



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DIVISIÓN DE CIENCIAS FORESTALES

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

**BIOCONTROL DE *Fusarium circinatum* EN PLÁNTULAS DE
*Pinus devoniana***



TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

presenta:

ORTEGA CERÓN MARÍA ALEJANDRA



Bajo la supervisión de: **ELIZABETH HERNÁNDEZ ACOSTA DRA.**



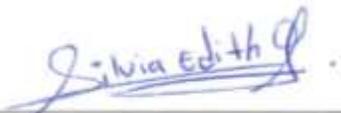
Chapingo, Estado de México, diciembre de 2022

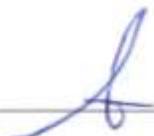
BIOCONTROL DE *Fusarium circinatum* EN PLANTULAS DE *Pinus devoniana*

Tesis realizada por **ORTEGA CERÓN MARÍA ALEJANDRA** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

DIRECTOR: 
Dra. Elizabeth Hernández Acosta

ASESOR: 
Dra. Silvia Edith García Díaz

ASESOR: 
Dr. Antonio Villanueva Morales

CONTENIDO

CONTENIDO	i
LISTA DE CUADROS.....	v
LISTA DE FIGURA.....	vi
ABREVIATURAS USADAS	viii
DEDICATORIA	ix
AGRADECIMIENTOS	x
DATOS BIBLIOGRAFICOS	xi
RESUMEN GENERAL	xii
GENERAL ABSTRACT	xiv
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Antecedentes.....	3
1.2 Justificación	3
1.3 Objetivos.....	4
1.4 Hipótesis.....	4
1.5 Contenido capitular del documento de titulación	5
1.6 Literatura citada.....	6
CAPITULO 2. MARCO CONCEPTUAL Y DE REFERENCIA.....	8
2.1 Marco conceptual	8
2.1.1 Deforestación	8

2.1.2 Reforestación	8
2.1.3 Vivero forestal	9
2.1.4 Calidad de planta	9
2.1.5 Sustrato	10
2.1.6 Sanidad	13
2.1.7 Hongos fitopatógenos.....	14
2.1.8 <i>Fusarium circinatum</i> Niremberg & O'Donnell	15
2.1.9 Control de la secadera	16
2.1.10 <i>Trichoderma harzianum</i>	17
2.2 MARCO DE REFERENCIA	19
2.3 Literatura citada	20
CAPITULO 3.....	23
Biocontrol de <i>Fusarium circinatum</i> en plántulas de <i>Pinus devoniana</i> sembrados en dos sustratos diferentes.....	23
Biocontrol of <i>Fusarium circinatum</i> in <i>Pinus devoniana</i> seedlings planted in two different substrates.	23
3.1 Aspectos destacados.....	23
3.2 RESUMEN.....	24
3.3 ABSTRACT.....	25
3.4 Introducción	26
3.5 Materiales y métodos.....	27
3.5.1 Área de estudio.....	27
3.5.2 Diseño experimental y análisis estadístico.....	27

3.5.3 Contenedores a emplear.....	28
3.5.3 Sustratos y semilla	28
3.5.4 Curva de crecimiento de <i>Pinus devoniana</i>	28
3.5.5 Obtención de cepas de hongos	28
3.5.6 Aislamiento, purificación y conservación de <i>Fusarium circinatum</i>	30
3.5.7 Caracterización morfológica.....	31
3.5.8 Prueba de Incidencia y severidad de <i>Fusarium circinatum</i> en plántulas de <i>Pinus devoniana</i>	32
3.5.9 Variables a evaluar	33
3.5.10 Estándares e índices morfológicos.....	33
3.5.11 Extracción de plántula	34
3.6 Resultados.....	35
3.6.1 Curva de germinación de <i>Pinus devoniana</i>	35
3.6.2 Prueba de Incidencia y severidad de <i>Fusarium circinatum</i>	36
3.6.3 Efecto de <i>Trichoderma harzianum</i> y tipo de mezcla sobre la Incidencia de <i>Fusarium circinatum</i> a las 2 semanas de evaluación	38
3.6.4 Severidad de <i>Fusarium circinatum</i> a las 29 semanas de evaluación..	41
3.6.5 Identificación morfológica.....	41
3.6.6 Calidad de planta	44
3.7 Conclusiones	47
3.8 Reconocimientos	47
3.9 Declaración de conflictos de interés	47
3.10 Referencias bibliográficas	47

CAPITULO 4	51
Efecto de N, P y K en sustrato sobre la patogenicidad de <i>Fusarium circinatum</i> en plántulas de <i>Pinus devoniana</i>	51
Effect of N, P, and K in the substrate on the pathogenicity of <i>Fusarium circinatum</i> in <i>Pinus devoniana</i> seedlings	51
4.1 Aspectos destacados.....	51
4.2 RESUMEN.....	52
4.3 ABSTRACT.....	53
4.4 Introducción,	54
4.5 Materiales y métodos.....	55
4.5.1 Área de estudio	55
4.5.2 Diseño experimental	55
4.5.3 Recolección de muestras.....	56
4.5.4 Preparación de la muestra	56
4.5.5 Pesado de muestras para análisis	57
4.5.6 Análisis de pH en agua	57
4.5.7 Evaluación de Nitrógeno inorgánico extraíble.....	57
4.5.8 Determinación de Fósforo extraíble en suelos neutros y alcalinos (OLSEN).....	58
4.5.9 Determinación de Fósforo extraíble en suelos neutros y ácidos (BRAY)	60
4.6 Resultados.....	62
4.7 Conclusiones	70

4.8 Reconocimientos	70
4.9 Declaración de conflictos de interés	71
4.10 Referencias bibliográficas	71
CAPITULO 5	
CONCLUSIONES GENERALES	72

LISTA DE CUADROS

Capítulo 3

Cuadro 1. Identificación de tratamientos establecidos en el experimento.....	30
Cuadro 2. Incidencia de la enfermedad por <i>Fusarium circinatum</i> en plántulas de <i>Pinus devoniana</i> de 9 meses de edad.....	38
Cuadro 3. P-valores asociados al análisis de varianza para incidencia entre tratamientos.....	40
Cuadro 4. Comparación de medias por aplicación de <i>Trichoderma</i> <i>harzianum</i> para incidencia.....	41
Cuadro 5. Valores de severidad por tratamiento.....	41
Cuadro 6. Valores obtenidos para análisis de correlación Pearson entre incidencia y severidad con P-valor de <0.0001.....	42
Cuadro 7. Sinopsis morfológica de las características observadas en las preparaciones permanentes del crecimiento de <i>Fusarium circinatum</i>	43
Cuadro 8. Índice de Calidad de Dickson para cada tratamiento.....	46
Cuadro 9. P-valores asociados al análisis de varianza para índice de calidad de Dickson entre tratamientos	47
Cuadro 10. Comparación de medias por mezcla de sustrato para índice de calidad de Dickson.....	47

Capítulo 4

Cuadro 1. Metodología para realizar la curva para análisis de fósforo extraíble por el método OLSEN	59
Cuadro 2. Procedimiento de muestras para análisis de fósforo extraíble en suelos neutros y ácidos por el método OLSEN	60

Cuadro 3. Metodología para realizar la curva para análisis de fósforo extraíble por el método BRAY	61
Cuadro 4. Procedimiento de muestras para análisis de fósforo extraíble en suelos neutros y ácidos por el método BRAY.....	61
Cuadro 5. Compilación de concentraciones de cada elemento obtenidas para cada tratamiento	63
Cuadro 6. Resultados de incidencia obtenidos en el capítulo 3 del presente trabajo.....	63
Cuadro 7. P-valores asociados al análisis de varianza para Nitrógeno entre tratamientos	65
Cuadro 8. Comparación de medias por sustrato para Nitrógeno.....	65
Cuadro 9. Comparación de medias por interacción de sustrato y aplicación de <i>Trichoderma harzianum</i> para Nitrógeno.....	66
Cuadro 10. P-valores asociados al análisis de varianza para Fósforo entre tratamientos.....	67
Cuadro 11. Comparación de medias por mezcla de sustrato para Fósforo.....	67
Cuadro 12. P-valores asociados al análisis de varianza para Potasio entre tratamientos	69
Cuadro 13. Comparación de medias por mezcla de sustrato para Fósforo	69

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 3

- Figura 1. Crecimiento, desarrollo y esporulación de *Fusarium circinatum* en medios de cultivo PDA, SNA y CLA..... 31
- Figura 2. Clases utilizadas para la evaluación de severidad aparente, se clasificó de acuerdo a los grados de infección mostrados en la plántula, siendo:
Clase 0 = 0%; Clase 1 = 20%, Clase 2 = 40%,
Clase 3 = 60%, Clase 4 = 80% y Clase 5 = 100%.....33
- Figura 3. Germinación acumulada en la semilla de *Pinus devoniana* a los 35 días de edad.....35
- Figura 4. Colonia con crecimiento micelial color purpura a partir de los aislados de plántulas con síntomas monitoreados.....36
- Figura 5. Síntomas observados en plántulas de *Pinus devoniana*:
A) Pudrición a nivel de cuello, B) Acículas cloróticas y retorcidas y doblamiento de puntas, C) Muerte descendente de plántula.....37
- Figura 6. Comparación de incidencia de *Fusarium circinatum* entre tratamientos inoculados con las diferentes formas de aplicación de *Trichoderma harzianum* en mezcla 1 de sustrato.....39
- Figura 7. Comparación de incidencia de *Fusarium circinatum* entre tratamientos inoculados con las diferentes formas de aplicación de *Trichoderma harzianum* en mezcla 2 de sustrato.....39

Figura 8. Comparación de severidad entre tratamientos.....	42
Figura 9. Características macro y microscópicas de <i>Fusarium</i> <i>circinatum</i> : A) Micelio algodonoso color purpura, B) Comparación de micelio en tres medios (PDA, ASN y CLA), C) Formación de esporodoquios de color naranja pálido, D) Monofialides y polifialides de los microconidios, E) Macroconidios alantoides con la célula basal poco desarrollada, F) Microconidios en falsas cabezas, G) Circinas	44
Figura 10. Comparación de Índice de Calidad de Dickson entre tratamientos	46
CAPITULO 4	
Figura 1. Comparación de concentraciones de macronutrientes por tratamiento	63
Figura 2. Comparación de concentraciones de Nitrógeno por tratamiento	65
Figura 3. Comparación de concentraciones de Fósforo por tratamiento	67
Figura 4. Comparación de concentraciones de Potasio por tratamiento	68

ABREVIATURAS USADAS

PDA	Papa dextrosa agar
SNA	Agar sintético nutritivo
CLA	Agar con clavel
ICD	Índice de Calidad de Dickson
N	Nitrógeno
P	Fósforo
K	Potasio
Fc	<i>Fusarium circinatum</i>
Th	<i>Trichoderma harzianum</i>
S1	Turba de musgo + Agrolita + Vermiculita.
S2	Aserrín de pino (de no más de 15 días de aserrado) + Corteza de pino (compostada) + Turba de musgo.
Ufc	Unidades formadoras de colonias
T	Tratamiento

DEDICATORIA

A mi padre, quien es mi guía, mi gran apoyo y quien me hace sentir segura en todo momento y a mi madre, mi mejor amiga, mi confidente y cómplice, a ambos agradezco todo el amor, confianza y apoyo que me brindan día con día y el valioso ejemplo inculcado de que todo objetivo se puede alcanzar con esfuerzo, dedicación y perseverancia.

A mi hermano, quien desde el día de su nacimiento se convirtió en mi mayor motivación para salir adelante, él que me da el valor y la fuerza para no rendirme y superar mis miedos por imposible que eso parezca, quien alegra cada día que pareciera ir mal y, sobre todo, quien me enseñó que las únicas limitaciones que existen son las que se impone uno mismo.

A Rayzon, mi fiel compañero quien fue parte fundamental para que yo retomara este camino, el único que paso horas a mi lado haciéndome compañía desde el inicio hasta culminar este proyecto.

A Adrián López López, a quien agradezco su amor, comprensión y apoyo incondicional durante toda esta etapa, por impulsarme a ser mejor cada día y alcanzar mis objetivos, y por estar a mi lado en cada momento difícil que parecía interminable devolviéndome el ánimo para continuar.

A mi familia, por cada palabra y gesto de amor con que me demostraron su apoyo incondicional y me impulsaron a continuar con mi preparación, y aunque algunos ya no están conmigo, llevo sus enseñanzas grabadas en el fondo de mi corazón.

A mis amigos Hugo Ontiveros y Cesar Cruz, por apoyarme personal y académicamente en todo momento y por hacer más alegre esta etapa.

AGRADECIMIENTOS

Al fondo sectorial CONACYT y a la Universidad Autónoma Chapingo por permitirme pertenecer a esta casa de estudios y por el apoyo para obtener el grado de maestro en ciencias en ciencias forestales.

Al proyecto A-S-67865 del Fondo Sectorial CONAFOR-CONACYT, titulado “Monitoreo, evaluación de daños, manejo preventivo y control de la secadora y pudrición de raíz causados por *Fusarium spp.*, y las moscas fungosas *Bradysia* y *Lycoriella*”.

A la Dra. Elizabeth quien dirigió esta investigación y siempre mostró compromiso en ella, pero, sobre todo por el apoyo y comprensión para conmigo haciendo esta etapa más amena y tranquila.

A la Dra. Silvia Edith quien fue guía e impulso desde la postulación a la maestría hasta el día de hoy, y por el apoyo brindado tanto en el ámbito académico como en el personal.

Al Dr. Antonio por el gran apoyo y disposición que nos brinda no solo como asesor, sino también como profesor.

A Hugo Ontiveros Palma e Irais Johanna Espinoza por su gran apoyo y guía durante la etapa experimental de este proyecto, así como por la paciencia que tuvieron conmigo y sus enseñanzas.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Ortega Cerón María Alejandra

Lugar de nacimiento: Texcoco, Estado de México, México

Profesión: Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola



Desarrollo Académico

Bachillerato: Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo (2010-2015)

Ingeniería: Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo (2015-2019)

Maestría: Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México

RESUMEN GENERAL

BIOCONTROL DE *Fusarium circinatum* EN PLÁNTULAS DE *Pinus devoniana*

BIOCONTROL OF *Fusarium circinatum* IN SEEDLINGS OF *Pinus devoniana*

En la actualidad uno de los problemas más relevantes en viveros forestales, es la presencia de enfermedades que disminuyen la producción de planta y afectan su calidad, una de las más importantes es conocida como “Secadera” causada por el hongo *Fusarium circinatum* para la cual se han tenido que buscar estrategias de control y manejo que disminuyan la incidencia y severidad. El objetivo de este trabajo de investigación, fue evaluar alternativas que permitan aminorar la incidencia de este patógeno y favorezcan la calidad de planta. Se estableció un experimento durante 9 meses en el invernadero de la División de Ciencias Forestales de 12 tratamientos en arreglo factorial con diseño completamente al azar (2x3x2) donde se analizó la incidencia y severidad en dos mezclas de sustratos; uno con 60% de turba de musgo, 20% de agrolita y 20% vermiculita; y el segundo 60% de aserrín de pino, 20% de corteza de pino y 20% de turba de musgo, la forma de aplicación de *Trichoderma harzianum* (al sustrato, a la semilla y testigo), y la presencia o ausencia del patógeno; además, también se evaluó la concentración de macronutrientes (N, P y K), Los resultados señalan que la colonia inoculada fue positiva al ser patogénica y al obtener los síntomas de marchitamiento, las características morfológicas coinciden con las descritas para *Fusarium circinatum*. La patogenicidad de *Fusarium circinatum* disminuyó significativamente en aquellos tratamientos donde se aplicó *Trichoderma harzianum* directamente al sustrato, y en la mezcla a de aserrín, corteza de pino y turba de musgo, y fue en esta última donde el análisis de macronutrientes mostró que había menor concentración de nitrógeno, pero mayor concentración de fósforo y potasio, finalmente, si bien toda la población de plantas se ubica dentro de los estándares de alta calidad los mejores índices se encontraron en aquellos tratamientos donde se utilizó la mezcla de turba de musgo, agrolita y vermiculita.

Palabras Clave:

Calidad de planta, Fitopatogeno, Macronutrientes Patogenicidad, *Trichoderma harzianum*,

Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Ortega Cerón María Alejandra

Director de Tesis: Acosta Hernández Elizabeth

GENERAL ABSTRACT

BIOCONTROL OF *Fusarium circinatum* IN SEEDLINGS OF *Pinus devoniana*

One of the most relevant issues in tree nursery nowadays is the presence of diseases that decreases the seedling production and it's quality as well. One of the most important is the "secadera" (dry out), caused by *Fusarium circinatum* for which management and control strategies had to be developed and improved in order to reduce incidence and severity. The objective of this research was to evaluate alternatives that allow decreasing the incidence of this pathogen and favoring the plant's production. A 9 month long experiment was established in the Forest Sciences Division's greenhouse with 12 treatments in a randomized complete design with factorial arrangement of treatments(2x3x2) where the incidence and severity were analyzed in two substrate mixtures, one of them composed by 60% of peat moss 20% agrolite and 20% vermiculite, and the other one by 60% of pine sawdust, 20% pine bark and 20% of peat moss, the *Trichoderma harzianum* application method (on the growing, the seed or the control) and the pathogen's presence or absence, other factors examined the concentration of the macronutrients (N, P and K); the results shows that the inoculated colony was positive at being pathogenic and in getting the withering symptoms, the morphological characteristics match with the described for *Fusarium circinatum*, the pathogenicity of *Fusarium circinatum* decreased significantly in those treatments were *Trichoderma harzianum* was directly applied in the substrate and in the mixture de pine sawdust, pine bark and peat moss , and was in this last one where the analysis of macronutrients showed a higher concentration of phosphorous and potassium, but lower nitrogen levels, finally, although all the population is cathegorized in the high quality parameters, but the best results were found in those treatments were the pine sawdust, pine bark and peat moss mixture was used.

Key words: Plant quality, Phytopathogen, Macronutrients, Pathogenicity, *Trichoderma harzianum*

Thesis, Universidad Autónoma Chapingo, Master of Science in Forest Science.
Author: María Alejandra Ortega Cerón
Advisor: Dra. Elizabeth Hernández Acosta

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

México posee alrededor de 137.8 millones de hectáreas cubiertas por vegetación forestal que otorga múltiples beneficios al ambiente, la fauna y la sociedad, esto se debe a que los procesos y componentes que integran dichos ecosistemas son parte de la regulación del clima, el amortiguamiento del impacto de los fenómenos naturales, mantenimiento de fuentes confiables de agua, generación de oxígeno, mantenimiento y recuperación del suelo, protegen la biodiversidad de los ecosistemas, además de aportar bienes y servicios para el sustento de una parte de la población, a pesar de ello se ha presentado una elevada disminución de estas áreas (PROFEPA, 2020).

El Global Forest Watch, 2019 reportó que desde el año 2001 hasta 2019 México perdió 602,000 hectáreas de bosque primario, y a nivel mundial, en 2018 se perdieron más de 24.7 millones de hectáreas, de las cuales casi el 50% se perdió en los trópicos, y se atribuye principalmente a la sobreexplotación y la tala ilegal, presión demográfica, incendios forestales, ganadería en zonas forestales, plagas y enfermedades y a la expansión de la frontera agrícola; lo que ha orillado a la búsqueda de estrategias para recuperar estas zonas y así aminorar el impacto que causa dicha pérdida, siendo la reforestación una de ellas (PROFEPA, 2017).

Desde mediados del siglo pasado se cuenta con viveros forestales destinados a la producción de planta que se utilizara en programas de reforestación, donde se debe garantizar la cantidad y calidad de la plántula, que deberá reunir las características morfológicas y fisiológicas necesarias para establecerse satisfactoriamente en el lugar donde serán plantadas, para ello, el manejo en vivero debe ser integral ya que las deficiencias en este afectaran en mayor o menor grado la calidad de la plántula, siendo la fertilización y el monitoreo de enfermedades los aspectos que requieren mayor atención (Rodríguez Laguna, 2010).

Dentro de las enfermedades más severas en vivero resalta una conocida como "secadera", causada por *Fusarium circinatum*.(García-Díaz *et al.*, 2017), el cual es un hongo ascomicete de amplia distribución y adaptabilidad que afecta principalmente a especies del género *Pinus*, fue detectado por primera vez al sureste de Estados Unidos

mientras atacaba *Pinus virginiana* (Nirenberg y O'Donnell, 1998) y logró extenderse casi a nivel mundial, a excepción de la Antártida, este patógeno es capaz de disminuir en gran medida la calidad de la plántula y generar pérdidas de hasta el 40% del total de la producción (Cibrián, *et al*/2008), se presenta tanto en preemergencia, dañando al embrión antes de germinar y necrosa al hipocótilo y cotiledones, como en post-emergencia donde causa constricción del tallo, doblamiento de la plántula, color rojizo en la acículas y pudrición de raíz causando la muerte (Solano y Brenes, 2012).

Fusarium circinatum es un hongo que ve favorecido su desarrollo por deficiencias en la nutrición, así como por el uso de sustrato con alto contenido de materia orgánica y humedad, por ejemplo, la mezcla estándar de peat moss + perlita + vermiculita, la cual se ha planteado que debe ser sustituida por aserrín y corteza de pino, así como la escasa desinfección de la semilla que se va a utilizar, entre otros (Hernández-Zarate *et al.*, 2014).

Debido a la facilidad con que se presenta esta enfermedad y la magnitud del problema que causa se ha recurrido a la búsqueda de estrategias para su control, destacando la desinfección de semilla con fungicidas y peróxido de hidrogeno, desafortunadamente estos métodos no impidieron la entrada de semilla infectada a los viveros o la presencia de plántula enferma en ellos, por lo cual se considera de suma importancia la búsqueda del equilibrio en la fertilización y la aplicación del control biológico, en especial el antagonismo de algunos hongos benéficos (Martínez-Álvarez, 2015) y algunas de las ventajas a destacar de este método de control es la escasa presencia de resistencia de las plagas, no hay intoxicación a sus aplicadores y tiene un efecto prolongado (Infoagro, 2020).

Un ejemplo es el uso de control biológico con *Trichoderma harzianum*, el cual, ha demostrado tener características que favorecen al control de algunos hongos fitopatógenos pertenecientes a los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium*, este hongo antagonista actúa como hiperparásito competitivo frente al patógeno, produciendo metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas, causando modificaciones en la estructura celular (vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular), además de presentar otras ventajas como la facilidad de su

reproducción y aislamiento, además de no atacar a las plantas superiores. (Ezziyyani *et al.*, 2004).

1.1 Antecedentes

Ya que los daños causados por *Fusarium circinatum* son una problemática de gran interés para el sistema de producción de plántula en vivero, se han establecido distintas investigaciones que tienen como fin encontrar alternativas para prevenirlo o bien controlarlo, así como analizar algunos otros beneficios propios de la fertilización adecuada, la correcta elección sustrato empleado y el hongo antagonista.

García *et al.*, (2017) evaluó el efecto de 3 mezclas de sustrato diferentes sobre la patogenicidad de *Fusarium circinatum* en *Pinus greggii*.

Robles Yerena *et al.*, (2017) realizó un análisis en plántulas de *Pinus* spp. donde analizó el ataque por *Fusarium oxysporum* Schldl. y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.

García-Díaz *et al.*, (2019) realizó una evaluación del efecto de *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium circinatum* en plántulas de *Pinus greggii*.

Moraga-Suazo *et al.*, (2011) realizó una comparación entre *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp. para conocer el control que ejercen sobre *Fusarium circinatum* en plántulas de *Pinus radiata*.

1.2 Justificación

La presente investigación se enfocará en estudiar la capacidad de *Trichoderma harzianum* para controlar “la secadera” causada por *Fusarium circinatum* durante la etapa de semillero y al mismo tiempo comparara su efecto en distintos sustratos y la concentración de macronutrientes para mejorar su eficacia, ya que es una de las enfermedades que más pérdidas causa durante esta etapa. Así se podrá mostrar un método adecuado que permitirá aumentar la calidad de planta para reforestación y conocer con ello el porcentaje de posibilidad de sobrevivencia al establecer en campo planta sana, aunado a esto se disminuirá la propagación de enfermedades que podrían

afectar también a arbolado adulto ya establecido, ayudando a la recuperación de la zona forestal a mediano y largo plazo.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar a nivel de semillero y vivero el biocontrol de *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium circinatum* para incrementar la supervivencia de plántulas de *Pinus devoniana* a través de su relación antagónica en dos sustratos diferentes, además, analizar las concentraciones de nutrimentos en dichos sustratos y su influencia en el desarrollo de la plántula y la incidencia y severidad del patógeno.

1.3.2 Objetivos específicos

- Evaluar la eficacia de *Trichoderma harzianum* (con dos formas de aplicación y el testigo) sobre *Fusarium circinatum* al sembrar *Pinus devoniana* en dos sustratos diferentes, para evitar pudrición de raíz y tallo.
- Identificar cuál de los dos sustratos, peat moos o aserrín, es mejor para mermar la patogenicidad de *Fusarium circinatum* en las plántulas de *Pinus devoniana*.
- Evaluar la calidad de las plántulas de *Pinus devoniana* considerando la presencia de *Trichoderma harzianum* y *Fusarium circinatum*, para seleccionar los tratamientos que menor incidencia presentaron.
- Evaluar el contenido de macronutrientes de cada mezcla de sustrato relacionado con el método de aplicación de *Trichoderma harzianum* y comparar entre sí para analizar su relación con el crecimiento de la plántula y la patogenicidad de *Fusarium circinatum*

1.4 Hipótesis

- *Trichoderma harzianum* tendrá mejor control sobre *Fusarium circinatum* si se aplica directamente al sustrato.

- La patogenicidad de *Fusarium circinatum* aumentará en sustrato de Peat moss, y disminuirá en el sustrato a base de Aserrín.
- La calidad de las plántulas será mejor en el sustrato a base de Aserrín en comparación con el sustrato a base de Peat moss.
- La presencia de sintomatología de *Fusarium circinatum* se relaciona directamente con la calidad nutrimental del sustrato y se verá mermada en la mezcla a base de aserrín en comparación con el sustrato a base de peat moss.

1.5 Contenido capitular del documento de titulación

En el capítulo uno se presenta una introducción general, antecedentes, la justificación, el objetivo general y específicos, las hipótesis, el contenido capitular y la literatura citada.

En el capítulo dos se presenta la revisión de literatura, donde incluirá el marco teórico, el marco referencial y la literatura citada.

En el capítulo tres se presenta el primer artículo científico, el cual se enfoca a la investigación de la patogenicidad de *Fusarium circinatum* y al análisis de calidad de planta, ambos influenciados por parte de los tratamientos, o de la interacción entre tratamientos.

En el capítulo cuatro se presenta el segundo artículo científico, el cual se enfoca a la investigación del análisis de macronutrientes en sustrato y la influencia de ello sobre la patogenicidad de *F. circinatum*.

1.6 Literatura citada

- Cibrián T., D., D. S. E. García, y M. B. Don Juan. 2008. Manual de identificación y manejo de plagas y enfermedades en germoplasma y planta producida en viveros. CONAFOR. México. 153 p.
- Ezziyyani, M., Pérez Sánchez, C., Sid Ahmed, A., Requena, M., & Candela Castillo, M. (2004). “*Trichoderma harzianum*” como biofungicida para el biocontrol de “*Phytophthora capsici*” en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología*, 0(26), 35–45.
- García-Díaz, S. E., Aldrete, A., Alvarado-Rosales, D., Cibrián-Tovar, D., & Méndez-Montiel, J. T. (2019). *Trichoderma harzianum* Rifai as a biocontrol of *Fusarium circinatum* Nirenberg & O’Donnell in seedlings of *Pinus greggii* Engelm. ex Parl. in three substrates. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 25(3), 353–367. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2018.12.088>
- García-Díaz, S. E., Aldrete, A., Alvarado-Rosales, D., Tovar, D. C., Méndez-Montiel, J. T., Valdovinos-Ponce, G., & Equihua-Martínez, A. (2017). Effect of *Fusarium circinatum* on germination and growth of *Pinus greggii* seedlings in three substrates. *Agrociencia*, 51(8), 895–908.
- Hernández-Zarate L., A. Aldrete, V. M. Ordaz-Chaparro, J. López-Upton, M. Á. L.-L. (2014). Crecimiento de *Pinus montezumae* Lamb. En vivero influenciado por diferentes mezclas de sustratos. 627–637.
- Infoagro. (2020). *MANEJO INTEGRAL DE PLAGAS. Control biológico y control químico.* - *Revista Infoagro México*. 2 de Marzo de 2020. <https://mexico.infoagro.com/manejo-integral-de-plagas-control-biologico-y-control-quimico/>
- Martínez-Álvarez, P. (2015). *Environmentally friendly methods for the integrated management of pine pitch canker (PPC) disease | Gestión Forestal Sostenible.* <http://sostenible.palencia.uva.es/content/environmentally-friendly-methods-integrated-management-pine-pitch-canker-ppc-disease>
- Moraga-Suazo, P., Opazo, A., Zaldúa, S., González, G., & Sanfuentes, E. (2011).

Evaluation of *Trichoderma* spp. and *Clonostachys* spp. strains to control *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata* seedlings. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71(3), 412–417. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392011000300011>

PROFEPA. (2017). *IMPLEMENTAN CONAFOR Y PROFEPA ACCIONES PARA COMBATIR LA DEFORESTACIÓN EN MÉXICO* | Procuraduría Federal de Protección al Ambiente | Gobierno | *gob.mx*. 19 de Noviembre de 2017. <https://www.gob.mx/profepa/prensa/implementan-conafor-y-profepa-acciones-para-combatir-la-deforestacion-en-mexico>

PROFEPA. (2020). *Importancia de los Ecosistemas Forestales; Especies de los Bosques y Selvas*. | Procuraduría Federal de Protección al Ambiente | Gobierno | *gob.mx*. 23 de Marzo de 2020. <https://www.gob.mx/profepa/es/articulos/importancia-de-los-ecosistemas-forestales-especies-de-los-bosques-y-selvas?idiom=es>

Robles Yerena, L., Leyva Mir, S. G., Cruz Gómez, A., Nieto Ángel, D., & Tovar Pedraza, J. M. (2017). *Fusarium oxysporum* Schltdl. y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. causantes de la marchitez de plántulas de *Pinus* spp. en vivero. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 7(36), 25–36. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v7i36.57>

Rodríguez Laguna, R. (2010). *Manual de prácticas de viveros forestales*. 49. http://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icap/LI_IntGenAmb/Rodri_Laguna/2.pdf

Solano, B. M., y C. D. Brenes. 2012. Evaluación de métodos de curación de sustratos para la prevención del mal de talluelo. *Rev. For. Mesoam. Kurú* 9: 63-65.

CAPITULO 2. MARCO CONCEPTUAL Y DE REFERENCIA

2.1 Marco conceptual

2.1.1 Deforestación

Según la Ley General de Desarrollo Forestal Sustentable la palabra “Deforestación” se refiere a “la pérdida de la vegetación forestal de manera permanente por causas naturales o inducidas” o bien “la conversión del bosque a otros usos de tierra, reducción permanente del dosel por debajo del umbral mínimo del 10%” según la FAO, y los factores causales se clasifican en bióticos (plagas y enfermedades), abióticos (incendios, huracanes e inundaciones) y antropogénicos (construcción de infraestructura, pastoreo, minería y cambios de uso de suelo), esto, sumado a la degradación de los ecosistemas ha resultado en erosión, sedimentación de lagos y ríos, poca captación de agua, inundaciones, disminución en la calidad del suelo, entre otros, todo esto ha repercutido en pobreza de la población rural y migración (CEDRSSA, 2019).

De acuerdo con el Informe Nacional de los Recursos Forestales Mundiales, 2015, elaborado por la CONAFOR la extensión de recursos forestales disminuyó 0.20% anualmente de 1990-2015 (CEDRSSA, 2019), esta problemática ha llevado a buscar estrategias que aminoren el impacto de dicha pérdida y una de ellas es la producción de planta para reforestación, la cual debe adaptarse fácilmente al lugar de destino.

2.1.2 Reforestación

La CONAFOR lo define como la planeación, operación, control y supervisión de las actividades destinadas a plantar árboles debido a la pérdida del área forestal, lo ideal es que esta se realice con especies autóctonas, sin embargo, se ha considerado una mejor opción buscar especies que presenten alto porcentaje de adaptabilidad y una tasa de crecimiento rápido, un ejemplo son aquellas especies que se encuentran dentro del género *Pinus* (Solano y Brenes, 2012).

En la fracción XXIX del artículo 7 de la LGDFS la reforestación se define como el establecimiento inducido de vegetación forestal en terrenos originalmente forestales mediante un proceso que comprende planeación, obtención de semilla, producción de

planta, selección del sitio de reforestación, preparación del terreno, plantación, mantenimiento, protección y manejo (CONAFOR, 2010).

Para que este procedimiento sea un éxito se deben considerar algunos aspectos como la selección de especie de acuerdo al clima y lugar, el uso de germoplasma con alta calidad genotípica y fenotípica, un buen sistema de producción que garantice planta de calidad, contar con transporte adecuado para movilizar la planta, realizar plantación en época adecuada para asegurar alto porcentaje de sobrevivencia, la aplicación de técnicas que favorezcan el desarrollo de las plantas, entre otros (Pronatura, 2020).

2.1.3 Vivero forestal

Es el lugar destinado a la reproducción de árboles para diversos fines, aquí se les otorgan condiciones óptimas durante su etapa inicial de crecimiento, la cual abarca desde su germinación hasta la edad en que estas serán llevadas a su lugar definitivo de plantación, esto con el fin de obtener plantas sanas y de calidad que podrán desarrollarse de manera correcta en su lugar de destino (Buamscha *et al.*, 2012).

Jimenez, (2002) Lo define como el primer paso de un programa de repoblación forestal, es el sitio destinado a la producción de plantas forestales donde se les mantiene con los cuidados necesarios desde su germinación hasta su etapa inicial de crecimiento, esto con el fin de que una vez culminen esta etapa de vivero sean trasladadas a su lugar definitivo de plantación y tengan éxito en su desarrollo.

2.1.4 Calidad de planta

El éxito de un programa de reforestación se basa principalmente en la calidad de la planta producida en los viveros, la cual debe abarcar tanto la parte aérea de la planta como la radical y se define como una plántula que, al terminar su estancia en el vivero, además de estar totalmente sana, posee las características morfológicas y fisiológicas que le otorgaran altas posibilidades de supervivencia y crecimiento vigoroso a partir de su establecimiento en el lugar definitivo (Rodríguez-Trejo, 2008).

Prieto *et al.*, (2009) Define la calidad de planta como la capacidad de estas para lograr adaptarse y desarrollarse bajo las condiciones climáticas y edáficas del sitio definitivo de

plantación, las cuales dependerán de las características genéticas del germoplasma utilizado y las practicas empleadas durante su reproducción en el vivero, esto se observara en las características morfológicas y fisiológicas que presenten, tales como altura de la planta, diámetro del cuello, presencia de yema terminal, porcentaje de lignificación, longitud de la raíz, cantidad de raíces secundarias, relación existente entre parte aérea y radical, nivel de micorrización, biomasa, calidad nutrimental, vigor, color, follaje, sanidad, entre otras, estas son fácilmente medibles en su mayoría, por lo que deben realizarse monitoreo constante con el fin de detectar plántulas que presenten anomalía en estas características y ser desechadas, ya que, a pesar de que lograrán sobrevivir su crecimiento no será satisfactorio o bien, en caso de ser una planta enferma podría contagiar al resto, disminuyendo la población y elevando la pérdida económica.

2.1.5 Sustrato

Se define como el material sólido distinto al suelo con un pH de 5.0-6.0, contenido de materia orgánica <2% y conductividad eléctrica media, que al ser colocado en un contenedor o envase permitirá la siembra de la semilla de la cual emergerá una plántula que podrá anclar y desarrollar sus raíces en dicho material, el cual podrá ser de origen natural o sintético, puede contener nutrimentos o no, y se clasifican en inertes y activos, los primeros actúan como soporte para la planta y generan macroporos en el medio de crecimiento, en estos encontramos perlita, agrolita, vermiculita, roca volcánica, entre otros, y los activos son aquellos que influyen en la absorción y fijación de nutrientes, aquí se encuentra peat moss o turba, composta de corteza de pino, aserrín, fibra de coco, bagazo de café o cebada, cascarilla de arroz, etc.

Su función principal de este material es proteger la raíz de la planta durante el cultivo, transporte y plantación, por lo tanto, al ser el lugar donde la planta pasara un largo periodo este debe garantizar buena aireación, drenaje, nutrición, y conformación del sistema radical (Prieto *et al*, 2009) (Buamscha *et al.*, 2012).

La mayoría de los viveros emplean como sustrato una mezcla conocida como estándar realizada a base de Peat moss, agrolita y vermiculita, la cual favorece el establecimiento de hongos dañinos debido a su elevado contenido de materia orgánica y humedad,

además de su elevado costo, por lo que se ha considerado al aserrín y corteza de pino como una alternativa de menor costo (Hernández-Zarate L *et al.*, 2014).

2.1.5.1 Peat moss

También conocido como Turba o Musgo fangoso, es un sustrato ampliamente comercializado hecho a base de plantas pantanosas del género *Sphagnum*, es un material ligero, capaz de retener hasta 10-20 veces su peso en agua, además posee un bajo contenido de minerales, muy usado como componente en mezclas de sustrato para crecimiento de plántulas de especies forestales en vivero, sin embargo, esta mezcla debe estar debidamente fertilizada, presenta un pH de entre 3.5-6 y se considera como un sustrato estéril debido a que su proceso es bajo altas temperaturas, sin embargo tiende a presentar problemas fitosanitarios con mosca fungosa (Prieto *et al.*, 2009).

2.1.5.2 Agrolita

También conocida como perlita, es un mineral estéril e inorgánico de origen volcánico, capaz de retener 5 veces su peso en líquido, además, una vez es integrado a la mezcla de sustrato favorece la estructura, permeabilidad y aireación.

2.1.5.3 Vermiculita

Es un mineral formado por silicatos de hierro con alta capacidad de retención de agua y pH de 7, dentro de la mezcla de sustrato favorece la aireación y la liberación paulatina de la humedad.

2.1.5.4 Aserrín

Es el resultado del proceso de aserrío de la madera, posee consistencia fuerte y densidad anhidra de alrededor de 0.3891 gr/cm³, útil como sustrato en vivero para el crecimiento de plántulas (Marín *et al.*, 2005).

2.1.5.5 Corteza de pino

Para poder usar la corteza de pino como sustrato esta debe ser triturada y composteada para obtener un material inerte y poroso que favorece el crecimiento radical, además de la absorción y retención de la humedad.

2.1.5.6 Composición química del sustrato

Esto incluye la relación que existe entre el pH y los nutrientes que posee, ya que del pH dependerán los procesos de humificación, la disponibilidad y movimiento de nutrientes y los procesos de intercambio catiónico, siendo de 5-6 el adecuado para la etapa de semillero y vivero del género *Pinus* ya que este rango favorece la disponibilidad del Nitrógeno, Fósforo y Potasio, además del crecimiento de micro flora benéfica,

2.1.5.7 Calidad nutrimental del sustrato

Se refiere a la proporción y disponibilidad de los elementos necesarios para el desarrollo de la planta.

Se consideran 16 elementos como esenciales para el desarrollo de la plantas, siendo el carbono, hidrógeno y oxígeno los que constituyen la mayor parte del peso seco de las plantas y provienen del CO₂ atmosférico y del agua, seguidos en importancia por nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre que se absorben directamente del suelo a través de las raíces, sin embargo, no de todos existen cantidades suficientes para satisfacer las necesidades de las plantas, por lo que se requiere de fertilización, y son clasificados en macronutrientes y micronutrientes.

2.1.5.8 Macronutrientes

Dentro de esta clasificación se encuentran nitrógeno, fósforo y potasio y son los más importantes en el crecimiento de las plantas, por lo que deben ser suministrados a través de fertilizantes.

2.1.5.9 Nitrógeno inorgánico

Este elemento ayuda a estimular el rápido crecimiento vegetal, además, favorece la síntesis de clorofila, aminoácidos y proteínas, la deficiencia en este elemento se presenta como falta de crecimiento de la plántula, amarillamiento foliar y escasa lignificación de tallo.

2.1.5.10 Fósforo

Este elemento en las plántulas ayuda al desarrollo de la raíz y participa en la fotosíntesis y respiración, además, en plantas adultas favorece la formación de la semilla, y en caso

de presentar deficiencia la plántula mostrara el área foliar y tallo color purpura y necrosis en hojas y frutos.

2.1.5.11 Potasio

Este elemento es de suma importancia en el proceso de establecimiento de las plantas, ya que aporta resistencia a enfermedades dando mayor vigor y fortalece el tallo de las plántulas, y en las plantas adultas da calidad a la semilla en formación, la deficiencia de este elemento se muestra como el oscurecimiento del margen foliar y tallos débiles.

2.1.6 Sanidad

Dentro de un vivero forestal es la protección a semillas y plántulas contra el ataque de plagas y enfermedades nativas y exóticas, esto se logra en base a la formulación de programas de monitoreo para la detección temprana de brotes, una vez detectada el área afectada se debe realizar el diagnostico que determinara el tipo de plaga o enfermedad, escala de los daños y se establecerán las medidas de combate y control pertinentes, las cuales deben contar con previa autorización de la instancia correspondiente y en base a las políticas públicas que previenen su dispersión, este procedimiento general también se en las hectáreas establecidas con arbolado, esto se debe a la preocupación de que la presencia de plagas y enfermedades provoca grandes pérdidas de producción y con ello económicas (CONAFOR, 2013).

Tiene como objetivo prevenir y reducir la incidencia de plagas y enfermedades que presentan problemáticas de índole económica, ecológicos y sociales en el país (CONAFOR, 2015).

2.1.6.1 Enfermedad

Hace referencia a aquellos efectos negativos que se producen por patógenos que causan la alteración fisiológica y morfológica, en este caso en las plántulas de *Pinus*, la cual se prolonga o se vuelve permanente haciendo que los síntomas propios se hagan visibles, lo cual perjudica la calidad y valor económico del individuo, aunque este término también puede aplicarse al deterioro de los productos, existen dos tipos de enfermedad, el primero es la infecciosa, causada por hongos, virus, bacterias, viroides, fito plasmas, nematodos, etc. y no infecciosa, las cuales pueden tener su origen químico o físico, y estos tipos de

enfermedad se diferencian porque los síntomas que presenta la plántula en el segundo caso son uniformes en los semilleros mientras que en el primero se presentan al azar. (Murace & Aprea, 2011).

Para poder realizar un diagnóstico es necesario tener claro que el término “signo” es propio de aquellas enfermedades causadas por hongos y bacterias, es la manifestación del patógeno presente en la plántula, estos pueden ser perceptibles a simple vista o bien requerir de equipo de aumento para lograr observarlos. y “síntoma” es la manifestación de la enfermedad en la plántula a través de modificaciones en su estructura, se clasifica en Necróticos (muerte del tejido de la plántula) y puede presentarse en manchas, podredumbres, canchales y marchitamiento, este último es común en aquellas enfermedades provocadas por hongos del suelo, los cuales se concentran en atacar las raíces y el cuello de la planta, provocando que se necrosen y destruyan; hiperplásicos (aumento desmedido en el tamaño del órgano afectado por hipertrofia (aumento en el volumen celular) o hiperplasia (multiplicación desmedida de las células); e hipoplásicos (disminución en el tamaño del órgano o del individuo o del contenido de algún elemento de la planta); y finalmente metaplasticos (cambios en el contenido celular, modificación anormal en la coloración de la planta afectada) (Murace & Aprea, 2011).

2.1.7 Hongos fitopatógenos

Son aquellos capaces de causar enfermedades a las plantas afectando su funcionamiento ampliamente, además, son los principales agentes causales de enfermedades forestales capaces de atacar durante cualquier fase de su ciclo vital, esto es gracias a su capacidad de infectar diferentes áreas de la planta en diferentes etapas de su crecimiento gracias a su elevado porcentaje de adaptación a los hospederos y al medio que los rodea, los hongos fitopatógenos de importancia forestal, en general, pertenecen a los *Oomicetes*, *Ascomicetes*, *Deuteromicetes* y *Basidiomicetes*, pero aquellos reportados en viveros se limitan únicamente a los *Oomicetes*, *Ascomicetes* y *Deuteromicetes* donde encontramos a los géneros *Pythium*, *Phytophthora* y *Fusarium*, los cuales causan pudrición de semillas, marchitez y pudrición de raíz de plántulas, sin embargo, uno de los más importantes durante la etapa de vivero son algunas especies pertenecientes al género *Fusarium*., dentro de las que sobresale *F. circinatum* (Pildain & De Errasti, 2011).

2.1.8 *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell

Fase anamórfica o asexual de *Giberella circinata* Nirenberg & O'Donnell ex Britz, T.A. Cout., M.J. Wingf. & Marasas, es un hongo fitopatógeno originario de América del Norte y Central distribuido en América, Europa y algunas regiones de Asia y África, el cual ataca principalmente a especies del género *Pinus* en distintas etapas de su ciclo de vida, es decir, puede establecerse en tronco, ramas y corteza de arbolado adulto o bien presentarse durante la etapa de vivero donde ataca conos, semillas y plántulas, en estas últimas se presenta como coloración amarillenta en las acículas que se ira tornando grisácea o marrón o bien estrangulamiento de tallo a nivel de suelo, esto se logra gracias a que sus esporas pueden dispersarse a través de semillas que al ser plantadas transmitirán el patógeno al sustrato, por esporas que viajan en los contenedores, en insectos vectores como *Pityophthorus*, *Ips* y *Tomicus*, incluso en el aire, una vez establecida se ve favorecida por la acción del riego o alto porcentaje de humedad, la cual le otorga las condiciones necesarias para su crecimiento, por otro lado el salpique causado por el riego aumenta su dispersión, entonces, una vez que las esporas llegan a otra plántula vecina sana penetran a través de heridas causadas por daño mecánico o por aberturas naturales como las lenticelas y una vez que se tienen las condiciones para su desarrollo las esporas inician su germinación e infectan los tejidos vegetales, causando una enfermedad conocida como "Secadera". (Murria Beltrán., 2002) (VAERSA, 2020).

2.1.8.1 Secadera

Enfermedad de vivero causada principalmente por especies del género *Fusarium* capaz de provocar pérdidas en la calidad de las plántulas así como hasta un 40% de la producción total de plántula, esto se debe a que esta enfermedad puede presentarse tanto en pre-emergencia dañando al embrión y necrosando al hipocótilo y cotiledones, como en post-emergencia cuando la plántula aún no está lignificada, esto gracias a su habilidad de contagio por parte de sustrato o tejido infectado, en este caso las acículas se tonaran de color rojizo y la raíz color café, finalmente causara doblamiento de la plántula, estrangulamiento de tallo a nivel de suelo y finalmente muerte de esta. (García-Díaz *et al.*, 2017).

Esta es una enfermedad que tiene la facilidad de propagarse en material vegetal o vectores bióticos y abióticos, anteriormente se pensaba que este hongo únicamente afectaba a arbolado adulto, en la actualidad se sabe que puede causar muerte a las plántulas en fase pre germinativa por la pudrición de semilla y la expansión del micelio por toda ella, y post germinativa, es decir, aquellas que logran germinar serán plántulas con ahorcamiento en la base del tallo de la plántula, en ambas fases se han reportado porcentajes de mortalidad que alcanzan en 100%, por otro lado, aquellas plántulas que sobreviven a esto aún pueden presentar síntomas propios de esta enfermedad, los cuales inician con el cambio en la coloración de las acículas y la muerte progresiva de las más jóvenes, doblamiento del tallo y finalmente muerte de la planta, y finalmente pueden presentarse aquellos casos donde las plántulas son asintomáticas, estas últimas son las que generan mayor problemática en una población, ya que las evaluaciones realizadas en los viveros son en su mayoría visuales y no incluyen evaluación en laboratorio, todo esto es indicador de la importancia de esta enfermedad, no solo por su virulencia y elevado porcentaje de mortalidad, si no por su facilidad de adaptabilidad a las condiciones ambientales, por la afectación directa a la economía por su manejo. (Flores-Pacheco, 2018).

2.1.9 Control de la secadera

Se empleó por mucho tiempo la aplicación de fungicidas, sin embargo el uso desmedido de químicos tuvo graves repercusiones, por ejemplo la aparición de resistencia de estos organismos a los productos, la destrucción de agentes benéficos, el severo daño al medio ambiente y la posible intoxicación de los aplicadores de dichos productos, por tanto se optó por la búsqueda de alternativas más viables como el tratamiento preventivo, por ejemplo, la desinfección de semillas con tratamientos térmicos con aplicación de calor durante 9 horas ($>55^{\circ}\text{C}$), la desinfección correcta de las instalaciones, de las bandejas de cultivo o mesas portatubetes así como de las herramientas empleadas, no exceder la densidad de siembra, tener un buen manejo de la cantidad de nitrógeno aplicado, favorecer el drenaje en los contenedores, eliminar todo el material vegetal enfermo, el uso de variedades y procedencias tolerantes asociadas a la inoculación de controlada de hongos endófitos protectores de la planta por competencia directa con el hongo patógeno (VAERSA, 2020).

2.1.9.1 Control biológico

Es un manejo altamente específico basado en el uso de organismos vivos que son enemigos naturales de un patógeno o plaga determinada, capaces de establecer una relación antagónica por diversos medios, por ejemplo, los hongos antagónicos pueden generar metabolitos o subproductos de dichos organismos que ayuden a reducir o eliminar el daño de hongos como *F. circinatum* en las plantas, esto se logra a partir del establecimiento de una serie de pasos que garanticen su éxito, partiendo de la correcta identificación del hongo patógeno así como la obtención reproducción del antagonista, por lo que se debe supervisar la población existente una vez aplicado y supervisar su eficacia, uno de los hongos fitopatógenos más empleados son aquellas especies pertenecientes al género *Trichoderma*, un ejemplo de ello es *T. harzianum* ya que es una de las especies comerciales más comunes en los viveros y de más fácil manejo (Serrano Carreón. & Galindo Fentanes., 2007).

2.1.10 Trichoderma harzianum

Es un hongo habitante natural del suelo, anaerobio, con alta capacidad reproductiva y de crecimiento, esto es gracias a su acelerada expansión micelial y abundante producción de esporas lo que le permite colonizar suelo o sustrato muy rápidamente, es muy resistente a condiciones desfavorables ya que puede utilizar los nutrientes de manera muy eficiente y posee naturaleza agresiva parasita o saprofita contra hongos fitopatógenos, gracias a estas características este género se ha vuelto muy conocido por su capacidad como agentes de control biológico que además pueden promover el crecimiento de plantas e inducir mecanismos de defensa (INTAGRI S.C., 2015).

2.1.10.1 Mecanismos de acción de Trichoderma harzianum

Los beneficios de este hongo antagónico en las plantas y en el control de hongos del género *Fusarium* son múltiples y muy variados, uno de ellos es su potencial para aumentar el crecimiento y desarrollo de las plántulas, esto podría deberse a la inhibición de patógenos menores y la producción de factores que la benefician y favorecen el aprovechamiento de nutrientes; por otro lado, la inhibición de hongos dañinos como *F. circinatum* es gracias a su mecanismo de acción, esto se logra a través de la competencia directa por nutrientes y espacio gracias a su acelerada tasa de crecimiento, volviéndola

un grandioso competidor por la rizosfera, además de su facilidad para movilizarse y aprovechar nutrientes, como carbono y nitrógeno, disponibles del suelo impidiendo así que otros microorganismos los utilicen y proliferen gracias a ello, por otro lado, produce metabolitos a manera de antibióticos volátiles y no volátiles capaces de inhibir el crecimiento y desarrollo de *Fusarium* además a esto se agregan enzimas líticas extracelulares, antibióticos y compuestos que favorecen la colonización del sustrato, inactiva las enzimas producidas por el fitopatógeno, cambia las condiciones ambientales, produce sustancias promotoras de su propio crecimiento y ejerce micoparasitismo, el cual es en base a una interacción antagonista-patógeno, esto se logra gracias al crecimiento quimiotrófico, reconocimiento, adhesión y enrollamiento, actividad lítica, esto último es la producción de enzimas líticas extracelulares (quitinasas, glucanasas y proteasas) que permiten la degradación de las paredes celulares de *Fusarium circinatum* permitiendo que las hifas de *Trichoderma* interactúen con él (INTAGRI S.C., 2015).

2.1.10.2 Método de aplicación

Para que este hongo antagónico ejerza un control correcto se deben considerar diversos aspectos que favorezcan su mecanismo de acción, esto con base en una aplicación correcta y eficiente dentro de un entorno favorable tanto en el medio ambiente (donde se considere la temperatura, humedad, presencia de oxígeno) como en el suelo (estructura, contenido de materia orgánica y cantidad de nutrientes disponibles), su forma de aplicación puede ser de manera foliar, al sustrato del semillero, al suelo, o bien, directamente a la semilla, este último tendrá múltiples beneficios, ya que combate de manera más eficaz hongos como *Fusarium circinatum*, haciéndolo un método de control fácil y económico; por otro lado, este agente antagónico también puede ser aplicado en residuos vegetales con el fin de disminuir población de hongos dañina en el suelo.

Además, se considera un método eficaz no solo en el control de *Fusarium*, sino también contra diversos hongos como *Rhizoctonia*, *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Armillaria*, *Pythium*, y bacterias como *Pseudomonas* y *Xanthomonas* (INTAGRI S.C., 2015).

2.2 MARCO DE REFERENCIA

A continuación, se presentan algunos trabajos donde se abordan temas sobre los efectos de *Fusarium circinatum* sobre plántulas del género *Pinus*, el control ejercido por *Trichoderma harzianum* y su relación con el sustrato donde se encuentra.

Moraga-Suazo *et al.*, (2011) comprobó que existen 15 cepas pertenecientes al hongo antagonista *Trichoderma* capaces de disminuir el crecimiento de *Fusarium circinatum* un 60%, además, estas cepas serán más efectivas si se aplican antes de la siembra del patógeno, es decir, tendrán un mejor efecto si se aplican de manera preventiva, reduciendo la mortalidad en preemergencia hasta un 80%-100% para el caso de 2 cepas específicas de *Trichoderma*.

García *et al.*, (2017) realizó una evaluación e identificación de *Fusarium circinatum* con la finalidad de analizar su efecto en la germinación y crecimiento de plántulas de *P. greggii*, en preemergencia, utilizando 3 sustratos diferentes (60:20:20) para la siembra de la semilla (S1: turba de musgo, perlita y vermiculita; S2: aserrín de pino, corteza de pino y turba de musgo; y S3: corteza de pino, aserrín de pino y turba de musgo) donde evaluó germinación, conteo semanal de plántulas enfermas y porcentaje con síntomas de secadera, concluyendo que las semillas no inoculadas con *Fusarium circinatum* tuvieron 83% de germinación, mientras que en las inoculadas disminuyó su germinación, y para la evaluación en post emergencia, la enfermedad se manifestó después de 5 semanas de siembra, los síntomas observados fueron la aparición de deshidratación de la planta, cambio de color en el tallo a nivel de cuello y finalmente muerte de la planta.

Robles Yereña *et al.*, (2017) Realizó un análisis sobre los síntomas de pudrición de raíz y marchitez en plántulas de *Pinus patula* y *Pinus pseudostrobus* con el fin de identificar al agente causal, esto se logró mediante la recolección del material enfermo en un vivero forestal, el cual fue procesado para realizar aislamiento de él y posteriormente la caracterización morfológica, de dicho estudio se obtuvo que las especies responsables de dichos síntomas son hongos pertenecientes al género *Fusarium* (*Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*) las cuales, después de realizar pruebas de incidencia y severidad no presentaron diferencias significativas entre ellas.

García-Díaz *et al.*, (2019) realizó una evaluación en 3 sustratos diferentes donde comparó el efecto de *Fusarium circinatum* con y sin *Trichoderma harzianum* en *Pinus greggii*, esto con el fin de analizar la incidencia y patogenicidad de *F. circinatum* por sí solo y su comportamiento al estar en antagonismo con *T. harzianum*, en base a esto se pudo observar que, para el caso de los tratamientos que solo poseían *F. circinatum* las plántulas que manifestaron los síntomas primero fueron aquellas que se encontraban sembradas en sustrato hecho a base de corteza de pino, por lo tanto, se puede deducir que la incidencia y severidad de la enfermedad se ve influenciada por el tipo de sustrato en que se encuentran las plántulas, ya que aquellas que se desarrollaron en el sustrato hecho a base de aserrín presentaron menor problema en comparación con aquellas que lo hicieron en el sustrato hecho a base de turba de musgo y el de corteza de pino, las cuales alcanzaron una incidencia de 99% y 94% respectivamente, por lo que concluyó que el sustrato hecho a base de aserrín puede ser una buena opción para aminorar el impacto de *Fusarium circinatum*, aunado a esto, para los tratamientos donde se aplicó *T. harzianum* se observó que presentaron menor incidencia en comparación con aquellos donde no se aplicó.

2.3 Literatura citada

- Buamscha, M. G., Contardi, L. T., Dumroese, R. K., Enricci, J. A., R., R. E., Gonda, H. E., Jacobs, D. F., Landis, T. D., Luna, T., Mexal, J. G., & Wilkinson, K. M. (2012). *Producción de plantas en viveros forestales*.
- CEDRSSA. (2019). *La actividad forestal en México, estrategias y acciones contra la deforestación*. 4(3), 24. <http://marefateadyan.nashriyat.ir/node/150>
- CONAFOR. (2010). *Prácticas de reforestación Manual básico*.
- CONAFOR. (2013). *Programa Nacional de Sanidad Forestal 2013-2018 - Consejo Civil Mexicano para la Silvicultura Sostenible*.
<https://www.ccmss.org.mx/acervo/programa-nacional-de-sanidad-forestal-2013-2018/>
- CONAFOR. (2015, September 29). *Sanidad Forestal | Comisión Nacional Forestal | Gobierno | gov.mx*. <https://www.gob.mx/conafor/documentos/sanidad-forestal->

- García-Díaz, S. E., Aldrete, A., Alvarado-Rosales, D., Tovar, D. C., Méndez-Montiel, J. T., Valdovinos-Ponce, G., & Equihua-Martínez, A. (2017). Effect of *Fusarium circinatum* on germination and growth of *Pinus greggii* seedlings in three substrates. *Agrociencia*, 51(8), 895–908.
- INTAGRI S.C. (2015). Trichoderma Control de Hongos Fitopatógenos. In *Intagri* (p. 1). <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/Trichoderma-control-de-hongos-fitopatogenos>
- Jimenez, F. (2002). Viveros Forestales Para Produccion De Planta a Pie De Repoblación. *Hojas Divulgadoras*, 6, 1–36. http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1993_06.pdf
- Marín, G., Riveros, M., Eliana, P., & Botía, L. (2005). *Redalyc. Uso de aserrín y acículas como sustrato de germinación y crecimiento de Quercus humboldtii (roble)*.
- Murace, M., & Aprea, A. (2011). *Enfermedades forestales. Generalidades*.
- Murria Beltrán., E. (2002). *Fusarium circinatum Niremberg & O'Donnell*.
- Pildain, M. B., & De Errasti, A. (2011). Hongos patógenos de pinos en la patagonia y su asociación con plagas entomologicas. *Serie Técnica: Manejo Integrado de Plagas Forestales*, 14.
- Prieto *et al.* (2009). Producción de Planta del Género *Pinus* en Vivero en Clima Templado Frío. In *Publicación Especial Núm. 28*. <http://sivicoff.cnf.gob.mx/ContenidoPublico/09 Manuales técnicos/Lista de documentos/Viveros forestales/Manual Produccion de planta de Pinus en vivero.pdf>
- Pronatura. (n.d.). *Reforestación en México*. 2020. Retrieved April 8, 2021, from http://www.pronatura.org.mx/blog_reforestaciones_mexico.php
- Rodriguez-Trejo. (2008). *Indicadores de calidad de planta forestal - 9789687462530 - D.A. RODRÍGUEZ TREJO - Compra del libro - mundiprensa.mx*. <https://www.mundiprensa.mx/catalogo/9789687462530/indicadores-de-calidad-de->

planta-forestal

Serrano Carreón., L., & Galindo Fentanes., E. (2007). *Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario*.

<https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/index.php/ediciones-anteriores/36-vol-58-num-1-enero-marzo-2007/comunicaciones-libres34/81-control-biologico-de-organismos-fitopatogenos-un-reto-multidisciplinario>

VAERSA. (2020). *El Chancro Resinoso del Pino: Fusarium circinatum*. November, 2021.

http://www.medioambiente.jcyl.es/web/jcyl/MedioAmbiente/es/Plantilla100/1284278163600/_/_/_

CAPITULO 3.

Biocontrol de *Fusarium circinatum* en plántulas de *Pinus devoniana* sembrados en dos sustratos diferentes.

Biocontrol of *Fusarium circinatum* in *Pinus devoniana* seedlings planted in two different substrates.

María Alejandra Ortega-Cerón¹, Silvia-Edith García-Díaz ¹(Autor correspondiente, sgarciad@chapingo.mx, 5529064997) (<https://orcid.org/0000-0001-8843-4521>), Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales, Carr. México-Texcoco Km. 38.5; Chapingo; Texcoco Edo. De Mex. C.P. 56230, Elizabeth Hernández-Acosta² (<https://orcid.org/0000-0002-1409-1623>), Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Suelos, Carr. México-Texcoco Km. 38.5; Chapingo; Texcoco Edo. De Mex. C.P. 5623, Antonio Villanueva-Morales³ (<https://orcid.org/0000-0002-8802-0625>) División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México. C. P. 56230.

(*Dra. Silvia Edith García Díaz sgarciad@chapingo.mx 55 29 06 49 97)

3.1 Aspectos destacados

La secadera es una enfermedad capaz de provocar pérdidas del 40% o más.

Trichoderma harzianum es un hongo antagónico que podría ser un buen agente de control.

El análisis de la severidad en una enfermedad permite tener una proyección más certera del desarrollo de la enfermedad y así una estrategia de control más efectiva

El análisis de calidad de planta es fundamental para tomar la decisión de llevar a campo o no una población.

3.2 RESUMEN

“La secadera”, causada por *Fusarium circinatum*, es una problemática importante durante la etapa de vivero. El objetivo de este trabajo fue evaluar a *Trichoderma harzianum* como alternativa para aminorar la patogenicidad del hongo fitopatógeno, analizar la eficacia del método de aplicación de *T. harzianum* y del tipo de sustrato utilizado. Se utilizaron dos mezclas: 1) Turba de musgo, agrolita y vermiculita y 2) Aserrín de pino, Corteza de pino, y Turba de musgo, 3 formas de aplicación de *Trichoderma harzianum* (al sustrato, a la semilla y testigo) y presencia y ausencia de *Fusarium circinatum*, generando 12 tratamientos establecidos en arreglo factorial completamente al azar (2x3x2) en los que se evaluó el efecto del tipo de mezcla de sustrato, la forma de aplicación del hongo antagonista y la interacción entre ellos en las propiedades morfofisiológicas de las plántulas y la sintomatología propia de *Fusarium circinatum*. Se detectaron diferencias significativas en la presencia de síntomas entre tratamientos y la relación entre los indicadores de calidad se vio afectada significativamente. Los resultados señalan que las características morfológicas en el crecimiento de la cepa en estudio coinciden con los descritos para *Fusarium circinatum*, la cepa resultó ser patogénica al causar enfermedad, además, la patogenicidad de *Fusarium circinatum*, disminuyó significativamente en aquellos tratamientos donde se aplicó *Trichoderma harzianum* al sustrato y en la mezcla a base de aserrín, finalmente, los resultados obtenidos en calidad de planta fueron superiores en aquellos tratamientos donde se utilizó la mezcla a base de aserrín.

Palabras clave

Secadera, hongo antagonista, calidad de planta, fitopatógeno, patogenicidad.

3.3 ABSTRACT

The “Secadera” (dry out) caused by *Fusarium circinatum* is an important issue during the nursery stage. The objective of this work was to evaluate *Trichoderma harzianum* as an alternative to decrease the phytopathogen fungus pathogenicity and its relationship with the application methods and the substratum used. Two mixes were used 1) Peat moss, agrolite and vermiculite and 2) Pine sawdust, pine bark and peat moss, *Trichoderma harzianum* was applied in 3 different ways (in the seed, the substratum and the witness) and presence of *Fusarium circinatum*, generating 12 established treatments in a fully random arrangement (2x3x2) in which the substratum mixture type effect, the application method of the antagonist fungus and the interaction between them in the morphophysiological properties of the plants and the proper symptomatology of *Fusarium circinatum*. The strain resulted to be pathogenic by causing disease, in addition, the pathogenicity of *Fusarium circinatum* decreased significantly in those treatments where *Trichoderma harzianum* was applied to the substratum and the sawdust base mixture, finally, the results obtained in the plant stage were superior in those treatments where the sawdust base mixture was used.

Key words

Damping off, antagonistic fungus, plant quality, phytopathogen, pathogenicity

3.4 Introducción

México pierde alrededor de 47,770 hectáreas de cobertura forestal anualmente debido a las diferentes actividades antropogénicas, por lo que se ha buscado el desarrollo de programas viables de reforestación que permitan la recuperación de esas áreas y así aminorar el impacto que causa su pérdida (Mongabay; Animal político; La-lista. 2021.).

Para que un programa de reforestación sea exitoso se debe utilizar planta de calidad de un vivero forestal, esto incluye el descartar la presencia de enfermedades o plagas, y evaluar características como altura, diámetro de tallo a nivel de cuello, tamaño, forma, volumen aéreo y volumen radical en fresco y en seco, presencia de yema terminal, potencial hídrico, capacidad de emisión de nuevas raíces, contenido nutricional, entre otros, y de los datos obtenidos analizar Índice de robustez, Índice de calidad de Dickson y relación parte área con radical para posicionar la calidad de la planta dentro de su clasificación y así decidir si la población puede ser llevada a campo o no y será capaz de llegar a la etapa adulta (Buamscha *et al.*, 2012 y Sáenz *et al.*, 2014).

Una de las más utilizadas para reforestación es *Pinus devoniana* Lindley, ya que además sirve para producción de resina, madera aserrada, leña y celulosa y es capaz de adaptarse mejor a diferentes ambientes, regularmente es mantenido en sustrato a base de peat moss, vermiculita y agrolita (55:35:10) o peat moss, corteza de pino, agrolita y vermiculita, ya que estas mezclas poseen la consistencia, textura, humedad y materia orgánica adecuada, se le aplica fertilizante de lenta liberación 30-15-10 para garantizar la presencia de nutrimentos a lo largo de la etapa de vivero, cabe mencionar que durante esta etapa la plántula enfrenta situaciones adversas que pueden repercutir en la población total (Aguilera R. Manuel; SIRE: CONABIO-PRONARE, 2001; CONAFOR, 2015).

La presencia de enfermedades patogénicas que afectan la supervivencia y la calidad de los individuos es un grave problema de interés, siendo los hongos aquellos que encabezan la lista de los agentes que más daño causan a la producción gracias a su acelerada reproducción bajo condiciones favorables, por lo que es necesario realizar monitoreos constantes para detectarlos tempranamente (Murace & Aprea, 2011).

Dentro de las especies de hongos más importantes se encuentra *Fusarium circinatum*, que es propio de coníferas, posee conidios que se dispersan por medio del aire, agua o insectos y se presenta durante la etapa de semillero, vivero y adulto, es uno de los más agresivos y puede causar pérdidas del 40% o más ya que provoca una enfermedad conocida como “La secadera”, desde la etapa de semilla, dañando al embrión e hipocótilo, o en fase de plántula causando pudrición de raíz, caída y secado de brote terminal, doblamiento de la planta, decoloración de acículas y muerte de la planta (García-Díaz et al., 2017).

Con base a lo explicado previamente sobre la problemática de *Fusarium circinatum* para los viveristas forestales el objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia de la forma de aplicación de *Trichoderma harzianum* como agente antagónico y comparar 2 mezclas de sustratos para identificar cuál de estos factores o la interacción entre ellos es mejor para aminorar la patogenicidad de *Fusarium circinatum* en las plántulas de *Pinus devoniana*, y al mismo tiempo su efecto sobre la calidad de las mismas.

3.5 Materiales y métodos

3.5.1 Área de estudio

El experimento se estableció en los invernaderos de la División de Ciencias Forestales (DICIFO) de la Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México, localizados en las coordenadas geográficas 19° 29' 34" N y 98° 53' 38" O y una altitud de 2240 msnm.

3.5.2 Diseño experimental y análisis estadístico

Diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial (2 x 2 x 3).

Uso de dos sustratos (S1, S2), con y sin *Fusarium circinatum* (fc), dos formas de aplicación de *Trichoderma harzianum* (al sustrato y a la semilla y sin *Trichoderma harzianum* (th), dando 12 tratamientos con cuatro repeticiones.

Cada repetición fue una mesa portatubetes de 25 cavidades y la unidad experimental equivale a 12 plantas del centro (48 plántulas por tratamiento, y 576 plántulas evaluadas. Para el ANAVA se utilizará el procedimiento Glimix de SAS, versión 9.4 (SAS institute, 2002) y para la comparación de medias se utilizará la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

3.5.3 Contenedores a emplear

Se utilizaron 48 charolas de 25 tubetes de 220 ml cada uno, dichas charolas fueron acomodadas en 12 tratamientos con 4 repeticiones cada uno; de los cuales, los correspondientes a la numeración 1, 2, 5, 6, 9, y 10 se llenaron con S1 como sustrato y los enumerados como 3, 4, 7, 8, 11 y 12 con S2 como sustrato.

3.5.4 Sustratos y semilla

Con base los trabajos realizados por García *et al* y Bernaola *et al.*, 2016 se realizaron 2 mezclas de sustrato en proporción 60-20-20 respectivamente.

S1: Turba de musgo + Agrolita + Vermiculita

S2: Aserrín de pino (de no más de 15 días de aserrado) + Corteza de pino (compostada) + Turba de musgo

A ambas mezclas se les agregó fertilizante de liberación controlada Multicote® 18-6-12, con tiempo de liberación de 8 a 9 meses, en dosis de 7 g / L de sustrato.

La siembra fue directa con 2 semillas de *P. devoniana* en cada tubete, estas fueron previamente desinfectadas con un lavado con hipoclorito de sodio al 10% durante 10 minutos, posteriormente se dejaron en remojo por 24 horas y finalmente se realizó una segunda desinfección con hipoclorito de sodio al 5% durante tres minutos, 30 días después de la siembra se realizó un repique, se realizó riego superficial diario durante la germinación y emergencia de las plantas y posteriormente cada tercer día.

3.5.5 Curva de crecimiento de *Pinus devoniana*

Durante los 60 días posteriores a la siembra se evaluó el porcentaje de emergencia por unidad experimental.

3.5.6 Obtención de cepas de hongos

Inoculación con Trichoderma harzianum

Se uso la cepa comercial PHC® T22 de *T. harzianum* (th), en su presentación de polvo (cepa T-22 KRL-AG2) en dosis de 3.4 g/L de agua, con una dilución de 1X10⁷ ufc/gramo de peso seco.

***Trichoderma harzianum* al sustrato**

Durante la preparación de los sustratos pertenecientes a los tratamientos T1 y T2 (S1) y T3 y T4 (S2) se le agregaron 13 litros de la dilución y se mezclaron perfectamente.

***Trichoderma harzianum* a la semilla**

En 1 litro de la dilución se colocaron durante 60 minutos las semillas correspondientes a los tratamientos T5 y T6 (S1) y T7 y T8 (S2) y una vez extraídas de dicha solución se sembraron inmediatamente.

Testigo

En los tratamientos T9 y T10 (S1) y T11 y T12 (S2) no se aplicó.

Inoculación con Fusarium circinatum

Se utilizó el aislamiento SF11 del vivero de Amealco, Querétaro proporcionado por el Laboratorio de Entomología y Patología de la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma Chapingo, el cual se incrementó en 6 cajas Petri con PDA-Bioxon hasta obtener una colonia de *F. circinatum* que abarcara totalmente la base de la caja Petri, esto bajo condiciones controladas de laboratorio (García., *et al* 2017).

Se llevo a cabo cuando las plántulas tenían 2 meses 20 días de edad; utilizando el contenido de 8 cajas Petri con micelio puro de 22 días de crecimiento y cobertura de al menos 70%, el cual se retiró totalmente con una aguja estéril y se diluyo en 13 lt de agua destilada estéril; la cual presentó una concentración de 1.6×10^6 y se aplicó 20 ml por inyección al sustrato de los tratamientos T2, T4, T6, T8, T10 y T12.

Posteriormente se realizó el monitoreo durante 25 semanas para ubicar y contabilizar el número de plántulas con presencia daños provocados por *Fusarium circinatum*, tales como el cambio en la coloración acicular (verdes a rojizas y posteriormente necróticas), doblamiento de brote apical, perdida de vigor y pudrición de tallo a nivel de cuello (Flores-Pacheco J. A., 2017.).

Cuadro 1. Identificación de tratamientos establecidos en el experimento.

Numero de tratamiento	Tratamiento
T1	S1 + <i>T. harzianum</i> al sustrato
T2	S1 + <i>T. harzianum</i> al sustrato + <i>F. circinatum</i>
T3	S2 + <i>T. harzianum</i> al sustrato
T4	S2 + <i>T. harzianum</i> al sustrato+ <i>F. circinatum</i>
T5	S1 + <i>T. harzianum</i> a la semilla
T6	S1 + <i>T. harzianum</i> a la semilla + <i>F. circinatum</i>
T7	S2 + <i>T. harzianum</i> a la semilla
T8	S2 + <i>T. harzianum</i> a la semilla + <i>F. circinatum</i>
T9	S1 + Te. Sin <i>T. harzianum</i>
T10	S1 + Te. Sin <i>T. harzianum</i> + <i>F. circinatum</i>
T11	S2 + Te sin <i>T. harzianum</i>
T12	S2 + Te sin <i>T. harzianum</i> + <i>F. circinatum</i>

S1 (Turba de musgo + Agrolita + Vermiculita), S2 (Aserrín de pino (de no más de 15 días de aserrado) + Corteza de pino (compostada) + Turba de musgo),

3.5.7 Aislamiento, purificación y conservación de *Fusarium circinatum*

Se seleccionó una plántula sintomática de cada repetición de cada tratamiento inoculado con *F. circinatum*, dando un total de 24 individuos procesados, con base en los trabajos realizados por Robles Yerena *et al.*, 2016; y García *et al.*, 2019, las muestras vegetales fueron fraccionadas y desinfectadas por inmersión en hipoclorito de sodio al 3% por 3 minutos y triple enjuague con agua destilada estéril, posteriormente fueron colocados en cajas Petri con medio de cultivo PDA y fueron almacenadas a 28°C, bajo régimen de 24 horas de luz.

Después de 10 días de crecimiento se realizó la identificación de *Fusarium circinatum* y se procedió al reaislamiento de las colonias desarrolladas, mediante la técnica de raspado de punta de hifa sembrado nuevamente en cajas Petri con medio PDA colocados a 28°C bajo régimen de 24 horas luz hasta obtener crecimientos puros del hongo.

Una vez obtenidas colonias puras de 10 días de se prepararon 10 cajas Petri con 3 divisiones colocando en cada una un medio de cultivo diferente (PDA, CLA y SNA), en

cada división se transfirió un disco de 5 mm de PDA con crecimiento micelial, dichas cajas fueron selladas y colocadas bajo las condiciones descritas anteriormente para obtener micro conidios, fiálides y esporodoquios con macro conidios (García-Díaz *et al.*, 2019 y Cibrián *et al.*, 2008).

3.5.8 Caracterización morfológica

A partir de los aislamientos de la cepa en 3 medios de cultivo: PDA, SNA y CLA (Figura 1), se observó el crecimiento y coloración de la colonia, del micelio y esporodoquios, de estos se realizaron montajes permanentes con glicerina al 100% y azul de metileno y se observaron al microscopio Leica Modelo DM 2500 para el análisis de la formación de macroconidios, microconidios, fiálides, circinas, clamidosporas y esporodoquios evaluando tamaño, forma, coloración y número de septos, además, se registró la formación de fiálides y la presencia o ausencia de clamidosporas. La identificación morfológica del hongo a nivel de género se llevó a cabo con el uso de claves especializadas (Barnett y Hunter, 1998); y la identificación a nivel de especie se basó en las descripciones de Leslie y Sumner (2006).

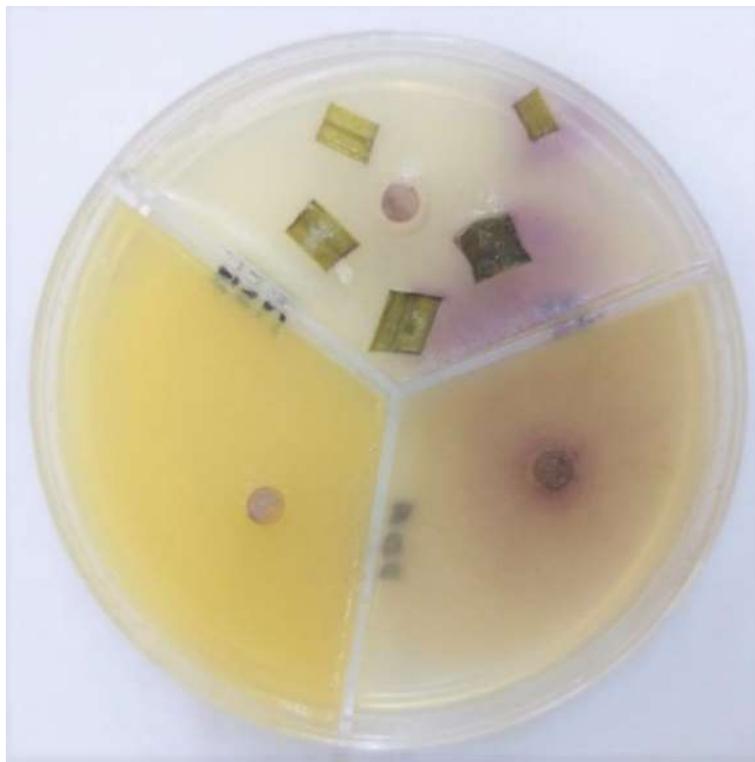


Figura 1. Crecimiento, desarrollo y esporulación de *Fusarium circinatum* en medios de cultivo PDA, SNA y CLA.

3.5.9 Prueba de Incidencia y severidad de *Fusarium circinatum* en plántulas de *Pinus devoniana*

La incidencia de la enfermedad se determinó mediante el registro de síntomas presentes y el número de plántulas muertas, obteniendo el porcentaje de incidencia de la enfermedad a los 9 meses de edad, tomando como tamaño de muestra las 100 plantas que conformaban cada tratamiento inoculado.

La severidad de la enfermedad se estimó mediante una escala diagramática (Figura 2) de la enfermedad presentada en la población y con la fórmula de Townsend y Heuberger descrita a continuación:

$$DS (\%) = \left[\sum \frac{nv}{NV} \right] X 100$$

Donde:

n = Grado de infección acorde a la escala

v = Numero de plantas por categoría

N = Grado máximo de infección

V = Numero de plantas total

La severidad aparente se clasificó de acuerdo a los grados de infección de la plántula (Figura 2.), siendo: Clase 0 = 0% de daño (Planta sana o asintomática); Clase 1 = 20% de daño (Acículas caídas o con amarillamiento distal); Clase 2 = 40% de daño (Marchitez parcial de la plántula); Clase 3 = 60% de daño (Marchitez media en la plántula); Clase 4 = 80% de daño (Marchitez avanzada en la plántula); Clase 5 = 100% de daño (Planta muerta). Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de correlación entre incidencia y severidad, esto con la finalidad de tener un panorama de la estructura del desarrollo de la enfermedad.

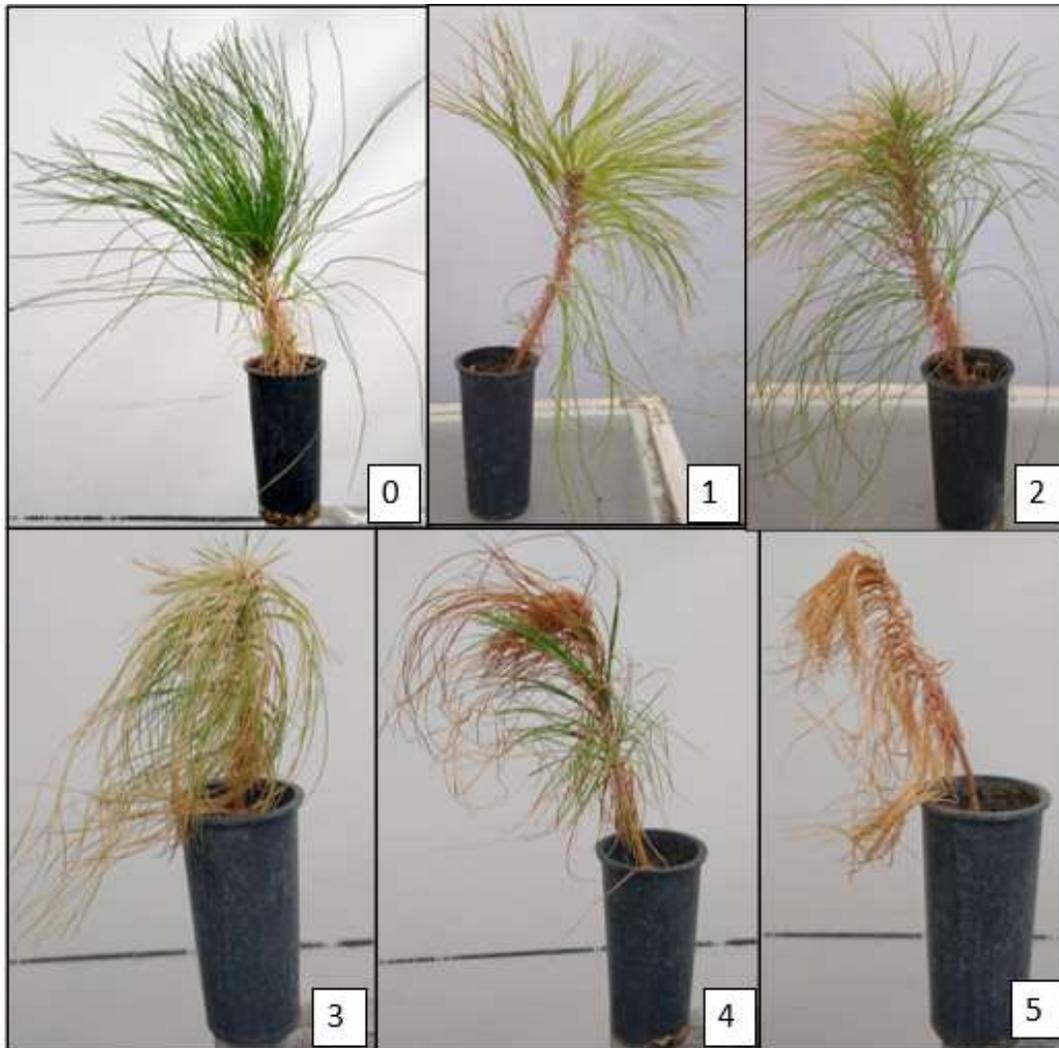


Figura 2. Clases utilizadas para la evaluación de severidad aparente. Se clasifico de acuerdo a los grados de infección mostrados en la plántula, siendo Clase 0 = 0%, Clase 1 = 20%, Clase 2 = 40%, Clase 3 = 60%, Clase 4 = 80% y Clase 5

3.5.10 Variables a evaluar

Se evaluó la capacidad de enfermar a las plántulas mediante el registro de síntomas como coloración rojiza en las acículas, marchitamiento de la plántula, pudrición a nivel de cuello y finalmente la muerte.

3.5.11 Estándares e índices morfológicos

9 meses después de la siembra se seleccionaron 5 plantas céntricas de cada mesa portatubetes, obteniendo 20 plantas por tratamiento, de las cuales se evaluó lo siguiente:

- Diámetro del tallo (D), en diferenciación de raíz principal.

- Altura de la parte aérea (A), desde diferenciación radical hasta el ápice de la yema terminal.
- Peso seco de la raíz (PSR) y peso seco de la parte aérea (PSA), uso de balanza analítica (OHAUS, modelo galaxy 200), con material previamente deshidratado en horno de secado (FELISA, FE-143) a 70 °C, durante 72 horas.
- Relación peso seco de la parte aérea con peso seco de la raíz (PSA/PSR).
- Índice de esbeltez (IE), obtenido al dividir la altura de la planta en cm, entre el valor del diámetro en mm.
- Índice de calidad de dickson (ICD), obtenido con la ecuación: $PST/(A/D) + (PSA/PSR)$, (dickson, leaf, & hosner, 1960).

Que se compararon entre tratamientos.

3.5.12 Extracción de plántula

Una vez seleccionadas y separadas del resto, estas se extrajeron del tubete, sin dañar al cepellón, para posteriormente sumergirlo en cubetas con agua limpia y eliminar el sustrato totalmente sin dañar la raíz de la plántula.

Se inició con la medición de diámetro a nivel de cuello y altura a partir del mismo, los cuales fueron recabados en una base de datos previamente preparada, posteriormente cada plántula fue seccionada en parte aérea y parte radical a nivel de cuello, y cada sección se colocó en una bolsa de papel, se selló y etiqueto de acuerdo al tratamiento, repetición, fragmento y número de planta para reconocer correctamente la muestra.

Finalmente, todas las bolsas, selladas y etiquetadas, fueron llevadas a una estufa Felisa modelo Fe-143 para secar las muestras a una temperatura de 70°C durante 72 horas, una vez concluido este tiempo, cada sección de plántula fue pesada en una balanza analítica OHAUS modelo Galaxy 2000 y anotado los datos obtenidos.

3.6 Resultados

3.6.1 Curva de germinación de *Pinus devoniana*

A partir de los 10 días de siembra se inició el conteo de germinación y culminó 24 días después, esto con el fin de analizar la capacidad germinativa de la semilla, obteniendo 78% de germinación (Figura 3).



Figura 3. Germinación acumulada de la semilla de *Pinus devoniana* a los 35 días de edad.

3.6.2 Identificación morfológica

Del material vegetal sintomático se obtuvieron 16 aislados de los cuales en 100% presentaron crecimiento de colonias identificadas con *Fusarium circinatum* (Figura 4).



Figura 4. Colonia con crecimiento micelial color púrpura a partir de los aislados de plántulas con síntomas monitoreados.

3.6.3 Prueba de Incidencia y severidad de *Fusarium circinatum*

La sintomatología observada inicio en la etapa de post emergencia, donde hubo secamiento, doblamiento apical de la plántula y pudrición de tallo a nivel de cuello, aunado a esto, presencia de acículas cloróticas y retorcidas que posteriormente se tornaron color café rojizo y murieron de manera descendente (Figura 5), dichos síntomas coinciden con los reportados por (Flores-Pacheco, 2017) y (García-Díaz *et al.*, 2017).

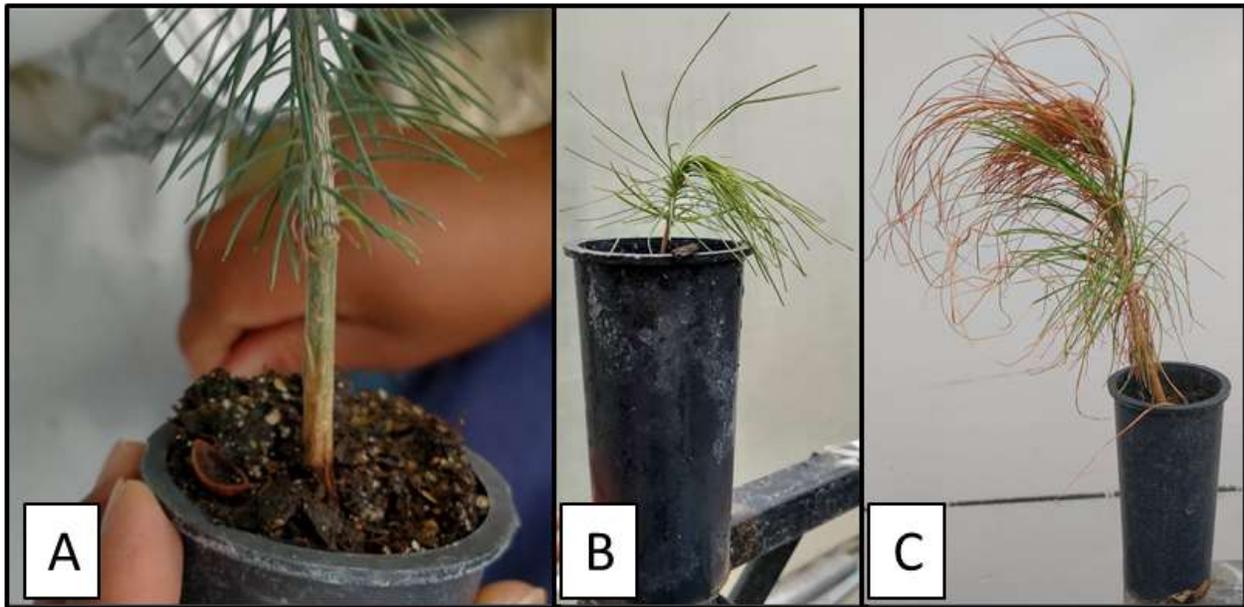


Figura 5. Síntomas observados en plántulas de *Pinus devoniana*, A) Pudrición a nivel de cuello B) Acículas cloróticas y retorcidas; doblamiento de punta. C) Muerte descendente de la planta.

El análisis de las 100 plantas evaluadas por tratamiento inoculado con el patógeno nos arroja que la incidencia durante los 9 meses de evaluación tuvo mortalidad de 46% para el tratamiento 2, de 42% para el tratamiento 4, de 59% para el tratamiento 6, de 58% para el tratamiento 8, de 66% para el tratamiento 10, de 63% para el tratamiento 12 (Cuadro 2), dichos porcentajes son similares a los reportados por (Cruz Marín. V. H. *et al.*, 2015; Flores-Pacheco, 2017; García-Díaz *et al.*, 2019).

Cuadro 2. Incidencia de la enfermedad por *Fusarium circinatum* en plántulas de *Pinus devoniana* de 9 meses de edad.

Numero de tratamiento	% Incidencia
T1	5
T2	46
T3	3
T4	42
T5	4
T6	59
T7	4
T8	58
T9	4
T10	66
T11	3
T12	63

3.6.4 Efecto de *Trichoderma harzianum* y tipo de mezcla sobre la Incidencia de *Fusarium circinatum* a las 2 semanas de evaluación

A continuación, se muestran dos graficas que corresponden al porcentaje acumulado de plantas con presencia de síntomas propios de *Fusarium circinatum*, las cuales ilustran las diferencias presentadas entre los tratamientos, inoculados con *Fusarium circinatum*, entre formas de aplicación de *Trichoderma harzianum* por cada mezcla de sustrato utilizada (Figura 6 y 7).

La sintomatología propia de *Fusarium circinatum* inicio a partir de la semana 12 después de la inoculación y culminaron en la semana 28 tal y como se muestra en la Figura 6 y 7.

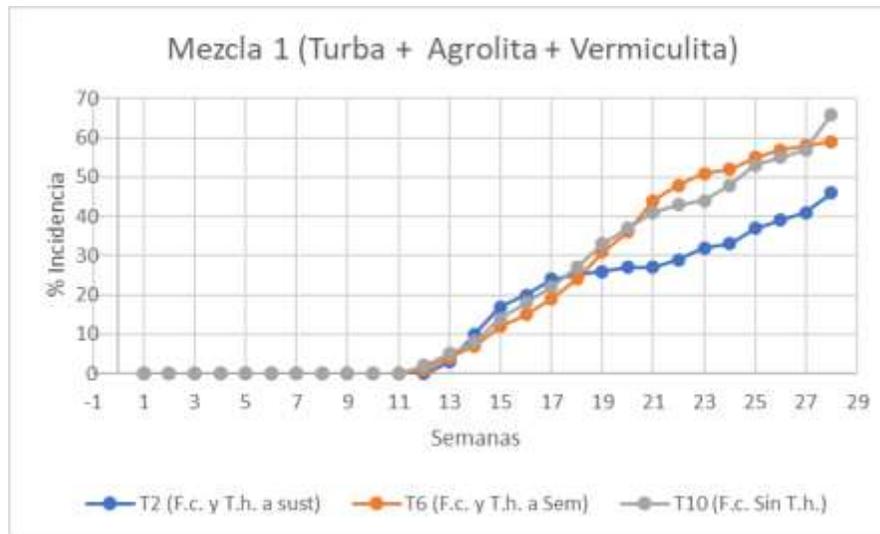


Figura 6. Comparación de incidencia de *Fusarium circinatum* entre tratamientos inoculados con las diferentes formas de aplicación de *Trichoderma harzianum* en mezcla 1 de sustrato.

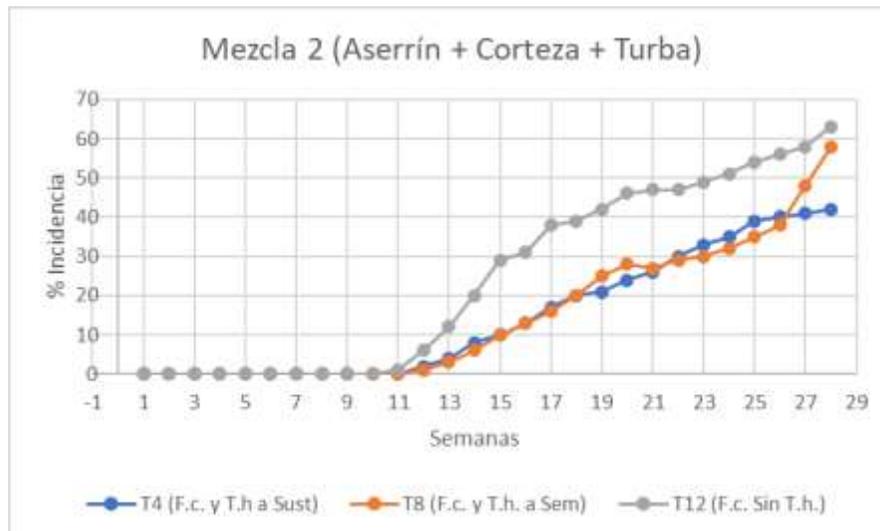


Figura 7. Comparación de incidencia de *Fusarium circinatum* entre tratamientos inoculados con las diferentes formas de aplicación de *Trichoderma harzianum* en mezcla 2 de sustrato.

El análisis de varianza ($p \leq 0.05$) para incidencia indica que el factor estadísticamente significativo en ella es la forma de aplicación de *Trichoderma harzianum* (Cuadro 3), ya que al ser aplicada directamente a la mezcla de sustrato presentó de 13 a 16% menos presencia de *F. circinatum* en comparación con la aplicación a la semilla y casi 20% menor que en donde no se aplicó, esto sucedió en ambas mezclas de sustratos, por otro lado, al realizar la prueba de comparación de medias ($p \leq 0.05$) por el método de Tukey

para formas de aplicación de *T. harzianum* se observó que hubo diferencia estadísticamente significativa entre la aplicación al sustrato y a la semilla siendo menor la incidencia presentada en la aplicación a sustrato, por otro lado, la aplicación de *T. harzianum* a la semilla no mostró diferencia significativa con el testigo, ya que solo disminuyó 4 a 7% en ambas mezclas, a pesar de ello los resultados coinciden con los reportados por (García-Díaz *et al.*, 2017) donde el daño causado por *Fusarium circinatum* fue menor en aquellos tratamientos donde se aplicó *Trichoderma harzianum* a las plántulas de *Pinus greggii*, por otro lado la disminución en el porcentaje de incidencia coincide con el reportado por (Moraga-Suazo *et al.*, 2011) ya que en su investigación mencionan que al aplicar *Trichoderma* a plántulas de *Pinus radiata* la incidencia se reduce más de un 20%.

Finalmente, los resultados obtenidos de este análisis indican que también hubo una disminución en la incidencia del patógeno dentro de aquella población desarrollada en mezcla a base aserrín de pino, corteza de pino y peat moss, si bien esta variación no muestra ser representativa (Cuadro 4) en el análisis estadístico, coincide con los resultados reportados por García-Díaz *et al.*, 2019 para *Pinus greggii* donde indica que la población desarrollada en sustrato a base de aserrín presentó menor incidencia de *Fusarium circinatum*.

Cuadro 3. P-valores asociados al análisis de varianza para Incidencia entre tratamientos, considerando una significancia de 0.05.

Variable	P-valor
Mezcla sustrato	0.3160
<i>Trichoderma harzianum</i>	0.0002
Mezcla sustrato + <i>Trichoderma harzianum</i>	0.8507
<i>Fusarium circinatum</i>	<0.0001
Mezcla sustrato + <i>Fusarium circinatum</i>	0.6467
<i>Trichoderma harzianum</i> + <i>Fusarium circinatum</i>	<0.0001
Mezcla sustrato + <i>Trichoderma harzianum</i> + <i>Fusarium circinatum</i>	0.9915

Cuadro 4. Comparación de medias por aplicación de *Trichoderma harzianum* para incidencia.

Aplicación de <i>Trichoderma harzianum</i>	Media
Sin <i>Trichoderma harzianum</i>	8.5 a
<i>Trichoderma harzianum</i> a la semilla	7.8125 a
<i>Trichoderma harzianum</i> al sustrato	6 b

3.6.5 Severidad de *Fusarium circinatum* a las 29 semanas de evaluación

Los resultados de severidad obtenidos a partir de la fórmula de Townsend y Heuberger se muestran en el cuadro 5, por otro lado, la Figura 8 ilustra la comparación entre tratamientos.

Cuadro 5. Valores de severidad por tratamiento.

Trat	Severidad (%)
T1	4.17
T2	26.17
T3	2
T4	25.17
T5	2.83
T6	33
T7	2.83
T8	24.83
T9	2.33
T10	34
T11	2.33
T12	37.5

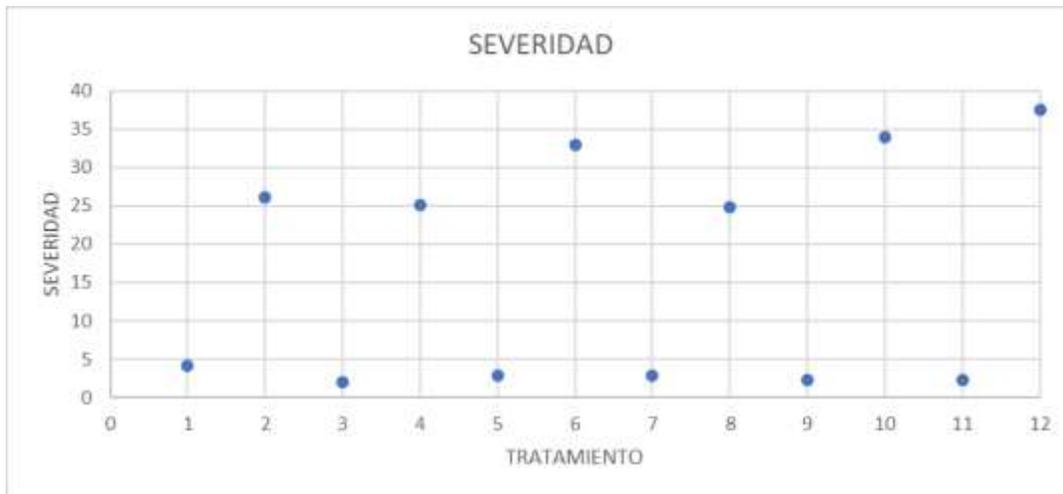


Figura 8. Comparación de severidad entre tratamientos.

Una vez obtenidos los resultados de incidencia y severidad se procedió con el análisis de correlación entre ambas variables, el cual nos indica un valor de 0.98617 (Cuadro 6), el cual resulta ser muy alta pues está muy cercana a 1. Significa que la relación entre las variables es casi de línea recta con pendiente positiva. El hecho de que sea una correlación positiva significa que cuando una de las variables aumenta la otra también aumenta en forma proporcional a la pendiente de la línea que define su relación.

El P-valor <0.0001 correspondiente a la prueba de la hipótesis nula indica que la correlación entre las dos variables es igual a cero. Como puede verse este P-valor $<.0001$, es cercano a cero, lo que implica que la evidencia estadística en contra de la hipótesis de correlación cero es muy fuerte, concluyéndose que la correlación es distinta de cero. donde nos arroja este nos indica que existe una fuerte interacción entre estos análisis, lo cual permite respaldarse entre ellos.

Cuadro 6. Valores obtenidos para análisis de correlación Pearson entre incidencia y severidad con p-valor de <0.0001.

	INC	SEV
INC	1	0.986 <0.0001
SEV	0.986 <0.0001	1

3.6.6 Identificación morfológica.

Una vez obtenidos los 4 aislamientos de cada repetición de cada tratamiento inoculado con *Fusarium circinatum* se procedió a la caracterización morfológica en base a las características observadas en cada elemento (Cuadro 7).

Cuadro 7. Sinopsis morfológica de las características observadas en las preparaciones permanentes del crecimiento de *Fusarium circinatum*.

Macroconidios		Microconidios							Arreglo			Conidióforos		Clamidosporas	Hifas estériles	Esporodocios	Figura
Forma típica	No. de cadenas	Fusiformes	Oval	Oval	Oval a	Ovoide	Clavado	Piriformes	No. de	Cadenas	Cadenas	Falsas	Monofialides				
+	3			+	+	+			0			+	+	+		Naranja	(x)

Fusarium circinatum (Nirenberg y O'Donnell).

La colonia desarrollada presentó micelio color blanco con tonalidades fucsia (Figura 9), tornándose violeta fuerte en medio de cultivo PDA (Figura 9A), de consistencia algodonosa, con pigmento color violáceo en el medio ASN (Figura 9B), la formación de esporodocios fue escasa en medio CLA, estos fueron color anaranjado pálido (Figura

9C), hubo desarrollo de hifas estériles en forma de espiral conocidas como circinas en medio de cultivo ASN, característica distintiva de esta especie (Figura 9G), los macroconidios observados son delgados, curvados, con 2-4 septos, predominando 3 (Figura 9E), midiendo 28-44 * 3.3-3.9 nm, siendo 39 x 3.8 nm en promedio y poseen célula apical curvada y basal poco desarrollada, finalmente los microconidios en forma ovoide a alantoides, unicelulares (Figuras 9F), desarrollándose sobre mono y polifialides (Figuras 9G), estas últimas abundantes, no se observó presencia de clamidosporas; las características y mediciones obtenidas (Cuadro 6) coinciden con las reportadas por García-Díaz *et al.*, 2019, Flores-Pacheco, 2017 y O'Donnell *et al.*, 2022.

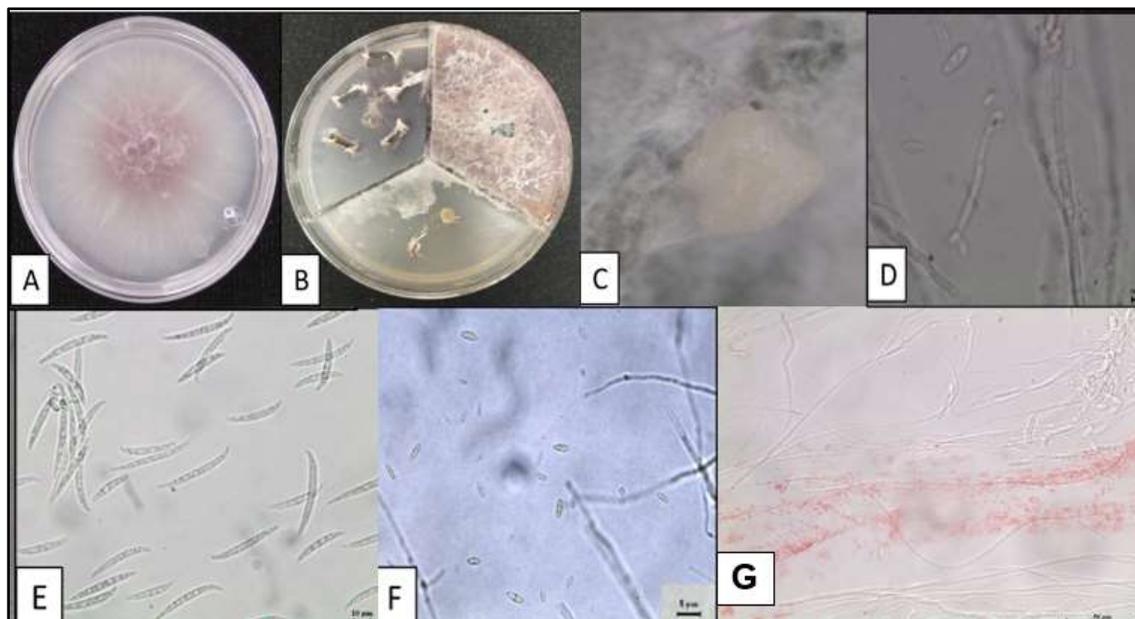


Figura 9. Características macro y microscópicas de *Fusarium circinatum*. A) Micelio algodonoso color púrpura. B) Comparación de micelio en tres medios (PDA, AA y ASN). C) Formación de esporodocios de color naranja pálido. D) Monofialides y polifialides de los microconidios. E) Macroconidios alantoides con la célula basal poco desarrollada. F) Microconidios en falsas cabezas. G) Circinas.

3.6.7 Calidad de planta

Para la evaluación de calidad de planta se concentró el análisis en el Índice de Calidad de Dickson, ya que este incluye todas las variables a analizar así como la relación entre ellas, aquí nos indica que la población presenta valores de entre 0.8 a 1.5 (Cuadro 8), por lo tanto se considera dentro de alta calidad según los parámetros establecidos para especies cespitosas, tal y como lo mencionan Sáenz Reyes J, 2014 y Rueda Sánchez *et*

al., 2012., además, de acuerdo al análisis de varianza ($p \leq 0.05$) para Índice de Calidad de Dickson (Cuadro 9) se obtuvo que únicamente el factor mezcla de sustrato fue estadísticamente significativo para dicho Índice, por otro lado, al realizar la comparación de medias para mezclas de sustrato (Cuadro 10) nos indica que si hubo diferencias estadísticamente significativas entre ellas, siendo el mejor tratamiento la mezcla de sustrato a base de aserrín, ya que fue aquí donde se obtuvieron los mejores valores para índice de calidad de Dickson (Figura 10), estos resultados coinciden con los obtenidos por Vicente-Arbona *et al.*, 2019 quien al evaluar Índice de calidad de Dickson entre plántulas de *Pinus greggii* desarrolladas en diferentes mezclas de sustrato mostraron mejores resultados en aquella mezcla con formulación similar a S2, por otro lado Aguilera-Rodríguez M. *et al.*, 2016 indica que la mezcla de sustrato a base de aserrín permite el desarrollo y obtención de plántulas de alta calidad al evaluarse mediante el Índice de calidad de Dickson, cabe mencionar que aunque la forma de aplicación de *Trichoderma harzianum* no mostro ser significativo en el análisis de varianza, dentro de esta población donde además contenía a *Fusarium circinatum*, el aplicar el hongo antagónico directamente al sustrato mostró valores más altos en comparación con aquellos tratamientos donde se aplicó a la semilla o el testigo,

Cuadro 8. Índice de Calidad de Dickson para cada tratamiento.

Tratamiento	ICD
s1(Tur-Ag-Ver) + <i>T. h</i> a sustrato	0.859
s1(Tur-Ag-Ver) + <i>T. h</i> a sustrato + <i>F. circinatum</i>	0.843
s2(As-Tur-Cor) + <i>T. h</i> a sustrato	1.538
s2(As-Tur-Cor) + <i>T. h</i> a sustrato + <i>F. circinatum</i>	1.448
s1(Tur-Ag-Ver) + <i>T. h</i> a semilla	1.095
s1(Tur-Ag-Ver) + <i>T. h</i> a semilla + <i>F. circinatum</i>	0.864
s2(As-Tur-Cor) + <i>T. h</i> a semilla	1.664
s2(As-Tur-Cor) + <i>T. h</i> a semilla + <i>F. circinatum</i>	1.428
s1(Tur-Ag-Ver) +Sin <i>T. h</i>	1.223
s1(Tur-Ag-Ver) + Sin <i>T. h</i> + <i>F. circinatum</i>	0.994
s2(As-Tur-Cor) +Sin <i>T. h</i>	1.478
s2(As-Tur-Cor) +Sin <i>T. h</i> + <i>F. circinatum</i>	1.349

En la figura 10 se ilustra la comparación entre tratamientos del Índice de Calidad de Dickson (Dickson *et al.*, 1960).

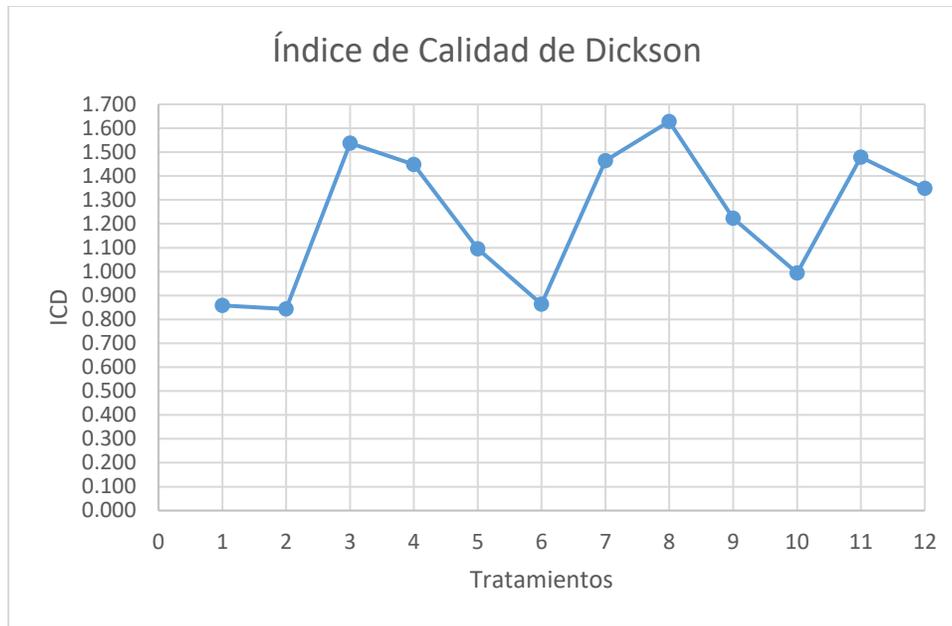


Figura 10. Comparación de Índice de Calidad de Dickson entre tratamientos.

Cuadro 9. P-valores asociados al análisis de varianza para Índice de Calidad de Dickson entre tratamientos, considerando una significancia de 0.05.

Variable	P-valor
Mezcla sustrato	<0.0001
<i>Trichoderma harzianum</i>	0.5717
Mezcla sustrato + <i>Trichoderma harzianum</i>	0.1929
<i>Fusarium circinatum</i>	0.2986
Mezcla sustrato + <i>Fusarium circinatum</i>	0.3634
<i>Trichoderma harzianum</i> + <i>Fusarium circinatum</i>	0.7058
Mezcla sustrato + <i>Trichoderma harzianum</i> + <i>Fusarium circinatum</i>	0.4315

Cuadro 10. Comparación de medias por mezcla de sustrato para Índice de Calidad de Dickson.

Mezcla	Media
Aserrín de pino, corteza de pino y peat moss	1.4799 a
Peat moss, agrolita y vermiculita	0.9814 b

3.7 Conclusiones

Las características morfológicas en el crecimiento de la cepa en estudio coinciden con los descritos por Nirenberg y O'Donnel (1998), y la cepa con la cual se trabajó resultó ser patogénica al causar enfermedad.

La patogenicidad de *Fusarium circinatum*, se vio disminuida en aquellos tratamientos donde se aplicó *Trichoderma harzianum* al sustrato y en la mezcla a base de aserrín, para el caso de la severidad en relación con la incidencia esta mostró un comportamiento lineal con pendiente positiva y alta correlación, por otro lado, a pesar de que la población en general se clasificó como "calidad alta" dentro de los parámetros del índice de calidad de Dickson para especies cespitosas se observó que los índices de calidad más altos estuvieron en aquellos individuos que se desarrollaron en la mezcla a base de aserrín y en donde se aplicó *Trichoderma harzianum* al sustrato.

3.8 Reconocimientos

A la Universidad Autónoma Chapingo, al fondo sectorial conacyt al proyecto Al proyecto A-S-67865 del Fondo Sectorial CONAFOR-CONACYT, titulado "Monitoreo, evaluación de daños, manejo preventivo y control de la secadora y pudrición de raíz causados por *Fusarium spp.*, y las moscas fungosas *Bradysia* y *Lycoriella*". por el apoyo para hacer posible el desarrollo de este proyecto.

3.9 Declaración de conflictos de interés

Los autores del presente trabajo declaran no presentar ningún tipo de conflicto de intereses.

3.10 Referencias bibliográficas

- Aguilera R. Manuel; SIRE: CONABIO-PRONARE. 2001. (2001). *Pinus devoniana Lindley*.
chrome-
extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/http://www.conafor.gob.mx:8080/documen-
tos/docs/13/957Pinus%20devoniana.pdf
- Aguilera-Rodríguez M, Aldrete A., Martínez-Trinidad T., & Ordaz-Chaparro V. (2016).
Producción de Pinus pseudostrabus Lindl. con sustratos de aserrín y fertilizantes de liberación controlada. <https://www.redalyc.org/journal/634/63446831002/html/>

- Buamscha, M. G., Contardi, L. T., Dumroese, R. K., Enricci, J. A., R., R. E., Gonda, H. E., Jacobs, D. F., Landis, T. D., Luna, T., Mexal, J. G., & Wilkinson, K. M. (2012). *Producción de plantas en viveros forestales*.
- Cibrián T., D., D. S. E. García, y M. B. Don Juan. 2008. Manual de identificación y manejo de plagas y enfermedades en germoplasma y planta producida en viveros. CONAFOR. México. 153 p.
- Cruz Marín. V. H., Navarro Rodriguez. S., Florido Barranco. E. J, & Cibrián Tovar, D. (2015). *Hongos entomopatógenos y sus metabolitos, una alternativa sustentable para el control de plagas en viveros forestales y agricultura protegida: caso Bradysia impatiens (Johannsen)*.
<https://sociedadesruralesojs.xoc.uam.mx/index.php/srpma/article/view/292/290>
- Dickson, A., A. L. Leaf and J. F. Hosner 1960. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. *Forestry Chronicle* 36(1): 10-13.
- Flores-Pacheco J. A. (n.d.). *Un asesino de árboles: el chancro resinoso del pino*.
- Flores-Pacheco, J. A. (2017). CHANCRO RESINOSO DEL PINO (*Fusarium circinatum*) HISTORIA, EVOLUCIÓN, DISPERSIÓN Y ESTRATEGIAS DE MANEJO. *Nexo Revista Científica*, 30(01), 19–42. <https://doi.org/10.5377/nexo.v30i01.5170>
- Forestal, C. N. (2015). *Germoplasma Forestal | Comisión Nacional Forestal | Gobierno | gov.mx*. <https://www.gob.mx/conafor/documentos/germoplasma-forestal-27707>
- García-Díaz, S. E., Aldrete, A., Alvarado-Rosales, D., Cibrián-Tovar, D., & Méndez-Montiel, J. T. (2019). *Trichoderma harzianum* Rifai as a biocontrol of *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell in seedlings of *Pinus greggii* Engelm. ex Parl. in three substrates. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 25(3), 353–367. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2018.12.088>
- García-Díaz, S. E., Aldrete, A., Alvarado-Rosales, D., Tovar, D. C., Méndez-Montiel, J. T., Valdovinos-Ponce, G., & Equihua-Martínez, A. (2017). Effect of *Fusarium circinatum* on germination and growth of *Pinus greggii* seedlings in three substrates. *Agrociencia*, 51(8), 895–908.

- Marilú, R., Paucar, B., Francisco, J., Natera, Z., de Jesús, J., Radillo, V., Manuel, V., Alcalá, C., Macías, R. R., & Salcedo Pérez, E. (2016). Calidad de planta en etapa de vivero de dos especies de pino en sistema Doble-Trasplante. In *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* (Vol. 7, Issue 33). chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.scielo.org.mx/pdf/remcf/v7n33/2007-1132-remcf-7-33-00074.pdf
- Moraga-Suazo, P., Opazo, A., Zaldúa, S., González, G., & Sanfuentes, E. (2011). EVALUATION OF *Trichoderma* spp. AND *Clonostachys* spp. STRAINS TO CONTROL *Fusarium circinatum* IN *Pinus radiata* SEEDLINGS. In *CHILEAN JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH* (Vol. 71, Issue 3).
- Murace, M., & Aprea, A. (2011). *Enfermedades forestales. Generalidades*.
- O'Donnell, K., Whitaker, B. K., Laraba, I., Proctor, R. H., Brown, D. W., Broders, K., Kim, H. S., McCormick, S. P., Busman, M., Aoki, T., Torres-Cruz, T. J., & Geiser, D. M. (2022). DNA Sequence-Based Identification of *Fusarium*: A Work in Progress. *Plant Disease*, 106(6), 1597–1609. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-2035-SR>
- Robles Yerena, L., Gerardo Leyva Mir, S., Cruz Gómez, A., Camacho Tapia, M., Nieto Ángel, D., & Manuel Tovar Pedraza, J. (2016). seedlings in the nursery. In *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* (Vol. 7, Issue 36).
- Rueda Sánchez, A., de Dios, J., Solorio, B., Prieto-Ruiz, J. Á., Trinidad Sáenz Reyéz, J., Orozco-Gutiérrez, G., & Castañeda, A. M. (n.d.). *Calidad de planta producida en los viveros forestales de Jalisco*.
- SAS Intitute. 2002. The SAS system for windows. Release 9.4. SAS Institute. Cary, NC.
- Sáenz Reyes J, M. F. J. P. D. , R. S. A. ; H. R. J. (2014). Calidad de planta de tres especies de pino en el vivero "Morelia", estado de Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.scielo.org.mx/pdf/remcf/v5n26/v5n26a8.pdf

Sembrar deforestación: los bosques que México pierde por la agroindustria. (n.d.). Retrieved September 21, 2022, from <https://es.mongabay.com/2022/08/sembrar-deforestacion-en-los-bosques-de-mexico/>

Silvia, D., García, E., Alejandro, O., & Vera, P. (2019). *Incidencia y severidad por Fusarium spp ., y umbral de daño ocasionado por moscas fungosas Bradysia y Lycoriella.*

Vicente-Arbona, J. C., Carrasco-Hernández, V., Rodríguez-Trejo, D. A., & Villanueva-Morales, A. (2019). Seedling quality of *Pinus greggii* produced in sawdust-based growing media. *Madera y Bosques*, 25(2). <https://doi.org/10.21829/myb.2019.2521784>

CAPITULO 4

Efecto de N, P y K en sustrato sobre la patogenicidad de *Fusarium circinatum* en plántulas de *Pinus devoniana*

Effect of N, P, and K in the substrate on the pathogenicity of *Fusarium circinatum* in *Pinus devoniana* seedlings

María Alejandra Ortega-Cerón¹, Elizabeth Hernández-Acosta^{1*}(Autor correspondiente, EHERNANDEZ@chapingo.mx, 5959570126 (<https://orcid.org/0000-0002-1409-1623>), Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Suelos, Carr. México-Texcoco Km. 38.5; Chapingo; Texcoco Edo. De Mex. C.P. 5623 Silvia-Edith García-Díaz² (<https://orcid.org/0000-0001-8843-4521>), Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales, Carr. México-Texcoco Km. 38.5; Chapingo; Texcoco Edo. De Mex. C.P. 56230, Antonio Villanueva-Morales³ (<https://orcid.org/0000-0002-8802-0625>) División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México. C. P. 56230.

(*Dra. Elizabeth Hernández Acosta EHERNANDEZ@chapingo.mx, 595 95 7 01 26)

4.1 Aspectos destacados

Una correcta nutrición puede aminorar el ataque de un patógeno.

Alto porcentaje de N durante la etapa de desarrollo puede favorecer el ataque de *Fusarium*.

La calidad de planta está relacionada directamente con el alto o bajo nivel de calidad de planta.

Trichoderma harzianum favorece fijación de N

4.2 RESUMEN

Los nutrientes disponibles en el sustrato donde se desarrolla una plántula serán parte importante del éxito o fracaso en el desarrollo de la misma, así como en la resistencia que presentarán al ataque de diversos patógenos. El objetivo de este trabajo fue evaluar las concentraciones de macronutrientes de dos sustratos: 1) Turba de musgo, agrolita y vermiculita y 2) Aserrín de pino, Corteza de pino, y Turba de musgo y su relación con la patogenicidad presentada por *Fusarium circinatum* en plántulas de *Pinus devoniana* con previa aplicación de *Trichoderma harzianum* generando 12 tratamientos establecidos en arreglo factorial completamente al azar (2x3x2) en los que se analizó el efecto de la concentración de macronutrientes, la forma de aplicación del hongo antagónico y la interacción entre ellos en la incidencia de *Fusarium circinatum*. Se detectaron diferencias significativas en la presencia de síntomas entre mezclas de sustratos. Los resultados señalan que la patogenicidad de *Fusarium circinatum*, disminuyó significativamente en aquellos tratamientos donde hubo mayores concentraciones de P y K y presencia de *Trichoderma harzianum*, es decir, en la mezcla a base de aserrín.

Palabras clave

Fusarium circinatum, Macronutrientes, Nutrición, Patogenicidad, Sustrato

4.3 ABSTRACT

The available nutrients in the substratum where a seedling is developing will be an important part of the success or the failure of its development, as well as in the resistance that it will present against the attack of several pathogen threats. The main objective of this work was to evaluate the macronutrient concentration of two substrates 1) Peat moss, agrolite and vermiculite and 2) Pine sawdust, pine bark and peat moss and their relationship with the pathogenicity presented by *Fusarium circinatum* in *Pinus devoniana* seedlings with a previous application of *Trichoderma harzarium* generating 12 established treatments in a totally random arrangement (2x3x2) in which the macronutrients concentration's effect, the application method of the antagonist fungus and the interaction between them in the incidence of *Fusarium circinatum*. Relevant differences were detected in the symptoms 'presence between substrate mixtures, Results report a significant decreasing in *Fusarium circinatum* pathogenicity in those treatments with higher P and K concentrations and presence of *Trichoderma harzarium*, that is the sawdust base mixture.

Key words

Fusarium circinatum, Macronutrients, Nutrition, Pathogenicity, Substrate

4.4 Introducción,

En México los viveros forestales han cobrado gran importancia debido a la pérdida de áreas forestales y el deterioro de suelos, razones por las cuales se ha tenido que recurrir a la producción de planta en contenedor que permita la reforestación, esta debe ser de calidad con altas probabilidades de supervivencia en campo, para ello uno de los principales factores a considerar es el sustrato que se va a emplear, este debe garantizar un buen soporte, disponibilidad de nutrientes, correcta retención humedad y drenaje adecuado, cuando estas características están presentes se facilita el mantenimiento de la planta (Rodríguez Laguna, 2010).

Sustrato es aquel material natural o sintético, con componentes orgánicos y minerales que funge como soporte para la planta durante su estadía en el vivero y permite el desarrollo radicular de la misma, por lo que durante la elaboración de un proyecto de producción se debe seleccionar el sustrato adecuado en base a los requerimientos de la especie a producir y al medio ambiente del lugar, además del conocimiento de las propiedades físicas que presente ya que estas no pueden modificarse como las químicas.(Agrosintesis, 2022).

La gran mayoría de viveros forestales en México utilizan la mezcla tradicional a base de peat moss, agrolita y vermiculita para la producción de plántula, sin embargo, esta presenta una elevada retención de humedad y alto porcentaje de materia orgánica, esto se debe principalmente a las características físicas de peat moss y vermiculita, dichas características propician la proliferación de plagas y enfermedades, por lo que se han buscado alternativas que favorezcan el desarrollo de las plántulas y aminoren el ataque de plagas y enfermedades, siendo las mezclas a base de aserrín y corteza de pino algunas de las más sobresalientes por sus buenos resultados (García-Díaz *et al.*, 2017; Agrosintesis, 2022; Reyes-Millalon *et al.*, 2012).

Una vez seleccionado el sustrato se debe poner especial atención en la calidad nutrimental que presenta el sustrato, ya que esta será determinante durante el establecimiento y crecimiento de la plántula debido a la alta demanda de nutrientes, por ello se ha optado por el uso de fertilizantes de liberación controlada, los cuales están recubiertos por minerales o polímeros sensibles a la temperatura o humedad del suelo

que se van descomponiendo y liberando gradualmente los nutrimentos, reduciendo la pérdida por lixiviación. (Intagri, 2005; Reyes-Millalon *et al.*, 2012).

Otro factor a considerar es el monitoreo de enfermedades que afecten la calidad de la población, y una de las más importantes durante la etapa de semillero se conoce como “Secadera” causada por *Fusarium circinatum*, que pertenece a un género cosmopolita que se desarrolla muy bien en ambientes muy húmedos, con altas temperaturas y ricos en materia orgánica, por otro lado, este aumenta su severidad cuando la relación nitrógeno – potasio se altera, es decir, el nitrógeno es escaso en etapas tempranas o incrementa en etapas avanzadas del desarrollo. (DGSV-CNRF, 2020).

Por ello el objetivo de este trabajo fue comparar el contenido de macronutrientes en dos mezclas de sustratos distintas utilizando la dosis tradicional de fertilizante de lenta liberación y analizar su impacto sobre la incidencia de *Fusarium circinatum* en plántulas de *Pinus devoniana*.

4.5 Materiales y métodos

4.5.1 Área de estudio

Los análisis se llevarán a cabo dentro del laboratorio de análisis de suelo y agua del departamento de Suelos de la Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México, localizados en las coordenadas geográficas 19° 29' 34" N y 98° 53' 38" O y una altitud de 2240 msnm.

4.5.2 Diseño experimental

Diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial (2 x 2 x 3).

Uso de dos mezclas de sustratos (S1, S2), con y sin *Fusarium circinatum* (fc), dos formas de aplicación de *Trichoderma harzianum* (al sustrato y a la semilla y sin *Trichoderma harzianum* (th), para un total de 12 tratamientos con cuatro repeticiones.

Prueba de Incidencia de *Fusarium circinatum* en plántulas de *Pinus devoniana*.

La incidencia de la enfermedad se determinó mediante el registro de síntomas presentes y el número de plántulas muertas, con estos datos se obtuvo el porcentaje de incidencia

de la enfermedad a los 9 meses de edad, tomando como tamaño de muestra las 100 plantas que conformaban cada tratamiento inoculado.

4.5.3 Recolección de muestras

Este procedimiento se realizó de acuerdo a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana de Procedimientos de Análisis de Suelos y Certificación de Laboratorios, la cual, para efectos de practicidad será mencionada en el presente documento como “La Norma Oficial”.

Cada repetición fue una mesa portatubetes de 25 cavidades y la unidad experimental estuvo constituida por una muestra compuesta por el contenido de 12 portatubetes seleccionados al azar (4 repeticiones por tratamiento, dando un total de 48 muestras evaluadas). Para el ANAVA se utilizará el procedimiento glmix de SAS, versión 9.4 (SAS institute, 2002) y para la comparación de medias se utilizará la prueba de tukey ($p \leq 0.05$).

Para la mezcla compuesta se seleccionaron de manera aleatoria, bajo una guía de zig-zag, 12 tubetes de cada charola de los que se extrajo el sustrato contenido en ellos, se colocó en charolas de plástico y se homogenizó, de esto se tomó $\frac{1}{4}$ de la mezcla y se homogenizó nuevamente para tomar $\frac{1}{4}$ de dicha muestra, la cual fue almacenada en una bolsa de polietileno de $\frac{1}{2}$ kg etiquetada con los datos de identificación.

4.5.4 Preparación de la muestra

Llevada a cabo de acuerdo a lo mencionado en el Artículo 8° de la Norma Oficial, a través del método AS-04-1998.

Una vez obtenidas las 48 muestras a analizar, estas fueron llevadas al laboratorio de agua y suelos del Departamento de Suelos para ser preparadas y posteriormente someterlas a los análisis correspondientes a fertilidad, enfocado a macronutrientes.

Para el secado de la muestra, el contenido de cada bolsa fue extendida en charolas de plástico debidamente identificadas, cuidando que la capa de sustrato no superara los 2.5 cm de grosor, dichas charolas se colocaron bajo sombra a una temperatura de 24°C y una humedad relativa de 40% durante 4 días.

Una vez que las muestras estuvieron totalmente secas estas fueron cribadas 2 veces con ayuda de un tamiz de acero inoxidable con aberturas de 2 mm de diámetro (malla 10).

4.5.5 Pesado de muestras para análisis

Se utilizó una balanza analítica OHAUS modelo Galaxy 2000 en la que se pesaron 1 muestra de 5 gr y 3 de 2.5 gr de suelo de cada repetición de cada tratamiento, y cada una se guardó dentro de un bote de polietileno de 100 ml con tapa, los cuales fueron etiquetados y colocados en un lugar fresco y seco.

4.5.6 Análisis de pH en agua

El artículo 10 contenido en la Norma Oficial Mexicana nos indica que la determinación del pH del suelo medido en agua, así como la preparación de reactivos necesarios para este procedimiento se realizarán por el método AS-09-1998, del anexo técnico de la misma.

Para este procedimiento se utilizaron los botes que contenían 5 gr de suelo cada uno y se le adicionaron 60 ml de agua destilada, posteriormente cada bote fue cerrado y llevado al Shaker calibrado a 180 rpm durante 30 min, para posteriormente dejarse reposar durante 15 min.

Una vez preparada la solución se realizó la calibración del medidor de pH con solución reguladora de referencia y se enjuagaron correctamente los electrodos con agua destilada para iniciar las lecturas.

Se agitó nuevamente la suspensión y se introdujo el electrodo en ella hasta que el medidor indicara un valor estable, una vez obtenido dicho valor se retiró el electrodo y se enjuagó totalmente con agua destilada para poder realizar la siguiente lectura.

4.5.7 Evaluación de Nitrógeno inorgánico extraíble

Este procedimiento se llevó a cabo bajo el método AS-13-1998 de la Norma Oficial, donde indica los reactivos necesarios, los cuales fueron elaborados acorde a lo establecido en el mismo.

De cada repetición de cada tratamiento se seleccionó un bote con contenido de 2.5 gr de suelo y se le agregó 50 ml de solución de Cloruro de potasio 2N, se tapó correctamente

y se colocó en Shaker calibrado de 180 rpm durante 60 minutos, posteriormente fue llevado a centrifugadora calibrada a 35 rpm durante 10 min.

Dicha solución fue filtrada con ayuda de papel filtro en vasos de precipitado de 80 ml.

En un matraz Erlenmeyer de 125 ml se colocaron 10 mL de solución H_3BO_3 con indicador y conectarlo al tubo de salida del refrigerante para que quede en contacto con el líquido.

Por otro lado, con ayuda de una pipeta totalmente limpia extraer 20 ml del extracto de suelo y colocar en un matraz de destilación y agregar 0.2 gr de MgO calcinado y 0.2 gr de aleación de Dervada, y conectar al aparato de destilación, dejar destilar hasta que el matraz Erlenmeyer complete los 75 mL.

Titular la muestra con ácido sulfúrico 0.005 N hasta el cambio de color de verde a rosa tenue y anotar gasto.

La cantidad de nitrógeno inorgánico se calcula con la siguiente ecuación:

$$N \text{ ppm} = (M - B) * N * 14 * \frac{V_i}{a} * \frac{1}{p} * 1000$$

Donde:

M y B = mL de ácido sulfúrico usados en la titulación de muestra y el blanco respectivamente.

N = Normalidad del ácido = 0.005

V_i = Volumen del extractante = 10 mL

a = Alícuota destilada = 75 mL

p = Peso de la muestra en gramos = 2.5 gr.

4.5.8 Determinación de Fósforo extraíble en suelos neutros y alcalinos (OLSEN)

Este procedimiento se llevó a cabo bajo el método AS-20-1998 de la Norma Oficial, donde indica los reactivos necesarios, los cuales fueron elaborados acorde a lo establecido en el mismo.

Una vez obtenido el pH correspondiente a cada tratamiento se procedió con la selección de análisis de P, siendo T1, T2 y T3 procesados bajo el método Olsen (Cuadro 2).

De cada repetición de cada tratamiento se seleccionó 1 frasco con 2.5 gr de suelo, y en cada uno se vertieron 50 ml de solución extractora Olsen y con ayuda del agitador se agitaron durante 30 min a 180 rpm.

En vasos de precipitado de 80 ml debidamente etiquetados, con ayuda de papel filtro se extrajo el contenido de cada frasco posterior a la agitación.

En matraces de 100 ml debidamente etiquetados se realizaron los procedimientos indicados en la Cuadro 1 y el procedimiento para el método Bray (Cuadro 2).

Cuadro 11. Metodología para realizar la curva para análisis de fósforo extraíble por el método OLSEN

	Paso 1 Sol. 5 ppm	Paso 2 Sol. Ext. Olsen	Paso 3 Agua destilada	Paso 4 Ac. ascórbico	Paso 5 Agua destilada
B	-----	5 mL	25 mL	5 mL	Aforar junto c/muestras
1	1 mL	5 mL	25 mL	5 mL	Aforar junto c/muestras
2	2 mL	5 mL	25 mL	5 mL	Aforar junto c/muestras
3	4 mL	5 mL	25 mL	5 mL	Aforar junto c/muestras
4	6 mL	5 mL	25 mL	5 mL	Aforar junto c/muestras
5	8 mL	5 mL	25 mL	5 mL	Aforar junto c/muestras
6	10 mL	5 mL	25 mL	5 mL	Aforar junto c/muestras

Cuadro 12. Procedimiento de muestras para análisis de fósforo extraíble en suelos neutros y ácidos por el método OLSEN.

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5
	M. filtrada	Sol. Ext. Olsen	Agua destilada	Ac. ascórbico	Agua destilada
B	-----	5 mL	25 mL	5 mL	Aforar junto c/muestras
1	5 mL	5 mL	25 mL	5 mL	Aforar junto c/muestras
2	5 mL	5 mL	25 mL	5 mL	Aforar junto c/muestras
3	5 mL	5 mL	25 mL	5 mL	Aforar junto c/muestras
N	5 mL	5 mL	25 mL	5 mL	Aforar junto c/muestras

Una vez aforados los matraces se dejaron reposar durante 30 min y se leyeron a 882 nm en fotocolorímetro.

Las lecturas obtenidas fueron procesadas con ayuda del algoritmo de Excel, propio de cada método, que se maneja dentro del Laboratorio de Recursos Naturales.

4.5.9 Determinación de Fósforo extraíble en suelos neutros y ácidos (BRAY)

Este procedimiento se llevó a cabo bajo el método AS-21-1998 de la Norma Oficial, donde indica los reactivos necesarios, los cuales fueron elaborados acorde a lo establecido en el mismo.

Una vez obtenido el pH correspondiente a cada tratamiento se procedió con la selección de análisis de P, siendo T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11 y T12 procesados realizando la curva explicada en el cuadro 3 bajo el método Bray (Cuadro 4).

De cada repetición de cada tratamiento se seleccionó 1 frasco con 2.5 gr de suelo, y en cada uno se vertieron 50 ml de solución extractora Bray y con ayuda del “Shaker” se agitaron durante 30 min a 180 rpm.

En vasos de precipitado de 80 ml debidamente etiquetados, con ayuda de papel filtro, se extrajo el contenido de cada frasco posterior a la agitación.

En matraces de 100 ml debidamente etiquetados se realizaron los siguientes procedimientos (Cuadro 3).

Cuadro 13. Metodología para realizar la curva para análisis de fósforo extraíble por el método BRAY.

	Paso 1 Sol. 5 ppm	Paso 2 Sol. Ext. Bray	Paso 3 Agua destilada	Paso 4 Ac. ascórbico	Paso 5 Agua destilada
B	-----	5 mL	25 mL	5 mL	Aforar junto c/muestras
1	1 mL	5 mL	25 mL	5 mL	Aforar junto c/muestras
2	2 mL	5 mL	25 mL	5 mL	Aforar junto c/muestras
3	4 mL	5 mL	25 mL	5 mL	Aforar junto c/muestras
4	6 mL	5 mL	25 mL	5 mL	Aforar junto c/muestras
5	8 mL	5 mL	25 mL	5 mL	Aforar junto c/muestras
6	10 mL	5 mL	25 mL	5 mL	Aforar junto c/muestras

Cuadro 14. Procedimiento de muestras para análisis de fósforo extraíble en suelos neutros y ácidos por el método BRAY.

	Paso 1 M. filtrada	Paso 2 Sol. Ext. Bray	Paso 3 Agua destilada	Paso 4 Ac. ascórbico	Paso 5 Agua destilada
B	-----	5 mL	25 mL	5 mL	Aforar junto c/muestras
1	5 mL	5 mL	25 mL	5 mL	Aforar junto c/muestras
2	5 mL	5 mL	25 mL	5 mL	Aforar junto c/muestras
3	5 mL	5 mL	25 mL	5 mL	Aforar junto c/muestras
N	5 mL	5 mL	25 mL	5 mL	Aforar junto c/muestras

Una vez aforados los matraces se dejaron reposar durante 30 min y se leyeron a 882 nm en fotocolorímetro.

Las lecturas obtenidas fueron procesadas con ayuda del algoritmo de Excel, propio de cada método, que se maneja dentro del Laboratorio de Recursos Naturales.

Determinación de la capacidad de intercambio catiónico y bases intercambiables en todo tipo de suelos.

Este procedimiento se llevó a cabo bajo el método AS-19-1998 de la Norma Oficial, donde indica los reactivos necesarios, los cuales fueron elaborados acorde a lo establecido en el mismo.

De cada repetición de cada tratamiento se seleccionó 1 frasco con 2.5 gr de suelo, y en cada uno se vertieron 33 ml de acetato de amonio y con ayuda del Shaker se agitaron durante 10 min a 180 rpm, posteriormente fueron centrifugados por 8 min a 35 rpm, para finalmente ser filtrados, con ayuda de papel filtro, en vasos de precipitado de 80 mL. Dicho procedimiento se repitió 3 veces.

Una vez culminado el tercer filtrado, el extracto se almaceno en frascos de polipropileno de 100 ml, debidamente etiquetados y cerrados, y se trasladaron al Laboratorio Central de la Universidad Autónoma Chapingo, para realizar la lectura.

4.6 Resultados

Una vez culminada la evaluación de macronutrientes de las muestras obtenidas se obtuvieron los resultados mostrados en la Cuadro 5 y se compararon entre tratamientos (Figura 1), estos se compararon con los parámetros establecidos para cada macronutriente en la Norma Oficial Mexicana de Procedimientos de Análisis de Suelos y Certificación de Laboratorios y nos indica que para nitrógeno los niveles de la mayoría de los tratamientos se clasifican como altos, a excepción de los tratamientos 7 y 11 que se encuentran en nivel intermedio, para el caso del análisis de fósforo los resultados se dividen en los obtenidos por cada uno de los dos métodos, Olsen y Bray, los resultados obtenidos de los 12 tratamientos se encuentran dentro de la clasificación de niveles muy altos y finalmente para potasio nos indica que los 12 tratamientos se encuentran clasificados como niveles bajos.

Cuadro 15. Compilación de concentraciones de cada elemento obtenidos para cada tratamiento.

T	Tratamiento	pH	N	P	K
1	s1(Tur-Ag-Ver) + <i>T. h</i> a sustrato	7.24	56	45.1525	21.975
2	s1(Tur-Ag-Ver) + <i>T. h</i> a sustrato + <i>F. circinatum</i>	7.26	47.25	50.0425	21.225
3	s2(As-Tur-Cor) + <i>T. h</i> a sustrato	7.13	56.00	49.76	25.65
4	s2(As-Tur-Cor) + <i>T. h</i> a sustrato + <i>F. circinatum</i>	5.99	52.5	62.9375	25.45
5	s1(Tur-Ag-Ver) + <i>T. h</i> a semilla	6.39	57.75	51.485	24.7
6	s1(Tur-Ag-Ver) + <i>T. h</i> a semilla + <i>F. circinatum</i>	6.83	40.25	46.3875	24.525
7	s2(As-Tur-Cor) + <i>T. h</i> a semilla	6.91	38.5	61.81	28.125
8	s2(As-Tur-Cor) + <i>T. h</i> a semilla + <i>F. circinatum</i>	6.71	70	59.675	27.075
9	s1(Tur-Ag-Ver) +Sin <i>T. h</i>	6.88	75.25	66.7925	20.7
10	s1(Tur-Ag-Ver) + Sin <i>T. h</i> + <i>F. circinatum</i>	6.99	64.75	71.78	15.125
11	s2(As-Tur-Cor) +Sin <i>T. h</i>	6.75	29.75	83.3475	21.6
12	s2(As-Tur-Cor) +Sin <i>T. h</i> + <i>F. circinatum</i>	6.89	45.5	91.5425	20.75

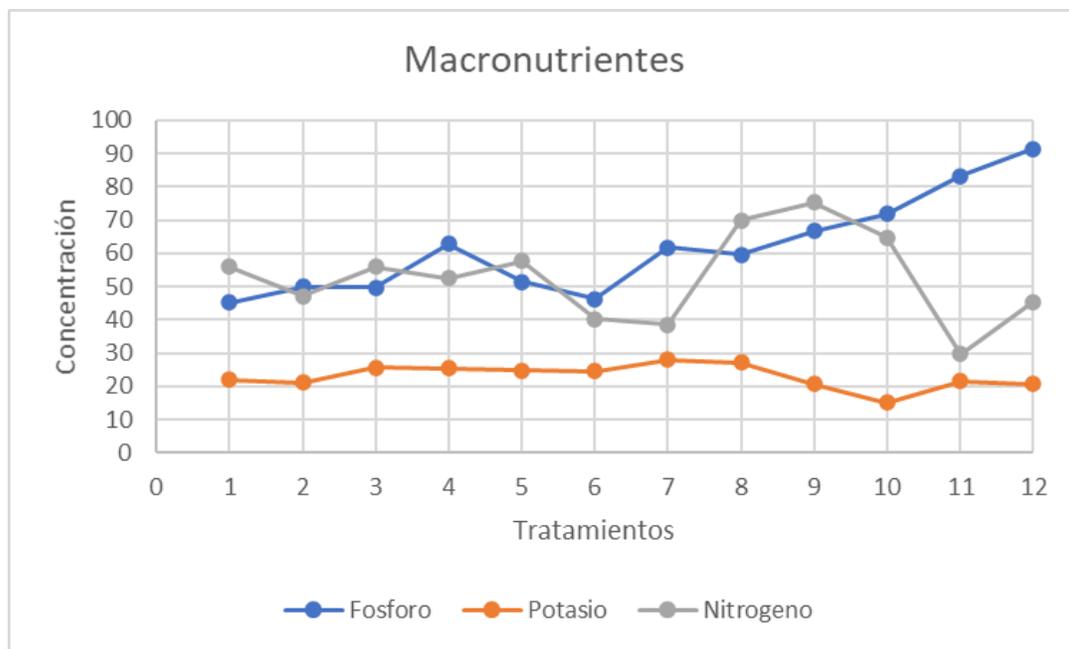


Figura 11. Comparación de concentraciones de macronutrientes por tratamiento.

Las concentraciones de los macronutrientes fueron asociadas con los factores de cada tratamiento para analizar la relación existente entre ellos y su impacto en la incidencia mostrada en la Cuadro 6.

Cuadro 16. Resultados de incidencia obtenidos en el capítulo 3 del presente trabajo.

Numero de tratamiento	Tratamiento	% Incidencia
T1	S1 + <i>T. harzianum</i> al sustrato	5
T2	S1 + <i>T. harzianum</i> al sustrato + <i>F. circinatum</i>	46
T3	S2 + <i>T. harzianum</i> al sustrato	3
T4	S2 + <i>T. harzianum</i> al sustrato+ <i>F. circinatum</i>	42
T5	S1 + <i>T. harzianum</i> a la semilla	4
T6	S1 + <i>T. harzianum</i> a la semilla + <i>F. circinatum</i>	59
T7	S2 + <i>T. harzianum</i> a la semilla	4
T8	S2 + <i>T. harzianum</i> a la semilla + <i>F. circinatum</i>	58
T9	S1 + Te. Sin <i>T. harzianum</i>	4
T10	S1 + Te. Sin <i>T. harzianum</i> + <i>F. circinatum</i>	66
T11	S2 + Te sin <i>T. harzianum</i>	3
T12	S2 + Te sin <i>T. harzianum</i> + <i>F. circinatum</i>	63

Una vez realizada la comparación de concentraciones de nitrógeno por tratamiento (Figura 2), el análisis de varianza ($p \leq 0.05$) para nitrógeno indica que el factor estadísticamente significativo para este macronutriente es el tipo de sustrato, así como las interacciones de sustrato con *T. harzianum*, sustrato con *F. circinatum* y sustrato con *F. circinatum* y *T. harzianum* (Cuadro 6), sin embargo, al realizar la prueba de comparación de medias ($p \leq 0.05$) por el método de Tukey únicamente se encontraron diferencias significativas entre los sustratos (Cuadro 7) donde nos indica que los valores más altos de nitrógeno se encontraron en la mezcla 1 compuesta por peat moss, agrolita y vermiculita, y en las interacciones sustrato y aplicación de *T. harzianum* (Cuadro 8) donde nos indica que solo hubo diferencias entre mezclas de sustrato y la presencia o ausencia de *Trichoderma*, indicando que los valores más altos de nitrógeno se encontraron en la mezcla 1 sin *T. harzianum* y los más bajos en la 2 sin aplicación de *Trichoderma*, al comparar estos resultados con los valores obtenidos con la incidencia por tratamientos se observa que las concentraciones más altas se encontraron en la

mezcla de sustrato 1 siendo esta donde hubo mayor porcentaje de incidencia de la enfermedad, estos resultados coinciden con lo descrito por Vivas & Solla, 2009 en su trabajo, donde menciona que nitrógeno favorece el aumento en la mortalidad de *P. pinaster* por *F. circinatum*, esto quizás por que inhibe ciertas defensas de la planta frente a enfermedades, por otro lado Martins P. *et al.*, 2008 coincide al mencionar que *P. pinaster* con mayor fertilización de nitrógeno presentaron mayor clorosis foliar y daño en yema apical por *F. oxysporum*, mencionando nuevamente que este macronutriente favorece el ataque del patógeno, por lo que la disminución en las concentraciones del mismo podría favorecer la disminución del daño causado por hongos del género *Fusarium*.

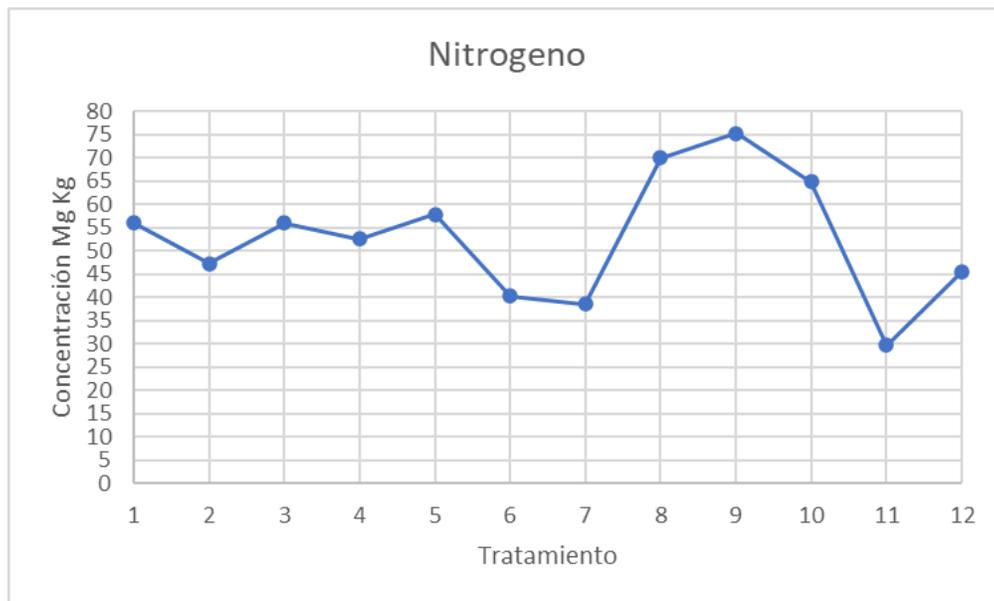


Figura 12. Comparación de concentraciones de Nitrógeno por tratamiento.

Cuadro 17. P-valores asociados al análisis de varianza para Nitrógeno entre tratamientos, considerando una significancia de 0.05.

Efecto	P-value
Mezcla sustrato	0.0044
<i>T. harzianum</i>	0.8001
Mezcla sustrato * <i>Trichoderma harzianum</i>	<0.0001
<i>Fusarium circinatum</i>	0.6664
Mezcla sustrato * <i>Fusarium circinatum</i>	<0.0001
<i>Trichoderma harzianum</i> * <i>Fusarium circinatum</i>	0.1413
Mezcla sustrato * <i>Trichoderma harzianum</i> * <i>Fusarium circinatum</i>	0.008

Cuadro 18. Comparación de medias por sustrato para Nitrógeno.

Sustrato	Media
1 (Turba de musgo, agrolita y vermiculita)	56.875 a
2 (Aserrín de pino, corteza de pino y turba de musgo)	48.7083 b

Cuadro 19. Comparación de medias por interacción de sustrato y aplicación de *Trichoderma harzianum* para Nitrógeno.

Sustrato	<i>T. harzianum</i>	Media
1 (Turba de musgo, agrolita y vermiculita)	Sin	70 a
2 (Aserrín de pino, corteza de pino y turba de musgo)	Al sustrato	54.25 b
2 (Aserrín de pino, corteza de pino y turba de musgo)	A la semilla	54.25 b
1 (Turba de musgo, agrolita y vermiculita)	Al sustrato	51.625 b
1 (Turba de musgo, agrolita y vermiculita)	A la semilla	49 b
2 (Aserrín de pino, corteza de pino y turba de musgo)	Sin	37.625 c

Una vez realizada la comparación de concentraciones de fósforo por tratamiento (Figura 3), el ANOVA con $p \leq 0.05$ para el mismo indica que la mezcla de sustrato y la forma de aplicación de *T. harzianum*, por separado son los factores que muestran diferencias estadísticamente significativas para este macro elemento (Cuadro 9), al realizar la prueba de comparación de medias ($p \leq 0.05$) por el método de Tukey para mezclas de sustrato y aplicación de *T. harzianum* nos muestra que solo el primer factor presenta diferencias importantes entre ellas, siendo la mezcla 2 la que presenta mayores concentraciones de fósforo (Cuadro 10), y al hacer la comparación de este resultado con la incidencia mostrada se observa que fue en ella donde hubo menor presencia del patógeno, Martins P. *et al.*, 2008 no menciona al fósforo como elemento determinante para el ataque de *F. circinatum* sino más bien como un aditivo que en presencia de nitrógeno favorece el desarrollo de patógenos como *Fusarium*, por otro lado Vivas M. *et al.*, 2009 menciona que las adecuadas concentraciones de fósforo favorecen el desarrollo general de la planta más no la susceptibilidad al patógeno; finalmente algunos autores mencionan que no se debe sembrar en presencia de altas concentraciones de fósforo ya que este puede favorecer el establecimiento de *F. circinatum*, esto por la posible presencia de altas concentraciones de nitrógeno.

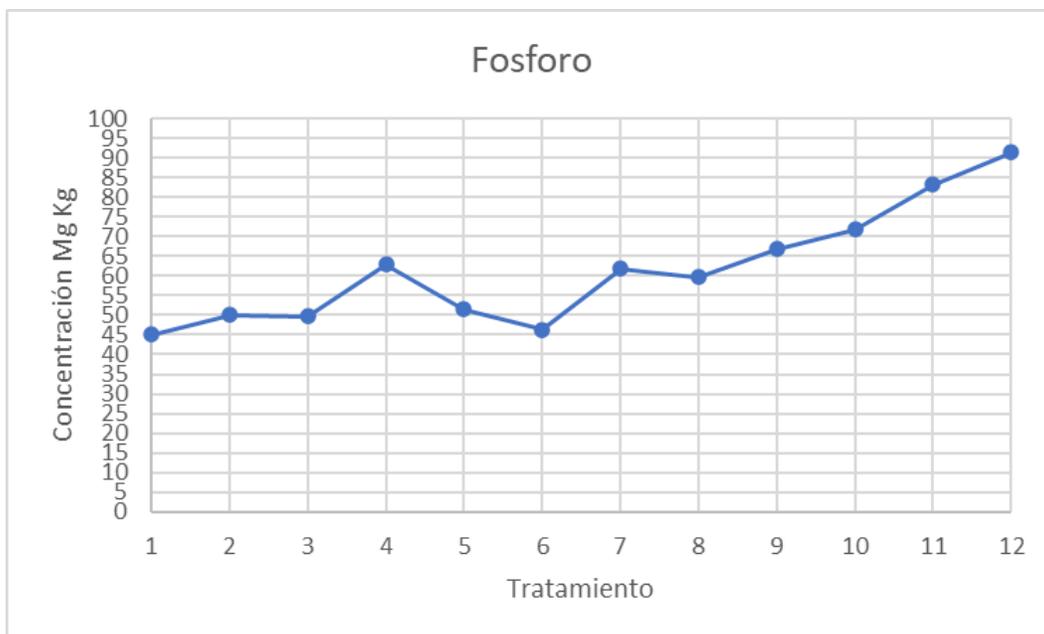


Figura 13. Comparación de concentraciones de Fósforo por tratamiento.

Cuadro 20. P-valores asociados al análisis de varianza para fósforo entre tratamientos, considerando una significancia de 0.05.

Efecto	P-value
Mezcla sustrato	0.0003
<i>T. harzianum</i>	<0.0001
Mezcla sustrato * <i>Trichoderma harzianum</i>	0.4904
<i>Fusarium circinatum</i>	0.2260
Mezcla sustrato * <i>Fusarium circinatum</i>	0.4632
<i>Trichoderma harzianum</i> * <i>Fusarium circinatum</i>	0.2547
Mezcla sustrato * <i>Trichoderma harzianum</i> * <i>Fusarium circinatum</i>	0.9313

Cuadro 21. Comparación de medias por mezcla sustrato para Fósforo.

Mezcla	Media
2 (Aserrín de pino, corteza de pino y turba de musgo)	68.1787 a
1 (Turba de musgo, agrolita y vermiculita)	55.2733 b

Finalmente, una vez realizada la comparación de concentraciones de potasio por tratamiento (Figura 4) el análisis de varianza con $p \leq 0.05$ para potasio indica que la mezcla de sustrato y la aplicación de *Trichoderma* resultaron significativos en su presencia, sin embargo, al realizar la prueba de comparación de medias ($p \leq 0.05$) por el método de Tukey para ambos factores por separado nos indica que únicamente hay diferencias significativas importantes entre mezclas, donde muestra que las concentraciones más altas se encontraron en la compuesta por aserrín, corteza y peat moss (Cuadro 12), al realizar la comparación de variación de concentraciones por mezcla de sustrato con los arrojados para incidencia nos indica que esta mezcla obtuvo valores más bajos, estos resultados se contraponen con los presentados por Martins P. *et al.*, 2008, quien menciona que K es un macronutriente que favoreció el ataque de *Fusarium oxysporum* en *P. pinaster*, ya que las plantas con fertilización de potasio presentaron mayor clorosis, y con los mencionados por Vivas & Solla, 2009 quien menciona que este

macroelemento en presencia de nitrógeno favorece la patogenicidad de *Fusarium circinatum*.

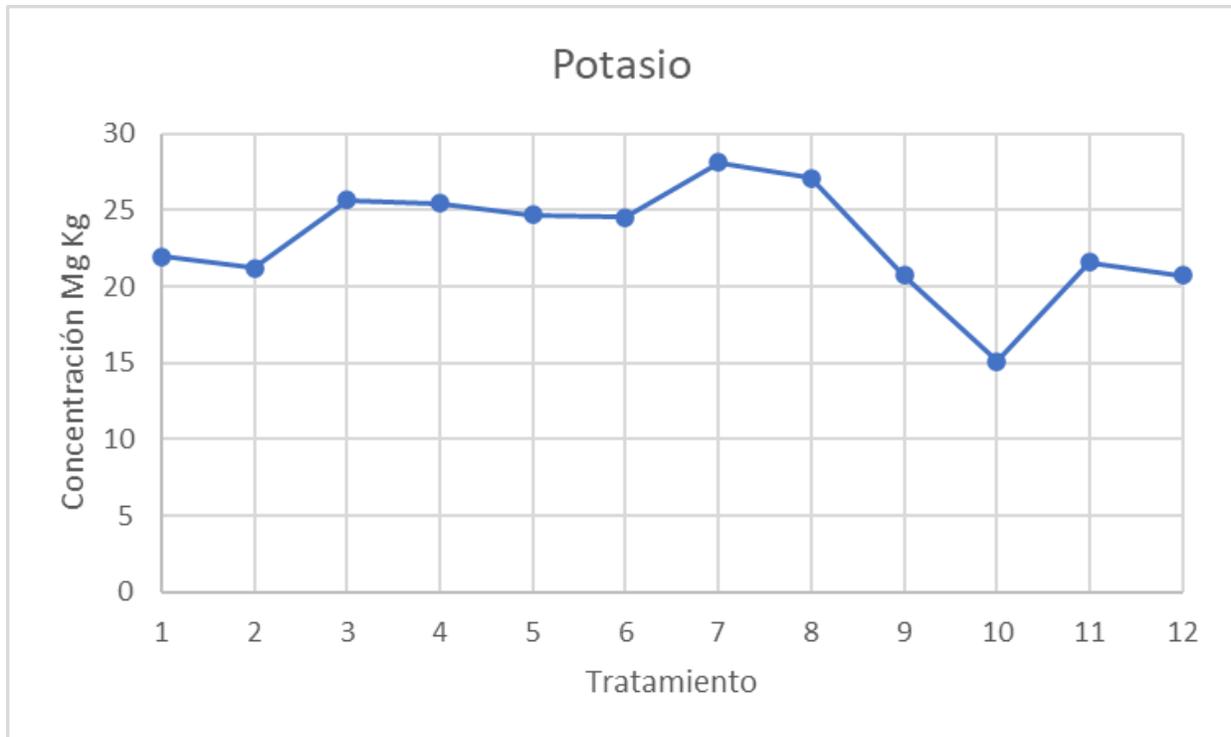


Figura 14. Comparación de concentraciones de Potasio por tratamiento.

Cuadro 22. P-valores asociados al análisis de varianza para potasio entre tratamientos considerando una significancia de 0.05.

Efecto	P-value
Mezcla sustrato	0.0036
<i>T. harzianum</i>	<0.0001
Mezcla sustrato * <i>Trichoderma harzianum</i>	0.9337
<i>Fusarium circinatum</i>	0.1976
Mezcla sustrato * <i>Fusarium circinatum</i>	0.5062
<i>Trichoderma harzianum</i> * <i>Fusarium circinatum</i>	0.5205
Mezcla sustrato * <i>Trichoderma harzianum</i> * <i>Fusarium circinatum</i>	0.5585

Cuadro 23. Comparación de medias por mezcla sustrato para Fósforo.

Mezcla	Media
2 (Aserrín de pino, corteza de pino y turba de musgo)	24.775 a
1 (Turba de musgo, agrolita y vermiculita)	21.375 b

4.7 Conclusiones

Existió menor incidencia y severidad de *Fusarium circinatum*, en los tratamientos donde se aplicó *Trichoderma harzianum* al sustrato. La incidencia fue significativamente menor en la mezcla 60% de aserrín de pino, 20% de corteza de pino y 20% de turba de musgo la que presentó menores concentraciones de N y mayores concentraciones de P y K.

Los tratamientos con mayor índice de calidad de Dickson, se encontraron en la mezcla 60% de aserrín de pino, 20% de corteza de pino y 20% de turba de musgo.

La disminución en las concentraciones de nitrógeno disminuyó el ataque causado por *Fusarium circinatum*, por otro lado, al fertilizar con fósforo ayudó al desarrollo de la plántula sin alterar sus barreras frente al patógeno.

Mantener un adecuado balance entre nitrógeno y potasio en el sustrato durante la etapa de establecimiento y crecimiento de la planta, mantendrá una baja incidencia del patógeno.

4.8 Reconocimientos

A la Universidad Autónoma Chapingo, al fondo sectorial conacyt y al proyecto Al proyecto A-S-67865 del Fondo Sectorial CONAFOR-CONACYT, titulado “Monitoreo, evaluación de daños, manejo preventivo y control de la secadora y pudrición de raíz causados por *Fusarium spp.*, y las moscas fungosas *Bradysia* y *Lycoriella*”. por el apoyo para hacer posible el desarrollo de este proyecto.

4.9 Declaración de conflictos de interés

Los autores del presente trabajo declaran no presentar ningún tipo de conflicto de intereses.

4.10 Referencias bibliográficas

- Agrosíntesis. (2022). *Sustratos y sus propiedades | Revista AgroSíntesis*.
<https://www.agrosintesis.com/sustratos-y-sus-propiedades/>
- DGSV-CNRF. (2020). *Podredumbre de raíces por Fusarium spp (Hypocreales: Nectriaceae en maíz)*.
- García-Díaz, S. E., Aldrete, A., Alvarado-Rosales, D., Tovar, D. C., Méndez-Montiel, J. T., Valdovinos-Ponce, G., & Equihua-Martínez, A. (2017). Effect of fusarium circinatum on germination and growth of Pinus greggii seedlings in three substrates. *Agrociencia*, 51(8), 895–908.
- Intagri. (2005). *Fertilizantes de Liberación Controlada, Lenta y Estabilizados | Intagri S.C.*
<https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/fertilizantes-de-liberacion-controlada-lenta-y-estabilizados>
- Martins P., Moreira X., Zas R., Sampedro L., & Solla A. (2008). SUSCEPTIBILIDAD DE Pinus pinaster A Fusarium oxysporum EN CAMPO: VARIACIÓN FAMILIAR Y EFECTO DE LA FERTILIZACIÓN. *Sociedad Española de Ciencias Forestales*, 26, 97–102.
- Reyes-Millalon, J., Gerding, V., & Thiers-Espinoza, O. (2012). Fertilizantes de liberacion controlada aplicados al establecimiento de pinus radiata d. don en Chile. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 18(3), 313–328.
<https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2011.08.060>
- Rodríguez Laguna, R. (2010). *Manual de prácticas de viveros forestales*. 49.
http://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icap/LI_IntGenAmb/Rodri_Laguna/2.pdf
- Vivas M., Vrhovnik M., & Solla A. (2009). *Fertilización de plántulas de Pinus pinaster y su efecto en la susceptibilidad a Fusarium circinatum*.
<https://www.researchgate.net/publication/236970118>

CAPITULO 5

CONCLUSIÓN GENERAL

La cepa de *Fusarium circinatum* trabajada en este proyecto mostró ser patogénica al causar enfermedad y no requirió la presencia de lesiones en la población de plántulas para establecerse, por otro lado, se corroboró que existe una fuerte correlación positiva entre incidencia y severidad de éste, las cuales se vieron disminuidas en la población que se encontraba en la mezcla S2 (60% de aserrín de pino, 20% de corteza de pino y 20% de turba de musgo) y en donde se aplicó *Trichoderma harzianum* directamente al sustrato, y se observó que la interacción de estos dos factores disminuyó considerablemente la patogenicidad de *F. circinatum*, por lo que se sugiere el cambio de la mezcla tradicional y la aplicación de *T. harzianum* de manera preventiva en sustrato, también, se verificó que las plántulas que se desarrollaron en aquellos tratamientos donde interactuaron la aplicación del hongo antagónico y la mezcla S2 mostraron mejores resultados en la evaluación del índice de calidad de Dickson.

Al realizar el análisis de macronutrientes en sustratos este arrojó que la mezcla S2 presentó menores concentraciones de N y mayores concentraciones de P y K, y la forma de aplicación de *Trichoderma harzianum* no tuvo relevancia en dichos resultados, lo cual, indica que las altas concentraciones de nitrógeno y bajas concentraciones de potasio tienden a favorecer el establecimiento de *Fusarium circinatum*, y a disminuir la calidad de plántula, por lo que es importante mantener ambos macronutrientes en correcto balance.

Es importante recalcar que este proyecto intenta iniciar a dar peso a la evaluación de severidad en coníferas, tema no muy estudiado, y se recomienda seguir con ello ya que podría favorecer a la predicción del ciclo de la enfermedad y así tener un mejor control de ella.

Entonces, si bien este trabajo busca dar opciones que permitan disminuir la patogenicidad de *Fusarium circinatum* en la etapa de vivero comparando 2 mezclas de sustrato se debe optar por la evaluación de otros sustratos, el conocimiento a profundidad de sus características y su interacción con antagonistas que favorezcan el control de este y otros hongos de suelo.