



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DIVISIÓN DE CIENCIAS FORESTALES

EFFECTIVIDAD BIOLÓGICA DE *Trichoderma* SPP CONTRA HONGOS
CAUSANTES DE DAMPING OFF EN VIVEROS FORESTALES.

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

PRESENTA

BONIFACIO DON JUAN MACÍAS

Chapingo, Texcoco, Estado de México
Marzo de 2006



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



**EFFECTIVIDAD BIOLÓGICA DE *Trichoderma* SPP CONTRA HONGOS
CAUSANTES DE DAMPING OFF EN VIVEROS FORESTALES**

Tesis realizada por **Bonifacio Don Juan Macías** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

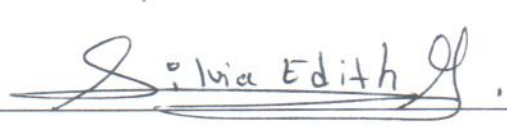
MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

DIRECTOR:



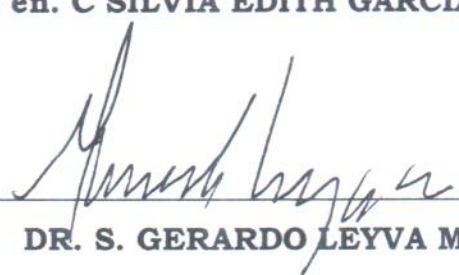
DR. DAVID CIBRIAN TOVAR

ASESOR:



M. en. C SILVIA EDITH GARCIA DIAZ

ASESOR:



DR. S. GERARDO LEYVA MIR

ASESOR:



DR. JOSE TULIO MENDEZ MONTIEL

Chapingo, Texcoco, Estado de México
Marzo de 2006

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que colaboraron en la culminación de este trabajo, el cual, sin ellos, no hubiera sido posible su culminación.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme brindado el apoyo financiero para la realización de mis estudios de Postgrado.

A la Universidad Autónoma Chapingo por contemplarme dentro del programa de Postgrado de la División de Ciencias Forestales, razón por la cual recibí un apoyo económico, que me ayudó en mucho para iniciar y concluir mi formación académica de postgrado.

Al Dr. David Cibrián Tovar, por la dirección y tiempo brindado para desarrollar este trabajo, y en especial, por despertar en mí el interés de investigar este tema, gracias por depositar la confianza para desarrollar esta investigación y muy en especial, por la amistad que me ha brindado como persona y como maestro.

A la M. en C. Silvia Edith García Díaz por su invaluable disposición en la revisión y redacción de este trabajo, pero sobre todo su gran calidad humana y amistad brindada antes y después del término de esta investigación.

Al Dr S. Gerardo Leyva Mir por sus atinadas sugerencias, tiempo y valiosa contribución que ayudaron al mejoramiento del presente trabajo.

Al Dr José Tulio Méndez Montiel por la revisión y sugerencias hechas para que este trabajo sea de interés a la sociedad.

Al Ph D. Francisco Zamudio Sánchez, una persona excepcional, el cual despierta el interés del alumno por indagar y hacer las cosas correctamente, académicamente y en la vida diaria.

A la Dra. Amparo Borja de la Rosa por su amistad y apoyo brindado durante mi estancia de Postgrado.

Al M. en C. Alejandro Corona Ambriz, por su amistad y apoyo incondicional brindado.

A todos los catedráticos del programa de Postgrado que influyeron directa e indirectamente en mi formación académica.

A mis amigos y compañeros de Postgrado, con quienes compartí momentos inolvidables. Oscar Leonel, Anwar, Adrián, Javier, Gabriela, Gricelda, Mario, Honoria, Joaquina, Osyel, Juan y Maribel, gracias por su amistad y apoyo siempre estarán en mi corazón.

Al Señor Wenceslao Sánchez por su amistad, consejos y apoyo brindado siempre.

A la familia Hernández González, por los momentos de alegría, amistad y apoyo brindado, siempre los recordare.

A la Señora Maria de los Ángeles Lazcares, por su valiosa amistad y apoyo brindado y por hacer más agradable mi estancia antes y después de la investigación.

DEDICATORIA

A Dios por permitirme vivir este momento tan especial para mí y poder dedicar este trabajo a mis seres queridos.

A mi esposa Esbeydi y mi hijo Ulises, quienes me apoyaron en todo momento y me alentaron a seguir adelante, además de que compartieron momentos tristes y de alegría que este reto nos impuso por siempre estarán en mi corazón.

A mis Padres: Alicia y Benito[†]:

Quienes con su amor y cariño me han inculcado respeto tolerancia deseos y tenacidad para buscar la superación en la vida.

A mis:hermanos y hermanas: Polo, Rafaela, Cirilo, Tito, Rodrigo, Mario, Felipa, Maria y Eva, con todo el cariño y amor que nos mantiene unidos.

A mis suegros Elvia y Bernabé quienes me han apoyado en todo momento en el cuidado de mi familia.

A mis cuñados y cuñadas por el respeto y apoyo que han otorgado a mi familia.

A mis sobrinas y sobrinos por la amistad, convivencia, estímulo y deseos de superación que me han demostrado.

Y a todos mis amigos y familiares, con un gran respeto y admiración siempre los tengo en mi corazón.

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor nació en Martínez de la Torre, Veracruz, el 8 de mayo de 1971, cursó sus estudios de primaria y secundaria en la misma ciudad. En 1994 ingresó a la preparatoria agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, donde estudió también su licenciatura en el Departamento de Parasitología Agrícola, obteniendo el título de ingeniero Agrónomo, Especialista en Parasitología Agrícola en el año 2001.

En diciembre de 2001 a junio de 2002 trabajó en la planta de residuos orgánicos, bordo poniente, en el proceso de composteo de material orgánico. De Agosto de 2002 a junio de 2003 colaboró en el proyecto de investigación sobre el control de la plaga del eucalipto *Glycaspis brimblecombeii* Moore.

De agosto de 2003 a julio de 2005, cursó los créditos de la Maestría en Ciencias Forestales, de la Universidad Autónoma Chapingo.

EFFECTIVIDAD BIOLÓGICA DE *Trichoderma* spp CONTRA HONGOS CAUSANTES DE DAMPING-OFF EN VIVEROS FORESTALES.

BIOLOGICAL EFFECTIVENESS OF *Trichoderma* spp AGAINST FUNGI CAUSES OF DAMPING-OFF IN TREE NURSERIES.

Bonifacio Don Juan Macías¹ David Cibrián Tovar²

RESUMEN

Se evaluó la efectividad biológica de los organismos antagonistas *Trichoderma erinaceum*, *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis*, contra el complejo Damping-off (*Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cinnamomi* y *Pythium debarianum*), el efecto de esta interacción se evaluó en *Pinus ayacahuite* var *veitchii* Shaw. El estudio se realizó en el vivero forestal de la División de Ciencias Forestales, de la Universidad Autónoma Chapingo.

Mediante un diseño completamente al azar, se evaluaron tres variables: porcentaje de germinación, altura y peso seco de raíz. Los resultados indican que las tres variables se vieron favorecidas con la aplicación de estos organismos (nivel de significancia $\alpha=0.05$ Duncan), en comparación con el tratamiento testigo que contenía el complejo Damping-off. Un tratamiento con el fungicida Ridomil fue usado como referencia. En los ensayos *In vitro* el hongo *Trichoderma* inhibió significativamente en un 80% el crecimiento de las colonias de los tres hongos patógenos. Por lo tanto se concluye que el uso de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma erinaceum*, tienen un impacto benéfico sobre el crecimiento y supervivencia de las plantas en viveros forestales.

Palabras claves: efectividad biológica, *Trichoderma erinaceum*, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium debarianum*, *Pinus ayacahuite*.

¹ Tesista

² Director de Tesis.

ABSTRACT

The biological effectiveness of the antagonistic organisms, *Trichoderma erinaceum*, *T. harzianum* and *Bacillus subtilis*, were tested in the tree nursery at the Forestry Department at the Universidad Autónoma Chapingo, against *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cinnamomi* and *Pythium debarianum* fungi, which are associated with Damping-off disease. *Pinus ayacahuite* was used as the tree host for the pathogenic fungi.

A random experimental design was used to evaluate three variables: the percentage of germination, seedling height, and dry root weight. The results indicated that the three variables were favored with the application of these organisms, (level of significance $\alpha=0.05$ Duncan) in comparison to the control treatment that consisted of the Damping-off complex. A treatment with Ridomil fungicide was used as a reference. With the *in vitro* test, *Trichoderma* showed significant inhibition effects on the growth of colonies of the three pathogens tested. Up to 80% inhibition was obtained. It is therefore concluded that if *Trichoderma erinaceum* and *T. harzianum* are used, there is a beneficial impact on tree growth and survival in tree nurseries.

Keys Words: biological effectiveness, *Trichoderma erinaceum*, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium debarianum*, *Pinus ayacahuite*.

CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	iii
DATOS BIOGRÁFICOS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	v
CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVO	3
2.1. Objetivo General.....	3
2.2. Objetivos Particulares.....	3
3. REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1. Viveros forestales.....	4
3.2. Damping off.....	5
3.2.1. Síntomas causados por Damping off.....	8
3.2.2. Distribución y hospedantes.....	8
3.2.3. Causas que originan el Damping off.....	8
3.2.4. Desarrollo de la enfermedad.....	9
3.2.5. Control.....	9
3.2.5.1. Control cultural.....	10
3.2.5.2. Control químico.....	11
3.2.5.3. Control biológico.....	13
3.2.5.3.1. <i>Trichoderma</i> spp.....	13
3.3. <i>Pinus ayacahuite</i>	15
3.4. Sustratos.....	15
3.4.1. Características de los sustratos.....	16
3.4.2. Tipos de Sustratos.....	16
3.4.2.1. Vermiculita.....	16
3.4.2.2. Agrolita.....	17

3.4.2.3. Turba de musgo o peat moss.....	17
3.5. Contenedores.....	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
4.1. Localización del área de estudio.....	18
4.2. Descripción del vivero.....	18
4.3. Organismos de estudio.....	19
4.4. Incremento de inóculo.....	21
4.5. Mezcla de patógenos.....	22
4.5.1. Concentración de inóculo.....	23
4.6. Mezcla y dosis de sustrato para la germinación y desarrollo de <i>P. ayacahuite</i>	25
4.7. Tratamiento a la semilla de <i>P. ayacahuite</i>	26
4.8. Siembra en contenedores.....	29
4.9. Diseño experimental.....	32
4.10. Efectividad de tratamientos.....	35
4.10.1. Porcentaje de germinación de semillas de <i>P. ayacahuite</i>	35
4.10.2. Altura de plantas de <i>P. ayacahuite</i>	35
4.10.3. Peso seco de raíz de <i>P. ayacahuite</i>	35
4.10.4. Prueba <i>In vitro</i> de <i>T. erinaceum</i> contra el complejo Damping off.....	36
4.11. Reaislamiento de hongos en plantas dañadas.....	36
4.12. Elaboración de preparaciones.....	37
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
5.1. Porcentaje de germinación de <i>Pinus ayacahuite</i>	38
5.2. Altura de plantas de <i>P. ayacahuite</i>	41
5.3. Peso seco de raíz de <i>P. ayacahuite</i>	44
5.4. Prueba <i>In vitro</i> de <i>T. erinaceum</i> contra el complejo Damping off.....	46
5.5. Síntomas de plantas inoculadas.....	48
5.6. Descripción de cepas de reaislamiento.....	51
5.7. Identificación de hongos.....	52
5.7.1. <i>Fusarium oxysporum</i>	52
5.7.2. <i>Phytophthora cinnamomi</i>	54

5.7.3. <i>Pythium debarianum</i>	56
5.7.4. <i>Trichoderma erinaceum</i>	57
6. CONCLUSIONES	59
7. BIBLIOGRAFIA	61
8. ANEXOS	67
Anexo 1 Modo de acción de <i>B. subtilis</i> y Ridomil Gold.....	67

ÍNDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Fungicidas químicos para el tratamiento de semillas.....	11
Cuadro 2. Fungicidas químicos para el control de Damping off.....	12
Cuadro 3. Dosis de inóculo del complejo Damping off.....	23
Cuadro 4. Dosis de productos comerciales y <i>Trichoderma erinaceum</i>	24
Cuadro 5. Dosis utilizadas para el llenado de 42 contenedores.....	25
Cuadro 6. Tratamientos que recibió la semilla de <i>P. ayacahuite</i>	27
Cuadro 7. Aleatorización de tratamientos.....	32
Cuadro 8. Análisis de varianza del porcentaje de germinación de <i>Pinus</i> <i>ayacahuite</i> var <i>veitchii</i> Shaw.....	38
Cuadro 9. Prueba de Duncan del porcentaje de germinación de <i>P. ayacahuite</i>	40
Cuadro 10. Análisis de varianza para la altura de planta de <i>P.</i> <i>ayacahuite</i>	41
Cuadro 11. Prueba de Duncan realizada a la variable altura de <i>P. ayacahuite</i>	42
Cuadro 12. Análisis de varianza del peso seco de raíz de <i>P. ayacahuite</i>	44
Cuadro 13. Prueba de Duncan realizada a la variable peso seco de raíz de <i>P. ayacahuite</i>	45
Cuadro 14. Número de plantas con síntomas.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Esquematización del vivero forestal.....	19
Figura 2. Organismos de estudio.....	20
Figura 3. Incremento de hongos en laboratorio.....	22
Figura 4. Mezcla y contenedores empleados.....	26
Figura 5. Tratamiento a la semilla de <i>P. ayacahuite</i>	28
Figura 6. Tratamientos en contenedores.....	34
Figura 7. Diferencia de tratamientos en cuanto a la altura.....	43
Figura 8. Pruebas <i>In vitro</i> de <i>Trichoderma erinaceum</i>	47
Figura 9. Síntomas en plantas inoculadas.....	50
Figura 10. Cepas de muestras de plantas dañadas.....	51
Figura 11. Característica morfológicas de <i>Fusarium oxysporum</i>	53
Figura 12. Característica morfológicas de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	55
Figura 13. Característica morfológicas de <i>Pythium debarianum</i>	56
Figura 14. Característica morfológicas de <i>Trichoderma erinaceum</i>	58

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades pueden mermar sustancialmente la calidad y cantidad de la planta producida en vivero, los organismos, principalmente hongos y bacterias, son importantes debido a que predisponen a la planta a daños severos, ocasionando mortandad o debilitamiento dentro de las plantaciones forestales, esto puede deberse al mal manejo que se le da a la planta y al uso excesivo de productos químicos.

Las enfermedades de raíz, causada por varios hongos entre los que destacan *Pythium*, *Fusarium*, y *Rhizoctonia*, y en algunos casos, *Phytophthora*, son importantes, el Damping off secadera o ahogamiento afecta hasta un 35% de los viveros de México (Patiño, 1993).

La enfermedad es frecuente en los viveros que utilizan tierra de monte como sustrato. En los viveros que utilizan sustratos a base de Peat-moss, agrolita, vermiculita, o compostas de corteza de pino, se tienen menos infecciones. Pero todavía el 70% de 700 viveros usan tierras de monte como sustratos principales (Peterson, 1992a).

Pinus ayacahuite es una especie con madera de buena calidad; normalmente se usa en aserrío, chapa, pulpa, papel, postes, construcciones y ampliamente en artesanías; es muy suave para trabajar. Su importancia reside en que es recomendable como ornamental, árbol de navidad y para plantaciones comerciales (Inifap, 2003); la especie es muy susceptible al ataque de los hongos *Fusarium* y *Phytophthora* (Cibrián, 2005¹).

¹ Comunicación Personal. Cibrián. T.D. 2005. Universidad Autónoma Chapingo. Edo de México.

El Damping off es una de las primeras enfermedades que el viverista encuentra en viveros y camas de crecimiento, y cuando se presenta causa pérdidas que van desde un 15% en casos donde las infecciones no son muy fuertes y del 30% hasta pérdidas totales cuando las infecciones son severas (Peterson, 1992a).

Existe la necesidad de generar conocimientos apropiados sobre el uso, modo de acción y manejo de productos biológicos que ayuden a minimizar las pérdidas que ocasiona el complejo de hongos causantes del Damping off; esta enfermedad se atribuye a varios hongos, notándose que los que aparecen con mayor frecuencia provocando daños son *Fusarium*, *Pythium* y *Phytophthora*, por ello esta investigación se enfocó al efecto que tiene la utilización de *Trichoderma ericaceum*, *T. harzianum* y *Bacillus subtilis* contra *Fusarium*, *Pythium* y *Phytophthora*; causantes de Damping-off, razón por la cual se plantearon los siguientes objetivos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar la efectividad de dos especies de *Trichoderma* (Deuteromycota: Moniliales) y la bacteria *Bacillus subtilis* para el control de Damping off en *Pinus ayacahuite* var *veitchii*. Shaw.

2.2 Objetivos particulares

Determinar el crecimiento y condición de salud de semillas y plántulas de *P. ayacahuite* que recibieron tratamientos preventivos.

Determinar a nivel de especie, uno de los hongos antagonistas (*Trichoderma erinaceum*).

Evaluar en medio de cultivo, el efecto antagonista de una especie de *Trichoderma* sobre (*Phytophthora cinnamomi* Rands, *Fusarium oxysporum* Schl y *Pythium debarianum* Auct. Non R. Hesse) hongos asociados a Damping off

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Viveros forestales

La Comisión Nacional Forestal menciona que para el ciclo 2002-2003 se contaba con 603 viveros forestales pertenecientes a la CONAFOR, SEDENA, Gobiernos Estatales y Municipales, Organizaciones Sociales e Instituciones de Enseñanza e Investigación, entre otros; con una capacidad de producción cercana a los 248 millones de plantas por año (CONAFOR, 2006).

De esta producción, aproximadamente el 50% se realiza bajo el sistema de producción "tradicional" en bolsa de polietileno y utilizando como sustrato diferentes mezclas de suelo forestal, agrícola y otros subproductos (corteza de pino, aserrín compostado, cascarilla de café y bagazo de caña) como complementos. Un 40% se realiza en contenedores de poliestireno expandido y plástico rígido y el restante 10% se lleva a cabo mediante la técnica de producción a raíz desnuda, principalmente en los estados con condiciones de clima tropical.

La tendencia de la producción en nuestro país esta orientándose hacia la implantación de los sistemas de producción en contenedores y utilizando como sustrato el musgo o turba (peat moss) complementado con agrolita y vermiculita (CONAFOR, 2006).

Los viveros de la República mexicana han tenido un alza en calidad y cantidad de planta que es producida. A pesar de esto el Damping off se encuentra cómo una de las enfermedades de mayor importancia por las pérdidas de producción, selección y preservación de las especies más adecuadas a las condiciones del sitio en el que serán depositadas finalmente, por lo cual se hace necesario la generación de manuales que faciliten la identificación y tratamiento de los problemas patológicos (Cibrián, 2005).

3.2. Damping Off

El Damping off, secadera o ahogamiento como comúnmente se le conoce es una de las primeras enfermedades que el viverista se enfrenta en los almácigos y camas de crecimiento, y que en ocasiones causa el 15% o más de la mortandad de plántulas. Esta enfermedad es provocada por varios hongos, siendo los más comunes *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Fusarium* spp., y *Rhizoctonia* spp. Otros hongos que se pueden asociar a este complejo son: *Thielaviopsis*, *Sclerotinia*, *Macrophomina*, *Cylindrocladium*, *Helminthosporium*, *Curvularia* y *Aphanomices* (Peterson, 1992b).

Phytophthora

Las especies de *Phytophthora* causan varias enfermedades en muchos tipos distintos de plantas desde plántulas de hortalizas y forestales; la mayoría de estas especies producen pudriciones en la raíz, ahogamiento de plántulas y pudriciones de tubérculos; como, base del tallo y otros órganos (Agrios, 1999). La más importante en los viveros es *P. cinnamomi* (Díaz, 2005), (Edwin y Ribeiro, 1996).

Este género de hongo presenta micelio cenocítico, turuloso, con vesículas globosas a piriformes de tamaños diferentes, en medio de cultivo V8 su crecimiento micelial es en forma de camelia; esporangióforos simples o ramificados en simpodio, en algunas ocasiones con una proliferación esporangial, cortos o largos; esporangios ovoides y oval-alargados, sin papila, con gran variación de medidas de 27 a 114 μm de largo por 20 a 63 μm de ancho; clamidosporas numerosas, esféricas, ovales a piriformes; oogonios esféricos, terminales; anteridios subclaviformes, las oosporas casi llenan el oogonio (Romero, 1988).

Pythium

Las especies de *Pythium* se encuentran ampliamente distribuidas en los suelos y el agua de todo el mundo, viven como organismos saprofitos sobre los restos de las plantas y animales muertos, o bien como parásitos benignos atacando a las raíces fibrosas de las plantas. Cuando un suelo húmedo se encuentra densamente infestado por *Pythium* éste hongo ataca todo tipo de semillas o plántulas que emerjan de aquellas (Agrios, 1999).

El género incluye 63 especies, separables en base a características morfológicas de los esporangios, anteridio, oogonios y oosporas (Romero, 1988).

Las pudriciones de raíz y cuello causadas por *Pythium* spp., son un mayor problema cuando existen humedades altas y temperaturas que van de los 15 a 32° C. Algunas especies de *Pythium* son dominantes a temperaturas frías de 11 a 21° C; otras especies son más activas en periodos de temperaturas altas de 23 a 40° C (Fermanian *et al*, 1997).

Las especies de este género forman micelio blanco, filamentosos, profundamente ramificado y de rápido crecimiento. El micelio produce esporangios terminales o que pueden ser de forma esférica, filamentosos o de cualquier otro, hifas delgadas, germinación por zoosporas o por tubo germinativo (Agrios, 1999).

Fusarium

La mayoría de las especies de este género producen marchitamientos vasculares; la especie de *Fusarium oxysporum*, se asocia con pudriciones de raíz y cuello, frecuentemente con el complejo Damping off y pudrición de raíz de planta de menos de un año de crecimiento en plantaciones recientemente establecidas; otras especies ocasionan la cancrrosis en árboles forestales (Smiley *et al*, 1994).

Las características de este género es que presenta micelio hialino, con los macroconidios curvados, o se forman en masa sobre un esporodio, y se forman en una hilera, los microconidios y clamidosporas de 0-1 septa con la presencia de dos tipos de conidios, micro y macroconidios (Kira, *et al* 2001).

Rhizoctonia

Ataca una amplia variedad de plantas huéspedes de todo el mundo, causando una variedad de enfermedades entre las que se encuentran la podredumbre de las raíces, la descomposición de los frutos e incluso enfermedades del follaje (Alexopoulos, 1985).

La desintegración de semillas y Damping off en preemegencia es común donde los suelos están infestados por *Rhizoctonia solani* kunh, las condiciones ambientales que favorecen al patógeno son alta humedad y alta temperatura. Las plántulas que van emergiendo presentan una pudrición café en el cuello de la raíz seguida por un marchitamiento de la parte apical, en conjunto causan el colapso y muerte en la plántula de almácigos o semilleros (Fermanian *et al*, 1997).

Rhizoctonia no produce esporas, forma micelio estéril, que es incoloro cuando pasa por su etapa juvenil pero que se torna amarillo o de color café claro conforme madura. El micelio consta de células largas y producen ramificaciones que crecen casi en ángulo recto con respecto a la hifa principal, se estrechan ligeramente a nivel de la bifurcación y posee una septa cerca de ella. Las características de la ramificación comúnmente son los únicos medios disponibles para identificar al hongo (Alexopoulos, 1985).

3.2.1. Síntomas causados por Damping off

Estos varían de acuerdo a la etapa en que ocurre y se le conoce de dos formas:

Damping off pre-emergente: es aquel que ocurre al iniciarse el desarrollo de la radícula de la plántula, el ataque y muerte se presenta antes de que la planta emerja, condición que en algunos casos causa confusión al creer que la semilla es vana.

Damping off post-emergente: se distingue por que provoca necrosis en el tallo, que ocurre debajo de la superficie del suelo. En coníferas, al debilitarse este tejido necrosado, la plántula se vuelve flácida y se dobla (Peterson, 1992a).

3.2.2. Distribución y hospedantes

El Damping off se presenta en todas las regiones tropicales y templadas del mundo y puede causar diversos tipos de daños, desde que comienza la germinación hasta que termina el estado de plántula y afecta a la mayoría de coníferas y latifoliadas con excepción de *Juniperus* (Peterson, 1992a).

3.2.3. Causas que originan el Damping off

Los factores que intervienen para el desarrollo de la enfermedad son:

- Demasiada humedad y mal drenaje (tiempo húmedo, exceso de riego, a veces, en combinación con suelos pesados);
- Poca ventilación o circulación de aire
- Temperaturas altas del suelo después de la aparición (mayores a 25° C)

- Temperaturas bajas del suelo antes de la germinación (debajo de 20° C)
- pH mayores de 7
- Materia orgánica en exceso
- Alta densidad de plantas
- Semilla de baja viabilidad o infectada

3.2.4. Desarrollo de la enfermedad

Estos hongos generalmente habitan en el suelo, se alimentan de materia orgánica y otros tienen estructuras que les permiten sobrevivir en condiciones ambientales adversas, como esporas, que en letargo esperan condiciones favorables para infectar a un nuevo hospedante.

Una vez atacada la planta, la infección puede aumentar debido a un mal manejo de práctica, o por la presencia de condiciones ambientales favorables para su desarrollo. Un ejemplo claro es el exceso de humedad, que frecuentemente conduce a un ataque más severo y este a su vez puede atacar a plantas aparentemente sanas, para evitar esto se recomienda aplicar riegos en forma adecuada, con el propósito de proporcionarle la humedad suficiente para su desarrollo.

Otra causa que también es importante para el desarrollo de la enfermedad es el pH ya que por lo general las pérdidas son mayores cuando éste es elevado, y mínimas, cuando es de 5.5 (Peterson, 1992a).

3.2.5. Control

Este se puede controlar empleando prácticas culturales químicas y biológicas, que pueden favorecer el crecimiento de las plántulas en las primeras semanas de desarrollo.

3.2.5.1. Control cultural

A continuación se presenta una lista de recomendaciones, para evitar o disminuir el riesgo de infección (Patiño, 1993).

- Semillas de alto porcentaje de germinación; mediante pruebas de germinación de rayos X, tetrazolio, entre otros
- Sustrato o mezcla de sustrato con características físicas y químicas adecuadas; ligero, poroso, fácilmente manejable, que mantenga constante su volumen en seco o en húmedo
- Si es en invernadero utilizar contenedores que tengan orificios en la parte inferior para no retener exceso de humedad; que propicien enfermedades o maleza
- Asepsia y esterilización del material con el que se trabaja; con agua y jabón, solución de hipoclorito de sodio, a vapor, entre otros más
- Iluminación adecuada; para evitar que originen un crecimiento acelerado
- Camas de siembra levantadas; para evitar condiciones favorables que favorezcan la incidencia de malezas y enfermedades del suelo.
- Control de aireación
- Sustrato con buen drenaje; para evitar el estancamiento y encharcamiento que puedan ocasionar problemas y hasta la muerte de la planta.
- Profundidad de siembra apropiada de acuerdo a la especie (0.5-2.5 cm); para asegurar una germinación y emergencia uniforme de las plántulas
- Densidades de siembra adecuadas; para un mejor desarrollo de las plantas, tanto en su parte aérea como en su sistema radicular.
- Esterilización del sustrato que se emplea para la siembra; con la finalidad de eliminar patógenos del suelo.
- pH ligeramente ácido 5.5 con ciertos compuestos a base de sulfuro (sulfuro de amonio) o ácidos inorgánicos (ácido sulfúrico)

- Utilice agua de calidad, no tratada; para evitar que las raíces impidan la absorción de los elementos nutritivos y como consecuencia la planta puede tener un desarrollo anormal o morir.
- Fertilización balanceada 1:2:1 para acelerar la maduración y evitar anomalías en la parte aérea o del sistema radicular o defoliación de la planta, entre otros
- Esterilización de herramientas de trabajo; con la finalidad de diseminar patógenos que pudieran estar presentes en las herramientas más comúnmente utilizadas

3.2.5.2. Control químico

Los productos químicos que previenen o controlan al Damping-off, están formulados para aplicarse a semillas, en sustratos o plantas. En el cuadro 1 se listan los utilizados en semillas y en el cuadro 2, los que se aplican a las plantas o al sustrato que contiene la raíz.

Cuadro 1. Fungicidas químicos para el tratamiento de semillas

Nombre común	Nombre comercial	Organismos que controla
Captan	Captan	<i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Colletotrichum</i>
Thiram**	Thiram	<i>Fusarium</i> , <i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i>
Tolclofos metil**	Rizolex	<i>Rhizoctonia</i>
Azoxystrobin***	Amistar	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Septoria</i>
Propiconazole***	Tilt	<i>Cladosporium</i> , <i>Septoria</i> , <i>Phymatotrichum</i> , <i>Mycosphaerella</i>
Iprodiona***	Rovral	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Sclerotinia</i>
Metalaxil**	Ridomil Gold	<i>Pythium</i> , <i>Phytophthora</i>

Fuente: * <http://www.ces.ncsu.edu/depst/pp/notes/oldnotes/od14>;

** http://saenzpe.inta.gov.ar/Fito/mal_tallito.htm ;

*** Diccionario de especialidades agroquímicas THOMSON PLM 2004

Cuadro 2. Fungicidas químicos para controlar Damping off aplicados a la planta o al sustrato.

Nombre común	Nombre comercial	Organismos que controla
Metalaxil*	Someten	<i>Pythium, Phytophthora, Aphanomices</i>
	Delatal	
Iprodione*	Chipco	<i>Botrytis, Rhizoctonia, Alternaria, Sclerotinia</i>
Etridiazole Thiofenato metílico*	Banrot	<i>Fusarium, Pythium, Phytophthora</i>
PCNB***	Terraclor	<i>Rhizoctonia, Sclerotinia, Botrytis, Fusarium, Streptomyces</i>
Fosetyl-A1***	Aliette	<i>Pythium, Phytophthora, Peronospora</i>
Benomy!	Benlate	<i>Rhizoctonia, Sclerotinia, Fusarium, Botrytis</i>
Ferbam*	Ferbam	<i>Phytophthora, Rhizoctonia, Colletotrichum, Mycosphaerella</i>
Etridiazole*	Truban	<i>Phytophthora y Pythium</i>
Metil isotiacianato****	Vorlex	<i>Phytophthora, Pythium, Fusarium, Rhizoctonia, Thielaviopsis</i>
Metam sodio****	Vapam	<i>Phytophthora, Pythium, Fusarium, Rhizoctonia, Verticillium</i>
Propamocarb****	Previcur	<i>Pythium, Phytophthora</i>
Carboxin**	Vitavax	<i>Rhizoctonia, Fusarium, Helminthosporium</i>

Fuente: * <http://www.ces.ncsu.edu/depst/pp/notes/oldnotes/od14>;

** http://saenzpe.inta.gov.ar/Fito/mal_tallito.htm ;

*** University of Illinois Extension report on PLANT DISEASE RPD N°. 615 February 1988;

**** <http://www.nsac.ns.ca/lib/apascc/acv/pest/99app02.htm>

3.2.5.3. Control biológico

Dentro de las especies que pueden ser utilizadas para el control biológico de este complejo destacan los hongos y las bacterias; son los principales agentes biocontroladores de esta enfermedad. Los hongos que pueden ser utilizados para el control de patógenos son; *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Streptomyces*. La bacteria *Bacillus subtilis* también se recomienda para el control biológico.

3.2.5.3.1. *Trichoderma*

Es uno de los organismos de control biológico que ha sido ampliamente estudiado debido a su gran variedad de atributos para controlar organismos dañinos. Es un hongo antagonista del suelo, que produce colonias blancas, amarillas o verdes cuando se cultiva. Los conidioforos muy ramificados, llevan fiálides en solitario o en grupo (Alexopoulos, 1985).

Modo de acción de *Trichoderma*

Al entrar en contacto con el suelo, sus hifas empiezan a crecer y formar ramificaciones que se dirigen hasta el micelio del hongo fitopatógeno, al entrar en contacto las hifas de los hongos, se entremezclan de una manera compatible, pasadas 72 horas del contacto inicial se aprecia esporulación abundante de *Trichoderma* y una inhibición del hongo patógeno, este efecto se le conoce como parasitismo (Anónimo, 2001).

Aparte de su facilidad para colonizar a las raíces de la planta, *Trichoderma* ha desarrollado mecanismos para atacar y parasitar a otros hongos y así, aprovecharlos como fuente nutricional. Recientemente han sido demostrados varios mecanismos con los cuales actúa *Trichoderma* como

biocontrolador y como colonizador de raíces (Harman, 2003); menciona y describe los siguientes mecanismos de acción.

Micoparasitismo: Abarca diferentes interacciones donde el hongo antagonista envuelve y penetra el micelio del patógeno donde las hifas de *Trichoderma* crecen y se desarrollan dentro de las hifas del huésped, durante este proceso el parásito forma apresorios que le permiten adherirse provocando lisis y huecos en la células del patógeno.

Antibiosis: Producción y liberación de sustancias químicas por parte del antagonista hacia el medio ambiente, las cuales pueden ser volátiles o no, *Trichoderma* produce sustancias como: Trichodermina, Dermadina, Sequisterpeno, Suzukacillina, Alamethicina, Trichotoxina y Acetaldehído, todas con propiedades antifungosas y antibacteriales.

Competencia: Consiste en el efecto adverso que ejerce un organismo sobre otro, debido al uso o eliminación de algunos recursos del ambiente, como nutrientes, oxígeno y espacio.

Tolerancia al estrés por parte de la planta: Mediante el crecimiento en cuanto a profundidad y cantidad de raíces que hacen a la planta más resistente a la sequía.

Solubilización y absorción de nutrientes inorgánicos: Produciendo un gran número de sustancias químicas que metabolizan y hacen más fácil la absorción de algunos nutrientes para la planta.

Resistencia inducida: Mediante mecanismos bioquímicos y físicos o estructurales de resistencia. Todos ellos gobernados genéticamente.

Desactivación de las enzimas del patógeno: Produciendo enzimas tales como: β -1,3 glucanasa, quitinasa y celulasa las cuales facilitan la habilidad del antagonista, ejerciendo su efecto sobre las paredes celulares.

3.3. *Pinus ayacahuite*

Árbol de 20 a 30 m de altura, ramillas moreno grisáceas, delgadas y flexibles, corteza lisa en árboles jóvenes y ásperas a grisáceas o moreno rojizas en los viejos, dividida en placas irregulares. Las hojas por lo regular se encuentran en fascículos de 5, de 1 a 13 cm y hasta 15.5 cm de largo, delgadas y triangulares de color verde oscuro, vainas de 12 a 15 mm y son amarillentas, pajizas, escamosas y pronto caedizas. Conos subcilíndricos, algo atenuados, miden de 22 a 28 cm pero pueden llegar a medir hasta 37 cm, encurvados ligeramente y colgantes; comúnmente por pares, de color amarillento con tintes ocre o ligeramente brillantes cuando jóvenes, y después opacos, resinosos. Pedúnculos de 15 a 20 mm.

Escamas anchas gruesas y fuertes, más numerosas que en la especie típica (150 en cada cono de 23 cm), casi aplanadas por dentro; de 50 a 60 mm de largo por 28 a 30 mm de ancho, semillas oscuras de unos 8 mm de largo, con manchitas claras; ala de 30 a 35 mm por unos 6 de ancho, enteramente adheridas a las semillas (Martínez, 1992).

3.4. Sustratos

El termino sustrato o substrato se aplica a todos los materiales sólidos y distintos de los suelos naturales, minerales u orgánicos, que colocados en un contenedor, en forma pura o mezclada, permite el anclaje del sistema radical para el soporte de la planta (Cadahia, 1992).

También es un medio del cual pueden absorber el agua y los nutrientes que se proporcionan mediante el riego y fertilización. Existen diferentes sustratos

o medios de crecimiento entre los que más se utilizan están la vermiculita, agrolita (o perlita) y turba de musgo o peat moss (Gallowey, 1983).

Las mezclas de sustratos generalmente proporcionan mejores propiedades que un solo componente individual. Las principales mezclas se hacen con turba de musgo *Sphagnum* y vermiculita, en proporciones que van de 1:1 hasta 1:3 donde a veces se incluye la agrolita con una formulación de 1:1:1 hasta 1:3:3 (Bures, 1997).

3.4.1. Características de los sustratos

Físicas: De las características del suelo, las condiciones físicas (textura, estructura y profundidad) son mucho más importantes que las condiciones químicas, ya que estas últimas pueden ser controladas y modificadas en manera más fácil. Las características físicas están determinadas por las estructuras internas de las partículas entre las que se encuentran: densidad aparente, granulometría, porosidad y aireación, retención de agua, permeabilidad, tamaño de poros y estabilidad estructural (Pastor, 1999).

Químicas: Son las que tienen que ver con la composición elemental de los materiales; éstas caracterizan la transferencia de materia entre el sustrato y la solución del mismo, entre las que destacan: capacidad de intercambio catiónico, pH, capacidad tampón, contenido de nutrimentos, relación carbono – nitrógeno (Pastor, 1999).

3.4.2. Tipos de sustratos

3.4.2.1. Vermiculita

Es un mineral micáceo que es extraído de minas de Estados Unidos y África. Es calentado a 1 000 °C para que las partículas se expandan y produzca una estructura como de acordeón, que le confiere una elevada relación

superficie/volumen y por consecuencia una capacidad de intercambio catiónico, CIC (82 meq/100 g). Proporciona cantidades de algunos nutrientes como (K, Ca, Mg), y posee a su vez una elevada capacidad de retención de humedad, y una baja densidad (64. 1 a 120. 2 kg/m³ en seco), un pH neutro (6 a 7.6) y es estéril (Cadahia, 1992).

3.4.2.2. Agrolita

Procede de escurrimientos de lava, se muele y calienta a 1000° C, expandiendo las partículas y formando los pequeños granos esponjosos y blancos. Es ligera (72.1 kg/m³), con una buena retención de humedad, estéril, difícil de comprimir, con un pH cercano a la neutralidad (6 a 8). Carece de nutrimentos y posee una baja capacidad de intercambio catiónico (3.5 meq/100g); (Bures,1997).

3.4.2.3. Turba de musgo o Peat moss

Está formada por restos de vegetación acuática, de pantano o ciénega, tal como musgos, tules o juncos, que ha sido preservada bajo el agua en estado de semidescomposición. Sus propiedades varían según el tipo de vegetación que la originó y el estado de descomposición, entre otros factores. Una de las más usadas es la turba de musgo del género *Sphagnum*, sus propiedades son: un pH de 3.5 a 4, una capacidad de intercambio catiónico de 180 meq/m¹⁰⁰g, una densidad de 96.1 a 128. 2 (kg/m³), y una cantidad mínima de algunos nutrientes (Bures, 1997).

3.5. Contenedores

Existe una gran diversidad de tipos de contenedores, éstos incluyen colores (blancos, negros, amarillos), materiales (plástico duro, poliestireno expandido, papel), formas (cónicas redondeadas, trapezoidales), con canales guías de raíz y sin ellos, existiendo piezas con diverso número

de contenedores por unidad de superficie (aproximadamente desde 25 hasta 1000/m²) o contenedores individuales agrupables en charolas o unidades y hay algunos contenedores que se pueden abrir longitudinalmente para inspeccionar la calidad de la raíz de la plántula.

La capacidad es muy variable, y puede ir de 40 a 492 cm³. En los diseños cónicos la forma en punta achatada del extremo inferior es para facilitar la extracción del cepellón de la plántula para plantar o inspeccionar. La oquedad ahí ubicada proporciona drenaje y salida a las raíces, de forma que al contacto con el aire se poden.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Localización del área de estudio

La presente investigación se inició en el laboratorio de Patología Forestal de la División de Ciencias Forestales (DICIFO), de la Universidad Autónoma Chapingo, donde se realizaron los cultivos y purificación de los hongos de estudio, reaislamientos, identificación de los hongos con claves específicas y toma de fotografías con microscopio. La fase de campo se realizó en el vivero perteneciente a la DICIFO, el cual se ubica a los 19° 29' Latitud norte y 98° 53' Longitud oeste a 2,240 m.s.n.m (García, 1981).

4.2 Descripción del vivero

El vivero cuenta con cuatro camas de 18.50 metros de largo y 2.75 metros de ancho cada una, las cuales están a 40 centímetros arriba del suelo para evitar encharcamientos a la hora del riego (fig 1A); cuenta con estructuras rectangulares de fierro donde se depositan charolas de plástico de diferentes medidas (fig 1B), presenta también malla sombra para la protección de

semillas al inicio de su germinación (fig 1C); riego automatizado el cual consta de dos aguilones cada uno con ocho boquillas para un mejor mojado del sustrato (fig 1D).



Figura 1. Descripción del vivero forestal. **A** camas del vivero forestal. **B** estructuras rectangulares. **C** malla sombra para evitar el ataque de pájaros. **D** riego automatizado.

4.3. Organismos de estudio

Los organismos patógenos con los que se trabajó fueron el complejo de hongos que causan Damping off, en este caso *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cinnamomi* y *Pythium debarianum* (fig 2A, B y C). La cepa de *P. cinnamomi* se obtuvo de aislamientos de *Pseudotsuga*; la cepa de *F. oxysporum* se obtuvo de aislamientos de muestras de *Pinus michoacana*. Los organismos antagonistas evaluados fueron *Trichoderma erinaceum*

Bissett (fig 2D), *T. harzianum* Rifai (PHC T22) y *Bacillus subtilis* (producto comercial Serenadet) (Fig 2E y F). El fungicida comercial Metalaxil (Ridomil Gold) se utilizó como referencia; la cepa de *T. erinaceum* y *P. debarianum* fueron proporcionadas por la M. en. C. Bertha Tlapal y el Dr Gerardo Leyva, Profesores del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. Todos fueron probados en plantas de *Pinus ayacahuite* var *veitchii* Shaw.

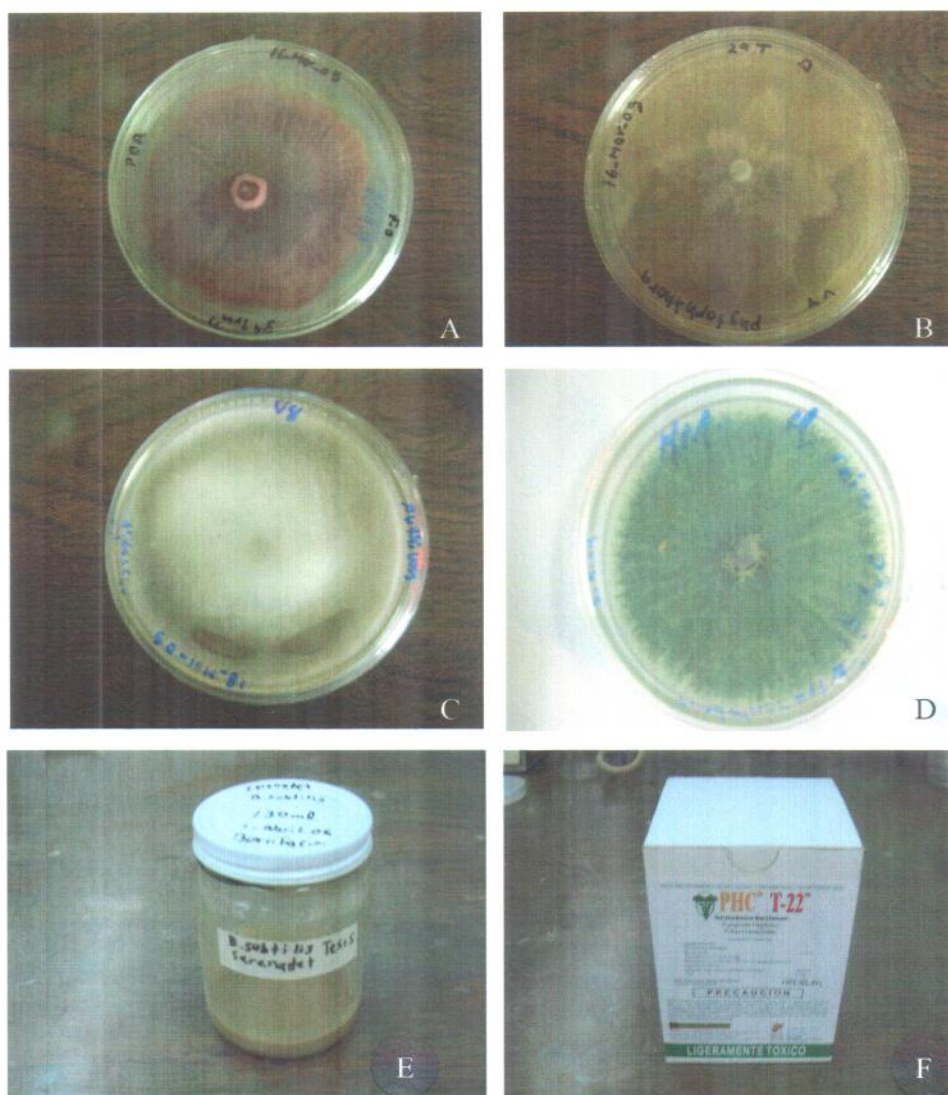


Figura 2 Organismos de estudio. **A** cepa de *Fusarium oxysporum* creciendo en medio de cultivo PDA. **B** crecimiento típico de *Phytophthora cinnamomi* en medio de V8. **C** colonia de *Pythium debarianum* en jugo de verduras V8. **D** cepa de *Trichoderma erinaceum* creciendo en extracto de malta agar. **E** producto comercial Serenadet a base de *Bacillus subtilis*. **F** PHC T22 a base de *T. harzianum*.

4.4. Incremento de inóculo

El incremento de inóculo, tanto de los hongos patogénicos como de la cepa de *Trichoderma erinaceum* cultivada en laboratorio, se realizó de la siguiente manera.

1.- Para el crecimiento de *Fusarium oxysporum* se utilizó medio de cultivo PDA (papa, dextrosa, agar) para su desarrollo; en el caso de *Pythium debarianum*, este se desarrolló en medio de cultivo jugo de verduras V8 agar; para *Phytophthora cinnamomi* se realizaron transferencias de tubos a cajas petri con medio de cultivo harina de maíz-agar para la producción de micelio a temperatura controlada de 27°C y bajo oscuridad.

2.- Se esterilizaron 30 frascos de vidrio de 250 ml con tapas herméticas, 10 para cada hongo, en los cuales se depositó arena de río, posteriormente se tomó de las cajas de petri una rodaja de 0.5 cm de diámetro y se depositaron en los frascos con el sustrato previamente esterilizado. Los frascos se mantuvieron por 10 días en una estufa de laboratorio con una temperatura de 27°C. Por este medio se logró el incremento de *P. cinnamomi*, *F. oxysporum* y *P. debarianum* (fig 3A B y C).

3.-Para el caso de la cepa de *T. erinaceum*, ésta se obtuvo del laboratorio de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo y se propagó en medio de cultivo V8 a 27°C (fig 3D).



Figura 3 incremento de hongos en laboratorio. **A** frascos con arena y micelio de *Phytophthora cinnamomi*. **B** frascos con arena de río que contiene micelio de *Fusarium oxysporum* para su desarrollo. **C** frascos con rodajas de 0.5 cm de diámetro de propágulo de *Pythium debarianum* para su reproducción. **D** cepa desarrollada en medio de cultivo V8 de *Trichoderma erinaceum*.

4.5. Mezcla de patógenos

La mezcla de patógenos se realizó de la siguiente manera.

1.- Para el caso de la mezcla que contuvo los hongos causantes de Damping off (*Fusarium*, *Pythium* y *Phytophthora*), se hizo una suspensión de la siguiente manera, se utilizaron 15 cajas de petri que contenían a los patógenos, los cuales tenían 15 días de crecida la colonia, cinco de cada hongo; el medio de cultivo, se incorporó en una licuadora, se le agregaron 500 ml de agua y se licuó por un minuto; posteriormente el contenido se vació a un recipiente más grande y se agregaron 1.5 litros de agua. En total se tuvieron 2 litros de suspensión de patógenos.

2.- Respecto a los hongos patogénicos que se desarrollaron en los frascos, éstos se vaciaron en una cubeta de plástico con capacidad de 10 litros a los cuales se le agregaron 5 litros de agua y se revolvió la mezcla de 6 kilos de arena de río durante 5 minutos para tener una buena homogenización, posteriormente de esa solución se tomaron 2 litros y se mezclaron con la solución de los hongos patogénicos que fueron cultivados en medio de cultivo para tener 4 litros de solución final de los hongos patogénicos. Esta mezcla se realizó con la finalidad de incrementar el número de propágulos que se aplicó a nuestros tratamientos, y así asegurarnos que nuestras semillas estuvieran bañadas de estos patógenos.

4.5.1. Concentración de inóculo

De la mezcla anterior se tomaron 100 ml y se depositaron en matraces de 250 ml; para posteriormente, con la ayuda de la cámara de Neubauer de $0,0025 \text{ mm}^2$, una pipeta graduada y un microscopio compuesto, realizar la cuantificación de propágulos; para el caso de *Pythium* y *Phytophthora* fueron hifas y clamidosporas y para *Fusarium* macro y microconidios. La dosis de cada hongo se presenta en el cuadro 3.

Cuadro 3. Dosis de inóculo, del complejo Damping off

Patógeno	Número de propágulos/ml
<i>Pythium debarianum</i>	1.19×10^5
<i>Fusarium oxysporum</i>	1.91×10^4
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	3.2×10^4

Referente a los productos a base de *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, Ridomil Gold la dosis para estos se determinó de acuerdo a la recomendada para cada producto no así para *T. erinaceum*, la cual se preparó como sigue; de una solución de 100 ml se extrajeron seis muestras con una pipeta graduada; de cada muestra se depositó una gota en la cámara de Neubauer con una calibración de $(0,0025 \text{ mm}^2)$ para cuantificar

el número de conidios por cuadrante, al termino del conteo se realizó una suma y se multiplicó por un factor de 1000 y con ello calcular la dosis que se aplicó a los tratamientos que llevaron dicha solución. En el cuadro 4 se enlistan las dosis por cada producto.

Cuadro 4. Dosis empleadas de producto comerciales y *Trichoderma erinaceum*

Organismo	dosis
<i>Trichoderma erinaceum</i> , cultivado en laboratorio	8.33×10^4 conidios/ml
PHC T22	1.2 gr/lit de agua
<i>Bacillus subtilis</i>	10 ml/lit de agua
Ridomil Gold	5 gr i.a/lit de agua

De acuerdo a la literatura consultada se recomiendan las siguientes dosis para los hongos en estudio, para *Pythium* una dosis de 1×10^7 conidios por ml, para *Fusarium* sp 1×10^6 conidios por ml y para *Phytophthora* se sugiere 25 gramos de semilla de mijo ó 2.5 gramos de semilla de trigo infectada previamente con *Phytophthora* (Martínez. 2000 y Díaz. 2005).

4.6. Mezcla y dosis de sustrato para la germinación y desarrollo de *Pinus ayacahuite*

En este trabajo el sustrato empleado fue el utilizado en los viveros forestales, consiste de Peat moss, vermiculita y agrolita en una proporción 60:20:20. En el cuadro 5 se listan los materiales utilizados para el llenado de 42 charolas de 40 cavidades de 35 cm de largo X 22 cm de ancho (fig 4A y B), con un diámetro de cada cavidad de 4 cm en la parte superior (fig 4C) y 2 cm de diámetro en la parte inferior (fig 4D); a la mezcla de sustrato se le añadió osmocote, que es un fertilizante de acción prolongada en forma de cápsula.

Cuadro 5. Dosis utilizadas para el llenado de 42 contenedores

MATERIAL	DOSIS
Peat Moss	120 Its
Vermiculita	40 Its
Agrolita	40 Its
Osmocote	650 gr



Figura 4. Mezcla y contenedores empleados. **A** incorporación de agrolita, vermiculita y peat moss. **B** aspecto final de la mezcla. **C** largo de charola. **D** ancho de charola. **E** diámetro de la cavidad superior. **F** longitud del cono y diámetro de la parte inferior de la cavidad.

4.7. Tratamiento a la semilla de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii*

En el diagrama del cuadro 6 se muestran los tratamientos aplicados a la semilla.

Cuadro 6. Tratamientos que recibió la semilla de *Pinus ayacahuite*

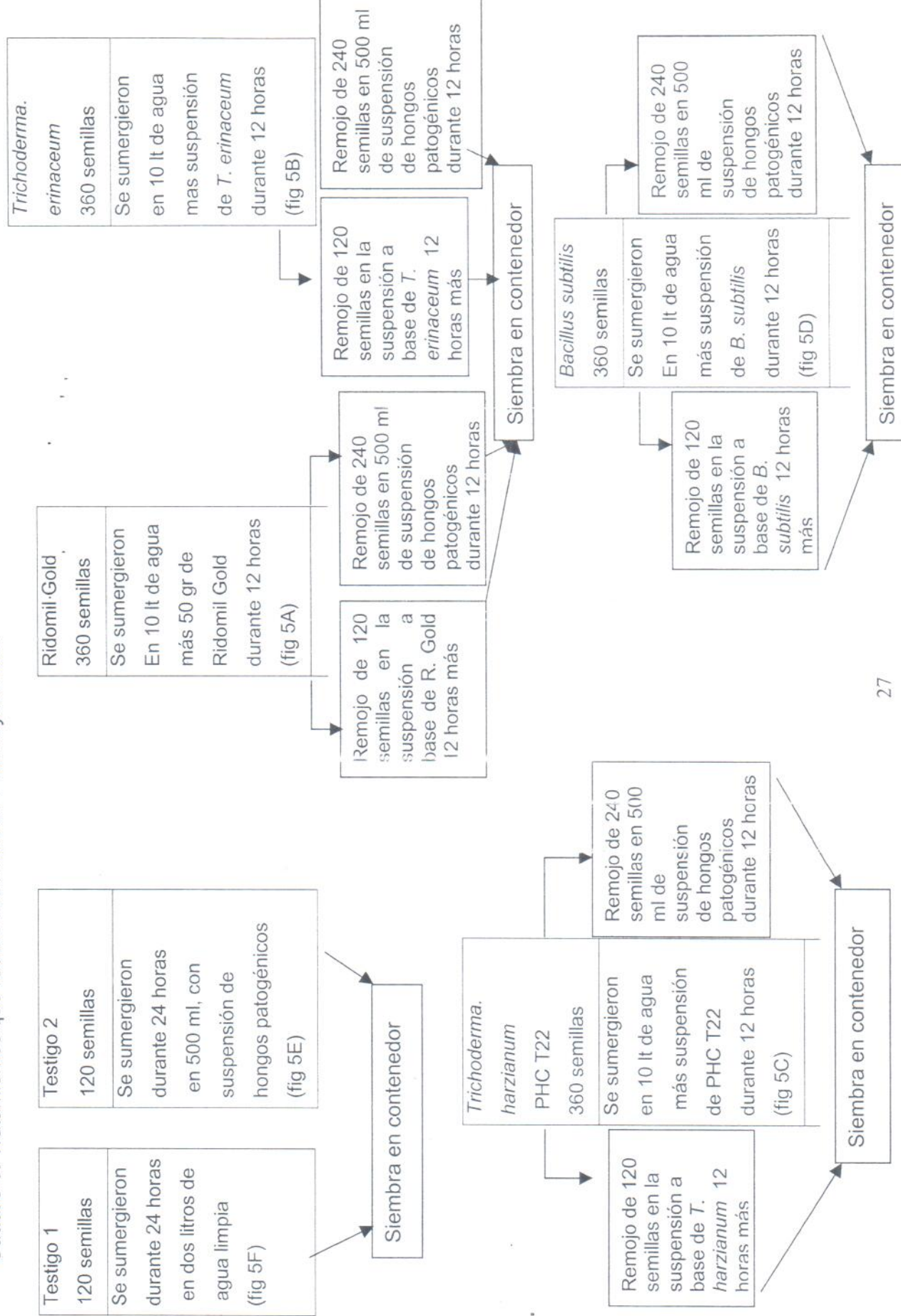




Figura 5. Tratamientos a las semillas de *Pinus ayacahuite veitchii*. **A** solución a base de Ridomil Gold. **B** tratamiento a la semilla a base de *Trichoderma erinaceum* cultivado en laboratorio. **C** suspensión a base del producto comercial PHC T22 conteniendo esporas de *T. harzianum*. **D** tina con 10 litros de agua y 100 ml del producto *Bacillus subtilis*. **E** solución con 2 litros de agua conteniendo la mezcla de hongos patogénicos. **F** tratamiento con semilla de *P. ayacahuite*, sumergida en 2 litros de agua limpia.

4.8. Siembra en contenedores

Una vez hecha la mezcla del sustrato, se procedió al llenado de las 42 charolas con los tratamientos (fig 6A); posteriormente, se proporcionó un riego para humedecer el sustrato (fig 6B). El siguiente paso consistió en la siembra de las semillas de *Pinus ayacahuite*, una por cavidad (fig 6C). Se tuvieron catorce tratamientos, cada uno con tres repeticiones; cada repetición consistió de una charola de 40 cavidades; las características y componentes de cada uno de los tratamientos se describen continuación.

Tratamiento uno

- a) Llenado de contenedores con la mezcla de sustrato.
- b) Siembra de 120 semillas de *P. ayacahuite* var. *veitchii*, remojadas en agua limpia.

Tratamiento Dos:

- a) Llenado de contenedores con la mezcla del sustrato.
- b) Siembra de 120 semillas de *P. ayacahuite*.
- c) Aplicación de 500 ml de la mezcla de hongos a tres charolas de 40 cavidades (fig 6D).

Tratamiento Tres:

- a) Llenado de contenedores con la mezcla de sustrato.
- b) Tratamiento a 120 semillas con un fungicida sistémico a base Ridomil Gold.
- c) Siembra de semillas tratadas con Ridomil.

Tratamiento 4:

- a) Llenado de contenedores con la mezcla de sustrato.
- b) Aplicación de 500 ml de la mezcla de hongos a tres charolas de 40 cavidades.
- c) Siembra de semillas tratadas con Ridomil y la mezcla del complejo Damping off.

Tratamiento 5:

- a) Llenado de contenedores con la mezcla de sustrato.
- b) Siembra de semilla tratada con la mezcla del complejo Damping off y ridomil.
- c) Riego con solución de Ridomil (fig 6E).

Tratamiento 6:

- a) Llenado de contenedores con la mezcla de sustrato.
- b) Siembra de 120 semillas tratadas a base de *Trichoderma erinaceum*.

Tratamiento 7

- a) Llenado de contenedores con la mezcla de sustrato.
- b) Aplicación de 500 ml de la suspensión de Damping off.
- c) Siembra de 120 semillas tratadas con suspensión de *T. erinaceum*, y la mezcla del complejo Damping off.

Tratamiento 8:

- a) Llenado de contenedores con la mezcla de sustrato.
- b) Siembra de 120 semilla tratada con solución a base de *T. erinaceum* y la mezcla del complejo Damping off.
- c) Riego al sustrato con solución a base de *T. erinaceum* (fig 6F).

Tratamiento 9:

- a) Llenado de contenedores con la mezcla de sustrato.
- b) Siembra de 120 semillas tratadas con la suspensión a base de *Trichoderma harzianum* PHC T22.

Tratamiento 10:

- a) Llenado de contenedores con la mezcla de sustrato.
- b) Aplicación de 500 ml de la suspensión de Damping off.
- c) Siembra de 120 semillas tratadas con *T. harzianum* y la mezcla del complejo Damping off.

Tratamiento 11:

- a) Llenado de contenedores con la mezcla de sustrato.
- b) Siembra de 120 semillas tratadas con suspensión a base de PHC T22 y la mezcla del complejo Damping off.
- c) Riego al sustrato con solución a base de PHC T22 (fig 6G).

Tratamiento 12:

- a) Llenado de contenedores con la mezcla de sustrato.
- b) Siembra de 120 semillas tratada con *Bacillus subtilis*.

Tratamiento 13:

- a) Llenado de contenedores con la mezcla de sustrato.
- b) Aplicación de 500 ml de la suspensión de Damping off.
- c) Siembra de 120 semillas tratadas con *B. subtilis* y la mezcla del complejo Damping off.

Tratamiento 14:

- a) Llenado de contenedores con la mezcla de sustrato.
- b) Siembra de 120 semillas tratadas con *B. subtilis* y la mezcla del complejo Damping off.
- c) Riego al sustrato con solución a base de *B. subtilis* (fig 6H).

Los tratamientos se asignaron aleatoriamente (cuadro 7); y así determinar su posición final a nivel vivero.

Cuadro 7. Aleatorización de tratamientos, el primer número indica el número de tratamiento y el r_i el número de repeticiones

8 r1		9 r1		1 r1		9 r2		3 r1		6 r1	
2 r1	3 r2	1 r2	5 r1	11 r1	12 r1	11 r2	7 r1	13 r2	10 r3	5 r3	4 r2
1 r3	13 r1	5 r2	2 r2	10 r1	8 r2	7 r2	12 r2	14 r2	8 r3	9 r3	13 r3
3 r3	10 r2	14 r1	6 r3	4 r1	6 r2	11 r3	4 r3	12 r3	7 r3	14 r3	2 r3

4.9. Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, Este diseño estuvo conformado por catorce tratamientos y tres repeticiones cada uno.

El diseño completamente al azar, es el más empleado a nivel laboratorio e invernadero, por que es posible, en estos casos, mantener en condiciones homogéneas las unidades experimentales que intervienen en el experimento (Castillo, 2001)

El modelo lineal de este diseño se presenta a continuación.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij} \quad i=1,2,\dots,t \quad j=1,2,\dots,r$$

Donde:

t = Número de tratamientos

r_i =Número de repeticiones para el i -esimo tratamiento

Y_{ij} = Variable respuesta

μ = Efecto medio general

T_i = Efecto atribuido al i -esimo tratamiento

e_{ij} = Término de error aleatorio

A demás mediante al procedimiento de Modelo Lineal General (PROC GLM), se analizaron los datos mediante un análisis de varianza y así determinar si hubo o no diferencias entre tratamientos, a través de la siguiente hipótesis.

$$H_0 = T_1 = T_2 = T_3 \dots = T_t$$

Vs

H_a = Al menos un tratamiento es diferente al de los demás.

Después se realizó una prueba de comparación múltiple de medias en este caso se utilizó la prueba de Duncan debido a que los datos de el rango de los valores de las medias es más flexible de manejar.



Figura 6. Tratamientos en contenedores. **A** llenado de los 42 contenedores con la mezcla de sustrato. **B** riego a los contenedores. **C** siembra de semilla de *Pinus ayacahuite*. **D** aplicación de la solución que contiene la mezcla a base de *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cinamommi* y *Pythium debarianum*. **E** riego con solución que contiene el fungicida a base de Ridomil Gold. **F** aplicación de solución a base de *Trichoderma erinaceum*. **G** aplicación de solución que contiene PHC T22. **H** aplicación de la solución a base de *Bacillus subtilis*.

4.10. Efectividad de tratamientos

Para evaluar los tratamientos descritos se realizaron las siguientes pruebas

4.10.1 porcentaje de germinación de semillas *Pinus ayacahuite* var. *veitchii*

La siembra de semillas de *P. ayacahuite* se realizó el día 8 de abril, la germinación inició el día 22 de abril y cesó el 7 de junio de 2005; se registraron los datos cada tercer día, y con ellos se calcularon los porcentajes de germinación en cada tratamiento

4.10.2. Altura de plantas de *P. ayacahuite*

Para los datos de esta variable se tomaron 5 plantas de cada repetición de los diferentes tratamientos, teniendo un total de 210 plantas muestreadas, a las cuales se les midió su altura el 31 de octubre, la toma de estos datos se realizó con una regla metálica de 30 cm de longitud; donde se midió la longitud de la base del tallo hasta la parte apical de las hojas.

4.10.3. Peso seco de raíz de *P. ayacahuite*

Para esto se realizó la extracción de 210 plantas de 84 días de edad, 15 de cada tratamiento, cada planta se colocó en una bolsa de papel. Las plantas se llevaron al laboratorio de la División de Ciencias Forestales, una vez ahí, se procedió a quitarle todo el sustrato y enjuagar la raíz para realizar un corte en la base del tallo donde se iniciaba la formación de raíz.

El siguiente paso fue pesar la raíz de cada planta en una balanza gravimétrica de 200 g de capacidad, posteriormente se anotaron los datos de peso fresco de cada una de las plantas y de acuerdo al tratamiento al que pertenecían se colocaron en las bolsas de papel para ponerlas a secar durante 48 horas en una estufa a temperatura de 70°C, transcurrido ese tiempo se sacaron de las bolsas y se pesaron nuevamente ya secas y sacar la diferencia de peso fresco y peso seco, para obtener así nuestros datos.

4.10.4. Prueba *in Vitro* de *Trichoderma erinaceum* contra el complejo Damping off

A nivel laboratorio se realizaron pruebas *In Vitro* de los hongos que se evaluaron en campo; mediante un sacabocado se tomó micelio de cada uno de los hongos del complejo Damping off y por separado se pusieron en el extremo de las cajas de petri con medio de cultivo y el hongo *Trichoderma erinaceum*, para observar el crecimiento y el efecto que tiene sobre *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cinnamomi*, y *Pythium debarianum* respectivamente; y así comprobar el efecto parasítico de este antagonista sobre los hongos patógenos.

4.11. Reaislamiento de hongos en plantas dañadas

De las muestras que manifestaron síntomas se trajeron al laboratorio para su análisis, donde se lavaron con agua de la llave, para lo cual se tomaron aquellas donde se diferenciaba bien el daño y la parte sana, luego con navaja se realizaron cortes de 0.5 centímetros de longitud, estos a su vez se limpiaron en una solución con hipoclorito de sodio al 1.5% durante un minuto, este paso se repitió dos veces, una vez transcurrido el tiempo de desinfección se depositaron en dos cajas de petri que contenían agua destilada estéril por 3 minutos, para eliminar exceso de cloro, posteriormente con un papel filtro se secaron para su siembra en medios de papa, dextrosa, agar (PDA), jugo V8 agar y harina de maíz agar (HMA). Esto con la finalidad

de comprobar que los daños que presentaron las plantas hayan sido provocados por nuestros hongos que inoculamos y no por factores externos.

4.12. Elaboración de preparaciones

Para poder identificar los hongos del experimento se realizaron preparaciones temporales y permanentes, las cuales se hicieron en un porta y cubre-objeto, al cual se le depositó una gota de glicerina y un poco de micelio que se extrajo de la caja de petri donde se desarrolló, a éste se le puso un círculo de cera para posteriormente pasarlo por un mechero, hasta que la cera se derritió, y con la ayuda de un microscopio compuesto y ocular de 40X, para observar las características morfológicas de los hongos en estudio y hacer las mediciones correspondientes.

5. RESULTADOS y DISCUSIÓN

5.1. Porcentaje de germinación de *Pinus ayacahuite*

El término a observar en el análisis de varianza con mayor atención es $Pr > F$, ya que este nos permitirá rechazar o no H_0 , al menos un tratamiento es diferente si $(Pr > F) < \alpha$. Comparando con una confiabilidad del 95% implica un $\alpha = 0.05$; de acuerdo a esta regla de decisión se concluye que al menos un tratamiento es diferente como se muestra en el cuadro 8.

Cuadro 8. Análisis de varianza para la variable porcentaje de germinación de *Pinus ayacahuite* var *veitchii*,

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Pr>F
Tratamiento	13	2801.785714	215.521978	2.14	0.0451
Error	28	2825.000000	100.892857		
Total	41	5626.785714			

El ANOVA solo nos indicó si el efecto de algún tratamiento es diferente de los demás. Para poder conocer cuál tratamiento era el mejor fue necesario realizar la comparación múltiple de medias de los tratamientos, en nuestro caso se utilizó la prueba de Duncan.

Los resultados encontrados en la germinación de semillas, a nivel general el porcentaje de germinación fue de 82.85%; de un total de 1680 semillas sembradas se tuvieron 1392 germinadas, a nivel de cada tratamiento los datos muestran cierto grado de incertidumbre, primero se reconoce que la semilla que recibió a los hongos que causan Damping off tuvo uno de los porcentajes más bajos de germinación, pero también, mostró datos similares uno de los tratamientos preventivos con *Trichoderma harzianum*; por el contrario, los primeros seis tratamientos de la lista lograron altos porcentajes de germinación.

Para explicar lo anterior se utilizaron los datos logrados por Roldan (2005). Esta autora trabajó la germinación de semillas del mismo lote que se usó en este trabajo, ésta obtuvo un 94.8% de germinación en condiciones de laboratorio. Por lo anterior se puede postular que en la semilla utilizada, los tratamientos preventivos no fueron tan necesarios o efectivos como para proteger y aumentar el porcentaje de germinación que mostró el testigo que solo recibió agua limpia. Los tratamientos intermedios no permiten llegar a discusiones absolutas ya que se tuvieron porcentajes de germinación variables, incluso cuando se utilizó *Trichoderma harzianum* y se regó con esa solución como se muestra en el cuadro 9.

Cuadro 9. Prueba de Duncan realizada para determinar el mejor tratamiento en cuanto al porcentaje de germinación.

Tratamiento	Descripción de los tratamientos semillas de <i>Pinus ayacahuite</i>	Media (% germinación)	Agrupación
9	con PHC T22	90.833	A*
6	con <i>Trichoderma erinaceum</i>	89.167	A
11	con PHC T22 más riego con solución a base de PHC T22	89.167	A
1	semilla limpia	89.167	A
3	con Ridomil Gold	86.667	A
13	<i>Bacillus subtilis</i> más Damping off	86.667	A
4	Ridomil Gold y Damping off	82.500	AB*
8	con <i>T. erinaceum</i> y riego con solución a base de <i>T. erinaceum</i>	80.000	AB
5	semilla con Ridomil Gold y riego de refuerzo con R. Gold	80.000	AB
7	<i>T. erinaceum</i> más Damping off	79.167	AB
14	con <i>B. subtilis</i> y riego con esa solución	78.333	AB
12	con <i>B. subtilis</i>	72.500	AB
2	con Damping off	65.833	B*
10	PHC T22 más Damping off	65.000	B

* Tratamientos con la misma letra o agrupación son estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba de Duncan con un $\alpha=0.05$

5.2. Altura de plantas de *Pinus ayacahuite*

Para la variable altura se postuló la hipótesis siguiente H_0 : todos los tratamientos son iguales contra H_a : al menos un tratamiento es diferente con una confiabilidad del 95% implicando un $\alpha = 0.05$; resultando que al menos un tratamiento es diferente como se muestra en el cuadro 10.

Cuadro 10. Análisis de varianza para la variable altura de planta de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* Shaw

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Pr>F
Tratamiento	13	155.7313143	11.9793319	2.30	0.0316
Error	28	145.8576000	5.209200		
Total	41	301.5889143			

El ANOVA solo nos indicó si el efecto de algún tratamiento es diferente de los demás. Para poder conocer cuál tratamiento era el mejor fue necesario realizar la comparación múltiple de medias de los tratamientos, en nuestro caso se utilizó la prueba de Duncan.

Los resultado encontrados en la altura, muestran datos evidentes, en primer término se observa claramente que la semilla que recibió a los hongos que causan Damping off tuvo el promedio más bajo en cuanto a la altura, pero también mostraron datos similares tres tratamientos preventivos; en contraste los tres primeros tratamientos de la lista lograron tener los más altos promedios en cuanto a altura se refiere.

Para explicar estos resultados se hace mención de los atributos de *Trichoderma* colonizando las raíces de la planta, produciendo a su vez un gran número de sustancias químicas que metabolizan y hacen más fácil la absorción de nutrientes para la planta los cuales los encauza al crecimiento

en altura y diámetro tal como lo explican Harman (2000) y Romo *et al* (2000). Por lo cual se afirma que la semilla tratada preventivamente es favorecida en cuanto al aumento en altura en comparación con los testigos 1 y 2, como se muestra en el cuadro 11.

Cuadro 11. Prueba de Duncan realizada para determinar el mejor tratamiento de la variable altura (15 individuos por tratamiento)

Tratamiento	Descripción de los tratamientos semillas de <i>Pinus ayacahuite</i>	Media (altura cm)	Agrupación
11	con PHC T22 más riego con solución a base de PHC T22	18.513	A*
6	con <i>Trichoderma erinaceum</i>	18.267	A
4	Ridomil Gold y Damping off	16.427	AB*
3	con Ridomil Gold	15.327	AB
9	con PHC T22	15.107	AB
13	<i>Bacillus subtilis</i> más Damping off	14.267	AB
1	semilla limpia	14.227	B*
7	<i>T. erinaceum</i> más Dampig off	13.813	B
10	PHC T22 más Damping off	13.527	B
8	con <i>T. erinaceum</i> y riego solución a base de <i>T. erinaceum</i>	13.507	B
5	semilla con Ridomil Gold y riego solución a base de R. Gold	12.740	B
14	con <i>B. subtilis</i> y riego solución a base de <i>B. subtilis</i>	12.727	B
12	con <i>B. subtilis</i>	12.673	B
2	Damping off	12.320	B

* Tratamientos con la misma letra o agrupación son estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba de Duncan con un $\alpha=0.05$

En forma visual las diferencias en cuanto altura; el tratamiento 11 a base de *Trichoderma harzianum* es muy notoria en comparación con el tratamiento 2 que contiene Damping off (fig 7A); las plantas de los tratamientos 11 a base de *T. harzianum* y el tratamiento 6 a base de *T. erinaceum* tienen una altura similar como se puede observar en la (fig 7B); a nivel general las plantas tratadas con algún organismo biológico presentan mayor vigor, coloración y altura en comparación con las de otras especies que se encontraban en el vivero (fig 7D) con el tratamiento que contiene la solución de Damping off (fig 7C).

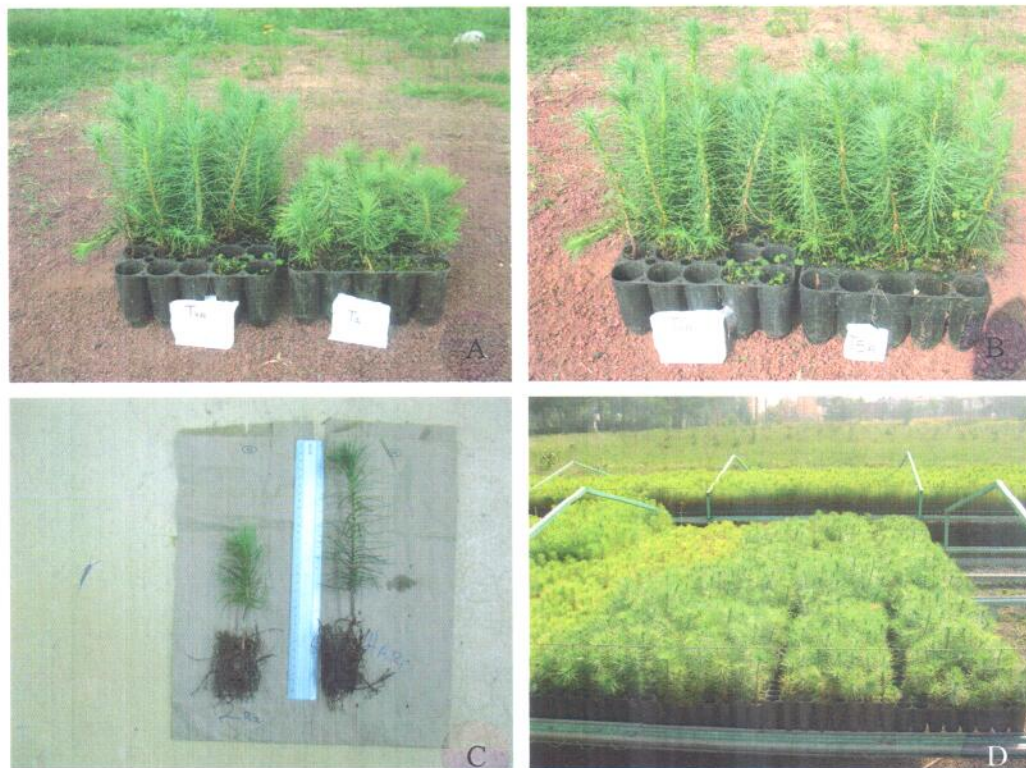


Figura 7. Diferencias en alturas. **A** tratamiento 6 a base de *Trichoderma erinaceum* comparado con el 2 a base del complejo Damping off. **B** alturas similares de los tratamientos a base de *T. erinaceum* y el producto comercial PHC T22. **C** diferencia en altura entre el tratamiento 2 y 6. **D** vista general del diseño experimental a nivel vivero.

5.3. Peso seco de raíz de *Pinus ayacahuite*

Para el peso seco de raíz se postuló la hipótesis siguiente: H_0 todos los tratamientos son iguales contra H_a : al menos un tratamiento es diferente con una confiabilidad del 95% implicando un $\alpha = 0.05$; concluyendo de acuerdo a los datos arrojados en el cuadro 12 que al menos un tratamiento es diferente.

Cuadro 12. Análisis de varianza de la variable peso seco de raíz

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Pr>F
Tratamiento	13	20.38348962	1.56796074	6.13	0.001
Error	28	7.15921267	0.25568617		
Total	41	27.54270229			

El ANOVA solo nos indicó si el efecto de algún tratamiento es diferente de los demás. Para poder conocer cuál tratamiento era el mejor fue necesario realizar la comparación múltiple de medias de los tratamientos. en nuestro caso se utilizó la prueba de Duncan.

Los resultados muestran claramente la diferencia que hubo entre la semilla que recibió a los hongos que causan Damping off teniendo uno de los promedios más bajos de peso seco de raíz; pero también, mostró datos menores uno de los tratamientos preventivos a base de *Bacillus subtilis*; en contraste los primeros 10 tratamientos lograron pesos de raíces arriba de 1g, para explicar lo anterior esto se debe a que el hongo produce abundante micelio al contacto con las raíces produciendo un gran número de sustancias químicas que metabolizan y hacen que la planta absorba más fácilmente algunos nutrientes aumentando así la cantidad de raíces tal como lo explican Harman (2003) y Romo *et al* (2000). Por lo anterior se puede afirmar que en la semilla utilizada, los tratamientos preventivos a base de *Trichoderma harzianum* y *T. erinaceum* fueron efectivos para aumentar el contenido de

raíces en comparación con los testigos 1 y 2. Estos resultados se muestran en el cuadro 13.

Cuadro 13. Prueba de Duncan realizada para determinar el mejor tratamiento de la variable peso de raíz. (Media de 15 individuos por tratamiento)

Tratamiento	Descripción de los tratamientos semillas de <i>Pinus ayacahuite</i>	Media (gr)	Agrupación
11	con PHC T22 más riego con solución a base de PHC T22	3.3637	A
10	PHC T22 más Damping off	2.2483	B
6	con <i>Trichoderma erinaceum</i>	1.4927	BC*
9	con PHC T22	1.4237	BCD
1	semilla limpia	1.3233	CD
13	<i>Bacillus subtilis</i> más Damping off	1.1843	CD*
4	Ridomil Gold y Damping off	1.1513	CD
14	con <i>B. subtilis</i> y riego con solución a base de <i>B. subtilis</i>	1.0410	CD
5	semilla con Ridomil Gold y riego con solución a base de R. Gold	1.0387	CD
8	con <i>T. erinaceum</i> y riego con solución a base de <i>T. erinaceum</i>	1.0357	CD
3	con Ridomil Gold	0.9870	CD
7	<i>T. erinaceum</i> más Damping off	0.8110	CD
2	Damping off	0.7680	CD
12	con <i>B. subtilis</i>	0.4493	D

*Valores con letras iguales dentro de cada tratamiento implica que no existe diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Duncan, con un $\alpha=0.05$.

En forma general el tratamiento a base PHC T22 fue el mejor en cuanto a la variable altura y peso seco de raíz, seguido del tratamiento a base *T. erinaceum*, no así para la variable porcentaje de germinación en comparación con los datos obtenidos por Roldan (2005).

En investigaciones realizadas por Hjeljord (2001), Holmes (2004), Aruna (2003), Gordon (2001) y Punja (2003), se probó la efectividad de *Trichoderma* spp., para el control de enfermedades provocadas por diferentes hongos teniendo resultados similares a los que obtuvieron en esta investigación.

5.4. Prueba *In vitro* de *Trichoderma erinaceum* contra el complejo Damping off

De acuerdo a las pruebas realizadas en el laboratorio de la División de Ciencias Forestales, las pruebas *In Vitro*, mostraron que para *Fusarium oxysporum* se presentó un porcentaje de inhibición del 80% (fig 8A y B); por su parte *Pythium debarianum* manifestó un 70% de inhibición en el crecimiento micelial (fig 8C y D); para el caso de *Phytophthora cinnamomi* se presentó un 70% de inhibición en el crecimiento del hongo (fig 8E y F); estos resultados se determinaron mediante el diámetro de la caja de petri para lo cual se pusieron discos de 0.5 centímetros de diámetros en cada extremo de la caja, al cabo de cinco días el micelio de *Trichoderma erinaceum* llegó al extremo de donde estaba el hongo patógeno y se fusionó con este para ya no permitirle desarrollo. Estos resultados son muy similares a los obtenidos por Karthikeyan (2003) quien a nivel laboratorio evaluó el efecto de parasitismo de una especie de *Trichoderma* para el control de *P. cinnamomi*; por su parte Torres (2001), en otra investigación probó, a nivel laboratorio, el efecto inhibitorio de *Trichoderma* contra *Pythium* y *Fusarium*, presentando un control de inhibición en el crecimiento micelial de estos hongos de un 70 a 80%.

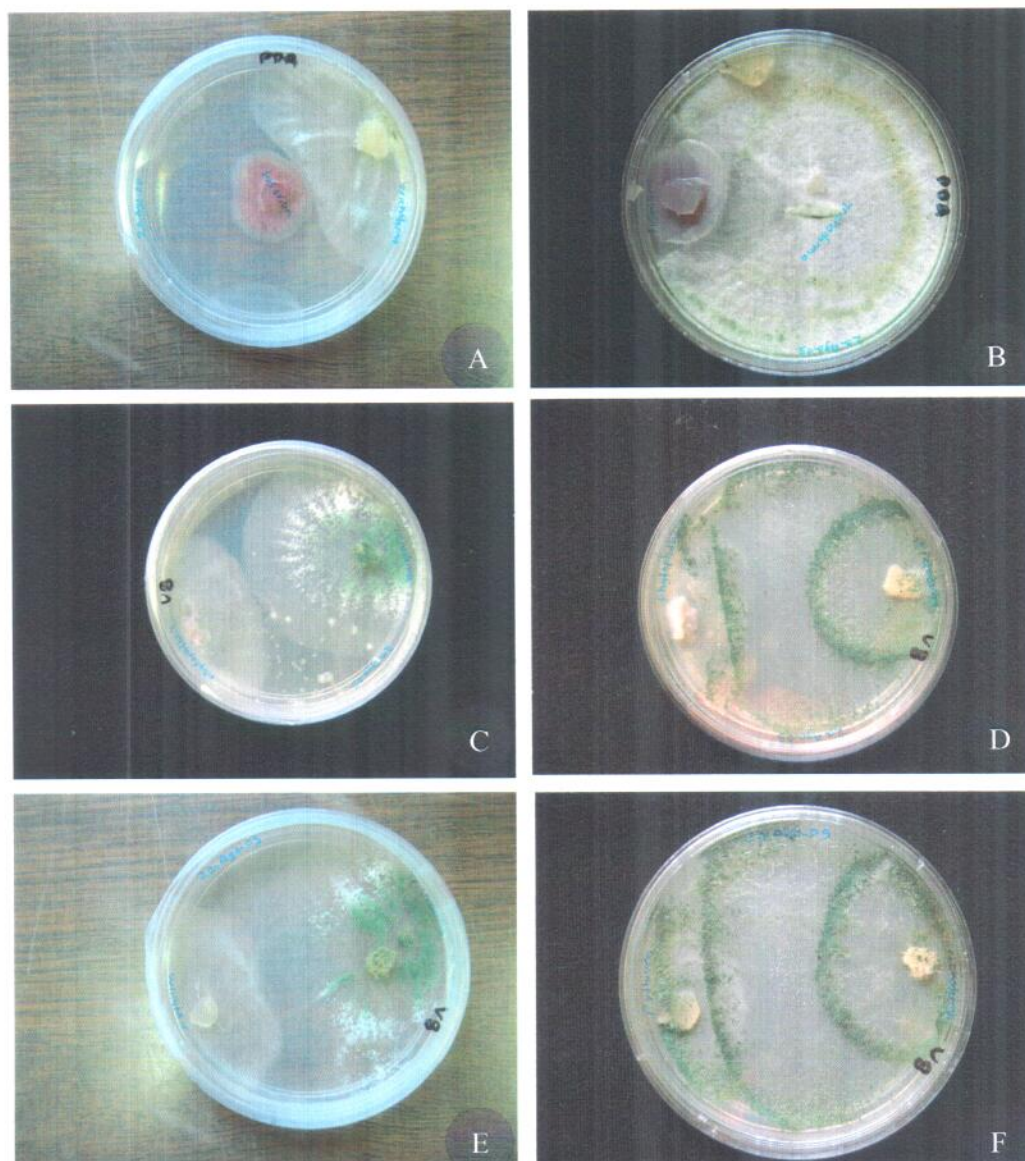


Figura 8. Pruebas *In vitro* del Parasitismo de *Trichoderma erinaceum* sobre el complejo Damping off. **A** *Fusarium oxysporum* y *T. erinaceum* a los cinco días de sembrado. **B** mezcla de micelio por parte de ambos hongos a los nueve días después de sembrado. **C** efecto inhibitorio contra *Pythium debarianum*. **D** desarrollo completo en la caja de petri de *T. erinaceum* parasitando por completo a *P. debarianum*. **E y F** efecto inhibitorio de *T. erinaceum* a los cinco y nueve días después de sembrado contra *Pythophthora cinnamomi*.

5.5. Síntomas de plantas inoculadas

El número de plantas que presentaron síntomas fue de 40 las cuales se analizaron en el laboratorio para ver el agente causal del daño desglosándose los resultados en el cuadro 14. Las plantas con los primeros síntomas se presentaron en un periodo variado ya que en unas plántulas, los primeros síntomas se manifestaron a los 15 días después de su emergencia; pero en otros casos en plantas con mayor edad y tamaño, estas fueron extraídas para su análisis en laboratorio presentando un achaparramiento (fig 9A) así como la decoloración de hojas verde pálido hasta un color amarillo, plantas marchitas de coloración café y una pequeña constricción en la base del tallo (figura 9B, C y D), estas se secan completamente y cuando se realiza un corte transversal el tallo se observa necrosado (fig 9E y F). Estos síntomas coinciden con los descritos por Peterson (1992a), Martínez (2001) y López (2002), quienes describen la sintomatología con una presencia de muerte de raíces, lo cual provoca una disminución en el crecimiento, clorosis y un marchitamiento de la parte aérea.

El porcentaje de plantas que manifestaron daños por *Fusarium oxysporum* fue de 62.5 y solo el 0.1% manifestaron daño por *Pythium debarianum* y *Phytophthora cinnamomi*.

Cuadro 14.Número de plantas con síntomas por tratamiento

Tratamiento	N° de plantas enfermas	Hongos aislados	Medio de cultivo
1	5	<i>F. oxysporum</i> , <i>Trichoderma</i>	V8,PDA
2	12	<i>F. oxysporum</i> , <i>P. cinnamomi</i> , <i>P. debarianum</i>	PDA, V8,HMA
3	2	<i>Trichoderma</i> , <i>F. oxysporum</i>	PDA,V8
4	3	<i>F. oxysporum</i> <i>Trichoderma</i>	PDA,V8
5	1	<i>F. oxysporum</i> <i>Trichoderma</i>	PDA,V8
6	3	<i>Trichoderma</i> , <i>F. oxysporum</i>	PDA,V8,HMA
7	1	<i>Trichoderma</i> , <i>F. oxysporum</i>	PDA
8	3	<i>Trichoderma</i> , <i>F. oxysporum</i>	PDA
9	1	<i>T. harzianum</i>	PDA
10	2	<i>T. harzianum</i> , <i>F.oxysporum</i>	PDA,V8
11	2	<i>T. harziaunm</i>	PDA
12	2	<i>B. subtilis</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Trichoderma</i>	PDA
13	2	<i>F. oxysporum</i>	PDA
14	1	<i>F. oxysporum</i>	PDA



Figura 9. Síntomas en plantas causado por Damping off. **A** estrangulamiento típico en la base del tallo. **B** tallo y hojas con una pudrición de color café. **C** marchites descendente de la plántula. **D** daño avanzado del ataque por Damping off. **E** vista de necrozamiento a nivel raíz. **F** corte longitudinal para observar pudrición a nivel interno del tallo.

5.6. Descripción de cepas de reaislamientos

Fusarium oxysporum presentó un crecimiento micelial hialino al inicio y a los cinco días la colonia se tornó de color púrpura (fig 10A1), *Trichoderma* presentó un crecimiento micelial incoloro al inicio y al cabo de cinco días se tornó de color verde en medio de V8 y de color amarillo en medio de PDA (fig 10A2), *Phytophthora cinnamomi* en medio de V8 presentó un crecimiento micelial ramificado al inicio, posteriormente, al cabo de 5 a 8 días, presentó un crecimiento micelial en forma de camelia (fig 10B1), por su parte *Pythium debarianum* desarrolló un micelio cenocítico incoloro al inicio y posteriormente de color blanco de aspecto algodonoso (fig 10B2).



Figura 10. Cepas de muestras de plantas dañadas. **A1** crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*. **A2** *Trichoderma erinaceum*. **B1** crecimiento micelial de *Phytophthora cinnamomi*. **B2** crecimiento de *Pythium debarianum*.

5.7. Identificación de hongos

5.7.1 *Fusarium oxysporum*

Se realizaron preparaciones fijas para determinar la especie, en este caso mediante sintomatología, características morfológicas y la ayuda de claves dicotómicas. *F. oxysporum* al inicio presentó un crecimiento micelial de color blanco, de aspecto algodonoso, posteriormente la colonia se tornó de color púrpura a violáceo (fig 11A y B), a los cinco días después de sembrado, las fiales donde se producen los conidios son hialinas y cortas (fig 11C); con presencia de macroconidios incoloros (fig 11D), estos fueron inducidos mediante hojas de clavel esterilizadas y puestas en cajas de petri con medio de cultivo (PDA), presentaron de 3 a 7 septas; en su mayoría con tres septas unicelulares y con célula apical en forma de gancho y célula basal en forma de bota con rangos de 30.6 μm a 73.95 μm de largo por 2.55 a 7.65 μm de ancho con un promedio para ambos de 55.61 a 6.22 μm ; los microconidios fueron hialinos algunos con una división, otros con dos y tres septas, con rangos de 10.24 μm a 35.84 μm de largo por 5.12 μm a 10.24 μm de ancho con un promedio para ambas de 22.48 $\times$ 5.47 μm (fig 11E); y una producción abundante de clamidosporas una característica distintiva de la especie (fig 11F). Estas características coinciden con las que reporta Booth (1971), Abad (2002), Martínez (2001) y Romero (1988).

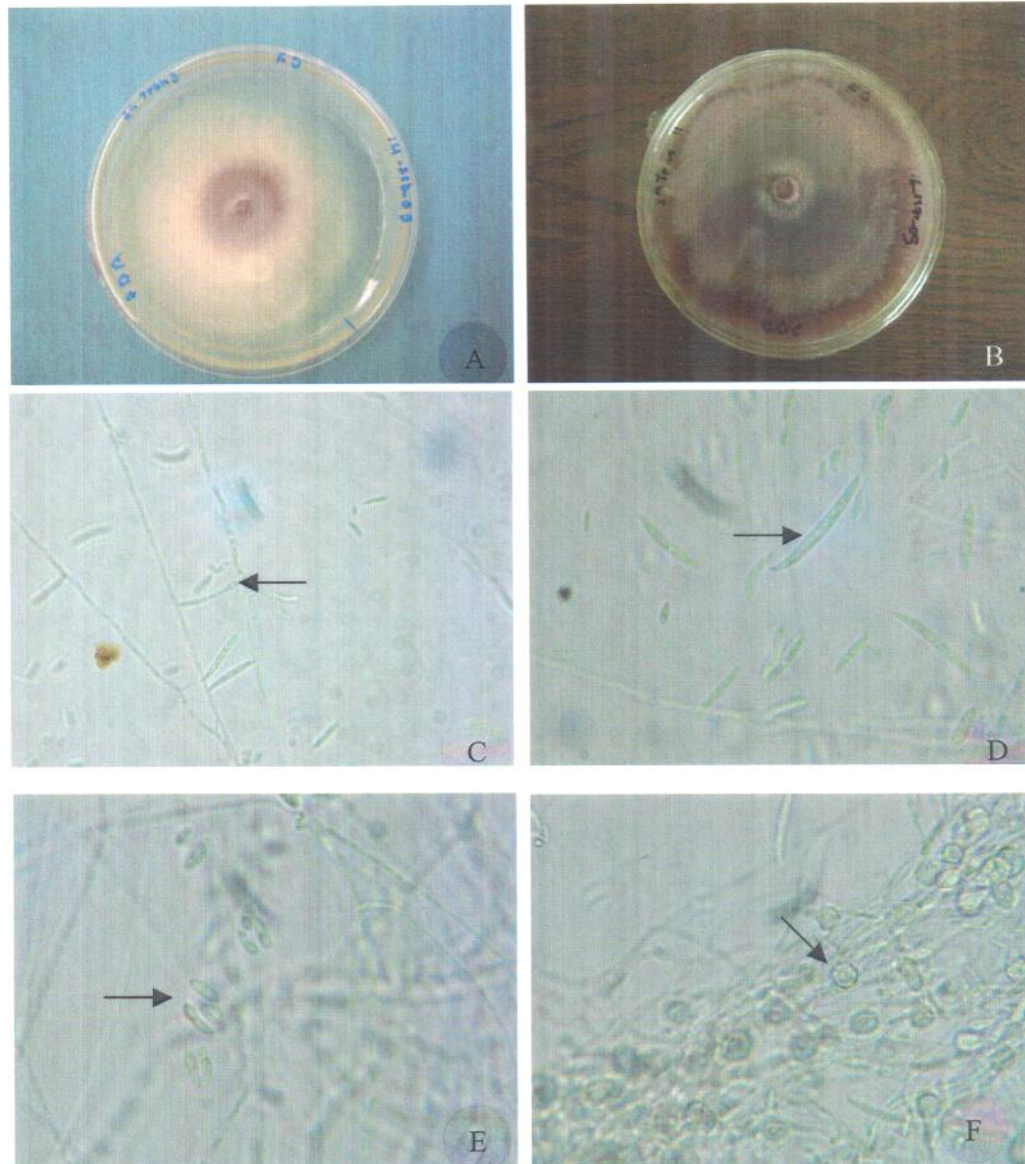


Figura 11. Características morfológicas de *Fusarium oxysporum*. **A** crecimiento micelial de *F. oxysporum*. **B** coloración característica de la colonia de *F. oxysporum*. **C** fialides cortas donde se producen los conidios. **D** macroconidios característicos en forma de canoa. **E** microconidios. **F** formación de clamidosporas abundantes en medio de cultivo.

5.7.2. *Phytophthora cinnamomi*

La identificación de este hongo se basó principalmente en las características morfológicas y claves dicotómicas; presentando crecimiento micelial turuloso con hinchamientos (fig 12A); una característica distintiva de éste fue un crecimiento en forma de camelia en V8 (fig 12B), coincidiendo estas características con las reportadas por Stamps y Waterhouse (1990), Edwin y Ribeiro (1996) y Romero (1988); para la formación de esporangios fue necesario hacer extracciones del medio con un saca bocado de 0.5 centímetros de diámetro y ponerlo en cajas de petri estériles con agua destilada y a oscuridad por 24 horas (fig 12C), una vez pasado el tiempo se hicieron preparaciones permanentes donde, se tomaron 100 esporangios, los que se midieron y los rangos de medidas fueron 30.72 a 112.64 μm de largo por 20.48 a 76.8 μm de ancho y un promedio ($72.86 \times 52.38 \mu\text{m}$), relacionándose un poco con las reportadas por Edwin y Ribeiro (1996), Díaz (2005). Por su parte Romero (1988), reporta medidas de esporangios en cultivo de ($40 \times 100\mu\text{m}$). Sin embargo, las dimensiones de ancho y largo de los esporangios varían en diferentes reportes Edwin y Ribeiro (1996).

Las clamidosporas fueron abundantes en medio de V8, globosas de pared delgada y coloración café (fig 12D), realizando 100 mediciones para sacar rango en diámetro de 20.84 a 107.52 μm (promedio 78.75 μm). Romero (1988).

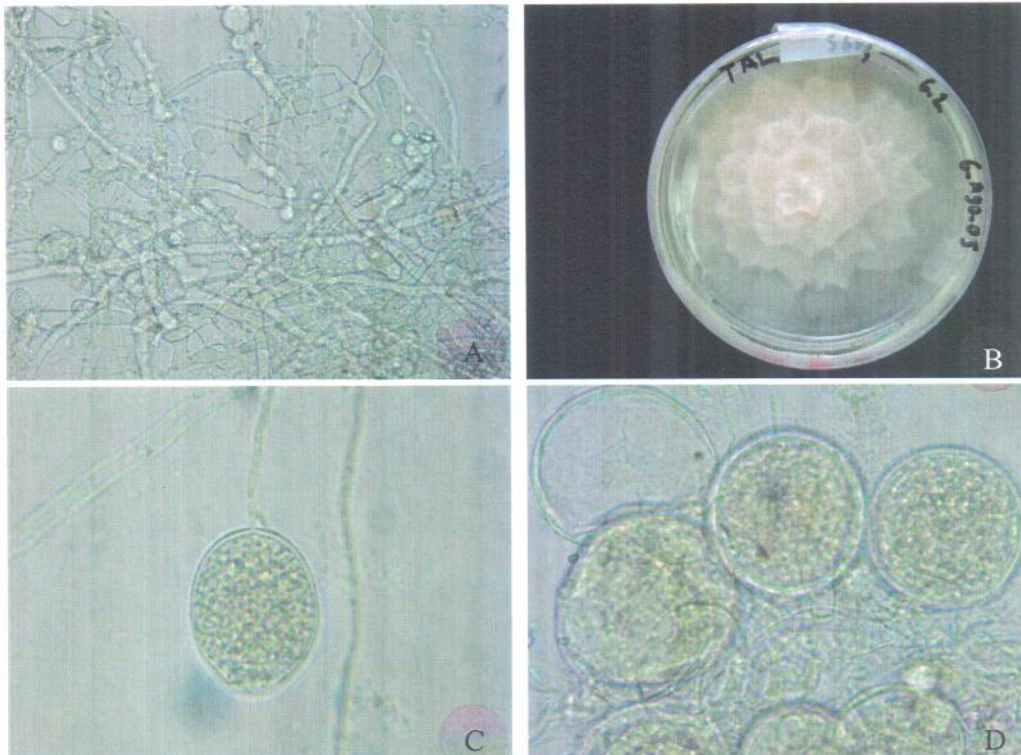


Figura 12. Características morfológicas de *Phytophthora cinnamomi*. **A** micelio turbuloso. **B** crecimiento en forma de camelia en medio de cultivo V8. **C** formación de esporangio en medio líquido. **D** formación de clamidosporas en V8.

5.7.3. *Pythium debarianum*

La colonia de *P. debarianum* se propagó en medio de cultivo V8 para formar micelio y posteriormente se sacaron muestras de la colonia con un saca bocado para depositarlas en cajas de petri con agua destilada estéril para la formación de esporangios, la colonia presentó un micelio cenocítico hialino al inicio y conforme se fue desarrollando se tornó de color blanco y de aspecto algodónoso (fig 13A y B); produjo gran cantidad de clamidosporas de forma circular (fig 13C),y formación de oogonios con anteridio (fig 13D).

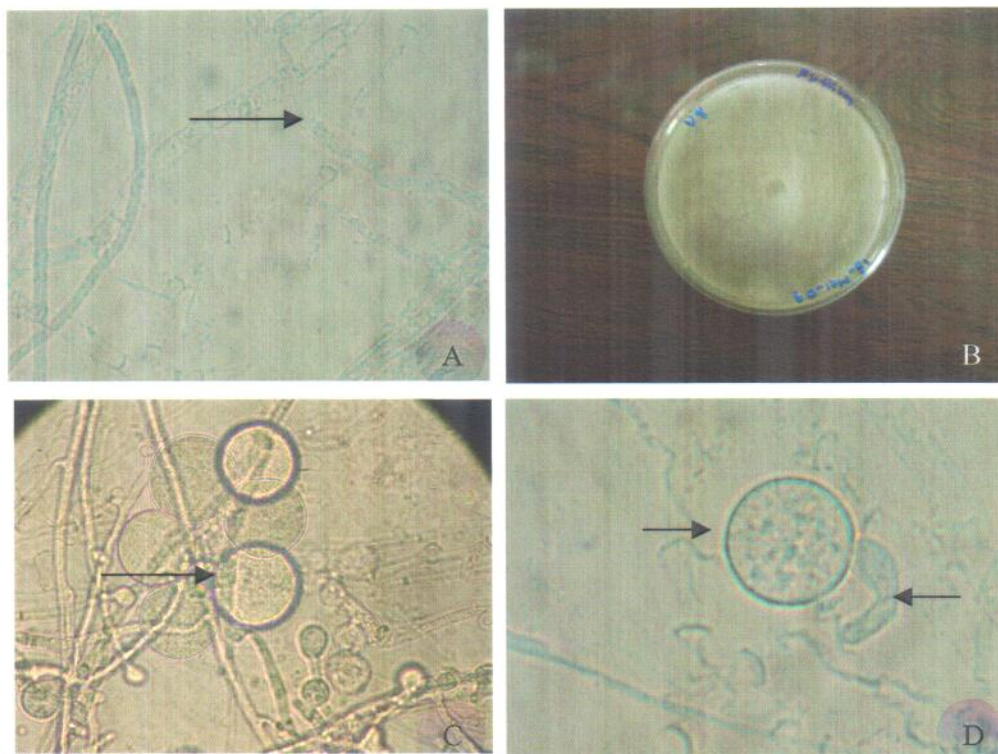


Figura 13. Características morfológicas de *P. debarianum*. **A** micelio cenocítico. **B** micelio de aspecto algodónoso en medio de cultivo V8;. **C** formación de clamidosporas. **D** Oogonio y anteridio

5.7.4. *Trichoderma erinaceum*

La identificación de *Trichoderma* se basó en características morfológicas de la colonia y el apoyo de claves del género las cuales fueron consultadas por vía electrónica²; se hicieron preparaciones permanentes donde se midieron 100 conidios, 100 clamidosporas y 50 fialides. Este hongo presentó crecimiento micelial de color blanco al inicio y al cabo de cinco días se tornó de color verde esto debido a la gran producción de conidios en V8 (fig 14A), por su parte donde hubo mayor producción de clamidosporas fue en PDA, tornándose la caja de un color amarillo y cubriendo por completo la caja de petri en 5 días a temperatura controlada de 27 °C (fig 14B); en ambos medios hubo presencia de conidios ovoides, de color verde amarillento de 5.1 a 10.2 µm de largo por 5.1 a 7.65 µm de ancho con promedio para ambos de 7.32 × 5.69 µm (fig 14C); clamidosporas transparentes, terminales y abundantes, globosas a ovoides de 15.3 a 35.7 µm de largo por 10.2 a 17.85 µm de ancho con un promedio 22.93 × 16.89 µm (fig 14D); los conidióforos son ramificados (fig 14E); fialides con ensanchamientos desde la base del conidióforo hasta la parte media, de forma verticilada y dispuestas paralelamente a lo largo de este, medidas de las fialides de 10.2 a 28.05 µm de largo por 5.1 a 7.65 µm de ancho con un promedio para ambos de 5.95 a 16.48 µm, este terminando con una fialide en el extremo, y dos a los lados de ahí se debe su nombre de Tri por terminar todos los conidióforos con tres fialides (fig 14F).

² http://ntuars-grin.gov/taxa_descriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm

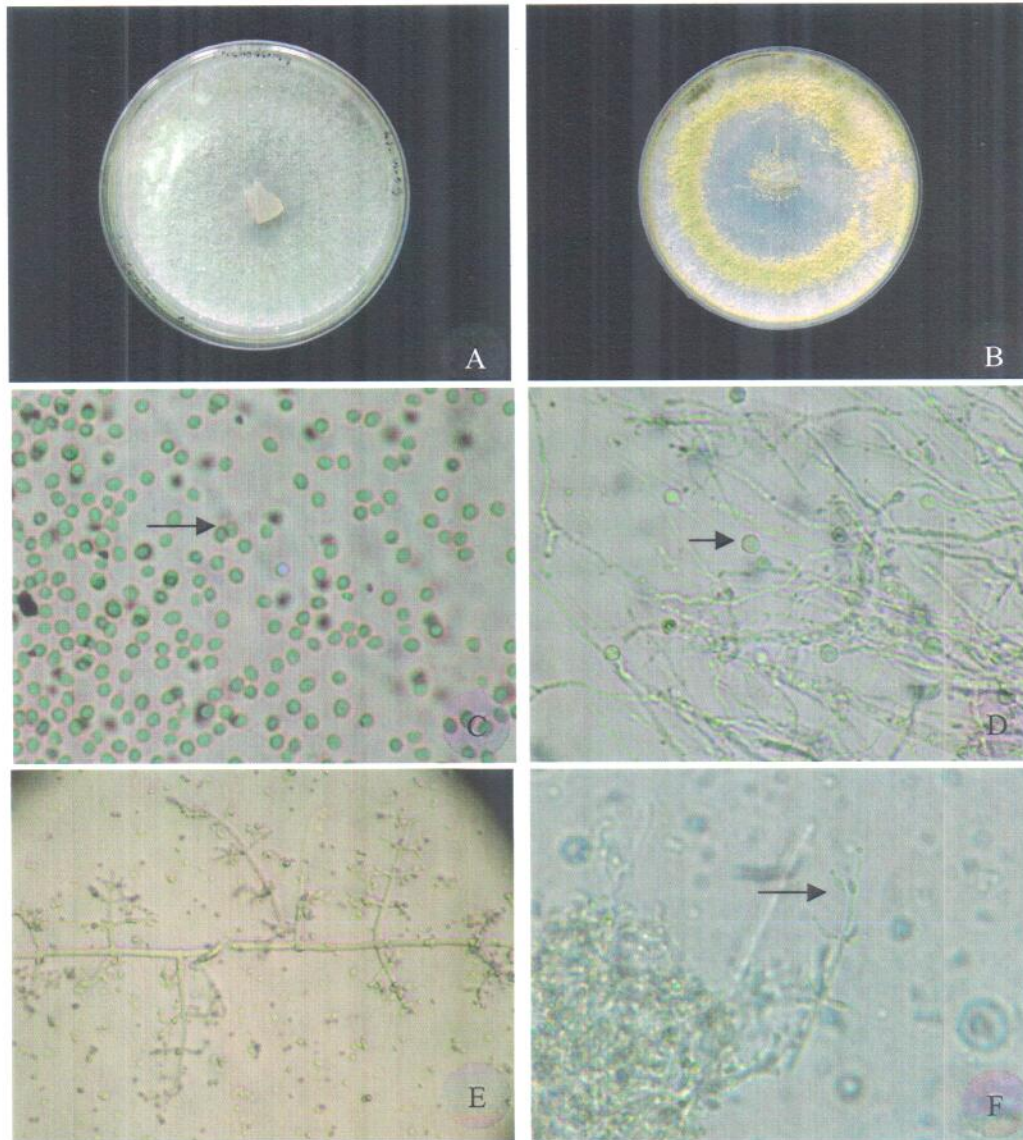


Figura 14. Características morfológicas de *Trichoderma erinaceum*. **A** crecimiento de *T. erinaceum* en medio de cultivo V8. **B** crecimiento micelial en medio de cultivo PDA. **C** conidios ovoides y de color verde amarillento. **D** formación de clamidosporas. **E** formación de conidioforos ramificados. **F** fialides características del género *Trichoderma* sp.

6. CONCLUSIONES

Con base a los objetivos planteados en esta investigación, se puede concluir lo siguiente.

De acuerdo a las diferentes pruebas realizadas pudimos constatar la gran ventaja de tratar preventivamente a la semilla de *Pinus ayacahuite* para prevenir el ataque de los hongos causantes de Damping off; con productos a base de organismos biológicos en nuestro caso la utilización de productos comerciales PHC T22, *Trichoderma erinaceum* y *Bacillus subtilis*, mostraron tener una eficiencia aceptable como productos preventivos contra el ataque de Damping off.

La aplicación de *T. erinaceum* y *T. harzianum* favoreció notablemente la altura de planta y peso seco de la raíz, comparando estos con el testigo dos a base de Damping off.

La condición de salud de las plantas que recibieron tratamiento preventivo fue mejor ya que las plantas presentaron mayor altura, vigor y coloración en comparación con el tratamiento donde se aplicó Damping off

Los hongos *Phytophthora cinnamomi* y *Pythium debarianum* se manifestaron en dos plantas de 40 que se muestrearon, representando un 0.1 % del total de las extraídas; las 38 restantes manifestaron daños por *Fusarium oxysporum*, poniendo de manifiesto que el hongo que más afecta a la especie de *P. ayacahuite* es *F. oxysporum*.

Trichoderma es un buen agente parasítico e inhibidor del crecimiento micelial de *F. oxysporum*, *P. cinnamomi*, y *P. debarianum*.

De acuerdo a las características morfológicas que presentó el hongo de estudio y con la utilización de claves del género el organismo antagonista con el que se trabajó fue *Trichoderma erinaceum*.

En forma general el efecto principal de *Trichoderma* es proporcionarle a la planta una barrera de protección contra patógenos del suelo, y así facilitar la absorción de nutrientes, más no interviene en el crecimiento de esta ya que la planta en un suelo estéril pero con nutrientes, las raíces son las encargadas de absorber estos y a su vez la planta los va canalizar en diámetro y altura.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abad, G. 2002. Plant pathogen Identificación Laboratorio. Dept. of Plant Pathology; Revisión del género *Fusarium*. Primer taller internacional sobre " identificación de hongos y Stramenopilas transmitidos por semillas". Texcoco, México.
- Agrios, G.N. 1999. *Fitopatología*. Ed. Limusa. Quinta impresión de la segunda edición. 854.p.
- Alexopoulos, C.J. 1985. *Introducción a la Micología*. Ed. Omega. 638 p.
- Anónimo 2001. Diccionario de especialidades Agroquímicas. Ed. PLM. 1575 p.
- Aruna, K and Chatterjee.N.C. 2003. Antagonism of *Trichoderma* species to *Polyporus sanguineus*- an incitant of Bamboo Decay. Mycology and Plant Pathology Laboratory, Department of Botany, Burdwan University, Burdwan (West Bengal). Indian Forester. 1281-1288 pp.
- Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological. Institute, Kew, Surrey England. C.A.B. Commonwealth Agricultural Bureaux. England. 237 p.
- Bures, S. 1997. *Sustratos*. Ed. Aerotécnicas. Madrid, España. 342 p.
- Cadahia, L.C. 1992. Caracterización química y físico-química de sustratos. 1 jornadas de sustratos. Actas horticultura, 11. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. 19-25 p.

Castillo, M.L.E.2001. Introducción al SAS para windows. Primera edición, Departamento de parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Edo. de México. 210 p.

Cibrián, T.D. 2005. Comunicación personal. Universidad Autónoma Chapingo Edo de México.

CONAFOR.2006.

http://www.conafor.gob.mx/programas_nacionales_forestales/pronare/Viveros_forestales.htm (consultado el día 17 de enero 2006)

Díaz, L.L.M. 2005. *Phytophthora cinnamomi* Rands Como agente causal de la pudrición de raíz en *Pseudotsuga macrolepis* Flous. En plantaciones de árboles de navidad. Tesis de Licenciatura, Ingeniera en Restauración Forestal, División de Ciencias Forestales; Universidad Autónoma Chapingo; Chapingo, México. 28 p.

Edwin, D.C and O.K. Ribeiro.1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS PRESS. The American Phytopatological Society. St Paul. Minnesota.. United Estate of America. 562 p.

Fermanian, T. W., Shurtleff, M. C., Randell, R. Wilkinson, H. T. 1997. Controlling Turfgrass Pest. Second Edition. Ed. Pentice-Hall, Inc. A Simon & Schuster Company. Upper Saddle River., New Jersey., U.S.A.

Gallowey, G.L. 1983. Manual de viveros forestales en la sierra Peruana. Ed FAO. Lima, Perú. 30 p.

García, E. 1981. Modificaciones al sistema climático de Koppen. Instituto de Geografía de la Universidad Autónoma de México. Tercera Edición. México 252 p.

Gordon, H.L. and A. Tensvand, and A. Tronsmo. 2001. Antagonism of nutrient-activated conidia of *Trichoderma harzianum* (atroviride) P1 against *Botrytis cinerea*. Vol 91, N°. 12, 2001. The American Phytopathological Society.

Harman, E.G. *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* (Deuteromycota: Moniliales). Cornell University, Geneva, NY. Saninet. (IICA), Agencia de Cooperación Técnica de Ecuador.
<http://www.iicasaninet.net/pub/sanveg/html/biocontrol/patogenos/trichoderma.html> (Revisado el 21/08/2003).

Harman, E.G. 2000. Myths and Dogmas of Biocontrol: Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum* T-22. Vol. 84 No.4 april 2000. The American Phytopathological Society. Cornell University and BioWork, Inc., Geneva, NY. 377-393 p.

Hjeljord, L.G., Stensvand, A., and Tronsmo, A. 2001. Antagonism of nutrient-activated conidia of *Trichoderma harzianum* (atroviride) P1 against *Botrytis cinerea*. Vol 91, No 12. 1172-1180.

Holmes, K.A. Scheoers, J. Thomas. 2004. Taxonomy and biocontrol potential of a new species of *Trichoderma* from the Amazon basin of South America. DGfM, Mycological Progress 3(2): 199-210.

INIFAP. 2003. Monografía de PINUS AYACAHUITE. Proyecto de Investigación Manejo y Conservación de la Biodiversidad de los Bosques de Clima Templado y Frío de México Proyecto Sierra Madre) CONACYT-INIFAP 820003-K0288-T9710) Libro técnico N° 6 División Forestal .364 p

- Karthikeyan, A. Kumar., S. and Surinder. 2003. *Trichoderma viride* a mycoparasite for the control of *Phytophthora cinnamomi*. Himalayan Forest Research, Institute, Shimla (Himachal Pradesh). Indian Forester. 632-634.
- Kira, P.M., P.F. Cannon, J.C. David and J.A. Stalpers. 2001. Dictionary of the Fungi. Ed. CAB international. 665 p.
- Martínez, R.A. 2000. *Fusarium oxysporum* Schl. Como agente causal del estrangulamiento del tallo de *Psedotsuga macrolepis* FLOUS y *Pinus ayacahuite* var. *Veitchii* SHAW. En plantas de vivero. Tesis de licenciatura. División de Ciencias forestales, UACH, Chapingo, Edo. de México. 89 p.
- Martínez, M. 1992. *Los pinos Mexicanos*. Ed. Botas, México, D.F. 361 p.
- López, R. E. 2002. Identificación, daños y control de los hongos causantes de pudriciones de raíz y cuello del césped (*Pennisetum clandestinum* Hochst, ex Chiov.). Tesis Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola, UACH, Chapingo, Edo. de México. 74 p.
- Pastor, S., J.N. 1999. "Utilización de sustrato de viveros" Revista Terra Serie Horticultura, Botánica y Jardinería Vol 17 (3).231.235 Lleida España.
- Patiño, V.F. 1993. Viveros Forestales. Planeación, establecimiento y producción de planta. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos; Impreso y hecho en México por el Centro de investigaciones Regional del Sureste del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. 159 p.
- Peterson, G.W. 1992(a). "Principales enfermedades de la raíz en vivero". Folleto Universidad Popular del Estado de Puebla. (UPAEP), 34p.

Peterson, G.W. 1992(b). Enfermedades de tallo y ramas en viveros forestales. Folleto. Universidad Popular del Estado de Puebla. (UPAEP), 34 p.

Punja, K.M and Raymon, Y. 2003. Biological control of Damping off and root rot caused by *Pythium aphanidermatum* on greenhouse cucumbers. Canadian Journal Plant Pathology.25: 411-417.

Roldan, C.M.A. 2005. Determinación de hongos y de la viabilidad mediante rayos X y su efecto en la germinación en semillas de *Pinus ayacahuite* var *veitchii* Shaw. Tesis de Licenciatura Ingeniero Forestal. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México. 68 p.

Romero, C.S. 1988. *Hongos fitopatógenos*. Universidad Autónoma Chapingo. Patronato Universitario A.C. Chapingo, México. 160 p.

Romo, L.I & Avila.J. 2000. *Trichoderma* spp como agente de control biológico (parte I). Avances Agropecuarios. Órgano Informativo del departamento de agricultura y ganadería de la Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora. México. 2p.

Smiley, R.W. Dernoeden, P.H., Clarke, B. B. 1994. Compendium of Turfgrass Diseases. Secon Edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minesota., U.S.A.

Stamps, D.J., G.M Waterhouse, *et al.* 1990. revised tabular key to the species of *Phytophthora*. 28p. Mycelia. Papers 162. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

STATICAL ANALYSIS SYSTEM. 1999. The SAS System for Windows Eight Versión. Institute Inc. Cary N. C., USA.

Syngenta. 2005. ficha técnica. Ridomil Gold. [http:// www. Florintegral. Com.co/paginas/productos/RIDOGOLD.htm](http://www.Florintegral.Com.co/paginas/productos/RIDOGOLD.htm). consultado el día 05-04-2005.

Thomson, W.T.1994. Agricultural chemicals. Vol VI. Thomson Publications. Fresno California, United Stated of America. 226 p.

Torres, H. G. 2001. Etiología de la secadera del Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn). En Texcoco, México; y la evaluación de su control *In Vitro*. Tesis de Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. 60 p.

8. ANEXOS

Anexo 1. Modo de acción de *Bacillus subtilis* y Ridomil Gold

B. subtilis: Forma cristales los cuales inhiben el crecimiento de las esporas, desarrollando colonias en el sistema radical de la planta, contra organismo que atacan raíz, a medida que el sistema radical crece, la bacteria coloniza el sustrato protegiendo a la planta y promoviendo el desarrollo radicular y el crecimiento vegetativo (Thomson, 1994)

Ridomil GOLD: crea una capa protectora en los tejidos superficiales de la planta, penetrando rápidamente los tejidos internos de esta, transportándose acropetalmente por el xilema. La capa protectora de este producto impide que las esporas del hongo, germine y penetre a la planta, interrumpiendo el ciclo de Krebs, afectando la obtención de energía de las células del patógeno, el fungicida que penetra y se transporta dentro de la planta actúa sobre el crecimiento subcuticular del hongo inhibiendo la síntesis de proteínas como consecuencia de la interferencia con la síntesis de RNA (ácido ribonucleico), en las células del hongo. (Ficha técnica, 2005).