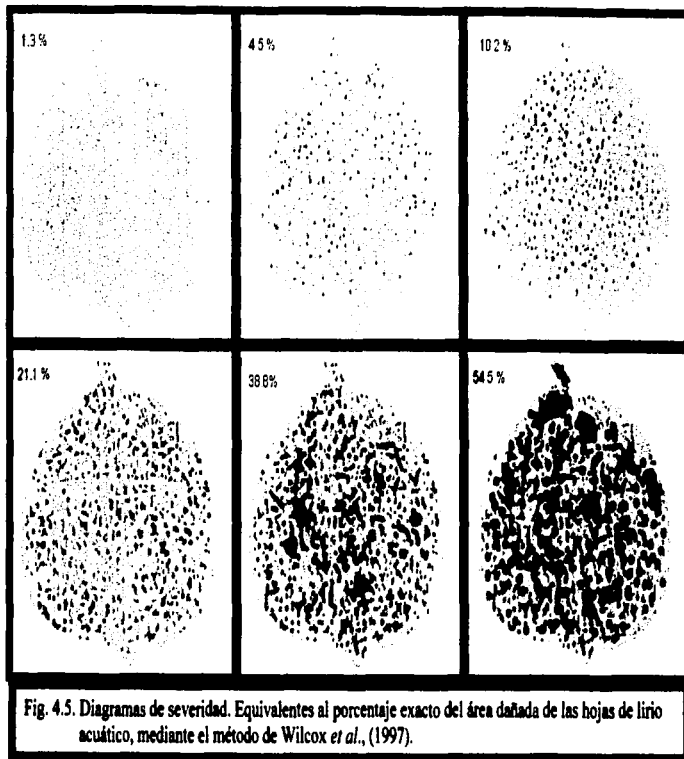
Cuadro 4.2. Escalas de severidad de *A. tenuis* Para lirio acuático. Por el método ajustado de Horsfall-Barratt, 1945.

clases	severidad	Media
0	0-0	0
1	0-2.73	1.3
2	2.73-6.36	4.5
3	6.36-14.13	10.2
4	14.13-28.48	21.3
5	28.48-49.09	38.8
6	49.09-60.00	54.5

4.7 Diagramas de severidad

Los diagramas de severidad sirven como referencia para identificar el porcentaje de severidad en las hojas que se van a evaluar, teniendo como margen de error la agudeza del ojo, por lo que se recomienda que la persona que haga las evaluaciones sea siempre la misma para que el margen de error sea el mismo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Realizando los diagramas de severidad en 6 clases, se hicieron al 60% puesto que cuando la enfermedad tiene un 60% de avance la planta detiene su crecimiento y producción de biomasa (Figura 4.5). Para la medición del avance de la enfermedad en lirio y al hacer evaluaciones en campo se pueda medir sin ningún problema sólo es cuestión de agudizar el ojo y el error será de la persona que evalúe, en muchos de los cultivos se han realizado diagramas de severidad y todos pueden ser diferentes, puesto que las enfermedades presentan un comportamiento distinto y dependiendo las plantas en las que se presenten, los diagramas para el tizón del sur del maíz, sólo lo hace para 1, 5, 25 y 50 % (Cambell y Madden, 1990), otro ejemplo son los diagramas del mildew polvoriento en cebada, con clases de 1, 5, 10, 25, 50 y 75% (Parry, 1990).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5. CONCLUSIONES

Se encontró un total de 4 géneros y 3 especies de *Alternaria*, de los cuáles únicamente se utilizó a *A. tenuis* como microherbicida.

Al hacer las inoculaciones se demostró que el hongo *Alternaria tenuis* detiene el crecimiento vegetativo y reproducción de lirio lo cual se presenta en mayor proporción a los 34 ddi y a los 50 ddi lo mata.

Las pruebas de seguridad mostraron que el hongo no afecta a los cultivos de maíz y frijol, tampoco a las malezas de la región, por lo que es recomendable inocular en campo para observar como afectan a los cultivos que se siembran en las cercanías a la Laguna de Zumpango, así como donde se utiliza esa agua para riego en parcelas de cultivos.

Con base en las pruebas de severidad así como seguridad se puede señalar que *Alternaria tenuis* presenta ventajas importantes para su uso como microherbicida.

Para su uso como microherbicida para control de Lirio acuático sería conveniente confirmar y verificar los resultados obtenidos a nivel de campo para poder dar una recomendación formal o extensiva de *Alternaria tenuis* como microherbicida.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. BIBLIOGRAFIA

- Agrios, G.N. 1995. Fitopatología. Ed. UTEHA. 2ª. Ed. México. D. F. 838 p.
- Arnold, H.P. 1990. Aquatic weeds the ecology and management of nuisance aquatic vegetation. Oxford Sci. Publi. United States. 593p.
- Asdrúbal, A.; Soto, P.E. y Tellechea, V. 1988. Ocurrencia de *Alternaria helianthi* sobre girasol en Venezuela. Fitopatol. Venez. 1(2):65-68.
- Ashton, P.J. y Steyn, D.J. 1981. Uso de herbicidas para el control de lirio acuático (*Eichhornia crassipes*). Water Sci. and Tech. 13(2): 865-882.
- Barnett, H.L. y Hunter, B.B. 1999. Illustrated genera of imperfect fungi. 4ª. Ed. Ed. The American Phytopathological Society. U.S.A. 218. p.
- Barrett, S.C.H. 1989. Waterweed invasions. Sci America. 264(4): 90-97.
- Blackburn, R.D. y Weldon, L.W. 1963. Suggested control measures for common aquatic weed of Florida. Hyacinth cont. J. 2:2-3.
- Body, C.E. y Sacarbrook, E. 1975. Influence of nutrients addition of water hyacinth *Eichhornia crassipes*. Netherlands. Aquatic Bot. 1(3)253-261
- Burnett, J.H. 1976. Fundamentals of mycology. Ed. Edward Arnold, 2ª ed. U.S.A. 673 p.
- Campbell C.I. y Madden. L. V., 1990, Introduction to plant disease epidemiology. Ed. John Wiley and Sons, United States of America. 532 p.
- Carlile, M.J. y Watkinson, S.C. 1994. The fungi. Academic Press. Great Britain, 588p.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Charudattan, R. y Conway, K.E. 1975. Comparison of *Uredo eichhorniae*, the water hyacinth rust, and *Uromices ponderiae*. University of Florida. Agric. Exp. Sta. Journal 67: 653-657.

Commonwealth Mycological Institute. 1968. Plant Pathologist's Pocketbook. Key Surrey England. 267 p.

Cooke, R.C. y Whipps, J.M. 1993. Ecophysiology of the fungi. Cambridge University Press. Great Britain. 233p.

Conway, K.E. 1975. *Cercospora rodmanii*, a new pathogen of water-hyacinth with Biological control potential. J. Botany. 54: 1079-1083.

Conway, K.E. 1976. Evaluation of *Cercospora rodmanii* as a biological control of water hyacinths. Pythopatology 66: 914-917

Conway, K.E. y Cullen, 1978. The effect of *Cercospora rodmanii* a biological control for wharhyacinth on the fish. Plant Pathology. 66(1-2): 113-116.

Conway, K.E. y Freeman, T.E. 1977. Host specificity of *Cercospora rodmanii*, a potential biological control of waterhyacinth. Plant Dis. Rep. 61(4): 262-266.

Croes, A.F. 1967. Induction of meiosis in yeast. I timing of cytological and biochemical, events. Plantae. 76: 209-226.

DeBrach, P. 1981. Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. Ed. Continental. 9 Ed. México. 949 p.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Delgado, M.M.; Bigeriego, M.; Water, I. y Guaediola, E. 1994. Optimization of conditions for the growth of water hyacinth in biological treatment. Rev. Int. Contam. Spain. 10(2):63-68.

Dhingra O. D. y Sinclair B.J. 1987. Basic plant pathology methods. ed. CRC Press. United States. 355p.

Fernández, M.A. 1995. Hongos asociados a (*Eichhornia crassipes*) como microherbicida potencial en el Valle de México. Tesis de Licenciatura, Ing. Agrícola. UNAM. Cuautitlan Izcalli. Edo. de México. 114 p.

Finch, 1981. Los hongos comunes que atacan cultivos en América Latina. Ed. trillas. México. 188 p.

Freeman, T.E. 1976. Biological control of aquatic weeds with plant pathogens. Aquat. Bot. Florida. 3:(276) 175-184.

French, R.E. y Teddy, T.H. 1980. Métodos de investigación fitopatológica, Ed. Lica. 287 p.

Gallagher, J.E. 1989. Chemical control, In: Trip report and assessment of aquatic weed problems in Colombia, S. A. Ed. in the corporation autonomic regional area of responsibility. Colombia. 226p.

García, E. 1987. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen. 4ª. Edición. Ed. Indianapolis. México. 218 p.

Gopal, B. 1987. Water hyacinth. Aquatic plant. Study 1. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. The Netherlands. 471 p.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gutiérrez, L. E. 1994. Control de malezas acuáticas en México. Ingeniería Hidráulica en México. IX(3): 15-34

Hasija, S.K., Miller, C.E. 1971. Nutrition of Chytriomycetes and its influence in morphology. Ann. J. Botany. 58: 939-944.

Hendrix, J.W. 1970. Sterols in growth and reproduction of fungi. Ann. Rev. Phytopathology. 8:111-130.

Horsfall, J. G. y Barratt. R. W. 1945. An improved grading system for measuring plant disease. Phytopatology. 35:655 (abstr.)

IMI. 1991. Descriptions of fungi and bacteria No. 1056, Mycopathologia 115: 141-142.

Jayanth, K.P. 1988. Successful biological control of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) by *Neochetina eichhorniae* (Coleoptera, Curculionidae). Tropical pest. Management. In Bangalore, India. 34(3):263-266

Julien, M.H. y Griffiths, M.W. 1992. Biological control of weeds: a world catalogue of agents and their target weeds. 4th Ed. CABI Publishing, Oxon, 186p.

Knoll, T.; Ham, B.M.; Pawliger, M.; Shaefer, S.; Sautam.; Gauthier, K.; Ault, J.; Bartell, J.; Byer, S.; Chien, J.; Cohen, S.; Cox, C. y Todor, G. 2000. Adobe 6.0. Systems incorporated marks of adobe. Systems incorporated for Windows. USA.

Lallana, V.S. 1989. *Eichhornia crassipes* waterweed invasions. Sci. America 264(4): 90-97.

Lindow, S.E. y Webb, R.R. 1983. Quantification of foliar plant disease symptoms by microcomputer-digitized video image analysis. Phytopatology 73: 520-524.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Loach, C.J. y Cardo H.A. 1983. Control of water hiacinth by *Neochetina bruchi* (coleotera; cuculionidae). Environ. Entomol in Argentina. 12:19-23

López, A.G. 1979. Manejo de hongos fitopatógenos. UACH. Chapingo, México, 135 p.

Lugo, A.E.; Jones, S.A.; Dugger, K.R. y Morris 1979. Ecological approaches to the Control of Aquatic Weeds. Geo. Eco. Top. 3: 193-213

Mariaca, M.R. 1984. Alelopatía factor presente por la adición de lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) como cobertura en la siembra de hortalizas. Tesis. Colegio Superior de Agricultura Tropical. Cárdenas Tabasco, México, D. F. 95 p.

Mitchell, D.S. 1978. Aquatic weeds in Australia Inland waters. Department environmental and Community Development. Australian Government Publishing Service. Camberra, Australia. 189 p.

Moore-Landecker, E. 1990. Fundamentals of the fungi. 3ª. Ed. Prentice Hall. USA. 561 p.

NagRaj, T.R. y Pannoppa, K.M. 1970. Blight of water-hyacinth caused by *Alternaria eichhornie* sp. nov. Commonwealth Institute of Biological Control, India Station. Trans. Br. Mycol. Soc. Bangalore 55(1): 123-130.

Neergaard, P. 1979. Seed pathology. MacMillan Press Ltd. 4ta. Ed. New York. 1191 p.

Neergaard, P. 1945. "Especies danesas de *Alternaria* y *Stemphyllium*". Copenhagen: Einar Munksgaard. 562.

Nitimargi, N.M. 1973. Studies in the genera *Citosporina*, *Phomopsis* y *Diaporthe*. VII. Chemical factors influencing sporing characteristics. *Ann. Botany*. London. 49:19-40.

Parry, W. D. 1990. Plant pathology in agriculture. Ed. Cambridge University Press, New York, U.S.A., 385 p.

Peréz, P.A., Aguilar, Z. J.A. y Andrade D.B. 1995. Control biológico del lirio acuático en el distrito de riego 010, Culiacan-Humaya-San Lorenzo, en Sinaloa. C.P.C.A., México, 64p

Rice, L.E. 1995. Biological the weeds and plant diseases advances in applied allelopathy. University of Aklahoma Press. U.S.A. 439 p.

Riemer, 1984. Introduction to freshwater vegetation. The VI Publishing Company, INC., Westport, Connecticut, U.S.A. 207 p.

Rodríguez, D.T. M. 1982. Plantas nocivas y como combatirlas. Control de plagas de plantas y animales Vol. II, Ed. Limusa. México. 574 p.

Romero, C.S. 1988. Hongos Fitopatogenos. Ed. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 347 p.

Smith, S.E., Bruhn, J. N. y Anderson, J.B. 1992. The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. *Nature* 356: 428-431.

Stevens, K.L., Badar, U.D., Ashfaq, A. y Mushtaq, A. 1979. The antibiotic bostrycin from *Alternaria eichhorniae*. Western research center. Science and education administration. *Phytochemistry*. 18: 1579-1580.

TeBeest, O.D. 1991. Microbial control of weeds. Ed. Chapman and Hall. New York. London. 284 p.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Templeton, E.G. y TeBeest, O.D. 1979. Biological weed control with mycoherbicides. Department of agricultural research. Science and Administration agricultural research. Phytopathol. 3712(17): 301-10

Thaye, D. y Ramey. 1986, Mechanical harvesting of aquatic weeds, Florida Department of Natural Resources. Technical Publicación Tallahassee, Florida USA.

Viswanath-Reedy, M. y Turian, G. 1975 Physiological changes during protoperithetrispora. Arch. Microbial. 90:365-374.

Wicklow, D. y Malloch, D. 1971. Studies in the genus *Theobolus*: Temperature optima for growth an Ascocarp development. Mycologia 63:118-131.

Widyanto, S.L. 1975, Studies on the growth and control of waterhyacinth (*Eichhornia crassipes* Mart. Solms). Jth conference, Asian-Pacific Weed Science Society. Indonesia. 430 p.

Wilcox, D., B. Dove, D. McDavid, and D. Greer. 1997. Image Tool for windows. version 1.28. The University of Texas Health Science Center in San Antonio.

Zillinsky, F.J. 1984. Guía para la Identificación de enfermedades en cereales de grano pequeño. CIMMYT. EL Batán. México 141 p.

Zita, P. G, Espadas, R.M, Martínez, V.A. 2002. Phytopatogen fungi in aquatic weeds in México, en memoria del 11th international EWRS symposium on aquatic weeds. En molets et Ma. Landes Francia.

Zadoks, J. C., y Schein, R. D. 1979. Epidemiology and plant disease management. Oxford. New York. 427 p.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN