



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DIVISIÓN DE CIENCIAS FORESTALES

**“CONTROL BIOLÓGICO DE *Fusarium oxysporum*
EN DOS ESPECIES DE PINO”**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

PRESENTA:

MARIA ANGELICA ROLDAN CORTES

BIBLIOTECA DIVISION DE CIENCIAS FORESTALES

Chapingo, Texcoco, Estado de México.
Abril de 2008.



“CONTROL BIOLÓGICO DE *Fusarium oxysporum* EN DOS ESPECIES DE PINO”

TESIS REALIZADA POR **MARIA ANGELICA ROLDAN CORTES** BAJO LA DIRECCIÓN DEL COMITÉ ASESOR, LA CUAL HA SIDO APROBADA POR EL MISMO Y ACEPTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

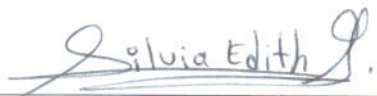
MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

DIRECTOR:



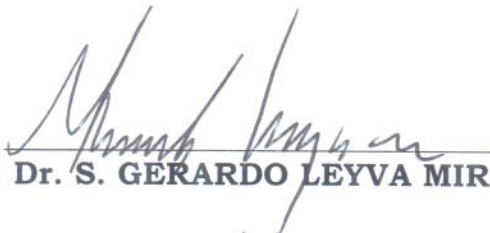
Dr. DAVID CIBRIÁN TOVAR

ASESOR:



M.C. SILVIA EDITH GARCÍA DÍAZ

ASESOR:



Dr. S. GERARDO LEYVA MIR

ASESOR:



Dr. JOSÉ TULIO MÉNDEZ MONTIEL

Chapingo, Texcoco, Estado de México.
Abril de 2008.

Estrella de libertad.

Si el pasado te atormenta, busca una luz en la oscuridad. Deja de ser presa del ayer, que no te atormente lo que pudo haber sido. Haz de lo sucedido una experiencia, pues de lo contrario corres el riesgo de perder lo único que posees: tu presente. Ama lo que eres y sin reclamos decídete a vivir aquí y ahora la estrella de la libertad que Dios te concedió al nacer. Decídete a vivir intensamente el ahora.

Estrella de libertad es decidir lo que deseas ser. No existe ni ayer ni mañana. Es hoy lo único que posees, tu único patrimonio eres tú mismo y nadie más puede tener un plan para tu vida. Es tu vida lo único que posees, atrévete a vivirla intensamente usando tu don más grande: la libertad.

Para encontrar la estrella de la libertad es necesario aprender a perdonar:

A ti mismo con tus propias limitaciones.

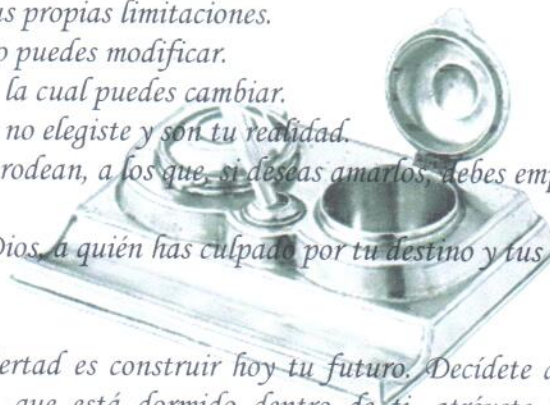
Un pasado que no puedes modificar.

Tu circunstancia, la cual puedes cambiar.

A tus padres, que no elegiste y son tu realidad.

A los seres que te rodean, a los que, si deseas amarlos, debes empezar por aceptarlos.

Y finalmente, a Dios, a quién has culpado por tu destino y tus adversidades.



Estrella de la libertad es construir hoy tu futuro. Decídete a luchar por hacer surgir al gigante que está dormido dentro de ti, atrévete a ser: agradecido, optimista, tenaz, perseverante y luchar incansablemente por lograr tus sueños.

Dios, haz que pueda comprender mi libertad y logre alcanzar la estrella de la plenitud, pues es mi vida lo único que poseo y deseo fervientemente ser una luz más en la grandeza de tu creación.

Miguel Angel Cornejo

BIBLIOTECA DIVISION DE CIENCIAS FORESTALES

DEDICATORIA

A DIOS por darme la oportunidad de ser parte de este proyecto de vida.

A MIS PADRES; quienes me enseñaron el camino de la verdad y la vida, porque gracias a su cariño, guía y apoyo he llegado a realizar uno de los anhelos mas grandes de mi vida, fruto del inmenso amor y la confianza que en mi depositaron. Gracias a ellos he logrado culminar una fase más, la cual constituye el legado más grande que pudiera recibir. Por ello y mucho más, mil gracias.

Al ser que amo con toda la fuerza que su amor le ha dado a mi alma, la gran mujer BENEDICTA CORTES GRANILLO; Ángel extraordinario que me dio la vida, quien día a día eleva sus oraciones por mí y a pesar de la distancia, me llegan sus bendiciones. Gracias mamita por ser mi gran amiga y gracias a Dios porque a través de ti me ha enseñado la magnificencia divina del amor.

Al verdadero ejemplo de superación; mi papá JOSÉ VÍCTOR ROLDAN HERNÁNDEZ; sustancial motivo por el cual mi mente se pierde en recuerdos y en cada escena de mis sueños aparece. Te haces presente cada vez que el viento suave roza mi cara y la brisa fresca besa mis mejillas. Papá, brindo contigo por un sueño más realizado.

A MAYRA AZUCENA; mi querida hermana mayor, por ser gran ejemplo de perseverancia y por el apoyo invaluable en todo momento. Una vez más te digo que este logro también es tuyo, contar contigo ha sido un gran regalo que Dios ha puesto en mi vida. También a tus hijos: Betzabel, Brayan F. y Marycarmen; quienes iluminan el hogar con su presencia y ofrecen un toque de alegría, ternura y entusiasmo. Gracias por existir.

A ALEJANDRO; mi gran hermano, excelente ejemplo de fuerza interior. A ti que permaneces en constante búsqueda de felicidad y progreso. Aún cuando no estés cerca, veo una sonrisa en tu rostro por un triunfo más que con tu confianza he alcanzado. A tus peques: Jesús Alejandro, Christian Alexander y Diana Alexandra, quienes son la esperanza de hoy y la realización del mañana, amplio reflejo de la bondad.

A DULCE LETICIA; por seguir siendo la hermana complaciente de mis debilidades, por ser amiga y confidente, por orientarme en los momentos de indecisión, por eso y muchísimo más. También a su esposo Luís; por formar parte de la familia y ofrecer apoyo, amistad y confianza en todo momento. A Eldi Damaris, Luís Fernando y Kenneth Yael; niños que reflejan amor e inocencia y que despiertan mi espíritu infantil.

A MARÍA; mi abuelita que con dedicación y esmero muestra la faceta divina del amor familiar. A DELFINO; mi abuelito que hasta el último momento, mostró la lección mas grata con su propio ejemplo de trabajo y honradez, transmisor de conocimiento cosechado de su experiencia.

A MI TÍO; quien me sigue alentando a continuar con valentía y a pesar de su ausencia, sigue presente en mí, me hace invitación a no aumentar la soledad con días vacíos, sino más bien, llenarlos con actos útiles. Gracias por la confianza que me profesaste. Seguirás cerca aún cuando nuestros caminos por hoy han dejado de abrazarse.

A JUAN PABLO; primo y amigo. Gracias por confiar en mí, por compartir días de locura, por animarme a seguir luchando y por permitir guardar la esperanza de un regreso no tan lejano. Que Dios te Bendiga y proteja.

A mi primo VÍCTOR y su esposa Silvia; por el apoyo otorgado al principio de mi formación profesional. Eternamente gracias por compartir la alegría de un logro más culminado y por permanecer cerca de mi familia. Hoy por hoy... mil gracias.

A las familias ROLDAN; motivo de superación continua y por formar parte de esta meta.

A las familias CORTES; al término de esta etapa de mi vida, quiero expresar un profundo agradecimiento a ustedes que con su apoyo y comprensión me alentaron a lograr esta hermosa realidad.

A una gran y maravillosa persona que con sus manifestaciones de afecto y amor me hace crecer. Por ti la fuerza del amor y la magia del entusiasmo de cada amanecer. Gracias por comprenderme, apoyarme y actuar como un genio, cumpliendo cada uno de mis deseos.

A SILVIA G; por estar pendiente en todo momento y mantener encendida la luz de la esperanza y la unidad. A ti que me insistes y apoyas en la continuidad del tratamiento logrando resultados extraordinarios, gracias.

A mi padrino el Ing. ENRIQUE FERNÁNDEZ y a su esposa Chelo; como un testimonio de gratitud ilimitada, porque su presencia ha sido y será un gran apoyo. Gracias por tener la palabra acertada y actitud generosa, además de ser pilar fundamental de mi carrera profesional.

A la familia SERRANO CARRILLO; por permitirme ser parte de ellos y por infundir en mi el sentimiento de lucha y constancia para derribar los más altos obstáculos. Además por la infinidad de atenciones que me ofrecen en los bellos instantes de convivencia. Kary, gracias por la transformación que has logrado en mí.

A PATY BOSCO y ROBERTO CAMPANA; quiero compartir un logro más con ustedes. Gracias por las palabras tan acertadas y por mostrarme que la vida no termina, sino que empieza con cada amanecer en el que hay tanto por aprender. Además, agradezco el ayudarme con la traducción al inglés del resumen de este trabajo.

A mis mejores compañeros y amigos:

Karla y Maribel; el gran dueto que en ocasiones permiten formar un trió. Porque ustedes conocen un poco de mí y me motivan a luchar por mis ideales, gracias por estar cerca en todo momento.

Carlos A. T. (Requiescat in pace). Que Dios te proteja siempre!!!

Héctor; gracias por tu paciencia y por todo lo que haces por mí, además por enseñarme a valorar las pequeñas grandes cosas de la vida y por incitarnos a conquistar nuevos horizontes.

Maira; por la amistad, apoyo moral y estímulo brindado a cada instante. Contigo aprendí que vale más conocer antes de enjuiciar para descubrir la esencia personal. Gracias por ayudarme en la toma de mediciones en campo..

Omar R.; por considerarme un Ángel, por ti la abreviatura a mi nombre. A Rosalino Díaz, Vicky R; la amiga de todos los tiempos y espacios, Lulú M., Vero F., Yex D., Fidel Fernández (gran muestra de superación), Al padre Arnulfo Mejía,

Gracias por permitirme ser parte de sus vidas.

Hoy y más que nunca... Gracias por ser parte esencial en mi vida.

Angelica.

AGRADECIMIENTOS

Al ser supremo, mi DIOS; por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos. A él que me ilumina con un espíritu entusiasta y valeroso para superar las dificultades, lo que soy es por su infinita voluntad. Todos los triunfos y obstáculos son porque tú los has decidido, los cuales me han permitido conocerte más. Una vez más y para siempre, Bendito seas Señor.

Ha llegado el momento de expresar el mayor agradecimiento a las instancias y personas que participaron en el desarrollo y culminación de esta investigación, quiero reiterarles que sin ustedes, no hubiera sido posible.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), institución que me permitió la realización de estudios de postgrado mediante el programa de becas que ofrece.

A la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO; por ser mi alma mater y brindarme la oportunidad de pertenecer un periodo más a ella al subir otro peldaño en mi preparación profesional. He llegado al final de este camino y en mi han quedado marcadas profundas huellas de este recorrido.

A la DIVISIÓN DE CIENCIAS FORESTALES; por existir y enseñarme a conocer y cuidar el ambiente, los bosques y todo el entorno natural. En sus aulas he adquirido el conocimiento necesario para aplicarlo en bien de nuestro bien.

Al Dr. DAVID CIBRIÁN TOVAR; no tengo palabras para agradecer el apoyo brindado para llevar a cabo esta investigación. Gracias por aceptarme como alumna y dirigir este trabajo, además por las acertadas sugerencias, aportaciones y correcciones que lo enriquecen. Le expreso mi gran admiración por su talento profesional y reconocimiento nacional e internacional en la sanidad forestal.

A la M.C. SILVIA EDITH GARCÍA DÍAZ; por su disposición durante el desarrollo de esta investigación, por compartir su conocimiento y enseñanza en el área de la patología, así como por las oportunas observaciones. Pero sobre todo, por la gran amistad. Una vez más, muchas gracias.

Al Dr. S. GERARDO LEYVA MIR; por aceptar formar parte del comité asesor, así como por las atinadas sugerencias y comentarios. Sobre todo, por dedicar su valioso tiempo en la revisión de este documento.

Al Dr. JOSÉ TULIO MÉNDEZ MONTIEL; por formar parte del comité asesor y guiar la parte estadística de la investigación.

A la Dra. Amparo Borja de la Rosa; por su gran apoyo, afecto y comprensión, por creer en mí y asesorarme en el ámbito profesional y por tener un consejo y orientación oportunos cuando requerí tomar decisiones.

Al M.C. Alejandro Corona; por el apoyo incondicional en algunas dudas respecto a los diseños experimentales.

A los maestros de la Universidad y de manera especial a los del programa de Postgrado; por impartir sus conocimientos y transmitirlos a las nuevas generaciones para un bien común, además de acrecentar en mí el interés por la investigación.

Al Dr. Hubert Tchikoué; esperé una vez más el momento ideal para expresarte un profundo agradecimiento por ser gran amigo y por hacerme creer en mí cuando en ocasiones he tenido flaquezas y debilidades. Aprovecho para expresar admiración por la calidad profesional que posees y que día con día buscas mejorar.

Al M.C. Guillermo Carrillo E.; profesor y excelente amigo. Gracias por darme la oportunidad de aprender de usted un poco de lo mucho que conoce en el ramo forestal, además por la amistad que día a día me manifiesta y enseñarme que mis sueños no desaparecen mientras yo no los abandone.

Al maestro Eligio Martínez R.; quien a través de enseñarme a sumar números y letras me enseñó a sumar amigos y restar tristezas, amarguras y desconsuelos y creer que siempre habrá una esperanza para dividirla entre todos y alcanzar la paz para multiplicarla por nuevos ideales.

Al Ing. Ruperto Vergara G.; por permitirme trabajar en el vivero forestal y por la invaluable ayuda que me proporcionó durante el trabajo en campo de esta investigación.

A la Sra. Ángeles L.; por hacerme creer que los sueños de ayer son las esperanzas de hoy y la realidad del mañana.

A la familia Vergara González; como gran ejemplo de optimismo y superación y por brindarme su amistad. A Tímo por su excelente apoyo durante el trabajo de campo de este trabajo, muchas gracias por todo.

Al personal del vivero forestal: Sr. Isaac, Sr. G. Cebrero, Sr. Jorge, Sr. Zaragoza, Josué y a todo el equipo por dedicarme parte de su apreciable tiempo en el establecimiento del experimento.

A Lolita, Laurita y Chío; secretarias que me brindan ayuda incondicional y ofrecen una mano amiga, una sonrisa alentadora y una palabra oportuna. Gracias por formar parte de la preparación de los forestales.

A mis compañeros de postgrado: Lorens por la amistad que me profesas. Mario: por mostrarme aprecio con sólo una sonrisa. Uriel por ofrecer confianza y ser paciente en todo momento. Omar por ser ejemplo emprendedor y por poseer el tacto de mostrar amistad ante cualquier adversidad.

A Carlos V.; por ser amigo incondicional; gracias por la confianza y el apoyo. A Alvaro V.; por darme ánimo para culminar esta meta.

A Bogarth, Lázaro y Miguel A.; por poseer ese gran sentido del humor que hace saltar de un momento de rutina a un momento de alegría y por asesorarme en ese mundo de los números y la matemática. Bogarth, gracias por esa bella serenata y por el regalo de tu voz en este día.

A Olga y Román; por enseñarme a admirar las bellas cosas de cada día. Arturo y Benita; por la amistad que me brindan. A mi tía Paz; por formar parte de este gran momento.

A Ignacio M.; por compartir conmigo los desvelos matutinos durante algunos traslados a la escuela con la finalidad de estar puntual en clase, por aquellos detalles florales y por amenizar este momento... Gracias.

A Víctor Corona; por la amistad que me manifiestas. Al padre Rolando Corona; por su amistad y por incluirme en sus oraciones. Que Dios los Bendiga.

A todos aquellos que no menciono pero que me permitieron conocerles y aprender un poquito de lo mucho que saben. Siempre estarán en mis oraciones y en mi pensamiento.

Con admiración y respeto.

Maria Angelica Roldán Cortes.

DATOS BIOGRÁFICOS

La autora nació en Tierra y Libertad, Municipio de Tlaxco, Estado de Tlaxcala el día 2 de mayo de 1981. lugar donde también cursó la educación básica primaria y secundaria

Ingresó en el año 1998 a la educación media superior en la Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. En 2001, inició estudios de licenciatura en la División de Ciencias Forestales de la misma Universidad obteniendo en 2005 el título de Ingeniero Forestal.

De enero de 2000 a febrero de 2004, colaboró durante periodos vacacionales en la oficina de Servicios Técnicos Forestales Tlaxco, en Tlaxco, Tlax.

En 2004, participó en el procesamiento de información en el Proyecto de Evaluación del Programa Nacional de Prevención y Combate de Incendios Forestales. Ejercicio Fiscal 2003. (DICIFO-CONAFOR).

En 2005, participó en trabajo en campo y procesamiento de información en el Proyecto de Evaluación del Programa Nacional de Prevención y Combate de Incendios Forestales. Ejercicio Fiscal 2004. (DICIFO-CONAFOR).

En 2006, participó en el Proyecto de Evaluación del PRODEFOR. Ejercicio Fiscal 2005. (DICIFO-CONAFOR).

En 2007, participó en el Proyecto de Evaluación del Programa Nacional de Prevención y Combate de Incendios Forestales. Ejercicio Fiscal 2006. (DICIFO-CONAFOR).

De enero de 2006 a diciembre de 2007, cursó los créditos de la Maestría en Ciencias Forestales en la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma Chapingo.

“CONTROL BIOLÓGICO DE *Fusarium oxysporum* EN DOS ESPECIES DE PINO”

“BIOLOGICAL CONTROL OF *Fusarium oxysporum* IN TWO SPECIES OF PINE”

Maria Angelica Roldan Cortes¹ David Cibrián Tovar²

RESUMEN

Con la finalidad de determinar el efecto que ejerce el hongo antagonista *Trichoderma erinaceum* contra hongos causantes de pudrición de raíz en plantas de vivero, se realizaron pruebas *In Vitro*, en medio de cultivo PDA (papa-dextrosa-agar), de cuatro patógenos y el antagonista *T. erinaceum*. En los bioensayos *T. erinaceum* inhibió 88% la colonia de *Fusarium oxysporum*; contra *Fusarium* sp. el efecto inhibitorio fue 94% de la cepa. El porcentaje de inhibición de *Phytophthora* sp. fue de 98% y de *Cylindrocladium* sp. de 97%.

También se evaluó, en dos fases, la efectividad biológica de *T. erinaceum* contra *F. oxysporum* en plántulas de *Pinus michoacana* y *Pinus pseudostrobus* durante su desarrollo en el vivero. La primera fase fue para evaluar el porcentaje de germinación por especie con inoculación a las semillas previa a la siembra. El periodo fue a partir de la siembra (25-01-2007) hasta concluir la germinación (30-04-2007), para lo cual se empleó un Diseño Completamente al Azar con 7 tratamientos: T1 (Testigo con sustrato estéril), T2 (Testigo con sustrato no estéril), T3 (*T. erinaceum*), T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*), T5 (Tiabendazol), T6 (Tiabendazol + *F. oxysporum*) y T7 (*F. oxysporum*) y 5 repeticiones cada uno. Mediante ANOVA y GLM con nivel de significancia de $\alpha=0.05$ y comparación de medias a través de Tukey no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de cada especie.

La segunda fase en el vivero fue de mayo a octubre de 2007, el objetivo fue evaluar en las plántulas las variables diámetro, altura y materia seca de raíz. Se hizo un reacomodo de plántulas bajo un Diseño en Parcelas Divididas con los mismos tratamientos y repeticiones que en la fase 1. Se realizaron dos inoculaciones directas al sustrato con 20 ml de solución de *T. erinaceum* y *F. oxysporum*, así como

ABSTRACT

In order of determining the effect of the antagonistic fungus *Trichoderma erinaceum* against root rot causing fungi in nursery plants, *In Vitro* tests were carried out in a PDA (potato-dextrose-agar) culture medium on four pathogens and the antagonist *T. erinaceum*. In these trials *T. erinaceum* inhibited 88% of the colony of *Fusarium oxysporum*. With *Fusarium* sp. the inhibitory effect was on 94% of the strain. The percentage of inhibition of *Phytophthora* sp. was 98% and *Cylindrocladium* sp. of 97%.

In addition, the biological effectiveness of *T. erinaceum* against *F. oxysporum* in *Pinus michoacana* and *Pinus pseudostrobus* seedlings during their development in the nursery was evaluated in two phases. In the first phase an evaluation was made of the percentage of germination for each species with inoculation of the seeds prior to planting. The period went from the time of planting (25-01-2007) to the conclusion of germination (30-04-2007), for which a Completely Random Experimental Design was employed with 7 treatments: T1 (Control with a sterile substrate), T2 (Control with a non sterile substrate), T3 (*T. erinaceum*), T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*), T5 (Tiabendazol), T6 (Tiabendazol + *F. oxysporum*) and T7 (*F. oxysporum*) with 5 repetitions of each. By means of an ANOVA and a GLM procedure with a level of significance of $\alpha=0.05$ and the Tukey means comparison test, no significant differences were found between the treatments of each species.

The second phase, in the nursery, went from May to October of 2007, with the purpose of evaluating in the seedlings the variables: diameter, height and dry root matter. The seedlings were rearranged into a Split Plot Experimental Design with the same treatments and repetitions as in phase 1. Two inoculations were made directly into the substrate with a solution of 20 ml of *T. erinaceum* and *F.*

¹ Tesista

² Director de Tesis

aspersión con tiabendazol a cada cavidad según los tratamientos asignados. Después de cada una, se tomaron mediciones de diámetro y altura y se extrajeron plantas enfermas para hacer aislamientos logrando identificar los hongos inoculados. Según los análisis estadísticos con ANOVA y GLM, nivel de significancia de $\alpha=0.05$ y comparación de medias con Tukey, los mejores resultados se obtuvieron hasta después de la segunda inoculación en ambas especies; los tratamientos con *T. erinaceum* mostraron diferencias significativas respecto a los tratamientos con tiabendazol y los testigo.

Finalmente, se extrajeron las plántulas para evaluar materia seca de raíz; con los datos obtenidos se hizo la evaluación estadística y resultó que para *P. michoacana* el mayor promedio de peso seco fue para los tratamientos inoculados con *T. erinaceum* con 0.38 g y 0.36 g respectivamente, en cambio, el testigo tuvo un promedio de 0.18 g mostrando diferencia altamente significativa. En *P. pseudostrobus*, los tratamientos con el hongo antagonista tuvieron mayor cantidad de materia seca (0.25 g y 0.23 g) respecto al tratamiento testigo (0.15 g), por lo tanto, también mostraron alta diferencia significativa.

Palabras clave: *Trichoderma erinaceum*, *Pinus michoacana*, *Pinus pseudostrobus*, vivero, tiabendazol.

oxysporum, as well as an aspersión with tiabendazol in each cavity according to the assigned treatments. After each treatment, measurements were taken with respect to diameter and height and the sick plants were removed in order to isolate and identify the inoculated fungi. According to the ANOVA and GLM procedure with a level of significance of $\alpha=0.05$ and the Tukey means comparison test, the best results were obtained only after the second inoculation in each of the species. The treatments with *T. erinaceum* showed significant differences with respect to the treatments with tiabendazol and the controls.

Finally the plants were removed in order of evaluating the dry root matter. The statistical evaluation showed that for *P. michoacana* the highest rate for dry matter was for the treatments inoculated with *T. erinaceum* with 0.38 g and 0.36 g respectively. However, the control obtained a rate of 0.18g showing a highly significant difference. In *P. pseudostrobus* the treatments with the antagonistic fungus obtained a higher quantity of dry matter (0.25g and 0.23g) in comparison to the control (0.15g), and consequently they also showed a highly significant difference.

Key Words: *Trichoderma erinaceum*, *Pinus michoacana*, *Pinus pseudostrobus*, forest nursery, tiabendazol.

CONTENIDO

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	iii
DATOS BIOGRÁFICOS.....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE CUADROS.....	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xvi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos	2
1.1.1. General	2
1.1.2. Particulares.....	2
1.2. Hipótesis.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Descripción del organismo antagónico y del organismo patogénico.....	12
2.1.1. <i>Trichoderma erinaceum</i>	12
2.1.1.1. Principales beneficios de la utilización de <i>T. erinaceum</i>	13
2.1.1.2. Mecanismos de acción de <i>T. erinaceum</i>	15
2.1.1.2.1. Mecanismos de control de fitopatógenos	18
2.1.2. <i>Fusarium oxysporum</i>	21
2.1.2.1. Descripción morfológica.....	21
2.1.2.2. Distribución.....	22
2.1.2.3. Hospedantes	22

2.1.2.4.	Síntomas y signos.....	22
2.1.2.5.	Desarrollo de la enfermedad	24
2.1.2.6.	Estrategias de control	24
2.1.2.6.1.	Control químico	24
2.1.2.6.2.	Control cultural	25
2.1.2.6.3.	Control biológico	25
2.2.	Descripción de las especies forestales.....	28
2.2.1.	<i>Pinus michoacana</i>	28
2.2.1.1.	Clasificación taxonómica	28
2.2.1.2.	Descripción botánica	28
2.2.1.3.	Distribución.....	28
2.2.1.4.	Importancia	29
2.2.2.	<i>Pinus pseudostrobus</i>	29
2.2.2.1.	Clasificación taxonómica	29
2.2.2.2.	Descripción botánica	29
2.2.2.3.	Distribución.....	30
2.2.2.4.	Importancia	30
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1.	Materiales.....	31
3.1.1.	Lugar del experimento	31
3.1.2.	Microorganismos	32
3.1.3.	Germoplasma	33
3.2.	Métodos.....	33
3.2.1.	Asignación de tratamientos para <i>P. michoacana</i>	34
3.2.2.	Asignación de tratamientos para <i>P. pseudostrobus</i>	36
3.2.3.	Reactivación de <i>F. oxysporum</i> y <i>T. erinaceum</i>	38
3.2.4.	Prueba <i>In Vitro</i>	38
3.2.5.	Prueba <i>In Vivo</i>	40
3.2.6.	Incremento de <i>T. erinaceum</i> y <i>F. oxysporum</i> para prueba <i>In Vivo</i>	40
3.2.7.	Concentración del inóculo.....	41
3.2.8.	Preparación de <i>F. oxysporum</i> y <i>T. erinaceum</i> para la inoculación y Tiabendazol para la aspersión de semillas	41
3.2.9.	Inoculación de las semillas y siembra.....	41
3.2.10.	Sustratos para germinación y crecimiento de los pinos en el vivero.	43

3.2.11. Inoculación de las plántulas	45
3.2.12. Riego	45
3.3. Diseño experimental.....	45
3.3.1. Evaluación de la germinación.	45
3.3.2. Evaluación del desarrollo y crecimiento de las plántulas	46
3.4. Evaluación de las pruebas de antagonismo <i>In Vitro</i> e <i>In Vivo</i> y efectividad de los tratamientos	48
3.4.1. Pruebas de antagonismo <i>In Vitro</i> de <i>Trichoderma</i>	48
3.4.2. Porcentaje de germinación de <i>P. michoacana</i> y <i>P. pseudostrobus</i>	48
3.4.3. Altura y diámetro de plántulas	49
3.4.4. Aislamientos.....	49
3.4.5. Identificación de hongos presentes en los aislamientos.....	50
3.4.6. Materia seca de raíz.....	51
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
4.1. Concentración del inóculo.....	54
4.2. Evaluación de la susceptibilidad	54
4.3. Pruebas de antagonismo <i>In Vitro</i>	54
4.4. Germinación de <i>Pinus michoacana</i> y <i>Pinus pseudostrobus</i>	58
4.5. Manifestación de daños y aislamientos.....	61
4.6. Identificación de <i>T. erinaceum</i> y <i>F. oxysporum</i> obtenidos de los aislamientos.....	67
4.7. Diámetro y altura de las plántulas de <i>Pinus michoacana</i>	69
4.8. Diámetro y altura para <i>P. pseudostrobus</i>	77
4.9. Materia seca de raíz de <i>Pinus michoacana</i> y <i>Pinus pseudostrobus</i>	85
5. CONCLUSIONES.....	92
6. RECOMENDACIONES.....	95
7. BIBLIOGRAFÍA.....	97
8. ANEXOS	103

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Mecanismos de control de enfermedades de las plantas mediante <i>Trichoderma</i>	20
Figura 2. Materiales. A: Charolas y desinfectante. B: Tecto 60 (Tiabendazol).....	31
Figura 3. Módulo automatizado para producción de especies forestales. A: Datos del vivero. B: Malla sombra de protección. C: Bastidores y charolas. D: Aguillones y boquillas del riego automatizado.....	32
Figura 4. Microorganismos. A: Colonia de <i>T. erinaceum</i> . B: Fiálides y conidios de <i>T. erinaceum</i> . C: Colonia de <i>F. oxysporum</i> en medio de cultivo Czapeck. D: Micro y macroconidios de <i>F. oxysporum</i>	33
Figura 5. Diagrama de tratamientos a <i>P. michoacana</i>	35
Figura 6. Diagrama de tratamientos a <i>P. pseudostrobus</i>	37
Figura 7. A: Cámara de Neubauer y contador de conidios. B: Cuadrantes de la cámara de Neubauer y conidios. C: Aspersores con la solución. D: Inoculación de semillas. E: Siembra de semillas en las charolas. F: Experimento establecido en el vivero.....	43
Figura 8. Sustratos. A: Sustratos: Peat-moss, agrolita y vermiculita. B: Mezcla de sustratos y osmocote. C: Llenado de charolas. D: Charola lista para la siembra.	44
Figura 9. Pruebas de antagonismo In Vitro; A y B: <i>Trichoderma erinaceum</i> vs. <i>Fusarium oxysporum</i> . C y D: <i>Trichoderma erinaceum</i> vs. <i>Fusarium</i> sp. E y F: <i>Trichoderma erinaceum</i> vs. <i>Phytophthora</i> sp. G y H: <i>Trichoderma erinaceum</i> vs. <i>Cylindrocladium</i> sp. (Nota: <i>Trichoderma</i> ubicada a la izquierda de la caja petri).	57
Figura 10. Porcentaje de germinación por tratamiento para <i>P. michoacana</i>	59

Figura 11. Porcentaje de germinación por tratamiento para <i>P. pseudostrobus</i>	60
Figura 12. Germinación. A: Vista general de germinación. B: Charolas con mayor porcentaje de germinación. C: Charolas con bajo porcentaje de germinación.	61
Figura 13. <i>Pinus michoacana</i> . A: Plántula de <i>P. michoacana</i> con síntomas de enfermedad en follaje. B: Raíz de la plántula enferma en medio de cultivo PDA después de la segunda inoculación. C: Crecimiento y coloración púrpura de <i>F. oxysporum</i> presente en el aislamiento de raíz. D: Micelio de <i>F. oxysporum</i> . E: Semilla en PDA con <i>F. oxysporum</i> . F: Colonia verde característica de <i>T. erinaceum</i> . G: Micro y macroconidios de <i>F. oxysporum</i> . H: Fiálides y conidios de <i>T. erinaceum</i>	65
Figura 14. <i>Pinus pseudostrobus</i> . A: Plántula de <i>Pinus pseudostrobus</i> con síntomas de enfermedad en follaje. B: Muerte descendente causada por <i>F. oxysporum</i> . C: Raíz de la plántula enferma en medio de cultivo PDA. D: Micelio color púrpura de <i>F. oxysporum</i> . E: Micelio característico de <i>F. oxysporum</i>	66
Figura 15. Alturas promedio por tratamiento en <i>P. michoacana</i> (Inoculación 1).	72
Figura 16. Diámetros promedio por tratamiento en <i>P. michoacana</i> (Inoculación 1).	72
Figura 17. Alturas promedio por tratamiento en <i>P. michoacana</i> (Inoculación 2).	75
Figura 18. Diámetros promedio por tratamiento en <i>P. michoacana</i> (Inoculación 2).	75
Figura 19. Comparación de alturas y diámetros de <i>P. michoacana</i> . A: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T1 (Testigo con sustrato estéril). B: T3 (<i>T. erinaceum</i>). C: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T4 (<i>T. erinaceum</i> + <i>F. oxysporum</i>). D: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T5 (Tiabendazol + <i>F. oxysporum</i>). E: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T6 (Tiabendazol). F: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T7 (<i>F. oxysporum</i>). Comparación de diámetros de <i>P. michoacana</i> . G, H: T3 (<i>T. erinaceum</i>). I: T4 (<i>T. erinaceum</i> + <i>F. oxysporum</i>). J: T5 (Tiabendazol + <i>F. oxysporum</i>). K: T7 (<i>F. oxysporum</i>). L: T6 (Tiabendazol).	76
Figura 20. Alturas promedio por tratamiento en <i>P. pseudostrobus</i> (Inoculación 1).	79
Figura 21. Diámetros promedio por tratamiento en <i>P. pseudostrobus</i> (Inoculación 1).	79

Figura 22. Alturas promedio por tratamiento en <i>P. pseudostrobis</i> (Inoculación 2).....	82
Figura 23. Diámetros promedio por tratamiento en <i>P. pseudostrobis</i> (Inoculación 2).....	82
Figura 24. Comparación de alturas y diámetros de <i>P. pseudostrobis</i> . A: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T1 (Testigo con sustrato estéril). B: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T2 (Testigo con sustrato no estéril). C: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T4 (<i>T. erinaceum</i> + <i>F. oxysporum</i>). D: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T5 (Tiabendazol). E: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T6 (Tiabendazol + <i>F. oxysporum</i>). F: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T7 (<i>F. oxysporum</i>). Comparación de diámetros de <i>P. pseudostrobis</i> . G: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T1 (Testigo con sustrato estéril). H: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T2 (Testigo con sustrato no estéril). I: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T4 (<i>T. erinaceum</i> + <i>F. oxysporum</i>). J: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T5 (Tiabendazol). K: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T6 (Tiabendazol + <i>F. oxysporum</i>). L: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T7 (<i>F. oxysporum</i>).....	84
Figura 25. Porcentaje de materia seca en <i>P. michoacana</i>	86
Figura 26. Porcentaje de materia seca en <i>P. pseudostrobis</i>	86
Figura 27. Comparación entre tratamientos de <i>Pinus michoacana</i> para materia seca. A: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T1 (Testigo con sustrato estéril). B: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T2 (Testigo con sustrato no estéril). C: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T4 (<i>T. erinaceum</i> + <i>F. oxysporum</i>). D: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T5 (Tiabendazol + <i>F. oxysporum</i>). E: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T6 (Tiabendazol). F: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T7 (<i>F. oxysporum</i>). G: Comparación de cantidad de follaje y raíz en los siete tratamientos.....	90
Figura 28. Comparación entre tratamientos de <i>Pinus pseudostrobis</i> para materia seca. A: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T1 (Testigo con sustrato estéril). B: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T2 (Testigo con sustrato no estéril). C: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T4 (<i>T. erinaceum</i> + <i>F. oxysporum</i>). D: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T5 (Tiabendazol + <i>F. oxysporum</i>). E: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T6 (Tiabendazol). F: T3 (<i>T. erinaceum</i>) vs. T7 (<i>F. oxysporum</i>). G: Comparación de cantidad de follaje y raíz en los siete tratamientos.....	91

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Biocontroladores utilizados y/o investigados para el control de hongos fitopatógenos en Chile.....	11
Cuadro 2. Cantidad de sustrato utilizado para el llenado de 70 charolas.	44
Cuadro 3. Análisis de Varianza de la variable porcentaje de germinación de <i>Pinus michoacana</i>	58
Cuadro 4. Análisis de Varianza de la variable porcentaje de germinación de <i>Pinus pseudostrobus</i>	58
Cuadro 5. Organismos presentes en los aislamientos por tratamiento de <i>Pinus michoacana</i>	64
Cuadro 6. Organismos presentes en los aislamientos por tratamiento de <i>Pinus pseudostrobus</i>	64
Cuadro 7. Análisis de varianza para la variable diámetro en <i>P. michoacana</i> (Inoculación 1).	70
Cuadro 8. Análisis de varianza para la variable altura en <i>P. michoacana</i> (Inoculación 1).	70
Cuadro 9. Análisis de varianza para la variable diámetro en <i>P. michoacana</i> (Inoculación 2).	73
Cuadro 10. Análisis de varianza para la variable altura en <i>P. michoacana</i> (Inoculación 2).	73
Cuadro 11. Análisis de varianza para la variable diámetro en <i>P. pseudostrobus</i> (Inoculación 1).	78
Cuadro 12. Análisis de varianza para la variable altura en <i>P. pseudostrobus</i> (Inoculación 1).	78

Cuadro 13. Análisis de varianza para la variable diámetro en <i>P. pseudostrobus</i> (Inoculación 2).	81
Cuadro 14. Análisis de varianza para la variable altura en <i>P. pseudostrobus</i> (Inoculación 2).	81
Cuadro 15. Análisis de varianza para la variable materia seca en <i>P. michoacana</i>	87
Cuadro 16. Análisis de varianza para la variable materia seca en <i>P. pseudostrobus</i>	88
Cuadro 17. Ubicación de los tratamientos de <i>P. michoacana</i> en el módulo del vivero forestal.....	108
Cuadro 18. Ubicación de los tratamientos de <i>P. pseudostrobus</i> en el módulo del vivero forestal.....	108

ÍNDICE DE ANEXOS.

ANEXO 1. Material.....	104
ANEXO 2. Medios de cultivo	105
ANEXO 3. Colocación aleatoria de los tratamientos por especie	108
ANEXO 4. Postulados de Koch	109
ANEXO 5. Peso seco de las raíces de los pinos.....	110

1. INTRODUCCIÓN

Los problemas fitosanitarios en estructuras reproductivas de las plantas pueden producir daños devastadores en la producción, disminuir los porcentajes de germinación de las semillas y las semillas mismas pueden ser transmisoras de enfermedades y diseminarlas de una región a otra. Las estructuras reproductivas de especies forestales pueden ser afectadas por gran cantidad de organismos vivos como insectos, ácaros, vertebrados y microorganismos (hongos, bacterias, virus y nemátodos). Una de las consecuencias de mayor importancia de utilizar semillas contaminadas, es la transmisión de hongos causantes de mal de talluelo, conocido también como “secadera, mal de almacigo, mal de semilleros o Damping-off, la cual constituye la enfermedad mas común y de mayor distribución en los viveros forestales del mundo. Los géneros mas importantes son: *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Cylindrocladium* spp., *Phoma* spp. y *Botrytis* spp. (Anónimo, 1997).

En los viveros forestales de México, las pérdidas por enfermedades es de gran importancia, entre los agentes causales destacan los patógenos de la raíz, como *Fusarium* y *Phytophthora*, ambos difíciles de controlar. En el país, la mayor parte de las acciones de control descansan en la aplicación de productos químicos (fungicidas) con los costos asociados y efectividad variable; pocos estudios se han realizado con controladores biológicos; sin embargo, en diferentes partes del mundo se están

desarrollando métodos alternativos; por ejemplo, con biocontroladores a base de *Trichoderma*. Por ello, en este trabajo se decidió probar la efectividad de una especie de *Trichoderma* en la prevención de infecciones. Los objetivos fueron:

1.1. Objetivos

1.1.1. General

Evaluar la susceptibilidad de *Pinus michoacana* y *P. pseudostrobus* al patógeno *Fusarium oxysporum* y la efectividad de *Trichoderma erinaceum* como control biológico.

1.1.2. Particulares

Evaluar el potencial antagónico *In Vitro* de *T. erinaceum*.

Determinar el porcentaje de germinación de las semillas de *P. michoacana* y *P. pseudostrobus* de acuerdo a los siete tratamientos establecidos para cada especie y en las plántulas, evaluar el potencial antagónico *In Vivo* de *T. erinaceum* como control biológico y Tiabendazol como control químico de *F. oxysporum*.

1.2. Hipótesis

H₀₁: El uso de organismos antagonistas como control biológico y fungicidas como control químico reducen la acción de agentes causales de enfermedad como *Fusarium oxysporum* durante la etapa de producción de planta en vivero de *P. michoacana* y *P. pseudostrobus*. Dichas especies forestales tienen susceptibilidad al ataque de dicho patógeno y el empleo del hongo antagonista *T. erinaceum* inhibe su crecimiento además de favorecer el desarrollo de raíz y tallo.

H_{a1}: El uso de organismos antagonistas como control biológico y fungicidas como control químico no reducen la acción de agentes causales de enfermedad como *F. oxysporum* durante la etapa de producción de planta en vivero de *P. michoacana* y *P. pseudostrobus*. Al menos una especie forestal no es susceptible al ataque del patógeno *F. oxysporum* y el empleo del hongo antagonista *T. erinaceum* no inhibe el crecimiento de este patógeno ni favorece el desarrollo de raíz y tallo.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

Existen diferentes métodos de control biológico, uno de ellos es el uso de organismos antagonistas que merman la cantidad de inóculo de organismos patógenos así como la reducción de la actividad enzimática de los mismos que provocan enfermedades. Don Juan (2006), evaluó la efectividad biológica de *Trichoderma* spp. contra hongos causantes de Damping-off en viveros forestales, en la cual obtuvo un porcentaje de germinación promedio de 82.85% en *Pinus ayacahuite* var. *veitchii*, en el tratamiento en el que aplicó el hongo antagonista *T. harzianum* la media de germinación fue de 90.8%, en el que utilizó el antagonista *T. erinaceum* fue de 89.2%, en el tratamiento que empleó el antagonista *T. erinaceum* y el complejo de patógenos del Damping-off fue de 79.2% y en el tratamiento con el antagonista *T. harzianum* fue de 65%. También determinó que la utilización del control biológico con *Trichoderma erinaceum* y *Bacillus subtilis* ejercen eficiencia aceptable como productos preventivos contra el ataque de hongos causantes de Damping-off durante la producción de árboles en viveros forestales, Asimismo, *Trichoderma* favoreció la altura de la planta y peso seco de la raíz mostrando condiciones de salud aceptables ya que es buen agente parasítico e inhibidor del crecimiento de *Fusarium oxysporum*.

Roldan (2005), determinó un porcentaje de germinación promedio de 95% en semillas de *P. ayacahuite* var. *veitchii* bajo condiciones de laboratorio. En la determinación de hongos exógenos en semillas de esta especie, el patógeno *Fusarium* spp. se presentó en el tratamiento sin desinfección en cámara húmeda.

Cid (2005) en su investigación de control biológico de patógenos en el tomate, logró mejores resultados en parámetros como altura, peso seco y peso fresco en plantas en los tratamientos que empleó *Paenibacillus lentimorbus* previo al trasplante. Obtuvo mayor crecimiento y desarrollo de raíces en los tratamientos en los que incorporó bioantagonistas.

La importancia de las coníferas en el mundo va más allá de su uso como materia prima de los productos forestales. Son componentes clave de los ecosistemas boscosos que cubren una gran parte del hemisferio norte y contribuyen considerablemente en el ciclo global del carbono. Los agentes causales de enfermedades ocasionan importantes pérdidas económicas en los bosques de coníferas, pero también son reguladores importantes de la estructura y composición de los bosques, así como de los procesos de descomposición y reciclado de los nutrientes (Hansen, 2003).

Los viveros de árboles forestales como un eslabón integral, son ecosistemas altamente modificados y simplificados y pueden ser mantenidos solo con aportaciones energéticas en forma de cultivo, fertilización y control de plagas. La constante atención al vigor de las plantas en todas las fases, desde la siembra hasta el arranque y almacenamiento antes de plantarlas en el monte asegura a los árboles la mejor condición para resistir al ataque

de los patógenos y llegar al sitio de la plantación en condiciones fisiológicas óptimas (Hansen, 2003).

La producción de planta en vivero es afectada por varias especies de *Fusarium*. Es uno de los hongos más comunes y dañinos, sus afectaciones causan la muerte de un porcentaje significativo de planta, además de provocar morbilidad en planta que no muere, pero queda afectada y puede salir del vivero con infecciones en raíces, tallos y puntas. Este hongo es versátil en su comportamiento; es decir, en el vivero puede afectar planta que apenas inicia su germinación, entonces se comporta como un organismo causal de Damping-off, también provoca infecciones en planta de pocas semanas a varios meses de edad, en ellas puede causar muerte de brotes, ahogamiento de tallos o pudrición de raíz (Cibrián, 2001).

Las semillas son en la práctica forestal, la mayor fuente de regeneración natural o artificial, y de éstas dependen la propagación de plantas para los proyectos de reforestación y plantación. Debido a esto, son necesarias grandes cantidades de semillas cada año para elevar las existencias de planta en los viveros. La calidad de planta depende de las características de la semilla. La patología de las semillas comprende estudios de la patogénesis de los organismos asociados a las semillas, así como su detección y control. Casi todos los grupos de hongos se encuentran asociados con semillas de especies de árboles (Vijayan, 1991).

La enfermedad en las plantas puede definirse como daño fisiológico y alteración estructural de los tejidos vivos de los órganos, causando la muerte. Puede ser afectada la

planta entera o sólo una porción. La mayoría de las enfermedades son causadas por las actividades del hombre. Las enfermedades pueden ser causadas por ambientes no adecuados, tales como suelo no favorable o condiciones atmosféricas. Dos o más agentes junto con las condiciones ambientales desfavorables que han debilitado la planta pueden combinarse para causar enfermedad por organismos vivos. Para determinar que un organismo es la causa de la enfermedad, se hacen la prueba con los postulados de Koch como se describe en el anexo 4 (Boyce, 1961).

Las enfermedades de la raíz que tienen su origen en el suelo, pueden presentarse desde el trasplante hasta la extracción de la planta; dentro de este grupo de enfermedades, se pueden incluir a las causadas por bacterias, virus, nemátodos y hongos. El Damping-off pre-emergente y post-emergente y las enfermedades de raíz son las más difíciles de diagnosticar, ya que los síntomas que presentan son muy similares a los que corresponden a otro tipo de enfermedades que afectan al follaje; por tal razón se recomienda poner atención especial en el diagnóstico y control de éstas, sobre todo si existen condiciones desfavorables en el suelo, tales como exceso de humedad, toxicidad y deficiencia de nutrientes entre otros (Peterson, 1992).

La mayoría de las enfermedades de las coníferas son causadas por hongos. Los hongos saprófitos descomponen las acículas, ramas y ramillas muertas abandonadas continuamente en el bosque. Sin ellos, muchos de los nutrientes del sistema estarían inmóviles en una capa cada vez más profunda de desechos. Los hongos patógenos dependen de los árboles vivos durante al menos una parte de su nutrición, muchos

también tienen hábitos saprófitos o viven en las partes muertas de los árboles vivos, pero otros son parásitos obligados que se desarrollan en árboles vigorosos (Hansen, 2003).

El Damping-off y las diferentes pudriciones de raíces de las plantas son las enfermedades más comunes y potencialmente destructoras de los viveros. Los patógenos de las raíces de las plantas en viveros son en su mayor parte patógenos agrícolas corrientes, no habitantes del bosque. Así, las especies de *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium* y *Phytophthora*, que causan Damping-off y pudrición de las raíces producen enfermedades similares en muchos cultivos. En efecto, estos cuatro géneros de hongos de suelo, figuran invariablemente al frente de las listas de patógenos en los viveros de árboles forestales, cualquiera que sea el hospedante y dondequiera que esté ubicado el vivero en el mundo. Los patógenos más generalizados de la parte aérea de la planta son *Fusarium*, *Phoma* y *Botrytis*. Los dos primeros son propagados desde el suelo por las salpicaduras de las gotas de lluvia, los cuales requieren normalmente aperturas o heridas en el tronco para iniciar la infección (Hansen, 2003).

En el interior de las semillas o en su superficie se pueden encontrar infecciones por el hongo *Fusarium*, las especies son varias y pueden ser saprofitas o parásitas. *Fusarium* puede causar muerte del embrión o pudrición en la semilla que apenas esta germinando. El control se logra con el fungicida Tiabendazol, cubriendo la semilla con solución antes de preservarla en el almacén (Cibrián, 2006).

Cuando el sustrato empleado para la producción de planta en vivero es a base de tierra de monte se presenta el Damping-off o mal del talluelo; enfermedad fácil de encontrar en almácigos y camas de crecimiento; en ocasiones, cuando el ataque es severo, llega a

provocar la pérdida total de la planta. La enfermedad es provocada por varios microorganismos entre los principales y los más comunes se encuentran: *Pythium* sp., *Fusarium* sp. y *Rhizoctonia* sp. (Cibrián, 2007).

El Damping-off ha sido dividido en pre-emergente, post-emergente y pudrición de raíces o mal de talluelo, de acuerdo al estado de desarrollo de la planta en el momento del ataque. En el primero, los microorganismos atacan la semilla o matan las plantas antes de que emerjan del sustrato, manifestándose por la necrosis del hipocótilo y de los cotiledones. Este tipo de infección es difícil de diagnosticar porque no hay sintomatología visible, pero puede saberse cuando los porcentajes de germinación son más bajos que los obtenidos. La modalidad post-emergente es la más común de la enfermedad, las plántulas son atacadas por los hongos a nivel del suelo o un poco más abajo, generalmente en el cuello, lo que produce estrangulamiento, caída y muerte de las plántulas en uno o dos días (Anónimo, 1997).

El viverista como persona responsable de la producción de árboles tiene la obligación de conocer las condiciones favorables mediante las cuales ciertos organismos patógenos tienen éxito en su ataque, como es el caso de los hongos del complejo Damping-off, la cual es una de las enfermedades a las que se enfrenta cualquier viverista, de ahí el interés en conocer las especies plantadas así como los posibles patógenos que se pudieran presentar en las diferentes etapas de desarrollo de la plántula. Los métodos de control van desde tratar las semillas para protegerlas así como aplicaciones periódicas de productos químicos (Tiabendazol), esto ha llevado a algunos hongos a la resistencia a ciertos fungicidas, por tanto, surge el interés de buscar alternativas de control que no

dañen al ambiente y que aseguren planta de calidad, para ello la implementación de organismos biológicos como nemátodos, virus, bacterias, hongos (*Trichoderma erinaceum*) entre otros, abre un campo amplio para su uso, solo basta determinar su mecanismo y modo de acción así como sus ventajas y desventajas.

Beristain (1980) afirmó que la acidificación del pH del agua de riego influye decididamente sobre la incidencia de la enfermedad en los semilleros conocida como Damping-off en forma sustancial en las especies probadas en su etapa de almácigo, no afectando grandemente el desarrollo en altura ni el porcentaje de germinación, observándose inclusive, la tendencia a mejorar el desarrollo en altura y un ligero aumento en el porcentaje de germinación. Los compuestos que aumentan la acidez del suelo, han sido utilizados para reducir el Damping-off en coníferas, causado principalmente por los hongos de los géneros *Rhizoctonia*, *Pythium* y *Fusarium*. Los compuestos más ampliamente utilizados han sido el ácido sulfúrico, sulfato de aluminio, ácido acético, ácido fosfórico y sulfato ferroso. La fertilización sola no es la solución al problema sino que ésta debe ir acompañada de un tratamiento de acidificación del sustrato, ya que el pH en razón de 8.0 a 8.6 tiende a reducir la disponibilidad de hierro, fósforo, boro, calcio, zinc, manganeso, así como a favorecer un gran desarrollo de microorganismos.

El control biológico, cuando es considerado desde un punto de vista ecológico como una fase del control natural, puede definirse como la acción de parásitos, predadores o patógenos para mantener la densidad de población de otro organismo a un promedio más bajo que el que existiría en su ausencia. La regulación de la abundancia de un organismo

debajo del nivel en que causa daños económicos es la meta del control biológico (DeBach, 1975).

El control biológico de enfermedades de plantas constituye una práctica ampliamente difundida y sigue siendo objeto de investigación y desarrollo. Es el control de los patógenos por uno o más organismos, logrado de forma natural o a través de la manipulación del medio ambiente, hospedante o por la introducción masiva de uno o más antagonistas. En sentido clásico es el uso deliberado de un organismo para controlar a otro (Cuadro 1).

El género *Trichoderma* es un claro ejemplo de antagonista biológico y ejerce su acción mediante varios mecanismos, entre los que juegan un rol importante el parasitismo (enzimas extracelulares como quitinasas, celulasas, Beta -1-3-glucanasas y proteasas que destruyen paredes de hifas o esclerocios de varios hongos fitopatógenos), y el efecto la competencia por sustrato y nutrientes liberados por la planta (Esterio, 2005).

Cuadro 1. Biocontroladores utilizados y/o investigados para el control de hongos fitopatógenos en Chile.

Biocontrolador	Nombre comercial	Cultivo	Fitopatógenos a controlar
<i>Bacillus subtilis</i>	Serenade SC y WP	Uva de mesa	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma polysporum</i>	Binab T y Polvo mojable		<i>Chondrostereum purpureum</i> , <i>Armillaria mellea</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Heterobasidion</i>
<i>Trichoderma harzianum</i>	Trichodex 25 WP	Uva de mesa	<i>Botrytis cinerea</i>

Fuente: Montealegre 2005 (a).

2.1. Descripción del organismo antagónico y del organismo patogénico

2.1.1. *Trichoderma erinaceum*

Es un hongo sumamente utilizado como control biológico contra un amplio rango de hongos fitopatógenos por el efecto antagónico que posee. Se encuentra de forma natural en suelos agrícolas y forestales sobretodo en aquellos que son ricos en material vegetal en descomposición, es un hongo facultativo anaerobio y antagonista. Altas densidades de raíz de las plantas favorecen el desarrollo de *Trichoderma* debido a que las utiliza como sustrato (Steel, 2000).

Posee un crecimiento y desarrollo rápido lo cual le confiere ventajas como un excelente agente de control biológico debido a que también produce una gran cantidad de enzimas inducibles con la presencia de hongos fitopatógenos. Puede desarrollarse en una amplia gama de sustratos, lo cual facilita su producción masiva. Su gran tolerancia a condiciones ambientales extremas y hábitat, donde los hongos son causantes de diversas enfermedades, le permiten ser eficiente agente de control; de igual forma pueden sobrevivir en medios con contenidos significativos de plaguicidas y otros químicos. Además su gran variabilidad, ya que se tiene referencia de aproximadamente 40 especies, se constituye en un reservorio de posibilidades de control biológico bajo diferentes sistemas de producción y cultivos (Páez, 2006).

Existen varias especies de *Trichoderma* dentro de las que se pueden citar las más estudiadas: *T. erinaceum*, *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii*, *T. atroviride*, *T. hamatum*, *T. aureoviride*, *T. longibrachiatum*, *T. polysporum*. Es un hongo antagónico del suelo, produce colonias blancas, amarillas o verdes.

Forma colonias de color verde intenso que crecen rápidamente, el micelio es hialino (transparente) y septado; donde se originan los conidióforos aterciopelados, irregulares, cortos y ramificados que a su vez dan origen a conidios unicelulares y esféricos en forma de racimos globosos (Barnnet y Barry, 1987).

Es fácil de aislar y producir en medios de cultivo artificiales (Anexo 2), crece favorablemente sobre varios sustratos, tiene un espectro amplio de hongos hospedantes, entre éstos, los hongos patógenos como *Fusarium oxysporum*, compite por espacio, produciendo antibióticos y un complejo de enzimas con propiedades antifungales y antibacteriales, por lo que es considerado como un modelo excepcional de control biológico (Romo, 2000).

Este hongo antagónico toma nutrientes de los hongos patógenos (a los cuales degrada) y de materiales orgánicos ayudando a su descomposición, por lo cual las incorporaciones de materia orgánica lo favorecen; también requiere de humedad para poder germinar, la velocidad de crecimiento de este organismo es alta, incluso más rápida que la de los hongos patógenos por esto es capaz de establecerse en el suelo y controlar enfermedades (Páez, 2006).

2.1.1.1. Principales beneficios de la utilización de *T. erinaceum*

Es de elevada propagación en el suelo, aumentando sus poblaciones y ejerciendo control duradero en el tiempo sobre hongos fitopatógenos. Ofrece un control eficaz de enfermedades de plantas. Ayuda a descomponer materia orgánica, haciendo que los nutrientes se conviertan en formas disponibles para la planta, por lo tanto, tiene un efecto indirecto en la nutrición de la misma. Estimula el crecimiento de los árboles

debido a que posee metabolitos que promueven los procesos de desarrollo, posee catalizadores o aceleradores de los tejidos meristemáticos primarios. Favorece la proliferación de organismos benéficos en el suelo, como otros hongos antagónicos (Páez, 2006).

Ataca patógenos de la raíz (*Pythium*, *Fusarium* y *Rhizoctonia*) y del follaje (*Botrytis* y *Mildius*) antes que puedan ser detectados y evita el ataque de *Phytophthora*. Previene enfermedades dando protección a la raíz y al follaje. Promueve el crecimiento de raíces y pelos absorbentes. Mejora la nutrición y la absorción de agua. Moviliza nutrientes en el suelo para las plantas. Actúa como biodegradante de agrotóxicos, dentro de los organismos utilizados para la biodegradación se ha estudiado el género *Trichoderma* el cual puede degradar plaguicidas organoclorados, clorofenoles, y otros insecticidas como DDT, endosulfán, pentacloronitrobenceno, aldrin y dieldrin, herbicidas como trifluralin y glifosato. Este hongo posee enzimas tales como celulasas, hemicelulasas y xylanases que ayudan a la degradación inicial del material vegetal y por último enzimas de mayor especialización que contribuyen a la simplificación de moléculas complejas como son las de bioplaguicidas (Páez, 2006).

Protege las semillas de fitopatógenos, los productores generalmente guardan semillas para siembras posteriores o para venta de las mismas a productores de plantas o comercializadores de semillas forestales y no les dan la suficiente protección para la conservación de su potencial germinativo y productivo. Esto trae como consecuencia que varias especies de hongos patógenos ataquen dichas semillas con relativa facilidad causando una significativa pérdida de sus cualidades botánicas y productivas. Se ha demostrado que una protección con *Trichoderma* garantiza el éxito en la próxima

infección del patógeno y de enzimas que hidrolizan a los componentes de las paredes celulares de los patógenos. Por lo tanto, los mecanismos de biocontrol que utilizan los hongos antagonistas son más numerosos que los que utilizan las bacterias. De ahí que sea importante poder establecer cuántos y cuáles mecanismos está expresando un hongo antagonista frente a un determinado fitopatógeno y si tiene la capacidad de expresar esos mismos mecanismos frente a otros patógenos, hecho que está relacionado con la composición de la pared celular del fitopatógeno y la inducción de la secreción de enzimas desde el biocontrolador para la degradación de esta estructura (Pérez, 2005).

El análisis más detallado de los mecanismos de antagonismo que usan los hongos biocontroladores, en especial los relacionados con la secreción de antibióticos, permiten describir la formación de canales iónicos en la membrana plasmática de los fitopatógenos como consecuencia de la interacción de péptidos antibióticos, los peptaiboles con dicha membrana. La secreción de enzimas como endoquitinasas, β , 1-3-glucanasas y proteasas permite la degradación de los componentes de la pared celular del fitopatógeno y se considera como uno de los mecanismos importantes del control biológico (Pérez, 2005).

Parasitismo: Este término, tal como hiperparasitismo, micoparasitismo y parasitismo directo, se usa para referirse a un hongo parasitando a otro. Al entrar en contacto con el suelo, sus hifas empiezan a crecer y a 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 de contacto inicial, se aprecia

esporulación abundante de *Trichoderma* e inhibición del hongo patógeno (Don Juan, 2006).

Harman (2007) menciona y describe los mecanismos de acción más estudiados de *Trichoderma*:

Antibiosis: Se refiere a la producción y liberación de sustancias químicas por parte de los antagonistas hacia su medio ambiente. *Trichoderma* produce sustancias tales como: Trichodermina, Dermadina, Sequisterpeno, Suzukacilina, Almethicina, Trichotoxina y acetaldehído, todas con propiedades antifungosas y antibacteriales; así como las enzimas β -1,3 glucanasa, quitinasa y celulasa los cuales facilitan la habilidad del antagonista para atacar un amplio rango de patógenos ejerciendo su efecto sobre las paredes celulares.

Resistencia inducida mediante mecanismos bioquímicos y físicos o estructurales de resistencia.

Competencia: Se presenta cuando existe demanda de dos o más microorganismos por un mismo recurso, la presencia de *Trichoderma* en suelos cultivados y no cultivados en todo el mundo demuestra que es un excelente competidor por espacio y recursos alimenticios (Romo, 2000).

2.1.1.2.1. Mecanismos de control de fitopatógenos

Según Harman (2007).A continuación se describen los mecanismos de control de *Trichoderma*, mismos que se ilustran en la figura 1.

Las esporas de *Trichoderma* pueden ser añadidas al suelo a través de varios métodos. Como se muestra en la figura 1a, si la cepa (parte coloreada en la sección de la imagen ampliada) es rizósfera apta, el hongo coloniza la superficie de la raíz y las capas exteriores del cortex, de tal manera que se establece una zona de interacción dentro de la cual, *Trichoderma* libera moléculas bioactivas. Esto incluye elementos de resistencia, tales como proteínas homólogas de no virulencia (Avr), así como proteínas con actividad enzimática y otras funciones.

El hongo también produce enzimas que liberan fragmentos de pared celular, los cuales también elevan las respuestas de resistencia de las plantas. Las plantas producen depósitos de pared celular (capa negra de la sección ampliada) y factores bioquímicos que limitan el crecimiento de la cepa de *Trichoderma* por lo cual se torna no virulento. Una planta que ha sido tratada se muestra a la derecha.

Los patógenos (se muestran en color azul en la imagen) pueden atacar raíces –tal como se muestra en la figura 1b- pero en presencia de *Trichoderma* la infección es reducida por moléculas similares y por las alteraciones a la pared celular que resultan sin virulencia de las cepas de *Trichoderma* (porción media, parte superior). Además, diversas cepas inducen resistencia sistémica en las plantas, aunque se localicen sobre las raíces, probablemente mediante la acción de un compuesto (en la imagen, flecha

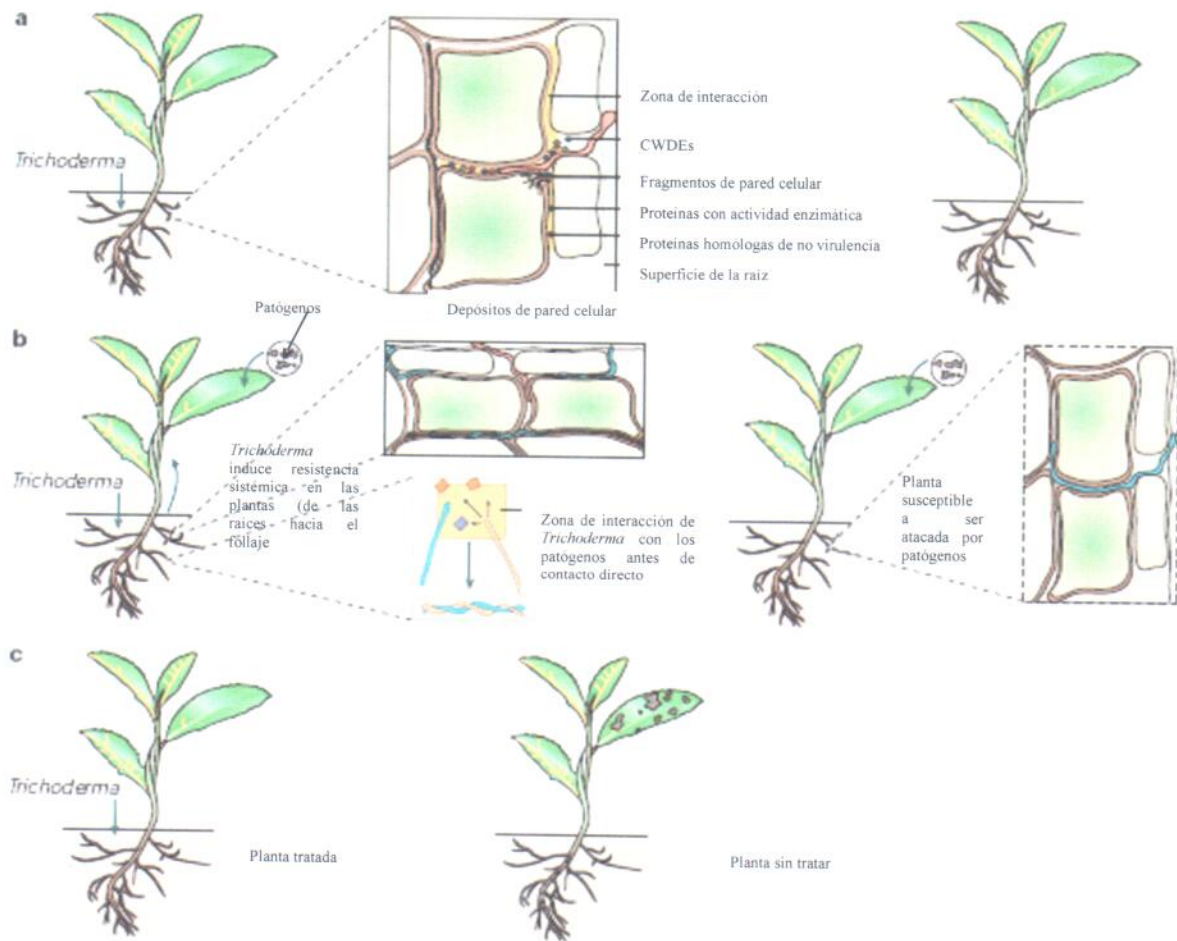
curveada que sale de la parte radical hacia la parte aérea). Así, cuando los patógenos atacan hojas o tallos de las plantas (en la imagen, organismos dentro del círculo), la planta es capaz de responder rápidamente a través de la producción de enzimas de defensa y componentes antimicrobianos. En suma, *Trichoderma* puede atacar patógenos en el suelo (en la figura, porción derecha, parte inferior ampliada) mediante una variedad de mecanismos. Las cepas responden a la presencia de los patógenos y la interacción empieza antes de que los dos organismos entren en contacto (recuadro amarillo).

Trichoderma produce enzimas “sensibles” (rectángulos naranjas) que liberan fragmentos de pared celular desde las hifas de los patógenos, los cuales incrementan la liberación de enzimas adicionales. Algunos antibióticos también pueden producirse (rectángulos púrpura). El siguiente paso de la interacción, es el mecanismo de parasitismo (el cual se manifiesta en la espiral de *Trichoderma* alrededor del patógeno) y la producción de un número de enzimas sinérgicas degradantes de pared celular y otras sustancias, seguida de la infección y muerte del hongo patógeno.

En ausencia de *Trichoderma*, los patógenos de la raíz (parte derecha de la figura) infectan las raíces y causan enfermedad. Las plantas carecen de protección contra patógenos del follaje, tallos y flores.

Como consecuencia de la interacción entre *Trichoderma* y las plantas, diversos patógenos de la parte radical y de la parte aérea de las plantas causan menos enfermedad en las mismas, gracias a que han sido colonizadas por *Trichoderma* (Figura 1c, parte izquierda).

Incluso, en ausencia de patógenos o enfermedad, con *Trichoderma* las plantas tienen raíces abundantes y altos niveles de productividad. En ausencia de *Trichoderma*, las plantas son más susceptibles a enfermedades y por lo tanto, menos robustas (Figura 1c, parte derecha).



Fuente: Tomado de Harman, 2007.

Figura 1. Mecanismos de control de enfermedades de las plantas mediante *Trichoderma*.

2.1.2. *Fusarium oxysporum*

2.1.2.1. Descripción morfológica

Posee micelio extenso y algodonoso de color blanco al principio y al ir madurando adquiere una pigmentación crema, rosa claro, salmón, violeta y púrpura oscuro (Martínez, 2000). Produce tres tipos de esporas asexuales: microconidios que tienen una forma oval-elipsoide, cilíndricos, rectos o ligeramente curvos con una a dos células de 5-12 x 2.2-3.5 μm , producidos en fiálides laterales simples y cortas, son las esporas que el hongo produce con mayor frecuencia y en mayor abundancia en todas las condiciones y en el interior de los vasos de las plantas hospedantes que ha infectado (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Los macroconidios son las esporas típicas de *Fusarium* miden de 27-60 x 3-5 μm , constituidas de 3 a 5 células con forma típica de canoa (se adelgazan gradualmente y se encorvan hacia ambos extremos); aparecen con gran frecuencia sobre la superficie de plantas que han sido destruidas por el patógeno y por lo común se forman en grupos similares a los esporodoquios. El último tipo de esporas, son las clamidosporas que están constituidas por una o dos células, de pared gruesa y de forma globosa, se forman separadas o en pares, terminal o intercalaramente en el micelio más viejo o en los macroconidios del hongo. Estos tres tipos de esporas se forman en los cultivos del hongo y quizá también en el suelo, aunque cabe indicar que solo estas estructuras sobreviven en este último sustrato por más tiempo (Romero, 1988).

2.1.2.2. Distribución

Es un hongo cosmopolita, sin embargo, sus diferentes formas especiales tienen variaciones en el grado de distribución. Los marchitamientos que causa son mucho mas comunes y destructivos en las regiones templadas más cálidas y en los trópicos y subtropicos llegando a ser menos dañinos o raros en climas más fríos, excepto en el caso de los cultivos de invernadero de esas áreas. Esta es la especie más ampliamente distribuida y perjudicial en la agricultura (Martínez, 2000).

2.1.2.3. Hospedantes

La especie está integrada por formas especiales, es decir, grupos de individuos patógenos a determinadas especies vegetales: *Phoenix dactylifera*, *Eucalyptus gomphocephala*, *Opuntia*, *Ficus indica*, *Pinus michoacana*, *P. pseudostrobus*, *P. ayacahuite*, *Quercus*, etc. (Martínez, 2000).

2.1.2.4. Síntomas y signos

Las formas especiales de esta especie pueden ser caracterizadas por causar los siguientes síntomas: marchitamientos vasculares, amarillamientos, pudrición de raíz y cuello (Damping-off). El primero se manifiesta de forma más o menos rápida, iniciándose en las hojas o partes más o menos infectadas de las plantas, las cuales pierden turgencia; adquieren una tonalidad que va del verde claro al amarillo verdoso; decaen, se marchitan y finalmente mueren. Las hojas marchitas pueden estar extendidas o bien, enrollarse, los retoños tiernos también se marchitan y mueren (López, 2002).

Las semillas que se tiene en el almacén del vivero pueden estar infectadas por esporas en la testa; cuando esta semilla se lleva al almácigo o a la siembra directa en contenedor, y no ha recibido ningún tratamiento, puede ser afectada por el hongo. Las plántulas germinan, pero a los pocos días, de la cubierta que aún cubre el brote de crecimiento y las pequeñas hojas en formación, se forma un micelio blanco que se pasa hacia el nuevo tejido y lo infecta. Dicho micelio mata la punta e incluso puede bajar al cuello de la plántula, al dejar en cámara húmeda a plantas enfermas, es decir ponerlas dentro de una bolsa de plástico con humedad, se forma un manto miceliar de color blanco en la superficie del tejido vegetal o en la cubierta de la semilla (Cibrián, 2001).

Los marchitamientos se deben a la presencia y actividad del patógeno en los tejidos vasculares xilémicos de las plantas, el cual en pocas semanas puede ocasionar la muerte de plantas completas o de su órganos que se localizan por arriba del punto de invasión vascular en la mayoría de las plantas anuales y algunas perennes, aunque en algunas plantas en este último grupo no mueren sino hasta después de varios años a partir del momento en que fueron infectadas por el hongo. Los cortes transversales que se hacen de tallos y ramillas infectados muestran varias zonas café decoloradas dispuestas en forma de un anillo completo o interrumpido que consta de tejidos vasculares decolorados. En los vasos xilémicos de tallos, raíces y otros órganos infectados, pueden existir micelio y esporas.

Algunos de los vasos xilémicos son obstruidos por el micelio, las esporas o los polisacáridos que produce el hongo. Esta obstrucción se incrementa aún mas por los geles y gomas que se forman por la acumulación y oxidación de los productos de

degradación de las células vegetales atacadas por enzimas del hongo. Al parecer, la decoloración café de los tejidos vasculares afectados se debe también a la oxidación y traslocación de algunos de los productos de degradación (Martínez, 2000).

2.1.2.5. Desarrollo de la enfermedad

El hongo puede estar en la semilla, en el suelo o sobre restos de plantas infectadas en donde sobreviven en forma de micelio o en cualquiera de sus formas de esporas, pero lo hacen con mayor frecuencia en forma de clamidosporas. Su número poblacional varía en forma considerable dependiendo de la susceptibilidad y tiempo de cultivo de las plantas hospedantes en el campo. Se propaga en el suelo en menor grado en forma de micelio que se desarrolla en las raíces o restos de plantas, lo hace principalmente en forma de micelio, esporas o esclerocios llevados por el agua de riego, equipo agrícola, transplantes, semillas de plantas infectadas y en casos, es forma de esporas llevados por el viento (Martínez, 2000).

2.1.2.6. Estrategias de control

2.1.2.6.1. Control químico

Los fungicidas sistémicos como Benomyl y Tiabendazol pueden controlar el marchitamiento, pero en la mayoría de los casos los fungicidas no tienen éxito para erradicarlo, por lo tanto, la práctica puede restringirse a un periodo de aplicación preventiva. Se recomienda la aplicación de Benomyl sobre suelos infectados antes de la plantación o fosforo de aluminio para disminuir la población del patógeno. Tratar las plantas antes de transplante con un fungicida sistémico como Tecto o Benlate (por

inmersión de la raíz de la planta) así como la esterilización del suelo o sustratos de invernadero con fungicidas (Martínez, 2000).

2.1.2.6.2. Control cultural

Desinfectar adecuadamente los contenedores y charolas antes de reutilizarlos ya que pueden albergar numeroso patógenos e infectar el nuevo ciclo de cultivo. Los tratamientos con calor son efectivos, los fumigantes como fosfuro de aluminio para controlar hongos, malezas, insectos y nemátodos. Usar semillas certificadas es muy recomendable (Martínez, 2000).

2.1.2.6.3. Control biológico

Actualmente las medidas utilizadas para el control de las enfermedades son el uso de productos químicos y prácticas culturales; sin embargo, el control por medio de estas prácticas se ve restringido por razones económicas y ecológicas. Las posibilidades de sustituir o disminuir el uso de productos químicos en el control de enfermedades producidas por hongos abre una ventana a la investigación de técnicas alternativas como el control biológico, realizando numerosos estudios de laboratorio e invernadero, que prueban el efecto antagonista de diversas especies de hongos entre ellas *Trichoderma* spp. y bacterias como las del género *Bacillus* (Cid, 2005).

El control biológico de las plagas de la agricultura se ha desarrollado con la agricultura moderna y ha sido concomitante con la acelerada adquisición y aplicación de conocimientos en biología en el último siglo. No fue un accidente fortuito que la primera demostración de control biológico fuera acompañada del conocimiento de que las plagas

agrícolas son inmigrantes extraños y que los conceptos iniciales de control biológico se desarrollaran contemporáneamente con la verificación de la necesidad de establecer restricciones legales (esto es, regulaciones cuarentenarias) sobre los cargamentos de plantas y animales (DeBach, 1975).

La fusión de los conocimientos biológicos y agrícolas que produjeron el control biológico ocurrieron en el siglo XIX, claramente basado en el fenómeno interespecífico de población y se apoya en el hecho de que la población de una especie permanece en una inmediata y funcional relación para otra especie (DeBach, 1975).

La premisa de control biológico descansa en que bajo ciertas circunstancias, muchas poblaciones son llevadas a bajas densidades por sus enemigos naturales. Este efecto se origina por la interacción de ambas poblaciones (plaga y enemigo natural); lo cual implica una supresión del tipo densidad-dependiente, que se traduce como el mantenimiento de ambas poblaciones en equilibrio. Bajo este concepto, la población del enemigo natural depende a su vez de la población de la plaga, es decir, la interacción de las poblaciones significa una regulación y no un control (García 2003).

El control biológico contempla: el estudio, la importación, el aumento o incremento y la conservación de los enemigos naturales (DeBach, 1975).

Control biológico clásico. En los casos donde se presenta la invasión de una plaga exótica que llega a un ambiente donde no existen enemigos naturales y los nativos no son capaces de efectuar control, se busca la utilización del control biológico clásico, mediante el establecimiento de nuevas especies. Comúnmente implica la búsqueda de

los enemigos naturales en el lugar de origen de la plaga e introducirlos al ambiente donde llego la plaga sin ellos, su cría, multiplicación y liberación donde la plaga ha invadido.

Control biológico por aumento o incremento. Este control se utiliza cuando se presenta una plaga ya sea endémica o exótica, que tenga enemigos naturales nativos o exóticos que puedan hacer control, pero que debido a su número tan reducido, ambiente desfavorable en alguna época del año o baja sincronía con su presa, no es posible que ocurra control sin incrementar sus poblaciones en campo. El incremento puede ser inoculativo o inundativo. El primer caso requiere una cantidad inicial de pocos individuos del agente regulador (inóculo) el cual se incrementa de manera inductiva en el lugar donde se encuentra la plaga. El segundo caso requiere que el agente de control cubra completamente un área con una liberación masiva y periódica. Para lograr control se requiere tener crías masivas y realizar liberaciones periódicas de los enemigos naturales.

Control biológico por conservación. En esta estrategia de control se busca proporcionar a los enemigos naturales establecidos en la zona, las mejores condiciones para que puedan desarrollar su función, es decir, hacer el medio ambiente más adecuado a los enemigos naturales.

2.2. Descripción de las especies forestales

2.2.1. *Pinus michoacana*

2.2.1.1. Clasificación taxonómica

Según Yáñez (2004):

Reino	Vegetal
Orden	Coniferales
Familia	Pinaceae
Género	<i>Pinus</i>
Especie	<i>michoacana</i>
Variedad	<i>Pinus michoacana</i>

2.2.1.2. Descripción botánica

Árbol de 20-30 m de altura, corteza áspera y agrietada. Hojas en grupos de 5 a veces 6 en varios fascículos de 30 a 35 cm, ásperas y fuertes de color verde claro brillante, ligeramente glaucas en sus caras internas. Conos oblongos ovoides o casi cilíndricos-cónicos de 25-30 cm de largo por 12-15 cm de ancho, de color moreno opaco, resinosos, persistentes y fuertes, extendidos o ligeramente colgantes, derechos o levemente encorvados, colocados por pares o en grupos de 3, rara vez solitarios.. Escamas de 5 cm de largo por 20-25 mm de ancho. Semilla triangular de 9-10 mm de largo por 6 mm de ancho, de color pardo con manchas negras; ala de 4.4 a 5 cm por 10-12 mm de ancho, de color café oscuro. La madera es blanca y algo amarillenta (Martínez, 1948).

2.2.1.3. Distribución

Se le encuentra en los estados de Colima, Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Durango, Jalisco, Michoacán, Puebla, Tlaxcala, Veracruz, Oaxaca y Zacatecas (Martínez, 1948).

2.2.1.4. Importancia

Su importancia radica en que se le pueden emplear tallo y ramas como combustible. La madera se utiliza en diversas construcciones rurales. La resina se emplea en la industria en la fabricación de aguarrás y brea. De manera tradicional, en muchas regiones del país en las que se le encuentra distribuido se utiliza como medicinal para ayudar en el tratamiento de torceduras.

2.2.2. *Pinus pseudostrobus*

2.2.2.1. Clasificación taxonómica

Según Yáñez (2004):

Reino	Vegetal
Orden	Coniferales
Familia	Pinaceae
Género	<i>Pinus</i>
Especie	<i>pseudostrobus</i>
Variedad	<i>Pinus pseudostrobus</i>

2.2.2.2. Descripción botánica

Árbol de 15-25 m de altura, corteza lisa cuando joven, áspera y agrietada al madurar; ramillas delgadas y frágiles, con largos entrenudos de color café rojizo, con tintes azulosos en sus partes tiernas. Hojas en grupos de 5, de 17-24 cm de largo, muy delgadas, triangulares y flexibles, de color verde intenso, a veces con ligero tinte amarillento o glauco, finamente aserradas. Conos ovoides de 8-12 cm de color café claro o amarillento, extendidos y muy levemente encorvados, generalmente en pares. Semilla

triangular, oscura de 6 mm con ala de 23 mm de largo por 6-9 mm de ancho. Madera dura y resistente (Martínez, 1992).

2.2.2.3. Distribución

Se encuentra en Chihuahua, Durango, Guerrero, Michoacán y Jalisco (Martínez, 1992).

2.2.2.4. Importancia

El fuste se utiliza en aserrío para fabricación de muebles, obtención de chapa, para construcción y cajas de empaque. Las ramas se usan como leña para combustible y en la elaboración de tejamanil. La resina es útil para la producción de brea y aguarrás y en el tratamiento contra el dolor muscular.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

Se utilizaron básicamente utensilios de laboratorio, medios de cultivo, semillas de *Pinus michoacana* y *Pinus pseudostrobus*, microorganismos, desinfectante, fungicida químico (Tecto 60), charolas de plástico de color negro de 40 cavidades de 35 cm de largo por 22 cm de ancho, un diámetro de cada cavidad de 4 cm en la parte superior y 2 cm de diámetro en la parte inferior con 93 cm³ de cavidad, sustratos inertes; agrolita, vermiculita y peat-moss, además de osmocote como fertilizante de liberación prolongada, cámara fotográfica, vernier y regla graduada (Figura 2, Anexo 1).

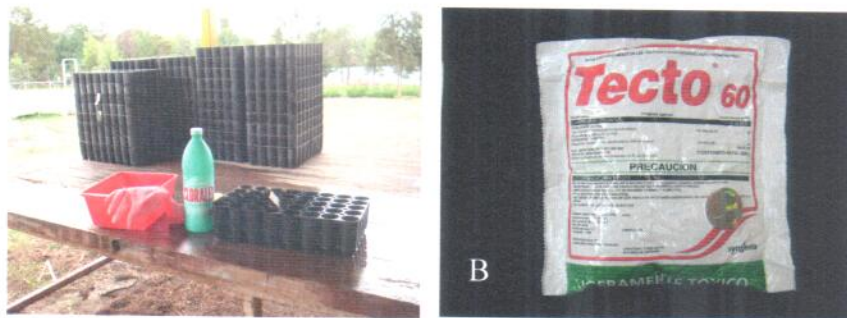


Figura 2. Materiales. **A:** Charolas y desinfectante. **B:** Tecto 60 (Tiabendazol).

3.1.1. Lugar del experimento

La parte de laboratorio se desarrolló en el área de Patología Forestal de la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma Chapingo con la preparación de medios de cultivo, purificación de hongos bajo estudio, re-aislamientos y prueba *In Vitro* así como toma de fotografías de estructuras microscópicas. La parte *In Vivo* se realizó en el vivero de la División de Ciencias Forestales en dos fases, el cual se ubica a los 19° 29' Latitud Norte y 98° 53' Longitud Oeste a 2,240 msnm, se evaluó el efecto de *T.*

erinaceum y Tiabendazol contra *F. oxysporum* en las dos especies de pinos (García, 1981).

El vivero cuenta con malla sombra y sistema de riego automatizado para un mejor mojado del sustrato con dos aguilones y ocho boquillas cada uno. Tiene cuatro camas de producción, cada una de éstas tiene 18.50 m de largo y 2.75 m de ancho, se encuentran a 0.40 m de altura del suelo con lo que se evitan los estancamientos de agua. Para colocar las charolas se tienen bastidores de fierro, con dimensiones exactas para poner 6 charolas por cada uno (Figura 3).



Figura 3. Módulo automatizado para producción de especies forestales. **A:** Datos del vivero. **B:** Malla sombra de protección. **C:** Bastidores y charolas. **D:** Aguilones y boquillas del riego automatizado.

3.1.2. Microorganismos

La cepa del organismo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* y del antagonista *Trichoderma erinaceum* empleados para la inoculación de la semilla bajo estudio se obtuvieron mediante la reactivación del material existente en el laboratorio de Patología, para las aplicaciones posteriores, de acuerdo a los tratamientos correspondientes, se obtuvo el inóculo de aislamientos de plántulas germinadas en el experimento y procesadas en el laboratorio (Figura 4).

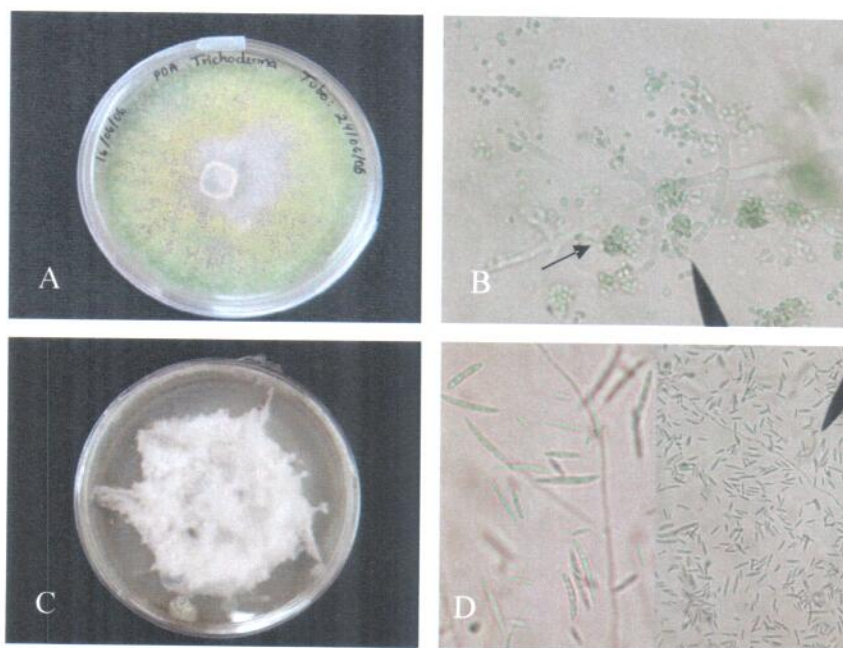


Figura 4. Microorganismos. **A:** Colonia de *T. erinaceum*. **B:** Fiálides y conidios de *T. erinaceum*. **C:** Colonia de *F. oxysporum* en medio de cultivo Czapeck. **D:** Micro y macroconidios de *F. oxysporum*.

3.1.3. Germoplasma

La semilla fue proporcionada por el Laboratorio de Semillas Forestales del Ing. Emanuel Farfán Vázquez. La semilla de *P. michoocana* fue colectada en el paraje Cerro Hueco de Tacámbaro Michoacán a una altitud de 1,400 msnm y la de *P. pseudostrobus* en el paraje Cerro del frijol de Salvador Escalante, Michoacán cuya altitud es de 2,200 msnm

3.2. Métodos

3.2.1. Asignación de tratamientos para *P. michoacana*.

Se asignaron los tratamientos del control biológico de *F. oxysporum* con *T. erinaceum* y control químico con Tiabendazol de acuerdo a la siguiente lista y a la figura 5.

Tratamiento Testigo 1 (T1 (Testigo con sustrato estéril)):

- Llenado de tres charolas con el sustrato estéril.
- Siembra semillas

Tratamiento Testigo 2 (T2 (Testigo con sustrato no estéril)):

- Llenado de cinco charolas con el sustrato sin esterilizar.
- Siembra semillas.

Tratamiento 3 (T3 (*T. erinaceum*)):

- Llenado de cinco charolas con el sustrato.
- Siembra de semillas inoculadas mediante aspersión con el antagonista a base de *T. erinaceum*.

Tratamiento 4 (T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*)):

- Llenado de cinco charolas con el sustrato.
- Siembra de semillas previamente inoculadas mediante aspersión con el hongo antagonista *T. erinaceum* y después de haber secado, se asperjó la solución con el patógeno a base de *F. oxysporum*.

Tratamiento 5 (T5 (Tiabendazol + *F. oxysporum*)):

- Llenado de cinco charolas con el sustrato.
- Siembra de semillas previamente asperjadas con el fungicida a base de Tiabendazol y después inoculadas mediante aspersión con el patógeno a base de *F. oxysporum*.

Tratamiento 6 (T6 (Tiabendazol)):

- Llenado de cinco charolas con el sustrato.
- Siembra de semillas previamente sometidas a tratamiento de protección con fungicida a base de Tiabendazol.

Tratamiento 7 (T7 (*F. oxysporum*)):

- Llenado de cinco charolas con el sustrato.
- Siembra de semillas inoculadas mediante aspersión con el patógeno a base de *F. oxysporum*.



Figura 5. Diagrama de tratamientos a *P. michoacana*.

3.2.2. Asignación de tratamientos para *P. pseudostrobis*

Se asignaron los tratamientos del control biológico de *F. oxysporum* con *T. erinaceum* y control químico con Tiabendazol de acuerdo a la siguiente lista y a la figura 6.

Tratamiento Testigo 1 (T1 (Testigo con sustrato estéril)):

- Llenado de tres charolas con el sustrato estéril.
- Siembra semillas

Tratamiento Testigo 2 (T2 (Testigo con sustrato no estéril)):

- Llenado de cinco charolas con el sustrato sin esterilizar.
- Siembra semillas.

Tratamiento 3 (T3 (*T. erinaceum*)):

- Llenado de cinco charolas con el sustrato.
- Siembra de semillas inoculadas mediante aspersión con el antagonista a base de *T. erinaceum*.

Tratamiento 4 (T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*)):

- Llenado de cinco charolas con el sustrato.
- Siembra de semillas previamente inoculadas mediante aspersión con el hongo antagonista *T. erinaceum* y después de haber secado, se asperjó la solución con el patógeno a base de *F. oxysporum*.

Tratamiento 5 (T5 (Tiabendazol + *F. oxysporum*)):

- Llenado de cinco charolas con el sustrato.
- Siembra de semillas previamente asperjadas con el fungicida a base de Tiabendazol y después inoculadas mediante aspersión con el patógeno a base de *F. oxysporum*.

Tratamiento 6 (T6 (Tiabendazol)):

- Llenado de cinco charolas con el sustrato.
- Siembra de semillas previamente sometidas a tratamiento de protección con fungicida a base de Tiabendazol.

Tratamiento 7 (T7 (*F. oxysporum*)):

- Llenado de cinco charolas con el sustrato.
- Siembra de semillas inoculadas mediante aspersión con el patógeno a base de *F. oxysporum*.



Figura 6. Diagrama de tratamientos a *P. pseudostrobus*.

3.2.3. Reactivación de *F. oxysporum* y *T. erinaceum*.

Para la reactivación de *F. oxysporum* y *T. erinaceum*, fue necesario trabajar en la campana de flujo laminar con los mecheros encendidos para crear un ambiente amplio de asepsia, se colocó agua estéril en 5 cajas petri, donde se lavó el micelio extraído de los tubos de ensaye con el fin de eliminar el aceite mineral en el que se encuentra preservado, después se colocó en papel filtro estéril para que secase lo mejor posible, enseguida se depositaron pequeños pedacitos del micelio en las cajas petri con el medio de cultivo PDA, se etiquetaron para evitar confusiones de material y se sellaron con papel parafilm para impedir o reducir al máximo la contaminación. Se hicieron observaciones diarias del crecimiento de las colonias y de las que presentaron algún contaminante, se hicieron las transferencias necesarias hasta lograr obtener la cepa pura del hongo bajo estudio.

3.2.4. Prueba *In Vitro*

Para seleccionar potenciales bioantagonistas como controladores biológicos, fue necesario realizar algunos ensayos *In Vitro* que orientaron respecto a su capacidad antagónica para seleccionar uno, el cual fue posteriormente utilizado en las pruebas de antagonismo *In Vivo*.

La utilidad de las pruebas de antagonismo *In Vitro* reside en que permiten establecer la capacidad antagónica de algunos hongos sobre patógenos. Puede ocurrir que un antagonista sea un excelente biocontrolador en experimentos *In Vitro* y funcione posteriormente mal a campo. Para la realización de la prueba de antagonismo *In Vitro* se utilizaron como antagonistas *Trichoderma erinaceum* y *Trichoderma* spp., la primera

fue reactivada de los tubos de ensaye del laboratorio y la segunda de aislamientos de muestras de *Pinus patula* que se tenía como material de trabajo del laboratorio. Los hongos patógenos estudiados fueron *Phytophthora* sp., *Cylindrocladium* sp., *Fusarium oxysporum* y *Fusarium* sp. cuyas muestras tomadas de colonias existentes también en el laboratorio de patología a excepción de *F. oxysporum* que se había reactivado a la vez, junto con *T. erinaceum*.

Cada organismo antagonista se probó con cada uno de los organismos patógenos con dos repeticiones sembrando una porción tomada con el sacabocado de cada uno de éstos y colocándolo en los extremos de las cajas petri con medio de cultivo PDA, de tal manera que se tuvieron 4 pruebas con 2 repeticiones para cada antagonista. Quedando de la siguiente manera:

Trichoderma erinaceum vs. *Fusarium oxysporum*

Trichoderma erinaceum vs. *Fusarium* sp.

Trichoderma erinaceum vs. *Phytophthora* sp.

Trichoderma erinaceum vs. *Cylindrocladium* sp.

Trichoderma spp. vs. *Fusarium oxysporum*

Trichoderma spp. vs. *Fusarium* sp.

Trichoderma spp. vs. *Phytophthora* sp.

Trichoderma spp. vs. *Cylindrocladium* sp.

Para la valoración del bioensayo, a partir de la fecha de siembra se tomaron 5 medidas del crecimiento de la colonia de ambos organismos con una frecuencia de cada tres días, considerando velocidad de crecimiento y mecanismos de acción del antagonista contra el patógeno, cuidando además que no se presentaran contaminantes que afectaran el buen desarrollo del experimento y por ende, los resultados.

3.2.5. Prueba *In Vivo*

Se evaluó en dos fases, la efectividad biológica de *T. erinaceum* contra *F. oxysporum* en plántulas de *Pinus michoacana* y *Pinus pseudostrobus* durante su desarrollo en el vivero. La primera fase fue para evaluar el porcentaje de germinación por especie, a partir de la siembra (25 enero 2007) hasta concluir la germinación (30 abril 2007). La segunda fase en el vivero fue de mayo a octubre de 2007 para evaluar en las plántulas las variables diámetro, altura y materia seca de raíz.

3.2.6. Incremento de *T. erinaceum* y *F. oxysporum* para prueba *In Vivo*

Para el crecimiento de *F. oxysporum* se utilizó medio de cultivo comercial PDA (papa-dextrosa-agar) y un medio específico llamado Czapeck para lograr la esporulación de este organismo. Para *T. erinaceum* se utilizó principalmente medio de cultivo PDA y de forma ocasional, medio de cultivo V8 (jugo comercial de ocho verduras). De cada hongo, se incrementaron en cantidad considerable cajas petri completamente puras a través de transferencias.

3.2.7. Concentración del inóculo

Para determinar la concentración con la que se trabajó, de la mezcla obtenida del hongo patógeno, se tomaron 100 ml, de ésta se tomó una pipeta de 10 ml y se colocó una gota en la cámara de Neubauer con calibración de 0.0025 mm^2 para la cuantificación de macro y microconidios mediante un microscopio compuesto en el aumento de 40X, también se determinó si estaban presentes las clamidosporas como estructuras de resistencia, se realizaron 10 conteos de conidios por cuadrante, al promedio del total se le multiplicó por un factor de 1000 y se obtuvo el número de esporas por ml. De la misma forma se procedió para calcular la concentración de conidios del hongo antagonista *T. erinaceum*. La concentración aplicada fue de 3.17×10^6 conidios por ml para *F. oxysporum* y de 3.48×10^6 conidios por ml para *T. erinaceum* (Figura 7A y 7B).

3.2.8. Preparación de *F. oxysporum* y *T. erinaceum* para la inoculación y Tiabendazol para la aspersión de semillas

La suspensión de cada hongo se preparó bajo la campana de flujo laminar. Con el contenido de 10 cajas petri y 250 ml de agua destilada y estéril se mezclaron por un minuto en licuadora a velocidad alta para lograr mayor dispersión de las esporas en el líquido. Tal suspensión se colocó en un aspersor manual de plástico completamente desinfectado para proceder a realizar los tratamientos a las semillas (Figura 7C).

3.2.9. Inoculación de las semillas y siembra

Después de las 24 horas de remojo de las semillas en agua destilada y estéril, se procedió con la aplicación de las soluciones de acuerdo a los tratamientos asignados. Las semillas del tratamiento testigo 1 con sustrato estéril y del testigo 2 con sustrato sin esterilizar no

recibieron inoculación con el fungicida biológico ni protección con el fungicida químico, únicamente se sembraron en las charolas correspondientes. El tratamiento 1 se estableció sólo en tres charolas debido a que no hubo sustrato estéril disponible para las 5 a diferencia del resto de los tratamientos. Las semillas de los tratamientos 3 y 4 se inocularon con *T. erinaceum*; cuando las semillas del tratamiento 4 ya estaban completamente secas se inocularon, mediante aspersión, con la suspensión de *F. oxysporum*. Las de los tratamiento 5 y 6 se asperjaron con el fungicida químico a base de Tiabendazol, también cuando las semillas del 5 ya estaban bien secas, se inocularon con *F. oxysporum* y las del tratamiento 7 se inocularon únicamente con *F. oxysporum*. Cuando las semillas de todos los tratamientos estuvieron completamente secas se procedió a sembrarlas en los contenedores (Figura 7D).

En cada cavidad de las charolas se colocaron dos semillas a una profundidad de aproximadamente dos veces su tamaño (Figura 7E). Se tuvieron 14 tratamientos en total, cada uno con cinco repeticiones y cada repetición consistió de una charola de 40 cavidades, excepto en el Tratamiento Testigo 1, en el que se emplearon tres charolas por cada especie debido a que el sustrato estéril sólo alcanzó para el llenado de 6 charolas y se requería experimentar en ambas especies de pino (Figuras 5 y 6). Se estableció el experimento en el vivero de manera aleatoria (Figura 7F, Anexo 3). Se colocó la malla sombra para evitar que las semillas o las plántulas recién emergidas fueran extraídas por pájaros.



Figura 7. A: Cámara de Neubauer y contador de conidios. B: Cuadrantes de la cámara de Neubauer y conidios. C: Aspersores con la solución. D: Inoculación de semillas. E: Siembra de semillas en las charolas. F: Experimento establecido en el vivero.

3.2.10. Sustratos para germinación y crecimiento de los pinos en el vivero.

El sustrato consistió de peat-moss (43%), vermiculita (30%) y agrolita (27%), además de 0.991 kg. de osmocote como fertilizante de liberación prolongada (Cuadro 2). Los tres primeros componentes del sustrato se revolvieron hasta obtener una mezcla homogénea, enseguida se distribuyó el osmocote y se mezclaron otra vez para lograr que se integrara lo mejor posible. Para tener mayor certeza de la asepsia del sustrato, en el Tratamiento

Testigo 1 se utilizó sustrato previamente esterilizado a 15 lb/in² de presión. Una vez hecha la mezcla de sustrato, se le agregó agua hasta capacidad de campo y se procedió con el llenado de las charolas (Figura 8).

Cuadro 2. Cantidad de sustrato utilizado para el llenado de 70 charolas.

Sustratos	Volumen (kg)	Porcentaje (%)
Peat-moss	142.260	43
Vermiculita	99.230	30
Agrolita	89.610	27
Osmocote	0.991	
Total	331.100	100

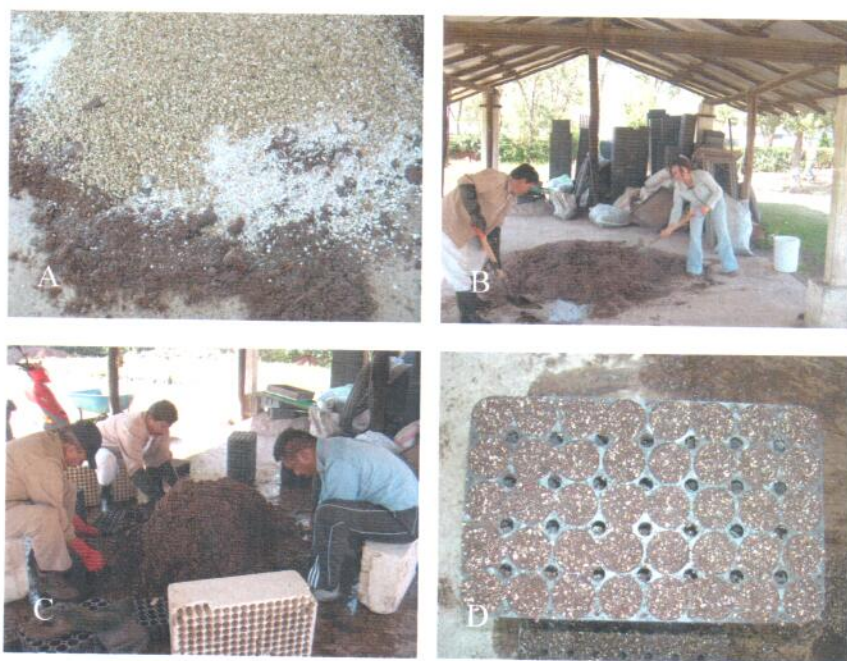


Figura 8. Sustratos. **A:** Sustratos: Peat-moss, agrolita y vermiculita. **B:** Mezcla de sustratos y osmocote. **C:** Llenado de charolas. **D:** Charola lista para la siembra.

3.2.11. Inoculación de las plántulas

Después de haberse concluido la germinación, se realizaron dos inoculaciones bajo el método de inyección directa al sustrato (con 20 ml de solución) a cada una de las plántulas de acuerdo al tratamiento correspondiente. Pasados 15 días después de cada inoculación, se hicieron las mediciones de diámetro y altura para poder realizar el análisis del efecto de los tratamientos en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

3.2.12. Riego

Se aplicó riego a diario o dos veces al día según los requerimientos y de acuerdo a la temperatura y época del año o bajo el régimen de riego empleado en el vivero, con agua sola hasta el momento en el que la germinación concluyó. Después de la germinación, se aplicó fertirrigación con fase iniciador cuya formulación es 7-40-17 N-P-K. Posteriormente, se utilizó la formulación 20-7-19 que corresponde a la fase de desarrollo y a partir de que las plántulas tenían en promedio 4 cm de altura se aplicó por dos meses la fase finalizador cuya formulación es 4-25-35 de N-P-K. En la etapa final del experimento fue riego con agua sin formulación alguna.

3.3. Diseño experimental

3.3.1. Evaluación de la germinación.

En el experimento *In Vivo* establecido en el vivero de la División de Ciencias Forestales en el que se evaluó el porcentaje de germinación de las semillas correspondiente a la primera fase de esta prueba, se empleó un *Diseño completamente al azar* cuyo modelo es:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Observación j-ésima del tratamiento i

μ = Media poblacional común a todas las observaciones

τ_i = Efecto debido al tratamiento i

ε_{ij} = componente de error aleatorio

Este diseño es útil cuando las unidades experimentales son esencialmente homogéneas, es decir, cuando la variación entre ellas es pequeña. Este es el caso de muchos experimentos en laboratorio, en los que una cantidad de material está completamente mezclado y luego se divide en porciones pequeñas para formar las unidades experimentales a las cuales se asignan los tratamientos en forma aleatoria, o en experimentos con plantas con condiciones ambientales muy parecidas (Steel y Torrie, 1985).

3.3.2. Evaluación del desarrollo y crecimiento de las plántulas

Para la segunda fase del experimento en el vivero, se hizo un reacomodo de las plántulas considerando los mismos tratamientos bajo un *Diseño en parcelas divididas* siendo la *parcela principal* (unidad) la *especie* y las *subparcelas* (subunidad) cada uno de los *tratamientos* (Steel y Torrie, 1985). Se obtuvieron datos de diámetro y altura de cada plántula existente por especie después de cada inoculación, generándose así, dos grupos de datos de acuerdo a dos inoculaciones realizadas, los cuales se analizaron por separado. El modelo de tal diseño es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \rho_i + \alpha_j + \gamma_{ij} + \beta_k + (\alpha\beta)_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

La observación en el bloque i-ésimo de un diseño de bloques completos al azar bajo el tratamiento j-ésimo de la unidad completa con el k-ésimo tratamiento de la subunidad. Este diseño es ideal en situaciones cuyo objeto principal de un experimento es comparar los efectos de varios fungicidas como protectores contra infección por una enfermedad. Para aumentar el alcance del experimento, se incluyen varias variedades de las cuales se sabe que difieren en su resistencia a la enfermedad (Steel y Torrie, 1985).

3.4. Evaluación de las pruebas de antagonismo *In Vitro* e *In Vivo* y efectividad de los tratamientos

Con la intención de evaluar la totalidad del experimento, se realizaron las siguientes pruebas:

3.4.1. Pruebas de antagonismo *In Vitro* de *Trichoderma*

Los bioensayos *In Vitro* fueron efectuados con el fin de comprobar si los hongos antagonistas *Trichoderma erinaceum* y *Trichoderma* sp. podían tener algún efecto sobre los patógenos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp. y *Cylindrocladium* sp.

3.4.2. Porcentaje de germinación de *P. michoacana* y *P. pseudostrobis*

Se tomó en cuenta el porcentaje de germinación de cada especie, de manera general y por tratamiento. La siembra se realizó el día 25 de enero de 2007. El periodo de germinación fue del 03 de marzo 30 de abril, mostrando el pico de mayor germinación el 19 de abril. Se empleó un diseño completamente al azar y para el análisis estadístico en SAS (Rebolledo, 2002), se utilizó una transformación angular o transformación arcoseno ($\arcsen \bar{y}$ o $\sin^{-1} \bar{y}$) que es aplicable a datos binomiales expresados como fracciones decimales o porcentajes, y se recomienda cuando los porcentajes cubren un intervalo amplio de valores.

3.4.3. Altura y diámetro de plántulas

Para tomar los datos de cada una de las plántulas por tratamiento y a su vez, por especie, se utilizó una regla graduada de 30 cm en el caso de la variable altura considerada de la base del tallo a la parte apical de la planta y un vernier digital electrónico para las lecturas del diámetro del tallo tomado en la base del mismo.

3.4.4. Aislamientos

Las plantas que manifestaron daño o síntoma de enfermedad fueron extraídas y clasificadas por tratamiento, se llevaron al laboratorio de patología para realizar las pruebas idóneas y comprobar si el agente causal de tal daño fue el organismo con el que se inocularon las plantas y si el hongo antagonista al emplearlo mostró una o varias ventajas que posee. Cada planta se etiquetó de acuerdo al tratamiento correspondiente y se colocó en bolsas de plástico limpias y ya en el laboratorio se le quitó el sustrato, además se lavó con agua para quitar el exceso del mismo. El procesamiento se realizó en la campana de flujo laminar con el apoyo de dos mecheros encendidos para tener un ambiente aséptico. Se hicieron cortes de raíz de 1 cm aproximadamente, para esto fue necesario considerar en cada corte una parte sana y una parte con manifestaciones de enfermedad. Se inició con dos enjuagues en agua estéril y enseguida se colocó en hipoclorito de sodio al 1.5% durante un minuto, después se realizaron otras dos enjuagues con agua estéril para eliminar completamente el desinfectante.

Se colocó en papel filtro estéril con el fin de que secase completamente y se procedió a la siembra en cajas petri con medio de cultivo PDA solidificado y limpio, colocando en promedio 10 pedacitos por caja utilizando pinzas de disección, las cuales en cada

manipulación, se dejaban por unos segundos al fuego del mechero para evitar contaminación entre porciones a sembrar. Enseguida, se selló con papel parafilm para cerrarlas y así evitar al máximo la contaminación de las cepas con otros agentes por su manejo en el cuarto de siembra. Se etiquetó cada caja de acuerdo al tratamiento y especie correspondiente. Fue necesario hacer revisiones diarias a las cajas para observar la presencia de micelio o bien, la manifestación de organismos contaminantes.

Cuando se notó esta característica, esas cajas se desecharon y para aquellas que mostraron micelio puro alrededor de la porción sembrada, se utilizó el sacabocado de 1 cm de diámetro para tomar dicha porción y se transfirió a caja petri con PDA para obtener una colonia pura. Al desarrollarse la colonia, se identificó el organismo en base a las características propias de cada uno, considerando coloración del micelio y crecimiento de la colonia. Para mayor certeza, se elaboraron preparaciones en porta objetos y con apoyo del microscopio compuesto, se identificaron los micro y macroconidios, así como las clamidosporas de *F. oxysporum* y también los conidios, fiálides y clamidosporas de *T. erinaceum*. De tal manera que a través de los aislamientos realizados se pudo comprobar la manifestación de los organismos utilizados en la investigación. Para ello se emplearan los postulados de Koch (Anexo 4).

3.4.5. Identificación de hongos presentes en los aislamientos

Para determinar si los hongos con los que se inocularon las plantas fueron los que se manifestaron, se tomó en cuenta la sintomatología de la plántula, la cual al ser atacada por un patógeno, en este caso *F. oxysporum*, los síntomas de daño son muy característicos en la coloración del follaje, la apariencia del tallo y de la raíz. Si la

plántula se favoreció con la aplicación del hongo antagonista *T. erinaceum*, se incrementa la densidad de raíces, así como también las dimensiones en diámetro y altura de la misma. Además, se consideraron las colonias obtenidas en los aislamientos, de acuerdo a crecimiento y coloración de las mismas ya que son propias de tales hongos. Así mismo, se procedió a la elaboración de preparaciones permanentes, para ello fue necesario extraer una pequeña porción del micelio que desarrolló alrededor del pedacito de raíz sembrado en PDA y se colocó en un portaobjetos con glicerina líquida, anillo de cera y cubiertas con un cubreobjetos y se observaron en el microscopio a 40X de aumento.

3.4.6. Materia seca de raíz

Al considerar el rendimiento de un producto es necesario expresarlo en unidades de materia seca, la cual está constituida por una fracción orgánica y otra inorgánica. El componente inorgánico está dado por los minerales que posee el vegetal, principalmente potasio y silicio. Pero también, la mayoría de los compuestos orgánicos contienen elementos minerales como componentes estructurales, por ejemplo, las proteínas contienen azufre y muchos lípidos y los carbohidratos contienen fósforo (Bassi, 2007).

Al término del experimento en el vivero (octubre de 2007), se contabilizaron y se extrajeron las plantas sobrevivientes de cada tratamiento con la finalidad de calcular la cantidad de materia seca en cada ejemplar y con esos datos hacer el análisis correspondiente para determinar que tratamiento fue el mejor en cuanto a mayor ganancia de peso seco, lo cual se atribuye a uno de los tantos beneficios que otorga el

hongo antagonista *T. erinaceum* al utilizarse durante la producción de planta en el vivero.

Posterior a la extracción, se eliminó completamente el sustrato de las plantas y se lavaron con agua estéril. Con una navaja se separó la parte aérea de la parte radical a nivel del cuello de la raíz; la parte foliar se desechó. Cada una de las raíces clasificadas por tratamiento se pesó en la balanza analítica, de esta manera se obtuvo el dato de peso fresco individual, se metió en una bolsa de papel, la cual se etiquetó de acuerdo a la especie y al tratamiento correspondiente. Se sometieron a estufa de secado a una temperatura constante de 27°C las 24 horas del día. Se continuó con la toma de datos de peso cada tercer día hasta que se logró el peso constante, que en sí corresponde al peso en seco. La cantidad de materia seca por cada raíz, se obtuvo mediante una diferencia de datos entre el peso fresco y el peso seco en gramos (g).

Con los datos obtenidos, se pudo trabajar también en porcentaje la cantidad de materia seca, pero en este caso por tratamiento. Para ello, se consideró un solo dato, así que se pesaron todas las plantas en conjunto de cada tratamiento, con lo que se tuvo el peso fresco (peso inicial) del tratamiento. Al tener el peso constante, se agruparon todas las plantas de cada tratamiento y se pesaron en conjunto para tener el peso seco (peso final) y con estos resultados se pudo calcular el porcentaje de materia seca.

Para ello, se empleó la fórmula siguiente (Bassi, 2007).

$$\%MS = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} * 100$$

Para esta fase del experimento, se realizó el análisis estadístico mediante el paquete de cómputo SAS con PROC GLM y Tukey con diseño de parcelas divididas, en base a los resultados de materia seca en gramos (g) para determinar de esta manera que tratamiento proporcionó mayor robustez a las plantas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Concentración del inóculo

La concentración aplicada para *T. erinaceum* fue de 3.48×10^6 conidios por ml y para *F. oxysporum* fue de 3.17×10^6 conidios por ml.

4.2. Evaluación de la susceptibilidad

La especie que resultó ser más susceptible a *Fusarium oxysporum* fue *P. pseudostrobus* ya que el porcentaje de sobrevivencia del número de plántulas germinadas que recibieron inoculaciones post-emergentes del patógeno *F. oxysporum* hasta el momento de concluir con la fase de vivero fue de 80%, en cambio, *P. michoacana* mostró una ligera diferencia con 83.4% de sobrevivencia, así como también, mayor crecimiento en altura y en diámetro.

4.3. Pruebas de antagonismo *In Vitro*

Los bioensayos mostraron la efectividad del uso de *Trichoderma erinaceum* y *Trichoderma* sp. como control biológico de los patógenos utilizados. Para la evaluación se consideró el tipo de antagonismo y el porcentaje de inhibición por el antagonico al crecimiento de la colonia generada por el patógeno.

El antagonista *Trichoderma erinaceum* manifestó parasitismo como mecanismo de inhibición en aproximadamente un 88% contra *Fusarium oxysporum* formando un ligero halo de inhibición alrededor de la colonia del patógeno evitando así que el micelio de éste se prolongará (Figura 9A y 9B).

También *T. erinaceum* presentó un efecto inhibitorio en un 94% de *Fusarium* sp., se forma un halo mas claro que en el caso anterior, el cual es un mecanismo de inhibición por parasitismo o competencia en el cual el hongo antagonista produce sustancias tóxicas para impedir el crecimiento del patógeno (Figuras 9C y 9D).

Respecto a la prueba a base de *T. erinaceum* y *Phytophthora* sp. también presenta un efecto de inhibición de crecimiento del patógeno en 98%, en este caso también se trata de un micoparasitismo en el que el antagonista crece sobre la colonia desarrollada por el patógeno, aunque también se observa la formación de un halo, el cual también impide la expansión del micelio del organismo patógeno que pudiera ser un efecto por antibiosis en el cual libera sustancias químicas para impedir el desarrollo del patógeno (Figuras 9E y 9F).

En cuanto a *T. erinaceum* y *Cylindrocladium* sp. se observa una inhibición de crecimiento del patógeno en un 97%, ya que ocurre también un efecto de micoparasitismo aunque en este caso, la formación de un halo es ausente, pero la colonia de color verde esta completamente cubriendo la colonia del patógeno y al haber una posible competencia, el antagonista ha dominado por lo que inicia la producción de conidios y maduración de las estructuras de reproducción (Figuras 9G y 9H).

Efectos similares ocurrieron en las pruebas *In Vitro* a base de *Trichoderma* sp. Para el caso de *Trichoderma* sp. contra *F. oxysporum* también hubo un efecto inhibitorio en un 84%. Respecto a *Trichoderma* sp. vs. *Fusarium* sp., de la misma forma, el efecto de inhibición por la formación de un halo como posible antibiosis y micoparasitismo en un 98%. Con *Trichoderma* sp. y *Phytophthora* sp. hubo inhibición aunque no esta claramente determinado si es por micoparasitismo ya que el hongo antagonista solo presenta estructuras en el extremo externo de la caja, es decir, en el sentido contrario a la dirección de crecimiento del organismo antagónico y colonizó todo el patógeno, el cubrimiento de la caja petri por el micelio del hongo antagónico fue de 98%. Situación similar se presentó con *Trichoderma* sp. y *Cylindrocladium* sp. en la que la formación del halo existe, aunque puede ser un efecto de inhibición por antibiosis y micoparasitismo en un 97%.

De estos resultados se eligió el uso de *T. erinaceum* para las pruebas de antagonismo *In Vivo* ya que tuvo mejores mecanismos de acción contra los patógenos.

Lozoya *et al.* (2006), demostró la actividad antagónica de los aislamientos bacterianos y fúngicos sobre el desarrollo de la enfermedad causada por *Phytophthora infestans*.

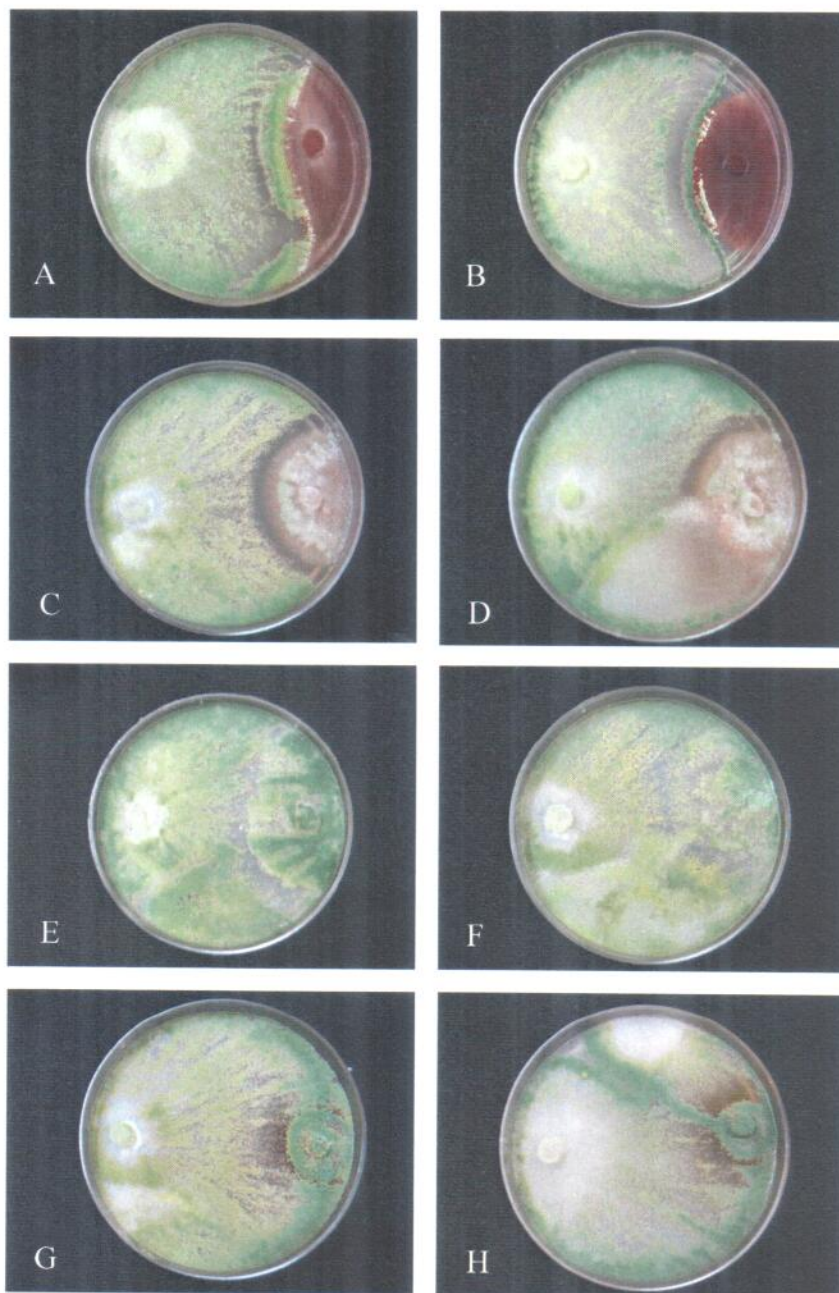


Figura 9. Pruebas de antagonismo In Vitro; **A y B:** *Trichoderma erinaceum* vs. *Fusarium oxysporum*. **C y D:** *Trichoderma erinaceum* vs. *Fusarium* sp. **E y F:** *Trichoderma erinaceum* vs. *Phytophthora* sp. **G y H:** *Trichoderma erinaceum* vs. *Cylindrocladium* sp. (Nota: *Trichoderma* ubicada a la izquierda de la caja petri).

4.4. Germinación de *Pinus michoacana* y *Pinus pseudostrobus*

Con una confiabilidad de 95% y de acuerdo al análisis de varianza se acepta la hipótesis nula de que los tratamientos son iguales dentro de cada una de las especies, debido a que $(Pr>F) > (\alpha=0.05)$ (Cuadros 3 y 4).

Cuadro 3. Análisis de Varianza de la variable porcentaje de germinación de *Pinus michoacana*.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Pr>F
Tratamiento	6	0.20206725	0.03367787	0.50	0.7843
Error	26	1.66892710	0.06418950		
Total	32	1.87099435			

Cuadro 4. Análisis de Varianza de la variable porcentaje de germinación de *Pinus pseudostrobus*.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Pr>F
Tratamiento	6	0.25400213	0.04233369	0.83	0.5563
Error	26	1.32331502	0.05089673		
Total	32	1.57731714			

Al hacer la comparación de medias mediante la prueba de Tukey, se corrobora lo que mostró el análisis de varianza. De tal manera que no hay diferencias significativas ni estadísticas entre los tratamientos de ambas especies.

El mayor porcentaje de germinación promedio para el caso de *P. michoacana* fue para el tratamiento 2 (Testigo con sustrato no estéril) con 61%, el siguiente fue el tratamiento 5 (Tiabendazol + *F. oxysporum*) cuyo porcentaje promedio fue de 56. El tratamiento 3 en el que se aplicó *T. erinaceum* como protector se obtuvo un porcentaje de germinación promedio de 45%. Los porcentajes mas bajos se obtuvieron en los dos tratamientos en

los que se empleó el hongo antagonista (T3 (*T. erinaceum*) y T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*)) con 47% y 45% respectivamente, de dichos tratamientos se esperaba mejor resultado en este punto (Figura 10).

Para el caso de *P. pseudostrobilus*, el mayor porcentaje de germinación promedio fue de 59% para el tratamiento 1 (Testigo con sustrato estéril), el siguiente fue el tratamiento 6 (Tiabendazol) cuyo porcentaje promedio fue de 55. El tratamiento 3 en el que se aplicó *T. erinaceum* como protector se obtuvo un porcentaje de germinación promedio de 32%, de tal manera que es el tratamiento con porcentaje de germinación mas bajo en esta especie (Figura 11).

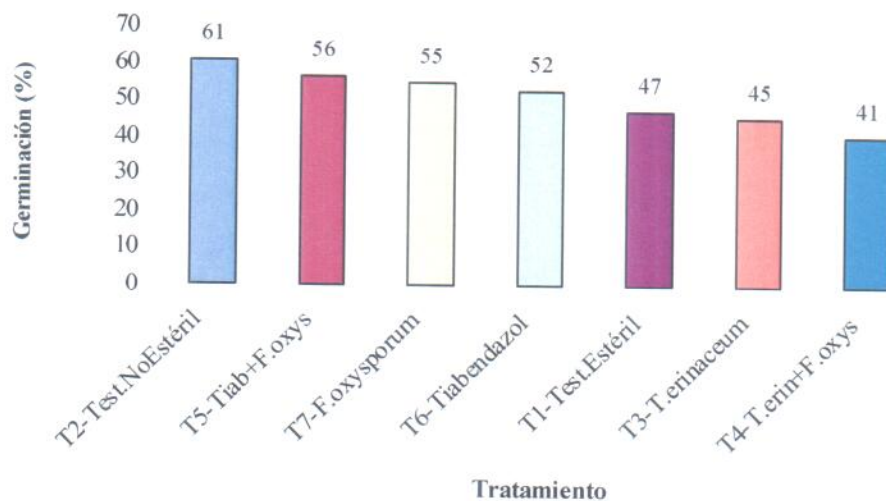


Figura 10. Porcentaje de germinación por tratamiento para *P. michoacana*.

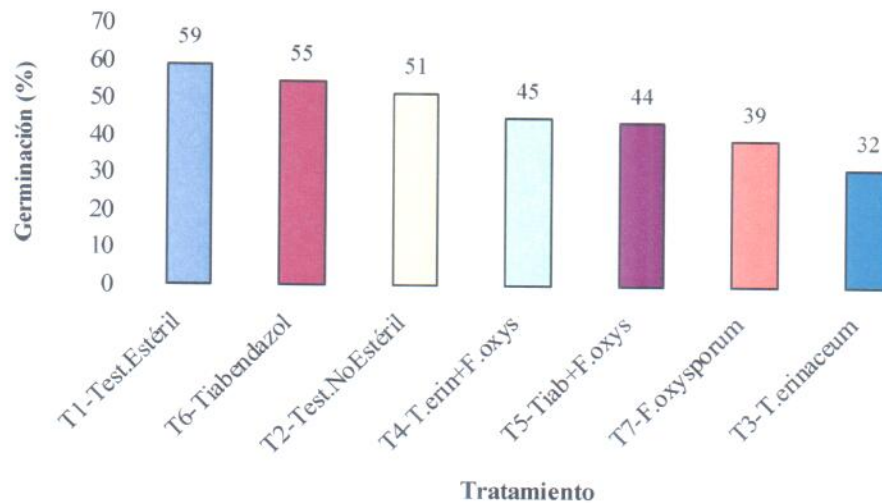


Figura 11. Porcentaje de germinación por tratamiento para *P. pseudostrobilus*.

De acuerdo a los porcentajes de germinación que se muestran en las figuras anteriores, se puede notar que si hay diferencias biológicas significativas aunque en el análisis estadístico no se muestran, lo cual se atribuye a que SAS realiza el análisis en base a la diferencia mínima significativa y la diferencia de las medias de dos tratamientos involucrados, en todas las comparaciones realizadas respecto a este dato no hay diferencia.

Concluyendo entonces en base a la respuesta biológica de las semillas, el fungicida tiabendazol surte buen efecto de protección pre-emergente, no así para *T. erinaceum* que tiene porcentajes bajos para ambas especies. Los porcentajes de germinación bajos que se presentaron pueden atribuirse a las condiciones en las que se desarrolló el experimento, las temperaturas al inicio (siembra en el mes de enero) fueron bajas, lo que implicó cubrir con un plástico durante la noche la cama de crecimiento y otra causa que

pudo haber jugado un papel importante en el mismo resultado es el método de siembra y profundidad de la semilla en la cavidad, así como la manipulación del germoplasma. Es muy probable que los tratamientos aplicados no tuvieron efectos en la germinación considerando las condiciones antes mencionadas (Figura 12).

Don Juan (2006) tuvo porcentajes de germinación bajos en los tratamientos que empleó *Trichoderma harzianum* como protección a la inoculación de hongos que causan Damping-off, en cambio, en los tratamientos en los que empleó *T. erinaceum* y fungicida químico tuvo porcentajes de germinación elevados.



Figura 12. Germinación. **A:** Vista general de germinación. **B:** Charolas con mayor porcentaje de germinación. **C:** Charolas con bajo porcentaje de germinación.

4.5. Manifestación de daños y aislamientos

Al concluir la germinación, mediante monitoreos al vivero se detectaron aquellas plantas que mostraron síntomas de enfermedad como variación en la coloración de las hojas, desde verde limón hasta café oscuro y/o la base del tallo constreñida y por ende, crecimiento menor, así como las semillas que no germinaron. Los síntomas anteriormente mencionados, corresponden a los descritos por López (2002). De cada especie y de cada tratamiento, se extrajeron dos ejemplares de semillas no germinadas y

dos de plantas enfermas para procesarlas mediante aislamientos en el laboratorio de patología y se determinó si los hongos que se emplearon en la inoculación previa a la siembra de las semillas, se manifestaron al germinar las mismas (Figura 13 y 14). Los primeros aislamientos se realizaron en el mes de mayo de 2007, en días posteriores al término de la germinación.

Se realizaron dos inoculaciones post-emergentes de acuerdo a cada tratamiento asignado desde el principio. La primera aplicación fue el 12 y 13 de julio de 2007 mediante inyección directa al sustrato con 20 ml de solución por cada plántula (fueron necesarios 2 días ya que en los tratamientos 4 y 5 se inoculó primero el agente protector y 24 horas después, el patógeno. El 27 de julio del mismo año, se tomaron mediciones de diámetro y altura para analizar el impacto que tuvo dicha aplicación en el desarrollo de las plántulas y también se hizo un análisis de datos para respaldar los resultados obtenidos. Las plántulas con síntomas de enfermedad posterior a la primera inoculación, se extrajeron y fueron procesadas a través de aislamientos el mismo día.

La segunda inoculación fue el 31 de agosto y el 01 de septiembre del 2007 con la misma técnica que en la primera. La toma de datos de diámetros y alturas se realizó el 25 de septiembre del mismo año, en esa misma fecha se hizo la extracción de plantas enfermas para procesarlas en medio de cultivo PDA y determinar el agente causal. Cabe mencionar que de los tratamientos que no manifestaron daños, también se extrajeron plantas para procesarlas mediante aislamientos y determinar si se manifestó el hongo antagonista o bien, el hongo patógeno.

En los cuadros 5 y 6, se enlistan los microorganismos que se presentaron en los tres aislamientos realizados a cada especie y por cada tratamiento durante la fase en el vivero. Aún cuando en el tratamiento 1 no se hizo aplicación de organismos biológicos, en *P. michoacana* se aisló el patógeno *F. oxysporum* en la evaluación a las semillas y plántulas recién emergidas así como en los aislamientos posteriores a la primera y segunda inoculación y sólo en la primera para *P. pseudostrobus*.

En los tratamientos que se aplicaron fungicidas biológicos y químicos, la incidencia de patógenos se redujo básicamente en el último aislamiento, probablemente a que las primeras inoculaciones manifestaron efectos y se pudieron observar mejor los resultados de éstas junto con la segunda inoculación.

En *P. michoacana* en los tratamientos 3 y 4 se eliminó la incidencia del patógeno en la segunda inoculación, de tal manera que el antagonista aplicado a las semillas antes de la siembra y en las dos inoculaciones posteriores inhibió a los agentes causales de enfermedad en raíz. En *P. pseudostrobus*, también en los tratamientos 3 y 4 si hubo presencia de *F. oxysporum*, comprobando de esta manera que esta especie fue la más susceptible al ataque de patógenos.

Cuadro 5. Organismos presentes en los aislamientos por tratamiento de *Pinus michoacana*.

Tratamiento	Hongos aislados (semillas y plántulas recién emergidas)	Hongos aislados (Plántulas) (1ra. Inoculación)	Hongos aislados (Plántulas) (2da. Inoculación)
T1. Testigo estéril	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Trichoderma erinaceum</i>
T2. Testigo no estéril	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Trichoderma erinaceum</i>	<i>Trichoderma erinaceum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
T3. <i>Trichoderma erinaceum</i>		<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Trichoderma erinaceum</i>
T4. <i>T. erinaceum</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Trichoderma erinaceum</i>
T5. Tiabendazol <i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
T6. Tiabendazol	<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Trichoderma erinaceum</i>
T7. <i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>

Cuadro 6. Organismos presentes en los aislamientos por tratamiento de *Pinus pseudostrobus*.

Tratamiento	Hongos aislados (semillas y plántulas recién emergidas)	Hongos aislados (Plántulas) (1ra. Inoculación)	Hongos aislados (Plántulas) (2da. Inoculación)
T1. Testigo estéril	-	<i>Fusarium oxysporum</i>	-
T2. Testigo no estéril	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Trichoderma erinaceum</i>
T3. <i>Trichoderma erinaceum</i>			<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Trichoderma erinaceum</i>
T4. <i>T. erinaceum</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Trichoderma erinaceum</i>
T5. Tiabendazol <i>Fusarium oxysporum</i>			<i>Fusarium oxysporum</i>
T6. Tiabendazol		<i>Fusarium oxysporum</i>	
T7. <i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>

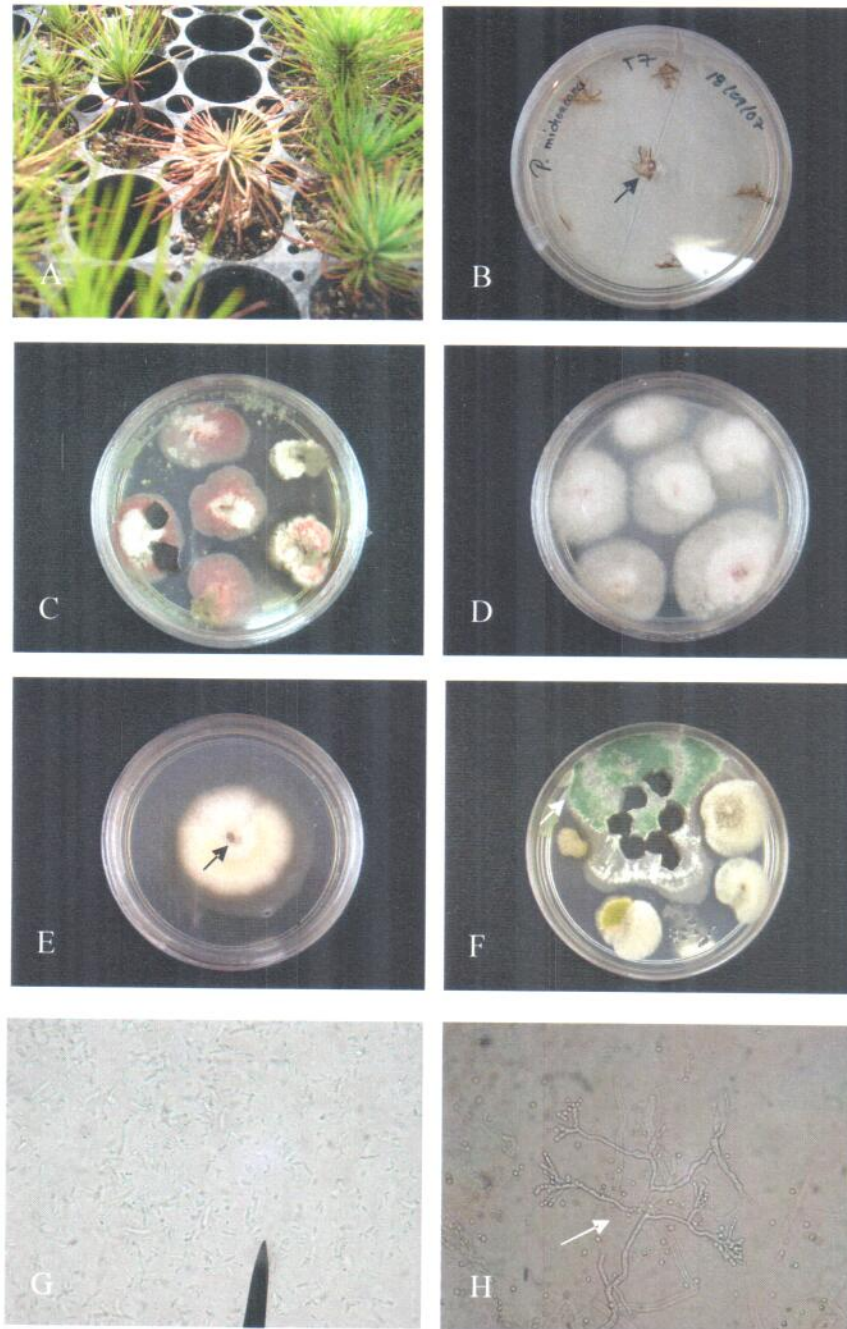


Figura 13. *Pinus michoacana*. **A:** Plántula de *P. michoacana* con síntomas de enfermedad en follaje. **B:** Raíz de la plántula enferma en medio de cultivo PDA después de la segunda inoculación. **C:** Crecimiento y coloración púrpura de *F. oxysporum* presente en el aislamiento de raíz. **D:** Micelio de *F. oxysporum*. **E:** Semilla en PDA con *F. oxysporum*. **F:** Colonia verde característica de *T. erinaceum*. **G:** Micro y macroconidios de *F. oxysporum*. **H:** Fiálides y conidios de *T. erinaceum*.

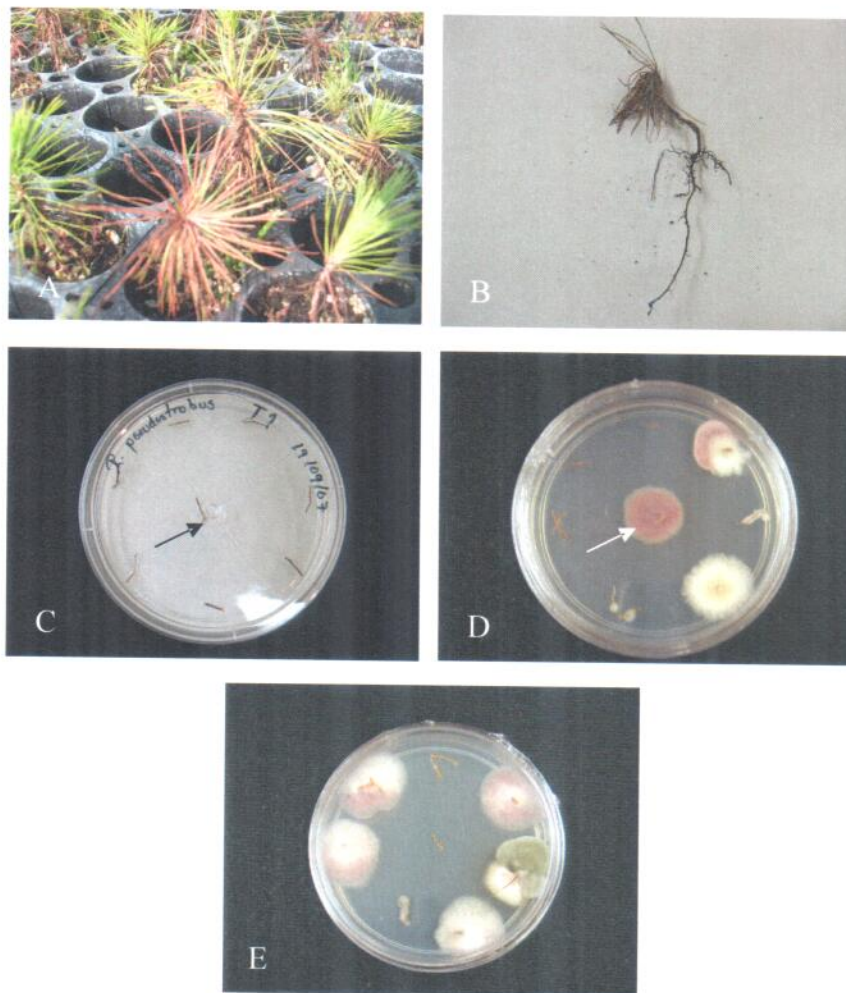


Figura 14. *Pinus pseudostrobus*. **A:** Plántula de *Pinus pseudostrobus* con síntomas de enfermedad en follaje. **B:** Muerte descendente causada por *F. oxysporum*. **C:** Raíz de la plántula enferma en medio de cultivo PDA. **D:** Micelio color púrpura de *F. oxysporum*. **E:** Micelio característico de *F. oxysporum*.

González (1979) en pruebas que realizó esterilizando el suelo del vivero con vapor de agua contra el Damping-off encontró que proporcionó mejor resultado en comparación con los que no fueron tratados y fue más efectivo el vapor de agua que cuando contenían en el sustrato hojarasca de pino. En pruebas individuales de las especies de hongos que causan Damping-off en *Pinus radiata*, comprobó que *Fusarium oxysporum* es el más

frecuente y recomienda controlarlo con la desinfección del sustrato. Además se ha obtenido protección en especies agrícolas contra el Damping-off usando especies de *Trichoderma* y *Penicillium* como antagonistas.

González (1979) trabajó la comparación de diferentes tratamientos al sustrato para controlar Damping-off en dos especies de pino producidas en vivero, reporta que el bajo porcentaje de incidencia de daños causados por el hongo, pueden deberse a que la desinfección de los sustratos con algunos productos, eliminan organismos antagónicos del Damping-off, lo que lleva consigo un alto porcentaje de plantas muertas, por encontrar fácil acceso a la recolonización del material hospedero y del sustrato.

Según Esterio (2005), en estudios efectuados para determinar la residualidad del producto aplicado en árboles de vid *In Vivo*, se pudo establecer que después del séptimo día post aplicación el nivel de control otorgado por el fungicida biológico tendía a disminuir y que el mayor efecto lo producía entre el tercer y quinto día post aplicación. Entre los fungicidas que resultaron ser mas compatibles con la germinación conidial con *Trichoderma* destaca Iprodione. En el estudio *In Vitro* se pudo comprobar que todos los fungicidas evaluados afectan el crecimiento de *Trichoderma*, destacando como el de menor compatibilidad Benomyl.

4.6. Identificación de *T. erinaceum* y *F. oxysporum* obtenidos de los aislamientos

Para la determinación de los hongos que se presentaron en las plantas, se observaron los síntomas que manifestaron las plántulas enfermas, la coloración del follaje al inicio fue verde claro, después se tornó amarillento hasta finalmente quedar café, esto coincidió

perfectamente con lo que causa *F. oxysporum*. Al extraer plantas de los tratamientos que recibieron inoculación con *T. erinaceum*, el crecimiento en altura y el incremento en diámetro fue mayor que las que recibieron inoculación con el patógeno. Al obtener los re-aislamientos, se hicieron las transferencias de las colonias que se manifestaron en la raíz que se sembró en medio de cultivo PDA hasta lograr colonias puras y de acuerdo al comportamiento de crecimiento y coloración, también corresponden al patógeno y al antagonista utilizados. Pero para mayor certeza se hicieron preparaciones permanentes y al observarlas al microscopio se identificaron los macro y microconidios de *F. oxysporum*, así como los conidios y fiálides de *T. erinaceum* de acuerdo a lo que describe (Barnnet y Barry, 1972).

Las colonias de *T. erinaceum* manifestaron coloración blanco al inicio, enseguida amarillo para finalmente tomar el color verde oscuro característico, así como gran producción de conidios, al realizar preparaciones, se observaron los conidios, clamidosporas y fiálides de acuerdo a las características propuestas por Samuels (2007).

La colonia de *F. oxysporum* al principio fue con micelio blanco algodonoso, a los pocos días se torna a un color violeta claro, finalmente toma la coloración púrpura violácea, en algunas cepas con apariencia algodonosa. Al hacer la preparación, se observan los micro y macroconidios hialinos característicos (Barnnet, 1996). Para lograr la esporulación de este hongo en cantidades elevados, fue necesario utilizar el medio de cultivo Czapeck, aún cuando los aislamientos se realizaron en medio de cultivo PDA (Anexo 2)

4.7. Diámetro y altura de las plántulas de *Pinus michoacana*.

La primera inoculación a las plántulas de acuerdo al tratamiento correspondiente, se realizó 2.5 meses después de haber concluido la germinación, es decir, el 12 y 13 de julio de 2007. La toma de datos de diámetro y altura referente a esta aplicación se hizo el 27 de julio del mismo año.

La segunda inoculación se hizo el 31 de agosto y el 01 de septiembre de 2007, o sea, 1.5 meses después de la primera. Las mediciones de diámetros y altura se hicieron el 25 de septiembre de 2007.

Inoculación 1

Las variables diámetro y altura se analizaron con el paquete estadístico ANOVA (PROC GLM) en el programa SAS con una confiabilidad de 95% y $\alpha = 0.05$ después de cada inoculación.

Posterior a la primera inoculación, con los datos obtenidos, la altura promedio fue de 7.58 centímetros, las plantas que recibieron tratamientos de protección previos a la inoculación con el patógeno tuvieron los mayores promedios, T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*) con 7.77 y T5 (Tiabendazol + *F. oxysporum*) con 7.75 cm. El T7 (*F. oxysporum*) dio también buenos resultados en cuanto a esta variable, con un promedio en altura de 7.71 cm, no así para el T1 (Testigo con sustrato estéril) que manifestó un promedio de 6.89 cm, siendo este el mas bajo (Figura 15).

Respecto a la variable diámetro, se tienen resultados semejantes solo que los mayores promedios se tuvieron en el T5 (Tiabendazol + *F. oxysporum*) con 2.11 mm y en el que

únicamente se aplicó el fungicida químico con 2.07 mm. En el que se aplicó control biológico antes del patógeno T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*) el promedio de diámetro es de los mejores con 2.03 mm. El promedio en la especie fue de 1.97 mm. Teniendo el dato más bajo en el T2 (Testigo con sustrato no estéril) con 1.81 mm (Figura 16).

Con un análisis mediante PROC GLM, las variables independientes definidas como variables de clasificación son tratamiento y bloque, en el modelo las variables dependientes son diámetro y altura de las plántulas de pino. Mediante este análisis se evaluó si existió o no efecto significativo de los tratamientos en el desarrollo de diámetro y altura. Para diámetro y altura en *P. michoacana* y de acuerdo al ANOVA (PROC GLM), se rechazó la hipótesis nula de que todos los tratamientos son iguales y se aceptó la hipótesis alternativa de que al menos uno es diferente (Cuadros 7 y 8).

Cuadro 7. Análisis de varianza para la variable diámetro en *P. michoacana* (Inoculación 1).

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Pr>F
Modelo	32	22.6896864	0.7090527	3.94	<0.0001
Error	640	115.2217067	0.1800339		
Total	672	137.9113932			

Cuadro 8. Análisis de varianza para la variable altura en *P. michoacana* (Inoculación 1).

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Pr>F
Modelo	32	83.4843880	2.6088871	1.92	<0.0001
Error	640	869.0907680	1.3879543		
Total	672	952.5751560			

Mediante la prueba de Tukey se determinó cual tratamiento resultó mejor, de tal forma que para la variable diámetro el T5 (Tiabendazol + *F. oxysporum*) y T6 (Tiabendazol)

tuvieron la mayor media con 2.11 y 2.07 mm respectivamente, por tanto fueron los que mejores resultados arrojaron, así que la protección a las semillas, antes de la siembra y con inyección al sustrato por cada cavidad con fungicida químico a base de tiabendazol posterior a la germinación, favorece el desarrollo de las plántulas, principalmente en diámetro. Los tratamientos T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*), T7 (*F. oxysporum*) y T3 (*T. erinaceum*), se comportaron de manera similar entre sí, observándose también que con la aplicación de fungicida biológico a base de *T. erinaceum* también se beneficia a la plántula en grosor de tallo. Estadísticamente, los tratamientos testigos tuvieron comportamiento igual, mostrando los resultados mas bajos, de tal manera que esterilizar o no el sustrato, no beneficia en nada a la planta, pudiera deberse a que el sustrato es comercial y se puede confiar en el grado de esterilidad que trae de origen. Por tanto, se concluye que es recomendable aplicar tratamientos post-emergentes con control biológico con *T. erinaceum* y control químico con tiabendazol para evitar reducción en el desarrollo de las plantas.

En la variable altura, el T7 (*F. oxysporum*) tuvo el mejor resultado, aunque su comportamiento es similar en aquellos tratamientos en los que se empleo tiabendazol y *T. erinaceum*, así que en esta primera inoculación, casi todos los tratamientos funcionaron igual en esta variable, excepto en el T1 (Testigo con sustrato estéril) que tuvo el resultado mas bajo y de la misma forma, dicha variable se favoreció en los tratamientos en los que se empleó protección biológica y/o química.

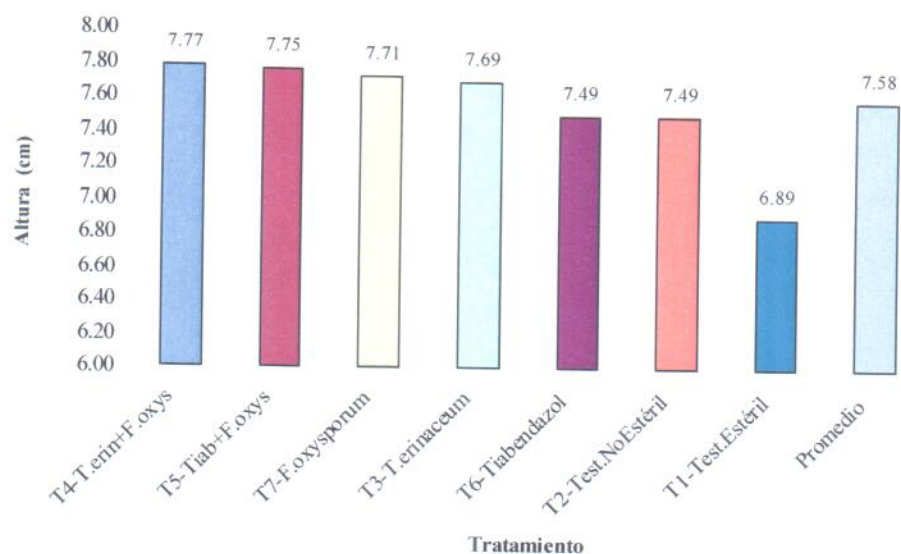


Figura 15. Alturas promedio por tratamiento en *P. michoacana* (Inoculación 1).

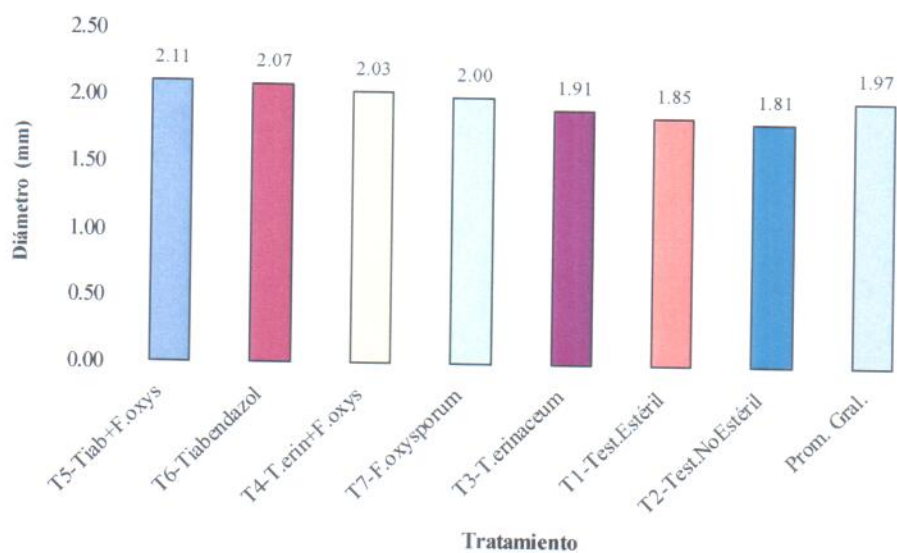


Figura 16. Diámetros promedio por tratamiento en *P. michoacana* (Inoculación 1).

Inoculación 2

Después de haberse realizado la segunda inoculación a las plántulas, posterior a la segunda inoculación, se tomaron mediciones resultando una altura promedio de 7.97 cm,

la diferencia con respecto a la primera inoculación fue de 0.39 cm. El T3 (*T. erinaceum*) fue el que tuvo mayor crecimiento en altura con 8.62 cm, de tal manera que con esta aplicación se vio favorecido en cuanto a altura promedio, así también para el diámetro, cuyo promedio fue de 2.43 mm, la diferencia respecto a inoculación 1 de este tratamiento es de 0.52 mm. El promedio general de diámetro fue de 2.28 mm, cuya diferencia es de 0.31 mm. Los tratamientos testigo T1 (Testigo con sustrato estéril) y T2 (Testigo con sustrato no estéril) tuvieron los resultados mas bajos de altura promedio, en cambio, los que recibieron algún tratamiento de protección, ya sea biológico o químico, tuvieron alturas promedio más altas, incluso aquellos que fueron inoculados con el patógeno con y sin protección previa al patógeno (Figuras 17 y 18).

De acuerdo al análisis de varianza con GLM en *P. michoacana*, se rechazó también la hipótesis nula de que todos los tratamientos son iguales y se aceptó la hipótesis alternativa de que al menos uno es diferente (Cuadro 9 y 10).

Cuadro 9. Análisis de varianza para la variable diámetro en *P. michoacana* (Inoculación 2).

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Pr>F
Modelo	32	24.9579788	0.7799368	3.14	<0.0001
Error	528	131.2439349	0.2485681		
Total	560	156.2019137			

Cuadro 10. Análisis de varianza para la variable altura en *P. michoacana* (Inoculación 2).

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Pr>F
Modelo	32	176.508481	5.515890	2.94	<0.0001
Error	528	991.748418	1.878311		
Total	560	1168.256898			

Mediante una prueba de comparación de medias y con la prueba de Tukey se determinó cual tratamiento, para las variables diámetro y altura, es diferente a los demás. Existe un efecto altamente significativo entre tratamientos sobre diámetro y altura. En cuanto a la variable diámetro, el T3 (*T. erinaceum*) se comportó mejor obteniendo la mayor media de tal manera que fue el mejor como se esperaba, además de que no es significativamente diferente con el T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*). Son estadísticamente diferentes a los demás. *T. erinaceum* benefició el desarrollo en diámetro de las plántulas de esta especie. Los tratamientos que tuvieron comportamiento semejante en tal variable fueron T2 (Testigo con sustrato no estéril), T5 (Tiabendazol + *F. oxysporum*) y T7 (*F. oxysporum*), de tal manera que son estadísticamente diferentes a los anteriores. Quedó en los niveles más bajos el tratamiento T1 (Testigo con sustrato estéril) mostrando una vez más que no se favoreció en nada con este procedimiento.

Respecto a la altura, el T3 (*T. erinaceum*) también tuvo la mayor media, por lo tanto, también es estadísticamente diferente a los demás tratamientos. Los tratamientos T7 (*F. oxysporum*), T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*), T5 (Tiabendazol + *F. oxysporum*) y T6 (Tiabendazol) manifestaron un comportamiento similar de tal manera que no se pudo diferenciar entre aplicación de fungicida biológico y fungicida químico, es decir, no son significativamente diferentes. Los tratamientos testigo T1 (Testigo con sustrato estéril) y T2 (Testigo con sustrato no estéril) no mostraron diferencia, de tal forma que esterilizar o no el sustrato mostró la misma condición.

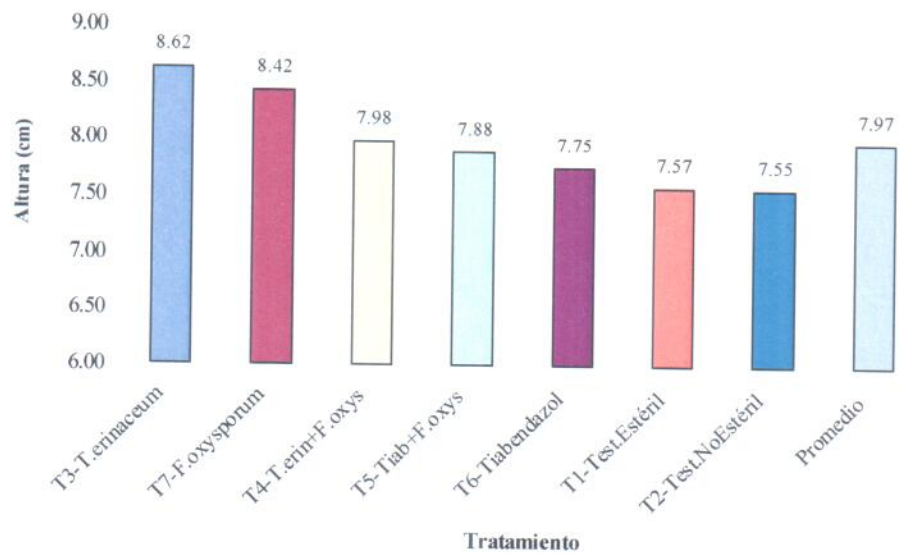


Figura 17. Alturas promedio por tratamiento en *P. michoacana* (Inoculación 2).

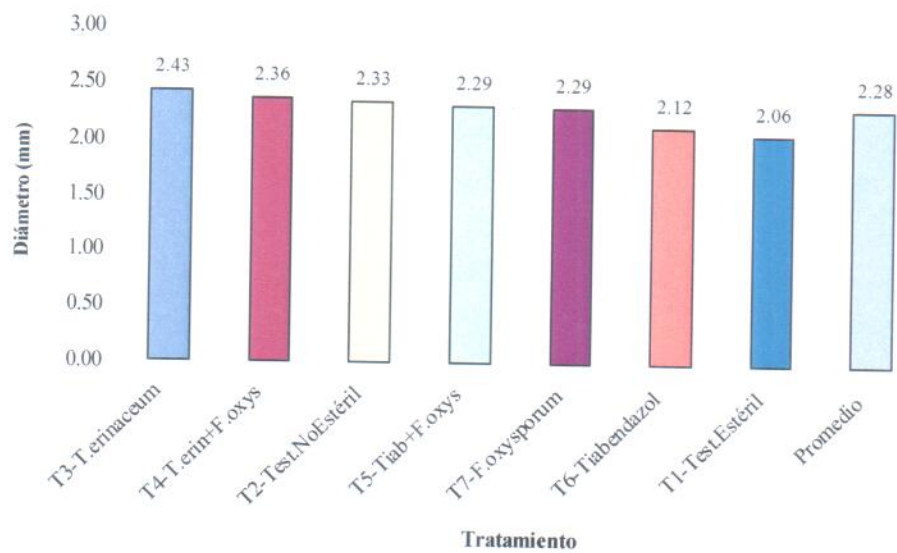


Figura 18. Diámetros promedio por tratamiento en *P. michoacana* (Inoculación 2).

Al concluir esta parte de la experimentación, se realizó una comparación visual de la altura y diámetro de las plántulas de cada tratamiento, haciendo notar los beneficios que aporta el control biológico con *T. erinaceum* (Figura 19).



Figura 19. Comparación de alturas y diámetros de *P. michoacana*. **A:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T1 (Testigo con sustrato estéril). **B:** T3 (*T. erinaceum*). **C:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*). **D:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T5 (Tiabendazol + *F. oxysporum*). **E:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T6 (Tiabendazol). **F:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T7 (*F. oxysporum*). Comparación de diámetros de *P. michoacana*. **G, H:** T3 (*T. erinaceum*). **I:** T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*). **J:** T5 (Tiabendazol + *F. oxysporum*). **K:** T7 (*F. oxysporum*). **L:** T6 (Tiabendazol).

4.8. Diámetro y altura para *P. pseudostrobis*

Inoculación 1

Las variables diámetro y altura se analizaron mediante el procedimiento estadístico de análisis de varianza con PROC GLM en el programa SAS con una confiabilidad de 95% y $\alpha = 0.05$ después de cada inoculación.

Posterior a la primera inoculación, con los datos obtenidos, la altura promedio fue de 6.30 cm, el tratamiento T7 (*F. oxysporum*) tuvo el mayor promedio con 6.72 cm, seguido del tratamiento T5 (Tiabendazol + *F. oxysporum*) que tuvo un promedio en diámetro de 6.68 cm. Los promedios de altura mas bajos fueron para los tratamientos T3 (*T. erinaceum*) y T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*) con 5.84 y 5.59 cm respectivamente (Figura 20).

La variable diámetro tuvo mejor promedio en el tratamiento T5 (Tiabendazol + *F. oxysporum*) 1.86 mm, el tratamiento T7 (*F. oxysporum*) también mostró resultados favorables con un diámetro promedio de 1.80 mm. En este caso, también los tratamientos en los que se empleó *T. erinaceum* tuvieron promedios bajos de diámetro, siendo únicamente mayores que el tratamiento T1 (Testigo con sustrato estéril). El promedio en todos los tratamientos fue de 1.74 mm, el resto de los tratamientos quedan intermedios de tal manera que tanto los que recibieron algún tratamiento de protección, protección-inoculación con patógeno, sustrato estéril y sin esterilizar reaccionaron de la misma forma sin notarse clara diferencia entre uno y otro (Figura 21).

Para el caso de diámetro y altura en *P. pseudostrobis* y de acuerdo al análisis de varianza, se rechaza la hipótesis nula de que todos los tratamientos son iguales y se acepta la hipótesis alternativa de que al menos uno es diferente (Cuadro 11 y 12).

Cuadro 11. Análisis de varianza para la variable diámetro en *P. pseudostrobis* (Inoculación 1).

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Pr>F
Modelo	32	10.8995504	0.3406110	1.92	0.0020
Error	542	96.0508409	0.1772156		
Total	574	106.9503913			

Cuadro 12. Análisis de varianza para la variable altura en *P. pseudostrobis* (Inoculación 1).

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Pr>F
Modelo	32	155.856260	4.870508	2.61	<0.0001
Error	542	1011.805061	1.866799		
Total	574	1167.661322			

A través de la prueba de Tukey se determinó que para la variable diámetro, cinco de los siete tratamientos responden de forma similar, incluyéndose en estos, aquellos en los que se empleó tiabendazol como control químico T5 (Tiabendazol + *F. oxysporum*) (mejor tratamiento para esta variable), el tratamiento en que se utilizó *F. oxysporum* (T7) y el T3 (*T. erinaceum*) no son significativamente diferentes respecto al primero (T5 (Tiabendazol + *F. oxysporum*)), pero si son estadísticamente diferentes al T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*) y T1 (Testigo con sustrato estéril) con valores mas bajos y por tanto, menos recomendables.

Así, se concluye que es recomendable aplicar tratamientos post-emergentes con control biológico como *T. erinaceum* y control químico con tiabendazol para evitar reducción en el desarrollo de las plantas.

En la variable altura, el T5 (Tiabendazol + *F. oxysporum*) tuvo respuesta favorable, siendo el tratamiento que tuvo el mejor resultado, dicho tratamiento no tuvo comportamiento significativo respecto al T7 (*F. oxysporum*) y al T2 (Testigo con sustrato no estéril). Los

tratamientos T3 (*T. erinaceum*) y T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*) en los que se utilizó el hongo antagonista no tienen diferencia significativa y son lo que menos media mostraron, de tal manera que son los menos recomendables (con solo una inoculación) si lo que se busca es favorecer la altura.

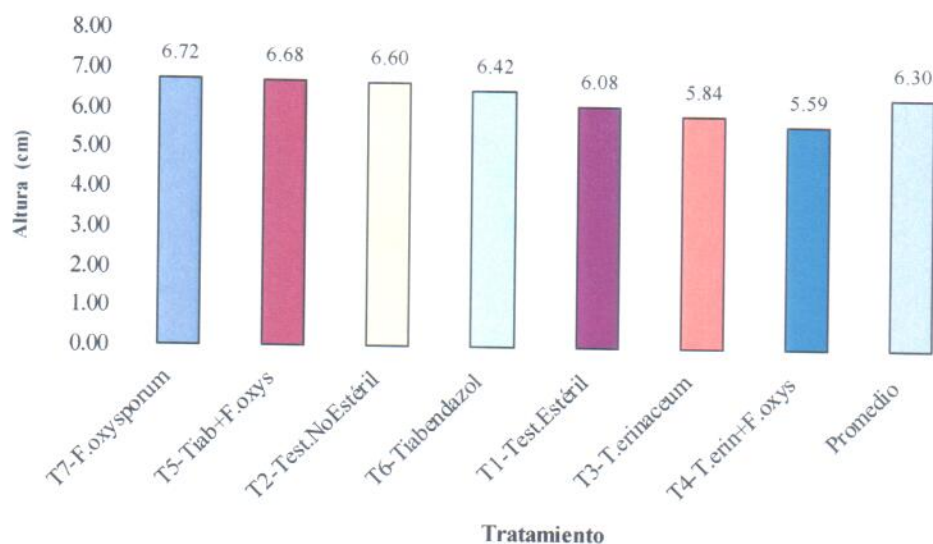


Figura 20. Alturas promedio por tratamiento en *P. pseudostrobilus* (Inoculación 1).

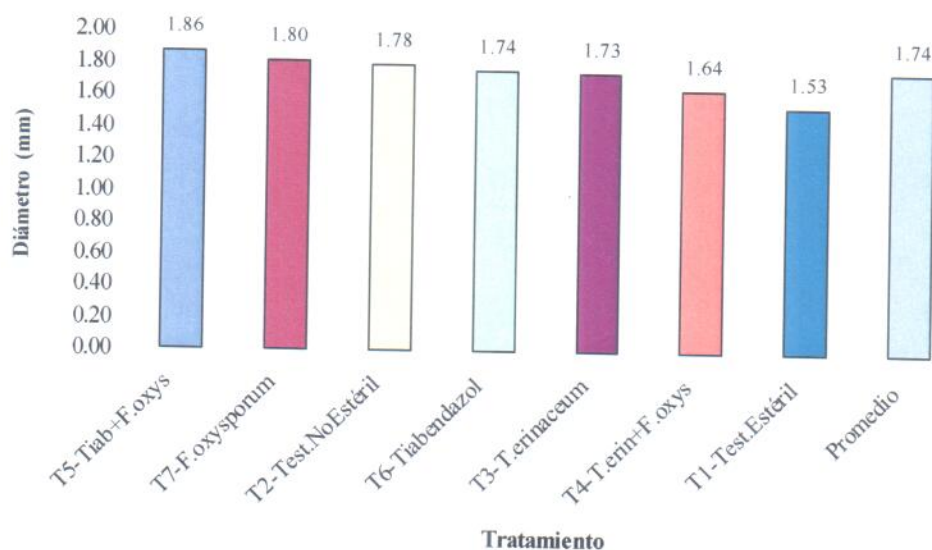


Figura 21. Diámetros promedio por tratamiento en *P. pseudostrobilus* (Inoculación 1).

Inoculación 2

Las variables diámetro y altura se analizaron también mediante análisis de varianza en el programa SAS con una confiabilidad de 95% y $\alpha = 0.05$ después de cada inoculación.

Posterior a la segunda inoculación y a su vez, la segunda medición, se tiene que la altura promedio fue de 7.85 cm, mostrando una diferencia respecto a la primera de 1.55 cm. El tratamiento que mayor altura promedio tuvo fue el T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*), con 8.01 cm. El segundo fue el T3 (*T. erinaceum*) con 7.96 cm. Los dos tratamientos en los que se empleó el fungicida químico quedaron intermedios, mostrando un buen resultado aunque claramente se observa que el fungicida biológico favoreció el desarrollo en diámetro y altura de las plántulas con respecto a la primera inoculación. El tratamiento con esterilización de sustrato T1 (Testigo con sustrato estéril) tuvo el promedio de altura más bajo, esto pudo deberse a que la cantidad de repeticiones utilizadas fue de 3 y no de 5 como en el resto de los tratamientos, por tanto, la cantidad de plantas fue menor (Figura 22).

La variable diámetro tuvo mejor promedio en el tratamiento T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*) con 2.18 mm, el tratamiento T3 (*T. erinaceum*) también mostró resultados favorables con un diámetro promedio de 1.91 mm. El promedio en todos los tratamientos fue de 1.85 mm. Los demás tratamientos manifestaron comportamientos similares, por tanto, la utilización de fungicida químico y esterilización de sustrato es indistinto para obtener resultados diferentes considerablemente. Los tratamientos T7 (*F. oxysporum*) y T1 (Testigo con sustrato estéril) son los que tuvieron diámetros promedio mas bajos, con 1.82 y 1.45 mm respectivamente (Figura 23).

Para el caso de diámetro y altura en *P. pseudostrobus* y de acuerdo al análisis de varianza, se rechaza la hipótesis nula de que todos los tratamientos son iguales y se acepta la hipótesis alternativa de que al menos uno es diferente (Cuadro 13 y 14).

Cuadro 13. Análisis de varianza para la variable diámetro en *P. pseudostrobus* (Inoculación 2).

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Pr>F
Modelo	32	27.3721659	0.8553802	4.35	<0.0001
Error	427	83.8853078	0.1964527		
Total	459	111.2574737			

Cuadro 14. Análisis de varianza para la variable altura en *P. pseudostrobus* (Inoculación 2).

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Pr>F
Modelo	32	149.976433	4.686764	1.82	0.0048
Error	427	1099.111393	2.574031		
Total	459	1249.087826			

A través de la prueba de Tukey se determinó que para la variable diámetro, el tratamiento que resultó mejor es el T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*), cinco de los siete tratamientos respondieron de forma similar, de tal manera que no hay diferencia significativa entre éstos, pero si hay diferencia estadística respecto al T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*), excepto en el tratamiento T1 (Testigo con sustrato estéril) que de acuerdo a los resultados obtenidos, es estadísticamente diferente a todos los anteriores y a su vez, el menos recomendable por lo resultados bajos que mostró. Por tanto, se concluye que es recomendable aplicar tratamientos post-emergentes con control biológico como *T. erinaceum* y control químico con tiabendazol para evitar reducción en el desarrollo de las plantas.

En la variable altura, cinco de los siete tratamientos no son significativamente diferentes: el tratamiento que resultó mejor fue también el T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*), seguido

del T3 (*T. erinaceum*), después T2 (Testigo con sustrato no estéril), T5 (Tiabendazol + *F. oxysporum*) y T6 (Tiabendazol). Los tratamientos T7 (*F. oxysporum*) y T1 (Testigo con sustrato estéril) no son significativamente diferentes entre sí pero si estadísticamente diferentes con el grupo anterior.

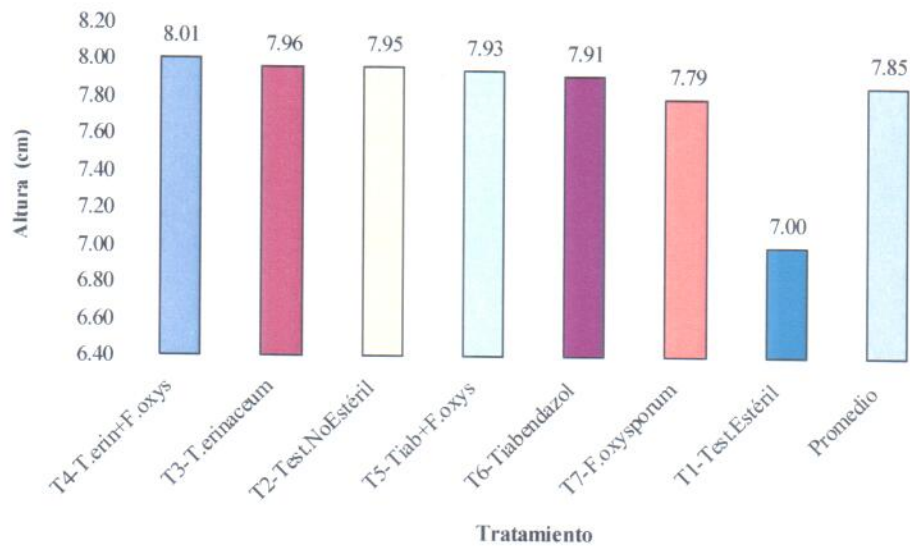


Figura 22. Alturas promedio por tratamiento en *P. pseudostrobilus* (Inoculación 2).

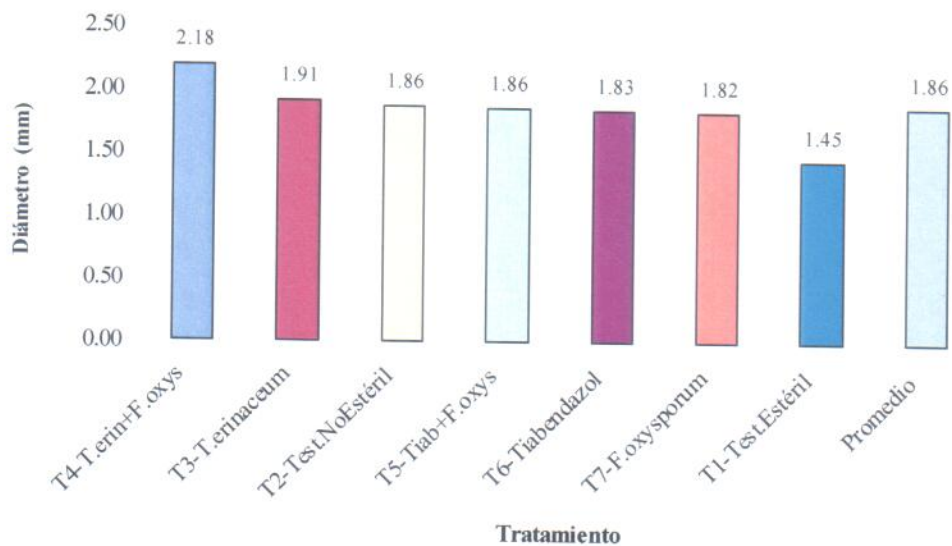


Figura 23. Diámetros promedio por tratamiento en *P. pseudostrobilus* (Inoculación 2).

De la misma forma, al concluir esta parte de la experimentación, se realizó una comparación visual de la altura y diámetro de las plántulas de cada tratamiento, haciendo notar los beneficios que aporta el control biológico con *T. erinaceum* (Figura 24).

Es importante comentar que la medición a las plántulas en diámetro y altura se hizo 15 días después de cada inoculación. A esto se atribuye que la diferencia de dichas variables entre una inoculación y la siguiente sea baja ya que aún el organismo antagonista no surtía el efecto total.

Otro punto de importancia es que en la segunda y última inoculación, los diámetros y alturas se elevaron en los tratamientos en los que se empleó *T. erinaceum* a diferencia de los obtenidos en la primera quedando éstos mas abajo del tratamiento en que se aplicó el hongo patógeno, aún cuando la toma de datos se hizo 15 días después de la aplicación. Se denota que esa mejoría se debió a la aplicación del hongo antagonista y a que ya se manifestó el efecto de la primera inoculación.

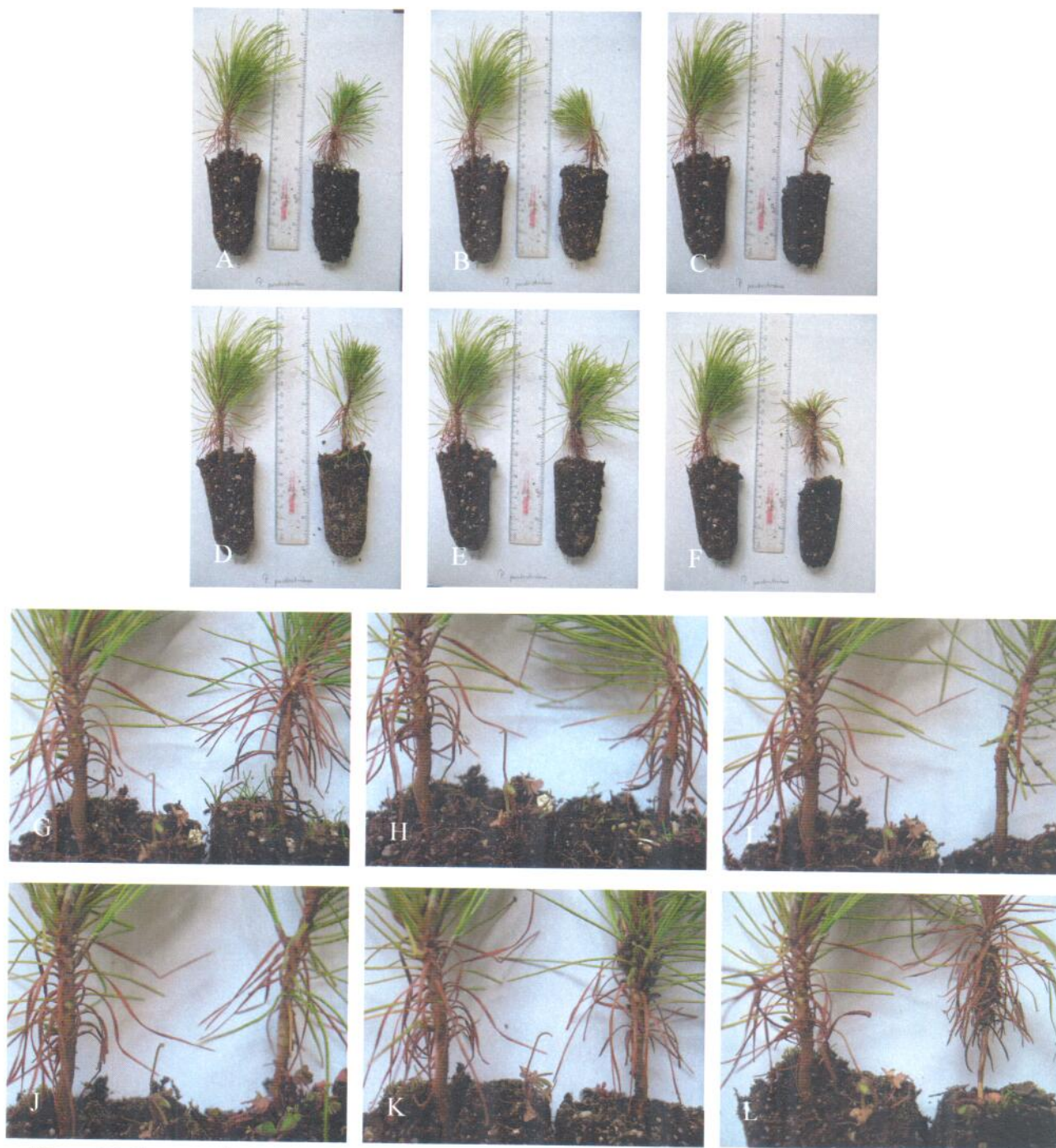


Figura 24. Comparación de alturas y diámetros de *P. pseudostrobus*. **A:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T1 (Testigo con sustrato estéril). **B:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T2 (Testigo con sustrato no estéril). **C:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*). **D:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T5 (Tiabendazol). **E:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T6 (Tiabendazol + *F. oxysporum*). **F:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T7 (*F. oxysporum*). Comparación de diámetros de *P. pseudostrobus*. **G:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T1 (Testigo con sustrato estéril). **H:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T2 (Testigo con sustrato no estéril). **I:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*). **J:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T5 (Tiabendazol). **K:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T6 (Tiabendazol + *F. oxysporum*). **L:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T7 (*F. oxysporum*).

4.9. Materia seca de raíz de *Pinus michoacana* y *Pinus pseudostrobus*

Con los datos obtenidos de peso inicial y peso final de 248 raíces de *P. michoacana* y 202 raíces de *P. pseudostrobus* se obtuvo el porcentaje de materia seca por tratamiento de cada especie. La especie *P. pseudostrobus* tuvo un porcentaje general de 67.2%, ligeramente mayor a *P. michoacana* con 66.3% (Figura 27 y 28).

Para el caso de *P. michoacana* el T3 (*T. erinaceum*) tuvo el porcentaje medio más alto con 70.1%, seguido del T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*) con porcentaje promedio de materia seca de 70%, mostrando resultados esperados con los tratamientos aplicados. El T1 (Testigo con sustrato estéril) tuvo el porcentaje mas bajo con 60.2%, de tal manera que esterilizar el sustrato no le favoreció ya que el T2 (Testigo con sustrato no estéril) estuvo entre los promedios mas altos. Los tratamientos bajo control químico tuvieron porcentajes parecidos ubicados en la parte media de los tratamientos evaluados (Figura 25).

La figura 26 muestra el porcentaje de materia seca entre tratamientos de *P. pseudostrobus*. El comportamiento es muy similar entre éstos, el mayor porcentaje se obtuvo en el T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*) con 75.9% y el menor en T5 (Tiabendazol + *F. oxysporum*) y T6 (Tiabendazol) con 62.6% para cada uno. A diferencia de la otra especie, el T1 (Testigo con sustrato estéril) tuvo valor alto con 69.2%, de tal forma que aquí si hubo beneficios con la esterilización del sustrato.

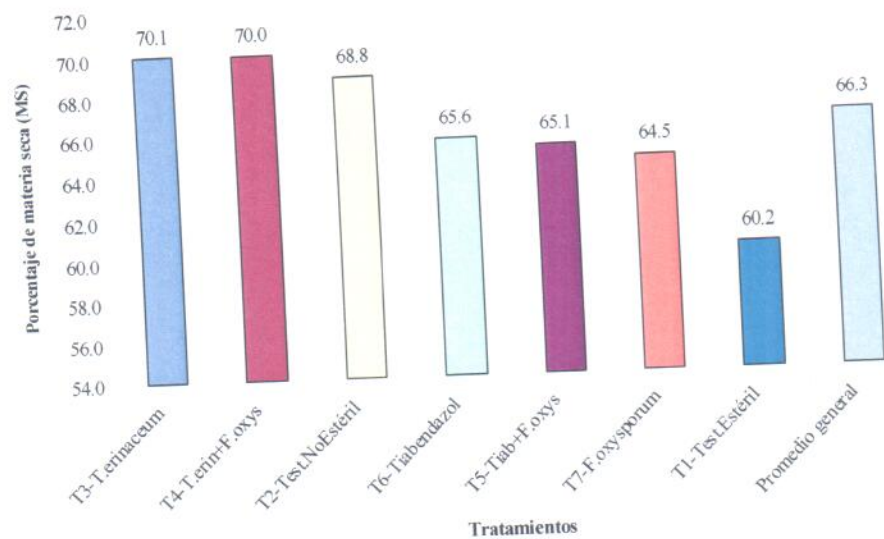


Figura 25. Porcentaje de materia seca en *P. michoacana*.

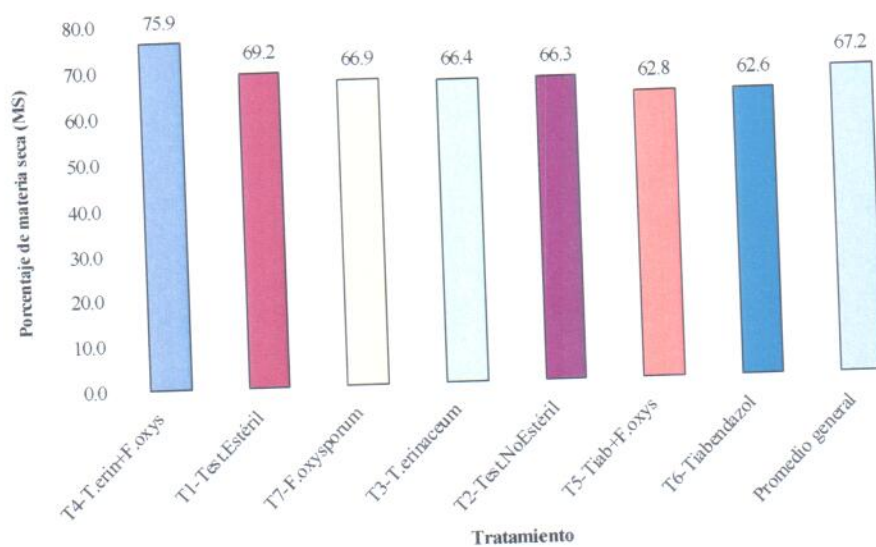


Figura 26. Porcentaje de materia seca en *P. pseudostrobilus*.

Con los datos individuales de peso seco (materia seca) de cada raíz en gramos (g) por especie, se realizó el análisis estadístico, con una confiabilidad de 95% y un $\alpha = 0.05$. Para ello, se planteó la hipótesis nula de que todos los tratamientos son iguales contra la hipótesis alternativa de que al menos uno es diferente.

De acuerdo al análisis de varianza en *P. michoacana*, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa (Cuadro 15).

Cuadro 15. Análisis de varianza para la variable materia seca en *P. michoacana*.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Pr>F
Modelo	38	1.16390081	0.03062897	3.90	<.0001
Error	209	1.64059967	0.00784976		
Total	247	2.8045 0048			

Mediante una comparación de medias con la prueba Tukey se determinó la diferencia entre tratamientos. El T3 (*T. erinaceum*) es el que mayor peso promedio (0.38 g) y por lo tanto, proporcionó robustez y densidad de raíces, de tal manera que es el tratamiento mas recomendable ya que estadísticamente resultó ser el mejor, también el T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*) arrojó resultados favorables (0.36 g), indicando que aún con la aplicación del patógeno no se vio afectado su desarrollo pues previamente se había inoculado con el antagonista (*T. erinaceum*).

Ambos tratamientos no son significativamente diferentes entre sí, sin embargo, muestran diferencia estadística con el resto de los tratamientos. Los tratamientos T6 (Tiabendazol), T2 (Testigo con sustrato no estéril), T5 (Tiabendazol + *F. oxysporum*) y T7 (*F. oxysporum*)

no resultaron significativamente diferentes entre sí, de tal manera que es indistinto aplicar uno u otro. En este estudio, no resultó favorable la esterilización del sustrato antes de la siembra, ya que en este caso el tratamiento (T1 (Testigo con sustrato estéril) tuvo el resultado mas bajo (0.18 g), por tanto, es menos recomendable.

Al realizar el análisis de varianza de la variable materia seca de *P. pseudostrobus*, se rechaza también la hipótesis nula de que todos los tratamientos son iguales y se acepta la alternativa que indica que al menos uno es diferente (Cuadro16).

Cuadro 16. Análisis de varianza para la variable materia seca en *P. pseudostrobus*.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Pr>F
Modelo	48	0.46860965	0.00976270	2.55	<.0001
Error	153	0.58465075	0.00382125		
Total	201	1.05326040			

Con la comparación de medias mediante la prueba Tukey, se obtiene que el tratamiento que mejor benefició en cuanto a cantidad de materia seca en esta especie fue el T3 (*T. erinaceum*) con 0.25 g en promedio, así podemos confirmar que la inoculación con *T. erinaceum* favorece el desarrollo de raíces en las plántulas. El tratamiento que le sigue fue el T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*) con 0.23 g, se vio reducido el efecto de *T. erinaceum* ya que se inoculó también el hongo patógeno. Estos dos tratamientos no tienen diferencia significativa entre sí, pero si con el resto de los otros. El T1 (Testigo con sustrato estéril) mostró el resultado más bajo en esta prueba (0.15 g).

Al concluir la investigación y de acuerdo a las hipótesis iniciales planteadas, se acepta la hipótesis nula (H_{01}) de que tanto el control biológico (*T. erinaceum*) como el control químico (tiabendazol) reducen el ataque de agentes causales de enfermedad como a *F. oxysporum* haciendo como mínimo dos aplicaciones posteriores a la germinación de hongos antagonistas durante la producción de planta en vivero de *Pinus michoacana* y *Pinus pseudostrobus*.

Ambas especies son susceptibles al ataque de dicho patógeno, aunque resultó mas sensible *Pinus pseudostrobus* tanto en número de plántulas vivas, así como tener el menor promedio total en el diámetro y altura de la plántula y la materia seca en la raíz. *T. erinaceum* inhibe el crecimiento y/o evita la presencia de hongos del suelo causantes de pudrición en la raíz además de que favorece el desarrollo de la misma en cantidad y por lo tanto, en peso de materia seca que se refleja en mejor crecimiento de la planta.

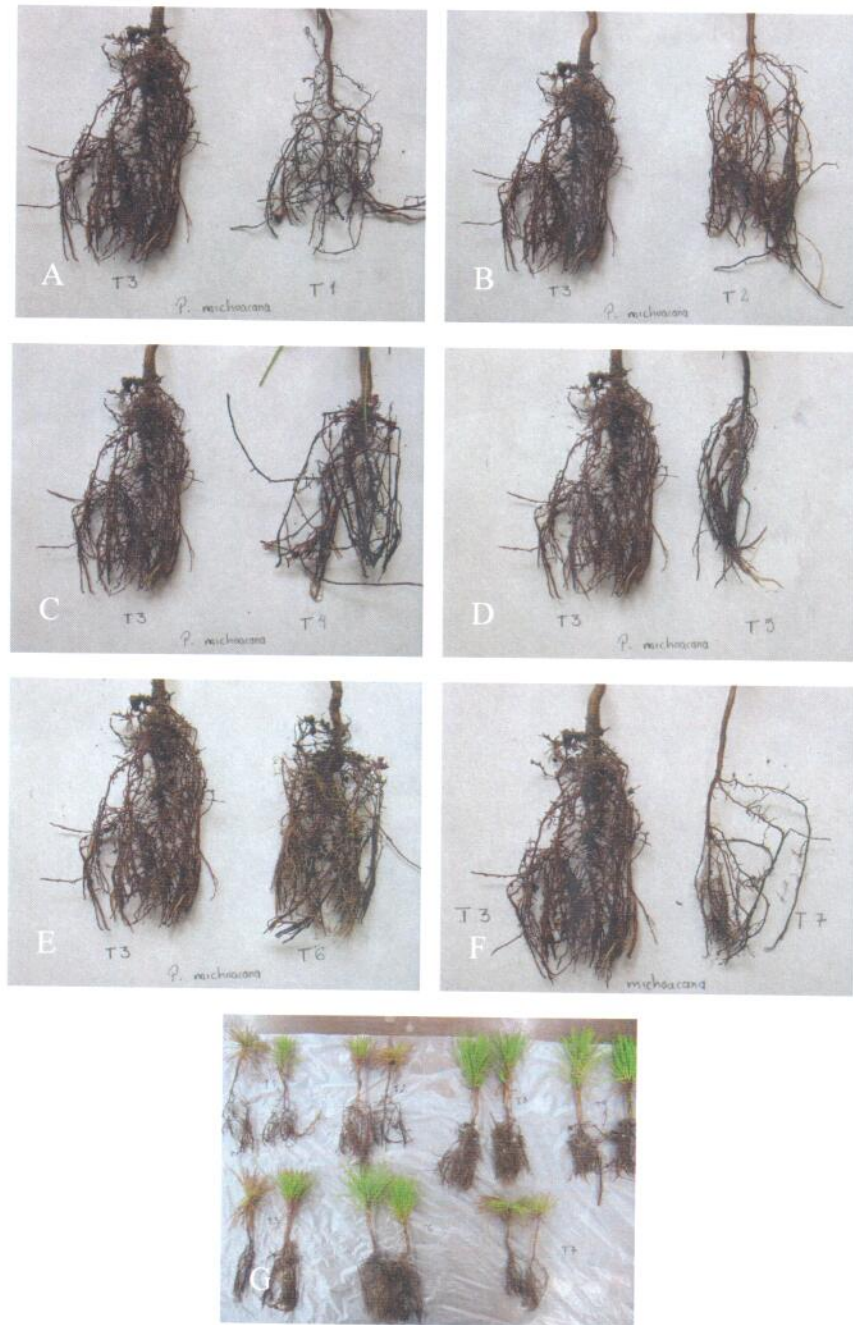


Figura 27. Comparación entre tratamientos de *Pinus michoacana* para materia seca. **A:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T1 (Testigo con sustrato estéril). **B:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T2 (Testigo con sustrato no estéril). **C:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*). **D:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T5 (Tiabendazol + *F. oxysporum*). **E:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T6 (Tiabendazol). **F:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T7 (*F. oxysporum*). **G:** Comparación de cantidad de follaje y raíz en los siete tratamientos.

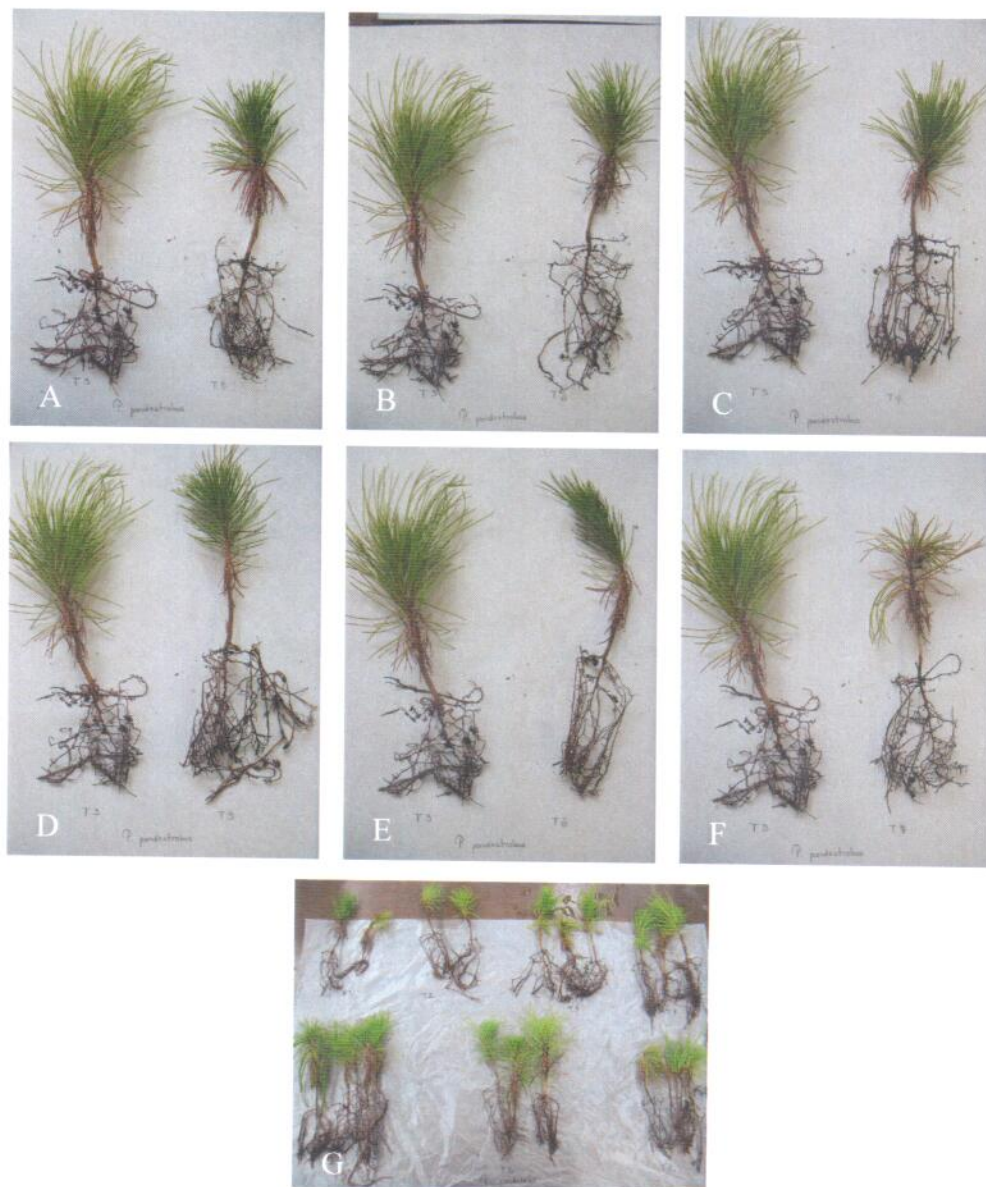


Figura 28. Comparación entre tratamientos de *Pinus pseudostrobus* para materia seca. **A:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T1 (Testigo con sustrato estéril). **B:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T2 (Testigo con sustrato no estéril). **C:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*). **D:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T5 (Tiabendazol + *F. oxysporum*). **E:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T6 (Tiabendazol). **F:** T3 (*T. erinaceum*) vs. T7 (*F. oxysporum*). **G:** Comparación de cantidad de follaje y raíz en los siete tratamientos.

5. CONCLUSIONES

Trichoderma erinaceum es un excelente antagonista que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento así como de micoparasitar a *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp. y *Cylindrocladium* sp.

En el bioensayo *T. erinaceum* resultó ser un excelente hongo antagonista de *F. oxysporum*, *Phytophthora* sp., *Cylindrocladium* sp. y *Fusarium* sp. logrando inhibir casi al 100% el crecimiento de la colonia de los patógenos a través de mecanismos de acción como micoparasitismo.

Trichoderma erinaceum presentó una alta capacidad de competencia por el sustrato, como consecuencia de ello, el organismo afectado (*Fusarium oxysporum*) tiende a iniciar un estado de latencia que podría ser por deficiencia de nutrientes o la presencia de cierto nivel de sustancias inhibitorias propias del biofungicida.

Durante la producción en vivero se está sujeto al ataque de plagas y enfermedades que reducen en gran porcentaje la cantidad y calidad de las plantas, lo cual se traduce en pérdidas e inversiones sin éxito.

De tal manera que tanto el control químico como el control biológico de las mismas, ofrecen una alternativa de mejorar las condiciones y a su vez, elevar la producción con calidad y cantidad.

Al evaluar ambos tipos de control en este experimento, se pudo constatar que las plantas se ven favorecidas con dichas prácticas, teniéndose mejores resultados en los tratamientos en los que se empleó *T. erinaceum* (fungicida biológico) sin dejar de lado lo que ayudó el Tiabendazol (fungicida químico) aún cuando genera mayor impacto ambiental y solamente contrarresta el ataque de patógenos, a diferencia del antagonista que además de eso, se incrementa el crecimiento y desarrollo de las plantas y la cantidad de raíz al evitar el ataque de hongos del suelo.

Las especies *Pinus michoacana* y *Pinus pseudostrobus* son susceptibles al ataque de *Fusarium oxysporum* durante la fase de producción en vivero, siendo ésta la que presenta mayor afectación y merma en el porcentaje de germinación, así como desarrollo de las plántulas. El hongo antagonista *Trichoderma erinaceum* mostró ser control biológico efectivo del patógeno con tratamientos a la semilla como protección e inoculaciones posteriores a la germinación con inyecciones dirigidas al sustrato.

A pesar de que el biocontrolador *T. erinaceum* no logró completamente la efectividad en el control de la enfermedad causada por *F. oxysporum* en las plantas que fueron inoculadas con este patógeno y comparable a lo obtenido con el fungicida químico tiabendazol, se observa que existe mayor crecimiento en masa de raíces en los

tratamientos en los que se incorporó el antagonista, de tal manera que actúa como promotor de crecimiento.

El antagonista, además de controlar al fitopatógeno produjo un efecto positivo en el desarrollo radical, así como el aumento de la cantidad de follaje de la parte aérea de las plantas.

Trichoderma erinaceum demostró que puede utilizarse en el control de *Fusarium oxysporum* durante la producción de planta en vivero de *P. michoacana* y *P. pseudostrobilus* como tratamiento preventivo al momento de la siembra con inoculación a la semilla y funcionó mucho mejor con aplicaciones posteriores a la emergencia de la plántula, controlando factores como viabilidad y calidad del germoplasma, método y época de siembra, riego, sustratos, temperatura, etc.

Dos aplicaciones post-emergencia de hongos antagonistas (*Trichoderma erinaceum*) favorecieron y garantizaron éxito en el desarrollo y crecimiento de las plántulas, así como la merma en la cantidad de inóculo de organismos patógenos (*Fusarium oxysporum*).

6. RECOMENDACIONES

De los resultados de esta investigación, se desprenden las siguientes recomendaciones:

- ✓ Durante la producción de planta en vivero, se deben hacer monitoreos a diario ya que la presencia de un foco de ataque se propaga rápidamente si no se le controla a tiempo.
- ✓ Para obtener mejores resultados de control de enfermedades durante la producción de planta en vivero se recomienda inocular las semillas previamente a la siembra con la mezcla de las cepas de *Trichoderma erinaceum* o algún producto comercial antagonista.
- ✓ Realizar la siembra en épocas adecuadas para evitar disminución en porcentaje de germinación o muerte de plántulas recién emergidas por la presencia de heladas o en condiciones que favorezcan el desarrollo de hongos causantes de enfermedades por el alto porcentaje de humedad relativa.
- ✓ Realizar mínimo dos aplicaciones (inyección al sustrato por cavidad) de *T. erinaceum* posteriores a la germinación para disminuir a través de sus mecanismos de acción como micoparasitismo el inóculo de hongos patógenos como *F. oxysporum*.

- ✓ El uso de fungicidas químico como Tiabendazol es efectivo en el control de hongos causantes de enfermedad, pero se tiene por otro lado, el daño al ambiente y además, sólo es un controlador del patógeno, sin aportar beneficios a la planta como lo hace el control biológico que favorece el desarrollo radical e incremento en altura.
- ✓ Tomar las mediciones de diámetros y alturas mínimo al mes de haber realizado la inoculación para dar al hongo antagonista el tiempo suficiente de manifestarse y ejercer los mecanismos de acción necesarios para evitar la presencia de patógenos.
- ✓ Realizar estudios sobre el impacto de la aplicación de *Trichoderma* y la micorrización.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ALEXOPOULUS, C. J., C. W. Mimes, and M. Blackwell, M. 1996. Introductory mycology, 4h ed. John Wiley. New York, New York, USA. 638 p.
- ANÓNIMO. 1997. Plagas de semillas forestales en América Central y el Caribe. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Serie Técnica. Manual Técnico No. 25. Turrialba, Costa Rica. 113 p.
- BARNNET, H. L. y BARRY, B. H. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth Ed. Mcmillan Publishing Company. Minneapolis, Minnesota. 241 p.
- BARNNET, H. L. y BARRY, B. H. 1987. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth Ed. Mcmillan Publishing Company. Minneapolis, Minnesota. 241 p.
- BARNNET, J. P. 1996. How seed orchard culture affects seed quality: experience with the southern pines. The Forestry Chronicle. Vol. 72. No. 5. 35 p.
- BASSI., T. 2007. Conceptos básicos sobre la calidad de los forrajes. Facultad de ciencias agrarias. Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Buenos Aires, Argentina.
<http://www.unlz.edu.ar/biblioteca/>
- BERISTAIN., D. F. I. 1980. Influencia del pH del agua de riego en la incidencia del Damping-off y desarrollo de dos especies de pino en almácigo. Tesis de licenciatura Ingeniero agrónomo especialista en bosques. División de Ciencias forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 92 p.

- BOYCE, 1961. Forest pathology. McGraw-Hill. Third edition. Yale University. Unites States of America. 572 p.
- CIBRIÁN., T. D. 2001. Manual para la identificación y manejo de las plagas y enfermedades forestales del estado de Jalisco. División de Ciencias forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 101 p.
- CIBRIÁN., T. D. 2006. Plagas y enfermedades en viveros forestales. División de Ciencias forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 101 p.
- CID., 2005. Control biológico de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Fusarium solani* en tomates bajo invernaderos. Departamento de Sanidad Vegetal. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Santiago, Chile. 6 p.
http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegre_j/14.html
- DEBACH., P. 1975. Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. Tercera impresión. Trad. de la 1ª. Ed. en Inglés por Carlos Manuel Castaños en 1968. México. Editorial CECSA. Compañía Editorial Continental. 949 p.
- DON JUAN., M. B. 2006. Efectividad biológica de *Trichoderma* spp contra hongos causantes de Damping-off en viveros forestales. Tesis de maestría en ciencias en ciencias forestales. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 67 p.
- ESTERIO., M. y AUGER., J. 2005. Uso de Trichodex en Chile para el control de *Botrytis cinerea* en uva de mesa. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 6 p.
http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegre_j/4.html

- GARCÍA, E. 1981. Modificaciones al sistema climático de Köppen. Instituto de Geografía de la Universidad Autónoma de México. Tercera Edición. México 252 p.
- GARCÍA., D. S. E. 1990. Agentes causales del cancro y marchitamiento de brotes en plántulas de *Pseudotsuga macrolepis* Flous (Abeto). Tesis de licenciatura Ingeniero agrónomo especialista en parasitología agrícola. Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez". Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Uruapan; Michoacán. México. 47 p.
- GARCÍA D., S., E., D. CIBRIÁN T. y D. ALVARADO R. 2007. Damping-off y pudrición de raíz por *Fusarium*. pp 502-504. In: Cibrián T., D., D. Alvarado R. y S. E. García D. (eds). 2007. Enfermedades Forestales en México/orest Diseases in Mexico. Universidad Autónoma Chapingo; CONAFOR-SEMARNAT, México; Forest Service USDA, EUA; Canadian Forest Service NRCAN, Canadá y COFAN, FAO. Chapingo, México. 587 p.
- GARCÍA., J. J. 2003. Análisis económico del control biológico del psilido del eucalipto en la ciudad de México. Tesis de maestría en ciencias en ciencias forestales. División de Ciencias forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 92 p.
- GONZÁLEZ., B. F. I. 1979. Comparación de diferentes tratamientos al sustrato para el control de "secadera" en *Pinus montezumae* Lamb. y *Pinus pseudostrobus* var. *oaxacana* Mtz. en vivero. Tesis de licenciatura Ingeniero agrónomo especialista en bosques. División de Ciencias forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 84 p.
- HANSEN., E. M. y LEWIS, K. J. 2003. Plagas y enfermedades de las coníferas. The American Phytopathological Society. España. 101 p.

- HARMAN, G. E. 2007. *Trichoderma species, opportunistic avirulent plant symbionts*. Departments of Horticultural Sciences and Plant Pathology. Cornell, University. Geneva. New York. Volumen 2. 14 p.
http://www.weizmann.ac.il/Biological_Chemistry/scientist/Chet/NR.pdf (Octubre, 2007).
- LOPEZ., 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 de licenciatura. Parasitología Forestal. Universidad Autónoma Chapingo. México. 74 p.
- LOZOYA, S. H., COYOTE, P. M., FERRERA, C. R., y LARA, H. E. 2006. Antagonismo microbiano contra *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Agrociencias. 40:491-499.
- MARTINEZ., M. 1948. Los Pinos Mexicanos. Ediciones Botas. México, D.F. 361 p.
- MARTINEZ., M. 1992. Los Pinos Mexicanos. Tercera Ed. Ediciones Botas. México, D.F. 260 p.
- MARTÍNEZ., R. A. 2000. *Fusarium oxysporum* Schl. como agente causal del estrangulamiento de tallo de *Pseudotsuga macrolepis* Flous y *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* Shaw en plantas de vivero. Tesis de licenciatura. División de Ciencias forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 89 p.
- MONTEALEGRE, A. J. R. 2005(a). Perspectivas y situación del uso de biofungicidas en Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 3 p.
http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegre_j/1.html

- MONTEALEGRE, A. J. R. 2005(b). Uso de la solarización y bioantagonistas para el control de patógenos radicales y malezas en el cultivo del tomate y de la frutilla en Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 3 p.
http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegre_j/15.html
- PÁEZ, O. 2006. *Trichoderma*. Uso agrícola del *Trichoderma*. Compilación. La Habana, Cuba. 3 p.
<http://www.soil-fertility.com/trichoderma/espagnol/index.shtml> (consultada el 4 junio de 2007).
- PEREZ, L. M. 2005. Bases moleculares del control biológico de fitopatógenos. Experiencia chilena. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 5 p.
http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegre_j/2.html
- PETERSON, G. W. 1992. "Principales enfermedades de la raíz en vivero". Folleto Universidad Popular del Estado de Puebla (UPAEP). 34p.
- 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. División de Ciencias forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 68 p.
- REBOLLEDO R., H. H. 2002. Manual SAS por computadora; análisis estadístico de datos experimentales. Editorial Trillas. México. 208 p.
- ROMERO., C. S. 1988. Hongos Fitopatógenos. Universidad autónoma Chapingo. Dirección de Patronato Univesitario. Chapingo, Estado de México. 347 p

- ROMO., L. I. G. 2000. *Trichoderma* sp. 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. 2 p.
- SAMUELS, G. J. CHAVERRI, P., FARRY, D. F. & McCRAY, E. B. 2007. *Trichoderma* online. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory. ARS. 6 p.
<http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm?hasVisited=yes>
- STEEL., L. I. G. 2000. *Trichoderma* sp. 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. 2 p.
- STEEL R., G. D. y TORRIE. J., H. 1985. Bioestadística: principios y procedimientos. Editorial McGraw Hill. Segunda edición (Primera en español). México. 622 p.
- VIJAYAN, A. K. 1991. Recent Advances in Forest Seed Pathology. Bishen Singh Mahendra Pal Singh. 23-A, Connaught Place, Dehra Dun, India. 218 p.
- YÁÑEZ E., L. 2004. Las Principales Familias de Árboles en México. Tesis de licenciatura. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 189 p.

8. ANEXOS

ANEXO 1. Material

- Cajas petri de 9 cm de diámetro
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Agujas de disección
- Vaso de precipitado
- Matraz erlenmeyer de 1 litro de capacidad
- Pipetas graduadas de 10 mililitros
- Papel parafilm para sellar cajas petri
- Algodón y gasa para tapón de matraz
- Papel aluminio para cubrir cajas.
- Medio de cultivo comercial BIOXON (papa-dextrosa-agar)
- Medio de cultivo V8 (jugo de 8 verduras)
- Medio de cultivo Czapeck
- Hojas de clavel
- Agar bacteriológico
- Cámara de Neubauer de 0.0025 mm^2
- Microscopio compuesto
- Agua destilada y estéril
- Alcohol
- Cámara fotográfica
- Licuadora para mezclar los inóculos
- Olla express para esterilización
- Balanza analítica
- Cera
- Charolas de plástico color negro de 40 cavidades de 35 cm de largo * 22 cm de ancho y un diámetro de cada cavidad de 4 cm en la parte superior y 2 cm de diámetro en la parte inferior con capacidad de 93 cm^3
- Hipoclorito de sodio
- Cepillos para lavar charolas
- Fungicida a base de Tiabendazol (Tecto 60)
- Recipientes de 1 y 2 litros de capacidad
- Aspersores
- Sustrato (Peat moss, agrolita y vermiculita)
- Fertilizante de liberación prolongada (osmocote)
- Jeringas estériles de 25 ml
- Desinfectante (Hipoclorito de sodio)
- Guantes
- Bandejas de 1 y 4 litros.
- Olla
- Recipientes de 2 litros de capacidad
- Glicerina

ANEXO 2. Medios de cultivo

Cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar BIOXON)

PDA Bioxon	15.00 g.
Agua destilada	500.00 ml
Matraz erlenmeyer	1.00
Gasa	
Papel aluminio	
Algodón	

Procedimiento.

Se coloca el PDA en el matraz erlenmeyer, agregando un poco de agua destilada y revolver hasta que se mezcle un poco, enseguida se afora hasta 500 ml, se coloca un tapón de algodón con gasa y se cubre con papel aluminio. Se sella y se esteriliza en la olla express a 120°C o 15 lb/in² durante 15 minutos. Después que ha enfriado un poco se vacía en cajas petri estériles bajo la campana de flujo laminar y se deja reposar hasta que solidifique para poder utilizarlo en las siembras de raíz o tranferencias.

Cultivo Czapeck para esporulación de *Fusarium oxysporum* (García, 1990).

Agar	7.50 g.
Nitrato de sodio	1.00 g.
Fosfato de potasio	0.50 g.
Sulfato ferroso	0.25 g.
Cloruro de potasio	0.25 g.
Sulfato de magnesio	5.00 g.
Sucrosa	15.00 g.
Água destilada	500.00 ml
Estreptomicina	1.00 g.
Hojas de clavel	Varias
Matraz erlenmeyer	1.00
Vaso precipitado 250 ml	1.00
Pinzas de disección	Varias

Procedimiento.

Se pone a calentar el agua destilada y se van disolviendo los productos unos por uno, excepto la estreptomicina. Una vez disueltos, se somete a esterilización por 15 minutos a 120°C o 15 lb/in². Antes de vaciar en cajas petri, se le agrega la estreptomicina (bajo la campana de flujo laminar para garantizar ambiente aséptico). Las hojas de clavel se cortan en pedazos de 1.0 ó 1.5 cm de longitud, se lavan y se colocan en un vaso de precipitado de 250 ml con agua destilada, se sella y se esterilizan en la olla express durante 15 minutos a 120°C o 15 lb/in². El medio de cultivo, se vacía en cajas petri estériles de 9 cm de diámetro. Antes de que solidifique, se procede al sembrado de las hojas de clavel, para lo cual se requiere de unas pinzas de disección, se colocan de 5 a 7 pedacitos de hojas por caja, colocando a su vez un disco de 1 cm de diámetro aproximadamente en el centro de la caja, se sella perfectamente y se hacen observaciones diarias hasta que la colonia crezca y presente estructuras de reproducción.

Cultivo V8

Jugo de 8 verduras	150.00 ml
Agar bacteriológico BIOXON	15.00 g
Agua destilada	500.00 ml
Centrífuga de 3000 rpm	
Matraz erlenmeyer	
Gasa	
Papel aluminio	
Algodón	

Procedimiento.

Se mezcla lo mejor posible el jugo de verduras con el agar, enseguida se vacía en 4 frasquitos de los que tiene la máquina centrífuga de manera proporcional, los cuales deben estar perfectamente cerrados y de manera equidistante se colocan en la máquina, la cual se cierra muy bien y se programa a 3000 rpm durante 5 minutos. Después que ha detenido el proceso completamente, se abre y se sacan los frasquitos. Se vacía el contenido en un matraz erlenmeyer excepto los sólidos que han quedado asentados en la base del frasquito. Se afora a 500 ml con agua destilada y se cierra con un tapón de algodón y gasa y se cubre con papel aluminio. Se sella y se esteriliza en la olla express a 120°C o 15 lb/in² durante 15 minutos. Después que ha enfriado un poco se vacía en cajas petri estériles bajo la campana de flujo laminar y se deja reposar hasta que solidifique para poder utilizarlo.

ANEXO 3. Colocación aleatoria de los tratamientos por especie

Cuadro 17. Ubicación de los tratamientos de *P. michoacana* en el módulo del vivero forestal.

<i>Pinus michoacana</i>					
1 - T4R4 TE	2 - T3R2 TE+FO	3 - T2R4 TEST NO EST	4 - T6R4 TIAB	5 - T5R1 TIAB+FO	6 - T6R1 TIAB
7 - T5R5 TIAB+FO	8 - T6R3 TIAB	9 - T2R2 TEST NO EST	10 - T5R3 TIAB + FO	11 - T3R5 TE+FO	12 - T3R1 TE+FO
13 - T1R1 TEST EST	14 - T7R1 FO	15 - T4R3 TE	16 - T1R2 TEST EST	17 - T2R1 TEST NO EST	18 - T7R4 FO
19 - T6R5 TIAB	20 - T4R2 TE	21 - T2R3 TEST NO EST	22 - T2R5 TEST NO EST	23 - T3R4 TE+FO	24 - T6R2 TIAB
25 - T7R3 FO	26 - T7R2 FO	27 - T5R4 TIAB+FO	28 - T4R5 TE	29 - T7R5 FO	30 - T5R2 TIAB + FO
31 - T1R3 TEST EST	32 - T4R1 TE	33 - T3R3 TE+FO			

Cuadro 18. Ubicación de los tratamientos de *P. pseudostrobus* en el módulo del vivero forestal.

<i>Pinus pseudostrobus</i>					
1 - T6R3 TIAB	2 - T2R4 TEST NO EST	3 - T7R3 FO	4 - T1R2 TEST EST	5 - T5R5 TIAB + FO	6 - T2R3 TEST NO EST
7 - T5R2 TIAB + FO	8 - T6R2 TIAB	9 - T2R5 TEST NO EST	10 - T4R2 TE	11 - T4R5 TE	12 - T3R2 TE+FO
13 - T1R3 TEST EST	14 - T7R2 FO	15 - T4R4 TE	16 - T7R1 FO	17 - T7R5 FO	18 - T4R3 TE
19 - T5R1 TIAB + FO	20 - T4R1 TE	21 - T2R2 TEST NO EST	22 - T7R4 FO	23 - T3R4 TE+FO	24 - T6R5 TIAB
25 - T5R4 TIAB + FO	26 - T3R5 TE+FO	27 - T5R3 TIAB + FO	28 - T1R1 TEST EST	29 - T6R4 TIAB	30 - T3R1 TE+FO
31 - T2R1 TEST NO EST	32 - T6R1 TIAB	33 - T3R3 TE+FO			

El número indica el número de charola. Va del 1 al 33.

TXRY, significa T el tratamiento aplicado y R la repetición correspondiente al tratamiento.

TIAB; tiabendazol

FO; *F. oxysporum*

TE; *T. erinaceum*

TEST NO EST; Testigo no estéril

TEST EST; Testigo estéril

ANEXO 4. Postulados de Koch

En caso de que sea probable un patógeno causante de la enfermedad, pero no se cuente con registros anteriores que apoyen esta suposición, tendrán que aplicarse los siguientes puntos para comprobar la hipótesis de que el patógeno es la causa de la enfermedad (García, 1990).

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

Una vez que estos puntos mencionados se cumplan, se tendrá la certeza de que el patógeno aislado es la causa de la enfermedad.

ANEXO 5. Peso seco de las raíces de los pinos

<i>Pinus michoacana</i>			<i>Pinus pseudostrobus</i>		
No. PLANTA	TRATAMIENTO	PESO SECO (g)	No. PLANTA	TRATAMIENTO	PESO SECO (g)
1	T1-Test.Estéril	0.262	1	T1-Test.Estéril	0.048
2	T1-Test.Estéril	0.283	2	T1-Test.Estéril	0.132
3	T1-Test.Estéril	0.111	3	T1-Test.Estéril	0.147
4	T1-Test.Estéril	0.201	4	T1-Test.Estéril	0.140
5	T1-Test.Estéril	0.163	5	T1-Test.Estéril	0.128
6	T1-Test.Estéril	0.147	6	T1-Test.Estéril	0.107
7	T1-Test.Estéril	0.115	7	T1-Test.Estéril	0.052
8	T1-Test.Estéril	0.185	8	T1-Test.Estéril	0.098
9	T1-Test.Estéril	0.137	9	T1-Test.Estéril	0.084
10	T1-Test.Estéril	0.127	10	T1-Test.Estéril	0.204
11	T1-Test.Estéril	0.247	11	T1-Test.Estéril	0.132
12	T1-Test.Estéril	0.257	12	T1-Test.Estéril	0.171
13	T1-Test.Estéril	0.170	13	T1-Test.Estéril	0.161
14	T1-Test.Estéril	0.138	14	T1-Test.Estéril	0.153
15	T1-Test.Estéril	0.277	15	T1-Test.Estéril	0.124
16	T1-Test.Estéril	0.174	16	T1-Test.Estéril	0.201
17	T1-Test.Estéril	0.157	17	T1-Test.Estéril	0.134
18	T1-Test.Estéril	0.178	18	T1-Test.Estéril	0.131
19	T1-Test.Estéril	0.163	19	T1-Test.Estéril	0.105
20	T1-Test.Estéril	0.236	20	T1-Test.Estéril	0.173
21	T1-Test.Estéril	0.197	21	T1-Test.Estéril	0.178
22	T1-Test.Estéril	0.156	22	T1-Test.Estéril	0.137
23	T1-Test.Estéril	0.143	23	T1-Test.Estéril	0.111
24	T1-Test.Estéril	0.221	24	T1-Test.Estéril	0.200
25	T2-Test.NoEstéril	0.294	25	T1-Test.Estéril	0.178
26	T2-Test.NoEstéril	0.306	26	T1-Test.Estéril	0.153
27	T2-Test.NoEstéril	0.296	27	T1-Test.Estéril	0.139
28	T2-Test.NoEstéril	0.192	28	T1-Test.Estéril	0.223
29	T2-Test.NoEstéril	0.355	29	T1-Test.Estéril	0.304
30	T2-Test.NoEstéril	0.375	30	T1-Test.Estéril	0.124
31	T2-Test.NoEstéril	0.255	31	T1-Test.Estéril	0.103
32	T2-Test.NoEstéril	0.127	32	T1-Test.Estéril	0.175
33	T2-Test.NoEstéril	0.231	33	T1-Test.Estéril	0.266
34	T2-Test.NoEstéril	0.315	34	T2-Test.NoEstéril	0.159
35	T2-Test.NoEstéril	0.163	35	T2-Test.NoEstéril	0.072
36	T2-Test.NoEstéril	0.296	36	T2-Test.NoEstéril	0.131
37	T2-Test.NoEstéril	0.364	37	T2-Test.NoEstéril	0.147
38	T2-Test.NoEstéril	0.180	38	T2-Test.NoEstéril	0.186
39	T2-Test.NoEstéril	0.453	39	T2-Test.NoEstéril	0.170
40	T2-Test.NoEstéril	0.344	40	T2-Test.NoEstéril	0.116
41	T2-Test.NoEstéril	0.384	41	T2-Test.NoEstéril	0.173
42	T2-Test.NoEstéril	0.208	42	T2-Test.NoEstéril	0.185
43	T2-Test.NoEstéril	0.340	43	T2-Test.NoEstéril	0.230
44	T2-Test.NoEstéril	0.245	44	T2-Test.NoEstéril	0.194
45	T2-Test.NoEstéril	0.223	45	T2-Test.NoEstéril	0.182

<i>Pinus michoacana</i>		
No. PLANTA	TRATAMIENTO	PESO SECO (g)
46	T2-Test.NoEstéril	0.213
47	T2-Test.NoEstéril	0.295
48	T2-Test.NoEstéril	0.231
49	T2-Test.NoEstéril	0.369
50	T2-Test.NoEstéril	0.261
51	T2-Test.NoEstéril	0.246
52	T2-Test.NoEstéril	0.244
53	T2-Test.NoEstéril	0.262
54	T2-Test.NoEstéril	0.414
55	T2-Test.NoEstéril	0.145
56	T2-Test.NoEstéril	0.314
57	T2-Test.NoEstéril	0.210
58	T2-Test.NoEstéril	0.283
59	T2-Test.NoEstéril	0.341
60	T2-Test.NoEstéril	0.127
61	T2-Test.NoEstéril	0.320
62	T2-Test.NoEstéril	0.338
63	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.469
64	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.577
65	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.318
66	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.341
67	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.434
68	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.565
69	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.289
70	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.271
71	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.542
72	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.363
73	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.347
74	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.292
75	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.328
76	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.377
77	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.534
78	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.274
79	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.373
80	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.344
81	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.303
82	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.472
83	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.246
84	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.389
85	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.338
86	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.453
87	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.321
88	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.416
89	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.303
90	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.496
91	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.495
92	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.317
93	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.483
94	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.275

<i>Pinus pseudostrobus</i>		
No. PLANTA	TRATAMIENTO	PESO SECO (g)
46	T2-Test.NoEstéril	0.233
47	T2-Test.NoEstéril	0.188
48	T2-Test.NoEstéril	0.126
49	T2-Test.NoEstéril	0.247
50	T2-Test.NoEstéril	0.185
51	T2-Test.NoEstéril	0.089
52	T2-Test.NoEstéril	0.219
53	T2-Test.NoEstéril	0.175
54	T2-Test.NoEstéril	0.306
55	T2-Test.NoEstéril	0.181
56	T2-Test.NoEstéril	0.152
57	T2-Test.NoEstéril	0.133
58	T2-Test.NoEstéril	0.244
59	T2-Test.NoEstéril	0.190
60	T2-Test.NoEstéril	0.158
61	T2-Test.NoEstéril	0.208
62	T2-Test.NoEstéril	0.192
63	T2-Test.NoEstéril	0.196
64	T2-Test.NoEstéril	0.153
65	T2-Test.NoEstéril	0.104
66	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.191
67	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.227
68	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.320
69	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.394
70	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.146
71	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.304
72	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.225
73	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.270
74	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.216
75	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.240
76	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.171
77	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.239
78	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.219
79	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.296
80	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.210
81	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.253
82	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.248
83	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.262
84	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.463
85	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.274
86	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.206
87	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.151
88	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.252
89	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.329
90	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.274
91	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.203
92	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.209
93	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.164
94	T3-T. <i>erinaceum</i>	0.205

<i>Pinus michoacana</i>			<i>Pinus pseudostrobus</i>		
No. PLANTA	TRATAMIENTO	PESO SECO (g)	No. PLANTA	TRATAMIENTO	PESO SECO (g)
95	T3- <i>T. erinaceum</i>	0.477	95	T3- <i>T. erinaceum</i>	0.228
96	T3- <i>T. erinaceum</i>	0.319	96	T3- <i>T. erinaceum</i>	0.307
97	T3- <i>T. erinaceum</i>	0.127	97	T3- <i>T. erinaceum</i>	0.209
98	T3- <i>T. erinaceum</i>	0.537	98	T3- <i>T. erinaceum</i>	0.250
99	T3- <i>T. erinaceum</i>	0.450	99	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.381
100	T3- <i>T. erinaceum</i>	0.359	100	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.104
101	T3- <i>T. erinaceum</i>	0.467	101	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.173
102	T3- <i>T. erinaceum</i>	0.311	102	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.223
103	T3- <i>T. erinaceum</i>	0.331	103	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.111
104	T3- <i>T. erinaceum</i>	0.298	104	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.158
105	T3- <i>T. erinaceum</i>	0.491	105	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.273
106	T3- <i>T. erinaceum</i>	0.264	106	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.110
107	T3- <i>T. erinaceum</i>	0.248	107	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.250
108	T3- <i>T. erinaceum</i>	0.404	108	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.256
109	T3- <i>T. erinaceum</i>	0.462	109	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.260
110	T3- <i>T. erinaceum</i>	0.374	110	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.238
111	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.406	111	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.174
112	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.397	112	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.244
113	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.394	113	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.277
114	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.448	114	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.316
115	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.399	115	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.171
116	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.430	116	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.368
117	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.463	117	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.182
118	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.228	118	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.263
119	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.315	119	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.271
120	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.364	120	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.142
121	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.207	121	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.327
122	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.332	122	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.309
123	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.495	123	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.172
124	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.391	124	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.194
125	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.433	125	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.231
126	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.392	126	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.292
127	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.302	127	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.330
128	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.404	128	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.216
129	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.281	129	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.206
130	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.397	130	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.176
131	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.366	131	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.312
132	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.372	132	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.236
133	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.358	133	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.199
134	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.317	134	T5-Tiab + <i>F. oxys</i>	0.159
135	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.434	135	T5-Tiab + <i>F. oxys</i>	0.246
136	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.353	136	T5-Tiab + <i>F. oxys</i>	0.158
137	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.464	137	T5-Tiab + <i>F. oxys</i>	0.168
138	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.419	138	T5-Tiab + <i>F. oxys</i>	0.126
139	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.543	139	T5-Tiab + <i>F. oxys</i>	0.238
140	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.259	140	T5-Tiab + <i>F. oxys</i>	0.135
141	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.250	141	T5-Tiab + <i>F. oxys</i>	0.181
142	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.444	142	T5-Tiab + <i>F. oxys</i>	0.204
143	T4- <i>T. erin</i> + <i>F. oxys</i>	0.257	143	T5-Tiab + <i>F. oxys</i>	0.115

<i>Pinus michoacana</i>			<i>Pinus pseudostrobus</i>		
No. PLANTA	TRATAMIENTO	PESO SECO (g)	No. PLANTA	TRATAMIENTO	PESO SECO (g)
144	T4- <i>T.erin</i> + <i>F.oxys</i>	0.279	144	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.240
145	T4- <i>T.erin</i> + <i>F.oxys</i>	0.356	145	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.110
146	T4- <i>T.erin</i> + <i>F.oxys</i>	0.373	146	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.243
147	T4- <i>T.erin</i> + <i>F.oxys</i>	0.279	147	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.223
148	T4- <i>T.erin</i> + <i>F.oxys</i>	0.234	148	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.170
149	T4- <i>T.erin</i> + <i>F.oxys</i>	0.214	149	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.091
150	T4- <i>T.erin</i> + <i>F.oxys</i>	0.328	150	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.230
151	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.353	151	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.110
152	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.330	152	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.190
153	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.214	153	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.133
154	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.277	154	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.148
155	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.172	155	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.163
156	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.228	156	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.170
157	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.362	157	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.157
158	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.353	158	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.166
159	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.261	159	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.067
160	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.201	160	T6-Tiabendazol	0.246
161	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.424	161	T6-Tiabendazol	0.078
162	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.290	162	T6-Tiabendazol	0.208
163	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.256	163	T6-Tiabendazol	0.166
164	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.213	164	T6-Tiabendazol	0.347
165	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.331	165	T6-Tiabendazol	0.214
166	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.289	166	T6-Tiabendazol	0.260
167	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.198	167	T6-Tiabendazol	0.090
168	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.216	168	T6-Tiabendazol	0.192
169	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.229	169	T6-Tiabendazol	0.172
170	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.387	170	T6-Tiabendazol	0.086
171	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.281	171	T6-Tiabendazol	0.165
172	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.178	172	T6-Tiabendazol	0.177
173	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.315	173	T6-Tiabendazol	0.113
174	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.323	174	T6-Tiabendazol	0.123
175	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.277	175	T6-Tiabendazol	0.106
176	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.178	176	T6-Tiabendazol	0.095
177	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.263	177	T6-Tiabendazol	0.199
178	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.166	178	T6-Tiabendazol	0.094
179	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.231	179	T6-Tiabendazol	0.158
180	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.259	180	T6-Tiabendazol	0.401
181	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.383	181	T6-Tiabendazol	0.203
182	T5-Tiab + <i>F.oxys</i>	0.288	182	T6-Tiabendazol	0.110
183	T6-Tiabendazol	0.219	183	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.154
184	T6-Tiabendazol	0.253	184	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.197
185	T6-Tiabendazol	0.200	185	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.183
186	T6-Tiabendazol	0.199	186	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.219
187	T6-Tiabendazol	0.277	187	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.152
188	T6-Tiabendazol	0.264	188	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.225
189	T6-Tiabendazol	0.394	189	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.187
190	T6-Tiabendazol	0.407	190	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.178
191	T6-Tiabendazol	0.273	191	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.249
192	T6-Tiabendazol	0.289	192	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.280

<i>Pinus michoacana</i>			<i>Pinus pseudostrobus</i>		
No. PLANTA	TRATAMIENTO	PESO SECO (g)	No. PLANTA	TRATAMIENTO	PESO SECO (g)
193	T6-Tiabendazol	0.182	193	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.283
194	T6-Tiabendazol	0.349	194	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.306
195	T6-Tiabendazol	0.258	195	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.112
196	T6-Tiabendazol	0.287	196	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.217
197	T6-Tiabendazol	0.255	197	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.110
198	T6-Tiabendazol	0.215	198	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.351
199	T6-Tiabendazol	0.211	199	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.227
200	T6-Tiabendazol	0.362	200	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.346
201	T6-Tiabendazol	0.323	201	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.287
202	T6-Tiabendazol	0.244	202	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.127
203	T6-Tiabendazol	0.223			
204	T6-Tiabendazol	0.230			
205	T6-Tiabendazol	0.355			
206	T6-Tiabendazol	0.342			
207	T6-Tiabendazol	0.356			
208	T6-Tiabendazol	0.370			
209	T6-Tiabendazol	0.361			
210	T6-Tiabendazol	0.294			
211	T6-Tiabendazol	0.180			
212	T6-Tiabendazol	0.321			
213	T6-Tiabendazol	0.354			
214	T6-Tiabendazol	0.586			
215	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.319			
216	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.265			
217	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.850			
218	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.223			
219	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.115			
220	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.183			
221	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.324			
222	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.228			
223	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.065			
224	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.328			
225	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.234			
226	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.424			
227	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.275			
228	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.229			
229	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.248			
230	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.134			
231	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.146			
232	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.305			
233	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.238			
234	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.190			
235	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.168			
236	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.205			
237	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.332			
238	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.269			
239	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.257			
240	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.324			
241	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.296			

<i>Pinus michoacana</i>		
No. PLANTA	TRATAMIENTO	PESO SECO (g)
242	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.208
243	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.163
244	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.187
245	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.313
246	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.210
247	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.192
248	T7- <i>F.oxysporum</i>	0.310

Descripción de tratamientos mencionados en la tabla anterior.

T1 (Testigo con sustrato estéril).

T2 (Testigo con sustrato no estéril).

T3 (*T. erinaceum*).

T4 (*T. erinaceum* + *F. oxysporum*).

T5 (Tiabendazol + *F. oxysporum*).

T6 (Tiabendazol).

T7 (*F. oxysporum*).