



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**Escuela Nacional de Estudios Profesionales
Iztacala**

**DETERMINACION DE HONGOS EN
SEMILLAS DE PINUS AYACAHUITE
VAR. VEITCHII SHAW.**

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
MA. GRACIELA BAEZ OLIVA

México, D. F.

1986





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis padres:

Quienes gracias a su amor, apoyo y gran esfuerzo me alentaron siempre a culminar uno de mis mas grandes anhelos.

A mis hermanos:

Por todo su amor y respaldo que siempre me brindaron.

A Eduardito:

Quien tanto quiero, por su amor y comprensión.

A mi abuelita Lupita:

Por todo el amor que me ha dado.

A mi maestro:

Rodolfo Salinas Quinard.

A mis amigos.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos a las personas que en diferente forma hicieron posible la terminación de este trabajo.

QBP. Rodolfo Salinas Quinar, asesorando y respaldando - el desarrollo y elaboración del estudio.

Señores Agustín González Medina y Roberto Villanueva - Melgoza, por su inapreciable cooperación en el trabajo de laboratorio.

Señores Carlos y Enrique Gaytán Arreola, por su infinita colaboración y ayuda en la elaboración del material fotográfico.

Sr. Antonio Valdes Barona, Biol. José Francisco Reséndiz Martínez, Sr. José Manuel Bonilla Camaeho, QBP. Luis - Vázquez Silva, Sr. Manuel Pantagua Valdéz y Sra. Rosario Genis Arvizu, por toda su ayuda brindada.

Personal de Laboratorio de Semillas (I. N. I. F.), que auxilió en la elección de la especie y selección de semillas.

Personal del Departamento de Estadística (I. N. I. F), orientador y colaborador en la elección de los Análisis Estadísticos.

I N D I C E

P A G I N A

I. RESUMEN -----	1
II. INTRODUCCION -----	3
III. ANTECEDENTES -----	6
IV. OBJETIVOS -----	17
V. METODOLOGIA -----	18
VI. RESULTADOS Y DISCUSION -----	23
VII. CONCLUSIONES -----	46
VIII. SUGERENCIAS -----	49
IX. BIBLIOGRAFIA -----	50
X. APENDICE -----	58

Determinación de Hongos en Semillas de Pinus
ayacahuite var. veitchii Shaw (1909)

MA. GRACIELA BAEZ OLIVA

I. RESUMEN

De semillas de la especie Pinus ayacahuite var. veitchii Shaw (1909), se determinó la micoflora asociada en tres lotes de semillas de diferentes años de cosecha (Lote 528 - año 1976; Lote 620 - 1977; Lote 759 - año 1979) provenientes de un Campo Experimental Forestal "San Juan Tetla", en el estado de Puebla.

Se obtuvieron por lote porciones de la semilla (testa y embrión) seleccionadas conforme a tres condiciones de desarrollo embrionario y sometidas a dos tratamientos.

Las muestras se sembraron en cajas Petri en medio de cultivo (Papa - Dextrosa - Agar) e incubación a temperatura de 25 a 27° C.

Fueron aisladas diecisiete cepas de diez géneros de hongos pertenecientes a dos clases: Clase Zygomycetes (Mucor, Rhizopus) ; Clase Deuteromycetes (Alternaria, Aspergillus, Helminthosporium, Hormodendrum, Monilia, Penicillium, Stemphylium y Trichoderma).

De los resultados estadísticos se registraron variaciones de incidencia y frecuencia de los microorganismos, atribuibles por una parte a condiciones de almacenamiento y por

otra a condiciones propias de las semillas, así mismo al tra
tamiento empleado y al manejo de las semillas referido este
a la obtención, extracción, desalado y envasado; consideran-
do que esta última probablemente influyó en la incidencia de
Zygomycetes en testas.

Fueron determinados algunos daños en embriones (adelga-
zamientos, malformaciones, reblandecimientos) asociados con
la presencia de *Aspergillus* y *Penicillium*, microorganismos
cuya incidencia probablemente fue decisiva en el hallazgo
de embriones no desarrollados (semillas vanas).

Se consideró que todos los microorganismos aislados fue-
ron contaminantes portados por la semilla de la especie en
estudio.

II. INTRODUCCION

La semilla representa la primera y mas importante etapa de la vida de un árbol, de modo que su existencia dependerá totalmente de que tal semilla encuentre, durante su primer contacto con el medio, las condiciones propicias para su sobrevivencia. Si la semilla sobrevive producirá plántula apta para desarrollarse hasta alcanzar dimensiones de árbol adulto en un tiempo determinado, prolongandose o acortandose este dependiendo de las dificultades que encuentre la planta durante su desarrollo, desde los procesos de germinación y crecimiento primario (Caballero, D. y J, Toral. 1967). De aquí que el conocimiento de los factores de deterioro y sus efectos en las semillas de especies forestales, revista gran importancia y haya sido abordado en varios estudios, incluyendo los de su Micoflora, en este caso haciendo énfasis principalmente en el deterioro de la viabilidad de las semillas almacenadas (Gibson, I. A. 1957; Holmes, D. y Buszewicz, G. 1958) y los efectos sobre plántulas en sus estados de preemergencia y postemergencia (Cox, R.S. 1953; Ching-Chang, Chen y Shung-Chang. 1964; Gómez, N. 1967, 1976) por lo que han sido relativamente escasos los trabajos referidos a los microorganismos presentes desde conos y semillas.

Es condición que normalmente las semillas deban estar libres de contaminaciones por microorganismos (Salinas, Q. R. 1978), puesto que se encuentran alojadas en receptáculos supe^uuestamente usépticos, pero los conos de los pinos (Peace, R. T. 1962) poseen una cubierta adherente de resina, consti

tuyendo superficies donde se posan partículas de polvo esporas de hongos y diferentes microorganismos, siendo por consecuencia fuentes de contaminación de las semillas.

Particularmente los hongos llegan a tener importancia cuando invaden el interior de los conos, siendo las superficies externas las primariamente colonizadas y subsecuente-mente invadidos los tejidos, hasta alcanzar las semillas.

Independientemente de los daños que en las semillas hayan sido causados por efectos de humedad, temperatura, o que haya habido algún proceso de orden fisiológico que determinara la degradación de los componentes químicos de la semilla, produciéndose subproductos tóxicos a la germinación la actividad de los microorganismos contaminantes invasores externos pueden causar deterioros.

En condiciones de almacenamientos los microorganismos contaminantes pueden ser transportados, y si la humedad y temperatura son favorables, son capaces de crear problemas, pudiéndose manifestar desde una reducción de las estructuras de las semillas, y reducción en la capacidad de germinación, a pesar de la prevención mediante productos químicos, puesto que esta tiene efecto superficial por ser común tratar a las semillas por vía seca (Salinas, Q. R. op. cit.).

En suelos de almácigos, el efecto puede ser similar, porque las semillas una vez sembradas, coadyuvan a liberar la cubierta protectora del fungicida y sólo en el transcurso del tiempo las semillas, como los microorganismos, quedan en condiciones adecuadas, unas para germinar y los otros para propagarse; éstos colonizando el suelo en donde

las semillas quedan expuestas a su actividad, llegan a producir en las plántulas enfermedades, o síntomas relacionados con la enfermedad del "mal de semilleros", no generada por patógenos habitantes del suelo.

Las actividades de estos daños y sus causas han sido comentados en otros países como Estados Unidos, India, Inglaterra, y Rusia por diferentes autores (Gibson, I. A. 1957; Frisyazhnyuk, A. A. 1960; Mason, N. y Van, A. 1958 y Sharma, D. A. 1980), señalando con énfasis los daños ocasionados en especies forestales de importancia económica.

En México el interés principal sobre los microorganismos contaminantes de semillas, se ha enfocado sobre granos y semillas de plantas de cultivo (Christensen, C. y López, L. 1962; Rangel, S. J. 1972); por lo que la micoflora de germinoplasma forestal no ha recibido la debida atención. Los estudios realizados con semillas se concretan a pruebas rutinarias de laboratorio: determinaciones de pureza, humedad, porcentaje de germinación, pruebas de viabilidad (Patiño, V. y Garza, P. 1983) para determinar la calidad de las semillas pero no se incluye el análisis fitosanitario que debiera considerarse prioritario, para conocer los daños causados y prevenir los posibles riesgos futuros, en planta reproducida en viveros y propagada en plantaciones, para ser utilizadas como recursos naturales, de importancia en la economía de México.

III. ANTECEDENTES

Los trabajos consultados en relación con el tema, se refieren a investigaciones en otros países; mencionando primeramente los estudios enfocados al conocimiento de problemas de germinación de granos y semillas de especies agrícolas y posteriormente los relacionados a semillas de especies forestales.

Manns, F. y Adams, F. (1923) señalaron la presencia de cuatro hongos parásitos que inhiben la germinación en granos de maíz: Cephalosporium sacchari, Fusarium moliniforme, Gibberella saubinetii y Diplodia zeae; así mismo de la parte interna de la semilla aislaron hongos de los géneros Aspergillus, Alternaria, Cladosporium, Penicillium, Helminthosporium, Rhizopus, Torula, Spicaria, Hormodendrum, Chaetomium, Colletotrichium, se pensó que su ocurrencia era resultado de las malas condiciones de almacenamiento de los granos.

Leukel, R. y Martín, J. (1943) al realizar aislamientos de semillas de sorgo, determinaron que Alternaria, Rhizopus, y Penicillium, afectaban la capacidad de germinación de las semillas, y las plántulas que habían sido utilizadas para prueba de patogenicidad se marchitaban.

Tuite, F. y Christensen, M. (1955) en semillas inmaduras de cebada reportaron la presencia de algunos hongos Alternaria, y Cladosporium, mencionan que después de la cosecha, las semillas fueron invadidas por Aspergillus y Penicillium y a humedades de 15% y 19% las semillas almacenadas son afectadas por algunas especies de Aspergillus, A. repens, A. ruber y todos

estos hongos así como Penicillium invaden varias partes de la semilla, teniendo un efecto significativo en la reducción de la germinación.

Janarette, A. C. (1979) realizó aislamientos e identificaciones de microorganismos desarrollados en semillas de maple y así mismo detectó los efectos que causaron en las plántulas que fueron utilizadas para pruebas de patogenicidad. De los resultados obtenidos esta autora menciona que los aislamientos fungicos son clasificados como saprofiticos; la viabilidad de las semillas disminuye al aumentar la incidencia de los hongos, y géneros como Alternaria, Penicillium, y Rhizopus, afectaban la emergencia de las semillas y en las plántulas se observan algunos síntomas de marchitamiento provocados por estos hongos.

Mc.Gee, C. y Brand, L. (1980) detectaron que Phomopsis y Fusarium fueron los hongos que tuvieron efecto significativo en la reducción de la germinación de las plántulas de frijol - soya, y hongos como Aspergillus, Alternaria alternata estuvieron relacionados con la baja calidad de semillas almacenadas.

Sharma, D. A. (1980) obtuvo veinticinco especies de hongos asociados en semillas de Achicoria (Cicorium intybus). Menciona que las colectas de 1976 fueron más ricas en micoflora que las colectadas en 1977. De la selección de semillas determinó que las semillas descoloridas fueron las que presentaron mayor incidencia de hongos y Fusarium sp., F. moliniforme, y Alternaria alternata causaron significantes pérdidas en las plántulas por pudrición.

Takur, V. y Sharma, D. A. (1981) en un estudio sobre la micoflora de semillas e inoculaciones realizadas en plántulas de Rhapanus sativus, once especies de hongos fueron aisladas de las semillas: Alternaria alternata, A. tenuissima, Aspergillus niger, Botrytis cinerea, Cladosporium cladosporoides, Mucor globosus, Drechalera australiensis, Penicillium sp, Rhizopus oryzae, Stemphylium botryosum y Trichothectum roseum . De éstos Alternaria alternata causó lesiones necróticas sobre los cotiledones y se encontró asociado en las testas de las semillas; por otra parte, Aspergillus niger y Cladosporium cladosporoides causaron significantes pérdidas antes y después de germinar las semillas .

De los trabajos sobre semillas forestales Fisher, L. P. (1941) al realizar algunas pruebas de inoculación para probar el efecto de germinación de algunas semillas de especies forestales, encontró que los hongos Botrytis cinerea, Fusarium sp, Pytium debaryanum, P. ultimum, Rhizoctonia Shaeropsis ellisii y Verticillium sp causaban algunos decaimientos en las radículas, al emerger de las testas, comparativamente con Aspergillus niger, Cylindrocladium, Penicillium, Rhizopus R. circinas, R. oryzae, Pestalozzia, Alternaria brassicae, Chaetomium globosum, Mucor, y Thielavia no causaron pérdidas considerables en las radículas.

En pruebas realizadas sobre inoculaciones de hongos en semillas de Pinus patula dañadas de la testa, Gibson, I. A. S. (1957), observó que el desarrollo de algunos hongos, Rhizopus arrhizus, Mucor, tamaritii, Chaetomium cochliodes, Cladosporium sp, Aspergillus tamaritii y Trichoderma koenigii, estuvo relacionado con las semillas dañadas y tuvieron un

efecto en la reducción de la germinación.

Prisyazhnyuk, A. A. (1960) al aislar setenta y tres especies de hongos en semillas y conos de tres especies de coníferas, determinó que algunos de ellos fueron saprofiticos o semisaprofiticos, exceptuando Alternaria spp y Fusarium spp. La infección en las semillas toma lugar en almacenamiento, pero puede prevenirse si son almacenadas en recipientes de vidrio hermeticamente sellados.

Urosevic, B. CSc. (1961) al realizar un estudio sobre la infección artificial de hongos en semillas y plántulas de Picea excelsa y Pinus sylvestris, determinó que los hongos desarrollados presentaban cierta especificidad, ya que las especies de Fusarium aisladas de Pinus sylvestris fueron más severas en la reducción de la germinación y los hongos identificados como Acremoniella atra, Alternaria brassicae, A. tenuis, Botrytis allii, Chaetomium globosum, Curvularia inaequalis, Mucor plumbeus, Cylindrocarpon radicum, Helminthosporium sativum, fueron algunos de los que presentaron el mismo efecto, pero en menor grado. De Picea excelsa reporta la presencia de los hongos que penetraron profundamente en los cotiledones y reducen la germinación.

Acrostalagmus cinnabarinus, Alternaria tenuis, Curvularia inaequalis, Chaetomium globosum, Mucor racemosus, Helminthosporium rostratum, H. sativum, Penicillium arenarium, Stemphylium atrum, Trichoderma lignorum. y Verticillium albo-atrum.

Peace, R. T. (1962) menciona que los conos de pinos

poseen una cubierta adherente de resina donde se posan esporas de hongos, que llegan a tener cierta importancia cuando invaden el interior de los conos y subsecuentemente los tejidos, hasta alcanzar las semillas, pudiendo manifestarse los deterioros desde una reducción en la capacidad de germinación hasta la completa reducción de las estructuras de la semilla.

Chi. Chang, Chen y Shung, Chang. J. (1964) reportaron algunos datos experimentales sobre estudios de efectos del medio, concentración del ión hidrogeno, temperaturas, y tratamientos químicos utilizados en el aislamiento de microorganismos asociados con semillas de Pinus elliotii, Pinus luchuensis y Pinus thunbergii. Estos autores mencionan la presencia de algunos géneros de hongos como: Aspergillus, Diplodia, Penicillium, Mucor, Rhizopus, Curvularia, Fusarium, y Glomerella, comprobaron que para realizar aislamientos de los microorganismos presentes en las capas superficiales de la semilla (testa) se requiere que sean tratadas con hipoclorito de sodio al 4%, y para los microorganismos desarrollados en la parte interna de la semilla se requiere del tratamiento con bicloruro de mercurio al 0.5%. Señalan al medio Papa - Dextrosa - Agar e incubación a temperatura de 28° C. como eficaces para el cultivo de esos microorganismos.

Estos mismos autores (1964) al realizar un estudio sobre la interacción de microorganismos del suelo y de semillas de coníferas relacionables con la enfermedad del mal de semilleros determinaron un descenso en la germinación de las plántulas cuando las semillas superficialmente esterilizadas fueron sembradas en suelos previamente esterilizados, debiéndose a que los microorganismos internos de la semilla

se activaron al desaparecer la micoflora de las capas superficiales de la semilla y del suelo. Observaron que las pudriciones de los cotiledones fueron causadas por hongos internos de la semilla, Diploidia, principalmente y Cylindrocladium; las del tallo debidas a hongos del suelo Fusarium, Verticillium, Aspergillus, Cylindrocladium, y Penicillium, siendo algunos de los microorganismos causantes del mal de semilleros en las plántulas.

Epnors, Z. (1964) en un estudio sobre la germinación de semillas de coníferas, reportó la presencia de hongos psicrófilos aislados a menos de 1 y 27° C. en células del endospermo y del embrión de las semillas. Determinó que los hongos producen simpodiosporas que tienen afinidad con los géneros de Constantinella y Nodulisporium, pero difieren significativamente de ellos. Bajo condiciones favorables estos hongos pueden matar en un 100% las semillas de coníferas en suelos infestados.

Timonin, I. M. (1964) reportó algunos efectos de la micoflora desarrollada en el estado de preemergencia y postemergencia de pinos: Pinus banksiana, P. contorta, Picea glauca. El autor llevó a cabo pruebas sobre semillas asepticadas y no asepticadas, sembradas posteriormente bajo las mismas condiciones.

Algunos resultados indicaron que P. banksiana, P. glauca, fueron los significativamente afectados por microorganismos en la emergencia de las plántulas, en tanto que P. contorta, mostró cierta selectividad.

Salisbury, J. P. (1965) en un estudio de hongos contaminantes en semillas obtenidas de Pseudotsuga taxifolia,

encontró que ciento ocho semillas obtenidas de conos completamente cerrados, noventa y tres estuvieron libres de hongos; las restantes sólo una presentó contaminación por Penicillium y cuatro por Pullularia.

Bloomberg, J. W. (1966) detectó que un 80% de las plántulas sanas de Pseudotsuga menziesii presentaron hongos, siendo los mas frecuentes Fusarium spp, Mycelium radicia atrovirens, y Cylindrocarpon diymum. En las plántulas enfermas determinó la presencia de algunos hongos imperfectos Alternaria, Phoma, Monilia, Cunninghamella, Pullularia, Rhizoctonia, R. solani, Trichoderma, Trichocladium y Stemphylium. Aisló un mayor número de hongos de las partes del tallo de las plántulas que de la raíz. En los lotes de semilla con mayor capacidad de germinación aisló a Trichoderma viride, y en los de menor grado de germinación a Rhizopus, y Aspergillus.

Chi. Chang, Chen. y Shung. Chang, J. (1966) determinaron la microflora de siete especies de coníferas en Taiwan, empleando dos aseptizantes. De las semillas sometidas al tratamiento con hipoclorito al 4% fueron aislados representantes de diez y siete géneros de hongos: Aspergillus, Cephalosporium, Chaetomium, Chaetomella, Curvularia, Fusarium, Diplodia, Graphium, Helminthosporium, Mucor, Penicillium, Phoma, Pestalotia, Rhizoctonia, Rhizopus, Verticillium, y Shaeropsis, siendo en -- contrado como causante del tizón de las yemas en Pinus elliotii un miembro de éste último género. De las semillas sometidas a tratamiento con bicloruro de mercurio al 0.5% fueron aislados once géneros de hongos: Chaetomium, Phoma, Aspergillus,

Diplodia Fusarium, Pestalotia, Verticillium, y de las partes internas de la semilla sólo Fusococcum, Phomopsis, Gloeosporium y Stemphylium, influyendo algunos de ellos en la capacidad de germinación de las semillas.

Bloomberg, J. W. (1969) determinó que las semillas de conos que habían sido cortados longitudinalmente no mostraron signos de enfermedad, pero después de ser extraídas para probar la capacidad de germinación, fueron afectados por hongos, como: Glilocladium, Trichoderma, Trichothecium, Cephalosporium, y Pullularia, variando la infección con el periodo de almacenamiento de las semillas.

Algunos de los hongos más frecuentemente aislados de los conos fueron Glilocladium, Penicillium, Spicaria, y Trichoderma. Se indicó que la baja capacidad de las semillas fué debida a los hongos facultativos aislados y también a la inmadurez de las semillas.

Salt, A. C. (1974) al aislar a Geniculodendron pyriforme de semillas de Picea sitchensis, sometidas a diferentes tratamientos, consideró que G. pyriforme constituye un hongo importante de semilleros, en cuyo estudio puede afectar a gran número de semillas.

En las inoculaciones realizadas reportó que sólo el 21% de las semillas germinaron y a los 100° C. se presentaron las máximas pérdidas. Mencionó que factores como erosión actividad animal, enfermedad del mal de semilleros, así como los tratamientos de estratificación de las semillas, pueden influir grandemente en la actividad de este hongo que es capaz de sobrevivir durante varios años en semillas almacenadas

y en aquellas que permanecen enfermas en los viveros.

Munjal, R. y Sharma, D. (1976) en un estudio sobre mi-
coflora de semillas de Pinus roxburghii, P. wallichiana, y
Cedrus deodora reportaron la presencia de cuarenta hongos de
los cuales veintiocho fueron comunes en todas las especies
de pinos: Alternaria tenuis, Aspergillus flavus, A. humicola,
A. niger, Cephalosporium sp, Chaetomium bostrychodes, C.
globosum, C. spiali, Coprinus sp, Curvularia sp, Fusarium
bostrycoides, F. moliniforme, F. nivale, Penicillium sp,
Pestalotia sp, Mucor globosus, Sordaria fimicola, Mucor
hiemalis, Rhizopus arrhizus, Trichoderma viride, Stemphylium
botryosum, Stilbella nanum. En un 4% del endospermo de la se-
milla de Pinus roxburghii se determinó la presencia de,
Penicillium y en algunas de las semillas mal formadas, delga-
das y pastosas se identificó a Chaetomium spirale.

Estos mismos autores en (1976) realizaron pruebas so-
bre el marchitamiento de plántulas en el estado de preemergen-
cia y postemergencia de Pinus roxburghii y P. wallichiana.
Determinaron que hongos identificados como Aspergillus flavus,
A. niger, Coniothecium sp, Curvularia sp, Helminthosporium sp,
Phoma spp, Stemphylium botryosum, causaron grandes pérdidas
en las plántulas en el estado de preemergencia, y los hongos
como Mucor spp, Cephalosporium sp, Fusarium spp, y Trichoderma
viride fueron los que causaron pérdidas en el estado de post-
emergencia de las plántulas y sólo Aspergillus humicola,
Stysanus medius, fueron los hongos que tuvieron efecto en la
germinación de las plántulas ya que la redujeron en un 11% y
13% .

Whittle, M. A. (1977) al realizar algunas pruebas sobre la presencia de hongos en semillas y conos de Pinus sylvestris, observó que todos los conos maduros y los que permanecieron sobre los árboles fueron invadidos por Sclerophoma pythiophila y hongos que caracterizaron la micoflora de almacenamiento fueron Penicillium y Mucor.

Mason, N. y van, A. (1978), realizaron setenta y un aislamientos a partir de conos, semillas y plántulas juveniles - pertenecientes a Pinus tadea.

Algunos de los hongos aislados correspondieron a géneros Aspergillus, Alternaria, Chaetomium, Curvularia, Epicoccum, Cladosporium, Gilmaniella, Geotrichium, Hyalodendrom, Fusarium, Pestalotia, Penicillium, Rizopus, Syncephalastrum, y Trichothecium. Estos autores mencionan que muchos de éstos microorganismos son comunes en otros hospedantes; sólo diez y siete disminuyeron la actividad de germinación de las plántulas y solo dos Fusarium moliniforme, y Trichothecium sp, causaron verdaderos estragos en los almácigos.

Salinas, Q. R. (1978) menciona que una alta proporción de semillas forestales, particularmente las vanas portan microorganismos contaminantes superficiales o internos adquiridos durante la floración, durante el desarrollo de los frutos o durante la manipulación de estos frutos y de sus semillas. Siendo así transportados a locales o recipientes de almacenamiento, donde si las condiciones de humedad, temperatura e iluminación resultan favorables, los microorganismos son capaces de crear problemas de deterioro de las semillas.

Sharma, D. A. (1980) siendo que el porcentaje de incidencia de los hongos aislados de semillas de Pinus roxburghii, de conos que abrieron en condiciones naturales fue mayor, se

indicó que estos microorganismos están presentes sobre la testa de la semilla y son contaminantes que se desarrollan durante la colecta o almacenamiento de los conos y semillas. Así mismo menciona que los hongos asociados en las semillas extraídas de conos que no abrieron y fueron aseptizados, son considerados como internos de la semilla y parece que son adquiridos durante la formación del cono o fruto. Los hongos aislados de las semillas extraídas fueron identificados como: Aspergillus flavus, A. niger, A. clavatus, Chaetomium bostrychides, Curvularia sp, Fusarium sp, Mucor globosus, Helminthosporium sp, Memnoniella echinata, Oedoscephalum glomerulosum, Penicillium sp, Phoma glomerata, Rhizopus arrhizus, Stemphylium botryosum, Stachybotrys atra, Stysanus medius, Trichoderma viride, y hongos estériles blancos y café.

IV. OBJETIVOS

- I. Determinar la presencia de contaminantes fungosos en semillas de la especie Pinus ayacahute var, veitchii Shaw (1909), de una misma procedencia (Campo - Experimental " San Juan Tetla ", Puebla).
- II. Definir grados de incidencia de contaminaciones y - frecuencia de contaminantes, según los tres años de cosecha del material de estudio, en las tres condiciones de desarrollo embrionario y en las dos partes de la semilla (testa y embrión).
- III. Registrar observaciones de daños o alteraciones en los componentes de la semilla, relacionados con - sus contaminantes.
- IV. Proporcionar información básica utilizable para es tudios similares de la misma especie, o de otras, como contribución a los procesos de selección sani taria de semillas de especies forestales.

V. METODOLOGIA

La semilla empleada en el presente estudio correspondió a la especie Pinus ayacahuite var. vetichii Shaw 1909, (Shaw, R. G. 1906; Martínez, M. 1948; Mirou, T. N. 1967), proporcionada por el Laboratorio de Semillas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, pertenecientes a tres lotes de diferentes años de cosecha (Lote 528 - año 1976; Lote 620 - año 1977; Lote 759 - año 1979) del Campo Experimental " San Juan Tetla " estado de Puebla; conservados en almacenamiento en recipientes de metal, a temperatura de 3°C.

SELECCION DE MUESTRAS

Se tomaron al azar 1500 semillas por lote, las que se depositaron durante 24 hrs. en un recipiente de vidrio perfectamente limpio, conteniendo agua corriente y cerrado para lograr el reblendecimiento de las testas. Una vez eliminada el agua y bajo condiciones de asepsia, fueron abiertas las semillas utilizando el aparato triturador y el selector de semillas (Portlock, F. y Dought, T. 1979: Ver apéndice: Lámina I ; fig. 1, 2), separando testas y embriones seleccionados basandose en el grado de desarrollo embrionario (Ver apéndice: Lámina II; fig. 3, 4, 5) conforme a las siguientes condiciones:

- a. Embriones completamente desarrollados
- b. Embriones poco desarrollados
- c. Embriones no desarrollados

De esta selección fueron obtenidas 420 semillas por lote, las que representaron 140 testas y 140 embriones de cada condición de desarrollo embrionario.

Este material por separado (Testas y embriones desprovistos de tegumento) fué colocado mediante pinzas esterilizadas, en cajas Petri provistas de papel filtro, posteriormente selladas, conservadas en refrigeración hasta el momento de emplearse.

PREPARACION DE MUESTRAS

Las dos porciones de la semillas (Testas y embriones) correspondientes a los tres grados de desarrollo embrionario, fueron sometidas a dos tratamientos, destinandose la mitad - del número total de éstas porciones como material prueba sometido a asepsia superficial con hipoclorito de sodio al 4% durante un minuto y enjuague profuso mediante cinco cambios de agua destilada esterilizada (Ching - Chang, Chen y Shung - Chang, J. 1964); la mitad restante, constituyó el testigo sometido a su vez con agua destilada esterilizada.

Posteriormente todo el material fué colocado en cajas Petri previamente esterilizadas, provistas de papel filtro para secarlo.

SIEMBRA DE MUESTRAS

Todo el material seco como se indicó anteriormente, fué transferido en condiciones de asepsia a placas previamente es

terilizadas conteniendo medio de cultivo *Papa - Dextrosa Agar* de confección casera, al cual se adicionaron unas gotas de ácido láctico hasta un *ph* de 3.9, para prevenir el desarrollo de bacterias, modificándose el proceso de preparación como se indica en el apéndice (Verna, L. C y Herrero, F. 1952, Ogawa, M. y Gilpatrick, D. 1978).

DISTRIBUCION DE MUESTRAS

Para el número total de cada porción de la semilla (140 Testas, 140 embriones) se emplearon 28 placas, destinándose 14 para el material prueba y 14 para el testigo, distribuyéndose por caja 5 porciones de testas o embriones (Ver apéndice: Lámina III), cada una en su caso debidamente numerada para su identificación y correlación posterior en las anotaciones de datos.

Todo el material fúellevado a incubación a una temperatura de 25 a 27° C. durante quince a veinte días para propiciar el desarrollo de microorganismos (Ver apéndice: Lámina IV).

AI SLAM IENTO DE MICROORGANISMOS

Del material sembrado e incubado, se realizaron observaciones cada tercer día, y durante quince a veinte días fueron aislados los microorganismos desarrollados en tubos (por duplicado) conteniendo medio *Papa - Dextrosa - Agar* inclinado de confección casera: por inoculación en punto mediante asa micológica e incubación de 25 a 27°C. en estufa para cultivos, durante tiempo variable (5 a 8 días), según los requerimientos de las cepas.

De las cajas de siembra original, los embriones y testas que no mostraron aún desarrollos fungosos en el momento del aislamiento, fueron transferidos a nuevas cajas de medio de cultivo, con objeto de evitar contaminaciones inconvenientes procedentes de los inóculos desarrollados.

IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS

La identificación de microorganismos fué conducida bajo los siguientes procedimientos micológicos:

1. Caracteres macoscópicos.

Incluyeron observaciones de las colonias desarrolladas considerando: forma, consistencia, tamaño, estructura y aspecto (color del micelio vegetativo, color del micelio de fructificación, cantidad de desarrollo, aspecto de desarrollo profundo, modificaciones en el medio por acción del hongo " color, turbidez, difusión de pigmentos "; (Verna, L. y Herrero, F. 1952).

2. Caracteres microscópicos.

Incluyeron técnicas de observación en microscopio óptico realizándose:

a. Preparaciones directas con el empleo de portaobjetos, cubreobjetos y agua destilada esterilizada.

b. Preparaciones con colorante vital como azul de lactofenol y el empleo de portaobjetos y cubreobjetos, - (Verna, L. y Herrero, F. op. cit).

c. Técnica de microcultivo (Ridell, R. W. 1950); Ver apéndice.

d. Método de Rivalier y Seydel (Langeron, M. 1945); Ver apéndice.

3. Empleo de claves micológicas (Funder, S. 1953, Molina, LL. M. 1957, Hazen, L. y Reed, C. 1960, Gilman, C. J. 1963, Malone, P. y Muskett, E. 1964, Barnett, L. H. 1960).

METODOLOGIA ESTADISTICA

Fara los grupos de hongos aislados de embriones y testas, fueron realizados los siguientes procedimientos estadísticos.

Se utilizó el diseño experimental Bloque al Azar (Ostle, B. 1968; Motgomery, C. 1976) comprendiendo tres tratamientos (Lotes de semillas, Condición de desarrollo embrionario, - Aseptizante) con catorce repeticiones (cajas de cultivo). Mediante éste diseño y la elección del arreglo "Factorial 3x3x2" (Steel, D. y Torrie, H. 1960; Snedecor, W. C. 1961; Motgomery, C. op. cit.) se efectuó la combinación de tratamientos o factores.

Se realizaron los correspondientes Análisis de Varianza (Caballero, D. 1973; Motgomery, C. op. cit.) y las Pruebas de Separación de Medias de Tukey (Walter, F. 1955; Steel, D. y Torrie, H. op. cit. ; Castañeda, R. P. 1978) que consiste en efectuar una comparación de medias de cada tratamiento y decidir cual es significativo y cual no lo es.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

CLASES DE HONGOS

De los resultados obtenidos en embriones y testas sometidos a tres tratamientos en estudio, fué determinada la presencia de dos clases de hongos Zygomycetes y Deuteromycetes, - identificandose dos miembros para la primera y un número mayor para la última.

ZYGOMYCETES EN EMBRIONES

Sobre el efecto de los tratamientos (Lotes, Condición de desarrollo embrionario, Aseptizante) en el desarrollo de los hongos pertenecientes a la clase de los Zygomycetes, aislados de embriones; el análisis de varianza mostró (Cuadro I) una alta significancia para los tratamientos e interacción de los mismos, indicando que tuvieron efectos en el desarrollo de estos microorganismos, resultados que no fueron similares para la interacción entre los tres tratamientos.

CUADRO I Análisis de varianza para la clase de Zygomycetes en embrión.

Fuente de variación	Grados de Libertad.	Cuadrados Medios.	F
Lotes	2	192.11	206.14 ⁺⁺
Condición de desarrollo embrionario	2	35.980	38.61 ⁺⁺
Aseptizante	1	37.337	40.06 ⁺⁺
Lot. / Cond. de desarrollo embrionario	4	20.480	21.06 ⁺⁺
Lotes / Aseptizante	2	6.873	7.38 ⁺⁺
Cond. de desarrollo embrionario / Aseptizante	2	7.315	7.85 ⁺⁺
Lot. / Cond. desa. emb. / Asep.	4	1.563	1.68
Error	234		

Significativo al nivel de 0.01.

Mediante la prueba de separación de Medias de Tukey se de terminó que para el tratamiento Lotes (Cuadro 2) el más antiguo 528 (colecta 1975) fué el significativamente diferente - al resto, por presentar el mayor número de microorganismos de sarrollados, el que disminuye relativamente en el lote más reciente 759 (colecta 1979) , lo que indicó que posiblemente el tiempo y las condiciones de almacenamiento según Holmes, G. y Buszewicz, G. (1958) y Prisyazhnyuk, A. A. (1960) influyeron en el desarrollo de los microorganismos identificados en el caso que se trata.

En otros trabajos (Salisbury, P. J. 1955 y Whittle, M. A. 1977) los microorganismos fueron considerados como micoflora de semillas, de almacenamiento de otras especies forestales.

Para el tratamiento Condición de desarrollo embrionario (Cuadro 2) se determinó que los embriones completamente desarrollados fueron los comparativamente diferentes, por mostrar la mayor incidencia de microorganismos y disminuir en los embriones poco desarrollados y sucesivamente en no desarrollados.

En el tratamiento Aseptizante (Cuadro 2) se determinó que las muestras testigo fueron significativamente diferentes, por presentarse como era de esperarse el mayor número de microorganismos.

CUADRO II Comparación de medias de tratamiento para el grupo de Zygomycetes en embrión.

Tratamientos	Medias	Significancia estadística
<u>Lotes</u>		
Lote 528 (cosecha 1976)	3.250	a
Lote 620 (cosecha 1977)	1.416	b
Lote 759 (cosecha 1979)	0.550	c
<hr/>		
<u>Condición de desarrollo embrionario</u>		
Embrión completamente desarrollado	2.238	a
Embrión poco desarrollado	1.738	b
Embrión no desarrollado	0.254	c
<hr/>		
<u>Aseptizante</u>		
Testigo	1.785	a
Prueba	1.254	b

Las literales (a, b, c) indican para cada tratamiento, las diferencias de medias obtenidas respecto a una probabilidad de 0.01 de acuerdo con la prueba de separación de Medias de Tukey.

De los resultados de interacción de tratamientos de acuerdo a la prueba de separación de Medias de Tukey, se determinó que para el tratamiento Lotes / Condición de desarrollo embrionario (Cuadro 3), aparentemente el tiempo de almacenamiento influyó en la aparición de microorganismos (Frisyazhnyuk, A. A. op. cit.) como anteriormente se mencionó, por presentarse un mismo grado de incidencia en cada uno de los lotes en su caso, observándose además una disminución cuantitativa en relación con la antigüedad de lote, siendo los más recientes los de menor incidencia de microorganismos. En cuanto a la condición de desarrollo embrionario se determinó, que los embriones completamente y poco desarrollados pertenecientes al lote más antiguo 528 (colecta 1976), fué en donde ocurrió mayor desarrollo de microorganismos, posiblemente por las condiciones propias de las semillas y la humedad prevaleciente, resultados que no fueron similares respecto a las condiciones semejantes en los lotes restantes en donde varió y disminuyó la incidencia de microorganismos.

CUADRO III

Comparación de medias de tratamiento en la interacción Lote/Condición de desarrollo embrionario para el grupo de Zygomycetes, en embrión.

<u>Tratamiento</u> <u>Lotes/Cond. de</u> <u>desarrollo emb.</u>	Medias	Significancia estadística
Lote 528 (1976)/Emb. comp. desarrollado	3.964	a
Lote 528 (1976)/Emb. poco desarrollado	4.071	a
Lote 528 (1976)/Emb. no desarrollado	1.714	b
Lote 620 (1977)/Emb. comp. desarrollado	2.535	b
Lote 620 (1977)/Emb. poco desarrollado	1.000	c
Lote 620 (1977)/Emb. no desarrollado	0.714	c
Lote 759 (1979)/Emb. comp. desarrollado	0.214	c
Lote 759 (1979)/Emb. poco desarrollado	0.142	c
Lote 759 (1979)/Emb. no desarrollado	0.392	c

Las literales (a, b, c) indican las diferencias o igualdad en su caso de medias de tratamiento, respecto a una probabilidad de 0.01 de acuerdo con la prueba de separación de Medias de Tukey.

En cuanto al tratamiento Lotes/Aseptizante, se indicó (Cuadro 4) que el aseptizante empleado, sí influyó sobre el desarrollo de éste grupo, puesto que la frecuencia de aislamientos disminuyó en general en las muestras prueba respecto a los testigos. Esto indica una decisiva influencia del aseptizante sobre la oportunidad de aislamiento de los hongos.

CUADRO IV Comparación de medias de tratamiento en la interacción Lotes/Aseptizante para el grupo de Zygomycetes en embrión.

<u>Tratamiento Lotes/Aseptizante</u>	Medias	Significancia estadística
Lote 528 (1976) / Testigo	3.928	a
Lote 528 (1976) / Prueba	2.571	b
Lote 620 (1977) / Testigo	1.785	c
Lote 620 (1977) / Prueba	1.047	d
Lote 759 (1979) / Testigo	0.357	d
Lote 759 (1979) / Prueba	0.142	e

Las literales (a, b, c) indican las diferencias o igualdad en su caso de medias de tratamiento, respecto a una probabilidad de 0.01 de acuerdo con la prueba de separación de Medias de Tukey.

En el tratamiento Condición de desarrollo embrionario/Aseptizante (Cuadro 5) se determinó que el efecto del aseptizante fué en los embriones completamente desarrollados y en los embriones poco desarrollados, donde se obtuvo una significancia estadística similar entre el testigo y la prueba, se interpretó como un efecto negativo del aseptizante, en cuanto a disminuir las -

oportunidades de aislamiento de los microorganismos, circunstancia que comparada con los otros casos que aparecen siendo lógicos como era de esperarse, pudo ser debida a varias situaciones que indujeron fuentes de error experimental.

CUADRO V Comparación de medias de tratamiento en la interacción Condición de desarrollo embrionario / Asepsizante para el grupo de Zygomycetes en embrión.

<u>Tratamiento</u> <u>Cond. de desarrollo</u> <u>embrionario</u>	<u>Medias</u>	<u>Significancia</u> <u>estadística</u>
Embrión completamente desarrollado / Testigo	2.833	a
Embrión completamente desarrollado / Prueba	1.642	b
Embrión poco desarrollado / Testigo	1.785	b
Embrión poco desarrollado / Prueba	1.690	b
Embrión no desarrollado / Testigo	1.452	b
Embrión no desarrollado / Prueba	0.428	c

Las literales (a, b, c) indican las diferencias o igualdad en su caso de medias de tratamiento, respecto a una probabilidad de 0.01 de acuerdo con la prueba de separación de Medias de Tukey.

ZYGOMYCETES EN TESTAS

El análisis de varianza para la clase Zygomycetes en testa indicó (Cuadro 6) que los tratamientos (Lotes, Condición de desarrollo embrionario, Aseptizante) y la interacción Lotes / Condición de desarrollo embrionario, tuvieron efectos en el desarrollo de este grupo de hongos, con características de una alta significancia.

CUADRO VI Análisis de varianza para la clase de Zygomycetes en Testa.

Fuente de variación	Grados de Libertad.	Cuadrados Medios.	F
Lotes	2	624.694	492.09 ⁺⁺
Condición de desarrollo embrionario	2	91.194	68.92 ⁺⁺
Aseptizante	1	58.099	43.91 ⁺⁺
Lot. / Cond. de desarrollo embrionario	4	51.819	99.16 ⁺⁺
Lotes / Aseptizante	2	3.956	2.99
Cond. de desarrollo embrionario / Aseptizante	2	1.480	1.12
Lot. Cond. desa. emb. / Asep.	4	5.712	4.32
Error	234	1.323	

⁺⁺Significativo al nivel de 0.01.

En la prueba de separación de Medias de Tukey, se determinó que los resultados para cada tratamiento (Cuadro 7) fueron semejantes a los obtenidos de embriones, en cuanto al año de colecta, condición de desarrollo embrionario y efecto del aseptizante, solo que el mayor desarrollo de microorganismos fué de -

terminado en testas, situación que indica la probabilidad que esta parte de la semilla es la más expuesta a la deposición o colonización de hongos, cuyas esporas se adhieren a las superficies tanto en forma natural como debido a condiciones de un mal manejo de semillas, desde su colecta hasta su almacenamiento, y procesos mecánicos de desalamiento (Gibson, I. A. S. 1957; Whittle, M. A. 1957; Sharma, D. A. 1980) que pueden alterar definitivamente a la semilla propiciando contaminaciones inconvenientes.

CUADRO VII Comparación de medias de tratamiento para el grupo de Zygomycetes en testa.

<u>Tratamientos</u> <u>Lotes</u>	<u>Medias</u>	<u>Significancia</u> <u>estadística</u>
Lote 528 (cosecha 1976)	7.083	a
Lote 620 (cosecha 1977)	2.714	b
Lote 759 (cosecha 1979)	2.071	c
<hr/>		
<u>Condición de desarrollo</u> <u>embrionario</u>		
Testa emb. completamente desarrollado	5.142	a
Testa emb. poco desarrollado	3.535	b
Testa emb. no desarrollado	3.190	c
<hr/>		
<u>Aseptizante</u>		
Testigo	4.436	a
Prueba	3.476	b

Las literales (a, b, c) indican para cada tratamiento, las diferencias de medias obtenidas respecto a una probabilidad de 0.01 de acuerdo a la prueba de separación de Medias de Tukey.

En los resultados de interacción Lotes/Condición de desarrollo embrionario se determinó (Cuadro 8), que para el mismo caso de embriones, el tiempo de almacenamiento influyó en la aparición de los microorganismos desarrollados, observándose una disminución cuantitativa de la incidencia respecto a la antigüedad del lote. Se determinó - que en testas correspondientes a embriones completamente y no desarrollados pertenecientes al lote más antiguo 528 (colecta 1976) ocurrió el mayor desarrollo de microorganismos, variando en las testas de las tres condiciones de desarrollo embrionario pertenecientes a los lotes más recientes, resultados que indicaron nuevamente que las condiciones propias de las semillas y la humedad prevaleciente, fueron posibles factores que influyeron en los microorganismos desarrollados.

CUADRO VIII

Comparación de medias de tratamiento en la interacción Lotes/Condición de desarrollo embrionario para el grupo de Zygomycetes en testa.

<u>Tratamiento</u> <u>Lotes/Cond. de</u> <u>desarrollo embrionario</u>	<u>Medias</u>	<u>Significancia</u> <u>estadística</u>
Lote 528 (1976) / Testa Emb. com. desarrollado	7.464	a
Lote 528 (1976) / Testa Emb. poco desarrollado	5.753	b
Lote 528 (1976) / Testa Emb. no desarrollado	8.428	a
Lote 620 (1977) / Testa Emb. com. desarrollado	4.000	c
Lote 620 (1977) / Testa Emb. poco desarrollado	2.428	d
Lote 620 (1977) / Testa Emb. no desarrollado	1.714	d
Lote 759 (1979) / Testa Emb. com. desarrollado	3.964	c
Lote 759 (1979) / Testa Emb. poco desarrollado	1.785	d
Lote 759 (1979) / Testa Emb. no desarrollado	0.464	e

Las literales (a, b, c) indican las diferencias o igualdad en su caso de medias de tratamiento, respecto a una probabilidad de 0.01 de acuerdo con la prueba de separación de Medias de Tukey.

DEUTEROMYCETES EN EMBRIONES

Para el grupo de Deuteromycetes en embrión el análisis de varianza mostró (Cuadro 9) que los tratamientos (Lotes, Condición de desarrollo embrionario, Aseptizante) y las interacciones Lotes/Condición de desarrollo embrionario y Lotes/Aseptizante, por ser altamente significativos tuvieron efecto en el desarrollo de éste grupo de hongos.

CUADRO IX Análisis de varianza para la clase de Deuteromycetes en embrión.

Fuente de variación	Grados de Libertad.	Cuadrados Medios.	F
Lotes	2	22.265	44.15 ⁺⁺
Condición de desarrollo embrionario	2	4.075	8.08 ⁺⁺
Aseptizante	1	2.682	5.32 ⁺⁺
Lot. / Cond. de desarrollo embrionario	4	6.908	13.70 ⁺⁺
Lotes / Aseptizante	2	5.956	11.81 ⁺⁺
Cond. de desarrollo embrionario Aseptizante	2	0.527	1.05
Lotes / Cond. desa. em. Asep.	4	1.158	2.30
Error	234	0.503	

⁺⁺Significativo al nivel de 0.01

La prueba de separación de Medias de Tukey indicó que para el tratamiento Lotes (Cuadro 10), el correspondiente al tiempo de almacenamiento intermedio 620 (colecta 1977), fué comparativamente diferente, por presentar la mayor incidencia de microorganismos, disminuyendo en los lotes más antiguo 528 (colecta 1976) y más reciente 759 (colecta 1979). Lo que indica

que existe un lapso intermedio en el que ocurre un aumento en las poblaciones de microorganismos, independientemente de los géneros componentes.

En el tratamiento Condición de desarrollo embrionario (Cuadro 10) se determinó que los embriones no desarrollados y poco desarrollados fueron los que presentaron mayor incidencia de microorganismos, y para el tratamiento Aseptizante - (Cuadro 10), se obtuvo que las muestras prueba y testigo - presentaron similitud en la incidencia de microorganismos, indicando que posiblemente el aseptizante no influyó sobre el desarrollo de éste grupo de hongos.

CUADRO X Comparación de medias de tratamiento para el grupo de Deuteromycetes en embrión.

<u>Tratamientos</u> <u>Lotes</u>	<u>Medias</u>	<u>Significancia</u> <u>estadística</u>
Lote 528 (cosecha 1976)	0.333	b
Lote 620 (cosecha 1977)	1.273	a
Lote 759 (cosecha 1979)	0.440	b
<hr/>		
<u>Condición de desarrollo</u>		
<u>embrionario</u>		
Embrión completamente desarrollado	0.464	b
Embrión poco desarrollado	0.678	a
Embrión no desarrollado	0.904	a
<hr/>		
<u>Aseptizante</u>		
Testigo	0.579	a
Prueba	0.785	a

Las literales (a, b, c) indican para cada tratamiento, las diferencias de medias obtenidas respecto a una probabilidad de 0.01 de acuerdo con la prueba de separación de Medias de Tukey.

De acuerdo con la prueba de separación de Medias de Tukey para el tratamiento Lotes/Condición de desarrollo embrionario se determinó (Cuadro 11) que el lote de año intermedio 620 (colecta 1977), le correspondió las mayores incidencias, siendo los embriones poco desarrollados los comparativamente diferentes, lo que posiblemente indique que las condiciones propias de la semilla y condiciones de almacenamiento, fueron factores que propiciaron el desarrollo de microorganismos, siendo algunos de los géneros reportados como micoflora de semillas de otras especies forestales (Holmes, G. y Buszewicz, G. 1958, Urosevic, B. CSc. 1961, Ghing, Chang, Chen y Shung, Chang, J. 1966).

La similitud de la incidencia de microorganismos en embriones no desarrollados de los tres lotes de semillas, muestra que estos microorganismos posiblemente sean indicadores del deterioro de la semilla y condiciones prevaletientes de humedad, favorecieron el desarrollo de microorganismos; además de no existir embrión, siendo limitante en algunos casos, puesto que las menores incidencias fueron determinadas en embriones completamente y poco desarrollados.

CUADRO XI

Comparación de medias de tratamiento en la interacción Lotes/Condición de desarrollo embrionario para el grupo Deuteromycetes en embrión.

<u>Tratamiento</u> <u>Lotes/Cond. de</u> <u>desarrollo emb.</u>	Medias	Significancia estadística
Lote 528 (1976)/Emb. comp. desarrollado	0.071	c
Lote 528 (1976)/Emb. poco desarrollado	0.071	c
Lote 528 (1976)/Emb. no desarrollado	0.857	b
Lote 620 (1977)/Emb. comp. desarrollado	0.892	b
Lote 620 (1977)/Emb. poco desarrollado	1.892	a
Lote 620 (1977)/Emb. no desarrollado	1.035	b
Lote 759 (1979)/Emb. comp. desarrollado	0.428	b
Lote 759 (1979)/Emb. poco desarrollado	0.071	c
Lote 759 (1979)/Emb. no desarrollado	0.821	b

Las literales (a, b, c) indican las diferencias o igualdad en su caso de medias de tratamiento, respecto a una probabilidad de 0.01 de acuerdo con la prueba de separación de Medias de Tukey.

En los resultados de interacción del tratamiento Lotes/Aseptizante, se determinó (Cuadro 12) que el aseptizante empleado no influyó en todos los casos sobre la aparición de desarrollos fungosos en los cultivos, por presentar el mayor desarrollo de microorganismos las muestras testigo pertenecientes al lote de año intermedio 620 (colecta 1977), probablemente por causas de error experimental que alteraron los resultados.

En los lotes de año más antiguo 528 (colecta 1976) y año más reciente 759 (colecta 1979), la influencia del asepticante se manifestó en las muestras prueba, por determinarse una disminución de microorganismos respecto a los testigo, lo que era de esperarse.

CUADRO XII Comparación de medias de tratamiento en la interacción Lotes/Asepticante para el grupo - Deuteromycetes en embrión.

<u>Tratamiento Lotes/Asepticante</u>	<u>Medias</u>	<u>Significancia estadística</u>
Lote 528 (1976) / Testigo	0.285	c
Lote 528 (1976) / Prueba	0.380	b
Lote 620 (1977) / Testigo	0.880	b
Lote 620 (1977) / Prueba	1.666	a
Lote 759 (1979) / Testigo	0.571	b
Lote 759 (1979) / Prueba	0.309	c

Las literales (a, b, c) indican las diferencias o igualdad en su caso de medias de tratamiento, respecto a una probabilidad de 0.01 de acuerdo con la prueba de separación de Medias de Tukey.

DEUTEROMYCETES EN TESTAS

Los resultados obtenidos del análisis de varianza para la clase de Deuteromycetes en testa mostró (Cuadro 13) que sólo el tratamiento Condición de desarrollo embrionario, presentaron una alta significancia, indicando que tuvieron efecto en el desarrollo de éste grupo de hongos.

CUADRO XIII Análisis de varianza para la clase de Deuteromycetes en testa.

Fuente de variación	Grados de Libertad.	Cuadrados Medios.	F
Lotes	2	3.250	4.56
Condición de desarrollo embrionario	2	5.904	8.28 ⁺⁺
Aseptizante	1	2.099	2.94 ⁺⁺
Lot. / Cond. de desarrollo	4	6.869	9.64 ⁺⁺
Lotes / Aseptizante	2	0.504	0.71
Cond. de desarrollo embrionario / Aseptizante	2	0.777	1.09
Lot. / Cond. desa. emb. Asep.	4	2.682	3.76
Error	234		

⁺⁺Significativo al nivel de 0.01.

En la prueba de separación de Medias para el tratamiento Condición de desarrollo embrionario se determinó (Cuadro 14) que la incidencia de microorganismos obtenida, fue muy similar respecto a la encontrada en embriones, correspondiendo las ma yores incidencias a testas de embriones, no desarrollados y - embriones poco desarrollados.

CUADRO XIV

Comparación de medias de tratamiento para el grupo de Deuteromycetes en testa.

<u>Tratamientos</u> <u>Condición de desarrollo</u> <u>embrionario</u>	<u>Medias</u>	<u>Significancia</u> <u>estadística</u>
Testa emb. completamente desarrollado	0.321	b
Testa emb. poco desarrollado	0.654	a
Testa emb. no desarrollado	0.845	a

Las literales (a, b, c) indican las diferencias o igualdad en su caso de medias de tratamiento, respecto a una probabilidad de 0.01 de acuerdo con la prueba de separación de Medias de Tukey.

En los resultados de interacción del tratamiento Lotes/Condición de desarrollo embrionario, se determinó (Cuadro 15) que las mayores incidencias fueron obtenidas en testas de embriones poco desarrollados de los lotes más recientes 620, 759 (colecta 1977, 1979), por lo que al igual que los resultados de embriones, las condiciones propias de las semillas y condiciones de almacenamiento, posiblemente fueron factores que propiciaron el desarrollo, de microorganismos y las mayores incidencias obtenidas en embriones no desarrollados del lote más antiguo 528 (colecta 1976) y más reciente 759 (colecta 1979) pudieron deberse a condiciones de humedad y ausencia del embrión, que en éste caso pudo ser limitante en testas de embriones completamente desarrollados de los tres lotes de semillas, por determinarse las menores incidencias de microorganismos.

CUADRO XV

Comparación de medias de tratamiento en la interacción Lotes/Condición de desarrollo embrionario para el grupo de Deuteromycetes en testa.

<u>Tratamiento</u> <u>Lotes/Cond. de</u> <u>desarrollo embrionario</u>	Medias	Significancia estadística
Lote 528 (1976) / Testa Emb. com. desarrollado	0.285	b
Lote 528 (1976) / Testa Emb. poco desarrollado	0.000	c
Lote 528 (1976) / Testa Emb. no. desarrollado	1.250	a
Lote 620 (1977) / Testa Emb. com. desarrollado	0.357	b
Lote 620 (1977) / Testa Emb. poco desarrollado	0.642	a
Lote 620 (1977) / Testa Emb. no desarrollado	0.428	b
Lote 759 (1979) / Testa Emb. com. desarrollado	0.321	b
Lote 759 (1979) / Testa Emb. poco desarrollado	1.321	a
Lote 759 (1979) / Testa Emb. no desarrollado	0.857	a

Las literales (a, b, c) indican las diferencias o igualdad en su caso de medias de tratamiento, respecto a una probabilidad de 0.01 de acuerdo con la prueba de separación de Medias de Tukey.

GENEROS DE HONGOS

Z Y G O M Y C E T E S

En la clase de Zygomycetes (Lámina VI) fueron identificadas tres cepas, de dos géneros de hongos Mucor 1, 2 y Rhizopus (Barnett, L. H. 1960), determinandose que en embriones y testas Mucor 1 fué el más prevaleciente en los tres lotes de semillas, y Mucor 2 fué el de menor incidencia.

Es posible que estos microorganismos no sean contaminantes del medio ambiente, porque los resultados obtenidos de los tratamientos analizados estadísticamente fueron muy similares en embriones y testas, y esta última parte de la semilla fué seleccionada al azar, no correspondiendo a su respectivo embrión que fué sembrado, pero sí a la selección que se hizo en cuanto a la condición de desarrollo embrionario.

Se observó que aparentemente estos géneros no causaron deterioros en los embriones y testas, por no presentarse malformaciones o decoloraciones, a diferencia de los resultados que mencionan (Vaartaja, O. 1952 y Urosevic, B. op. cit.), además que un gran número de embriones germinaron cuando se mantuvieron en la estufa en presencia del desarrollo de micelio de estos microorganismos.

En la mayoría de los trabajos realizados se hace mención de algunas especies de estos, se consideran causadores de daños en el estado de preemergencia y postemergencia de plántulas forestales (Gibson, I. A. S. op. cit., Urosevic, B. op. cit. , Munjal, R. y Sharma, D. A. 1976.).

DEUTEROMYCETES

De la clase Deuteromycetes fueron identificadas catorce cepas de ocho géneros de hongos: Aspergillus cinco cepas - (Lámina VII), Trichoderma, Hormodendrum, Alternaria - Helminthosporium, Stemphylium (Lámina VIII), Penicillium tres cepas (Lámina IX), Monilia (Barnett, L. H. op. cit.), presentándose como más prevalecientes las cepas registradas como Aspergillus 1 y Penicillium 1 en los tres lotes aislados de embriones y testas. Algunas cepas de los géneros Alternaria, Helminthosporium, Monilia y Stemphylium fueron muy escasas.

Se observó que algunos de estos géneros, a pesar de ser mínima su prevalecencia ocasionaron daños en los embriones, referibles como malformaciones, adelgazamientos, y reblandecimientos. Estas situaciones son comparables con las que mencionan algunos autores (Leukel, R. y Martín, J. 1943, Tuite, F. y Christensen, M. 1955, Gibson, I. A. op. cit. Timonin, I. M. 1964, Chi - Chang, Chen y Shung, Chang. 1956) ocurriendo en semillas de gramíneas y de especies forestales, donde la germinación es reducida. De aquí que es posible inferir que algunos de estos géneros causaron algunos daños en las semillas de Pinus ayacahuite var vaitchii, motivo de este estudio.

Algunos de los embriones que permanecieron en la estufa en presencia de desarrollo micelial de algunos de estos hongos, no germinaron.

Es probable que la presencia de estos microorganismos en embriones no desarrollados, sea un indicio del deterioro y - tal vez se presenten en las mismas condiciones como la menciona (Salinas, Q. R. 1978 y Fortlock, F. y Dought, T. 1979), ya que se observó que durante la selección de embriones no desarrollados, al ser abiertas las semillas ya presentaban micelio desarrollado y esporas. Cabe mencionar que estos microorganismos no fueron contaminantes del ambiente, puesto que se encontraron en embriones y testas habiendo sido esta última parte de la semilla sometida a las mismas condiciones de selección (Condición de desarrollo embrionario) como anteriormente se indicó en la descripción de Zygomycetes identificados.

Se encontró que el asepticante empleado fué eficaz, pero sin definir, como lo mencionan (Chi. - Chang, Chen y Shung, Chang 1964, Sharma, D. A. op. cit.), que su efecto fuera sobre microorganismos de la parte externa de la semilla (testa) o interna (embrión), por las condiciones metodológicas que se siguieron en este estudio; de aquí que es posible mencionar que géneros de las clases Zygomycetes y Deuteromycetes, mostraron cierta susceptibilidad aunque no todos los casos.

Se observó que algunas cepas identificadas como Rhizopus, Spicaria, y Rhodotorula^{*} fueron definitivamente contaminantes de laboratorio que se presentaron en mayor frecuencia en los medios no inoculados y durante las pruebas de esterilidad del medio Papa - Dextrosa - Agar, por la formación de agua de condensación de las cajas de cultivo.

*Identificación realizada por QFB. Raúl Garza V. de la Facul tad de Química (U. N. A. M.).

VII. CONCLUSIONES

1. Dos clases de hongos representados en diez y siete cepas, de diez géneros (Alexopoulos, C. J. 1960 y Barnett, L. H. 1960), fueron los microorganismos aislados de embriones y testas:

Clase Zygomycetes: Mucor, 2 y Rhizopus, 1

Clase Deuteromycetes: Alternaria, 1; Aspergillus, 5;
Helminthosporium, 1; Hormodendrum, 1;
Monilia, 1; Penicillium, 3;
Stemphylium, 1; Trichoderma, 1

2. La mayor incidencia y frecuencia correspondió a representantes de Zygomycetes y las menores a Deuteromycetes.
3. De acuerdo a las observaciones directas y a las confirmaciones de los cálculos estadísticos, el tiempo de almacenamiento tuvo influencia en la incidencia de microorganismos Zygomycetes en embriones y testas y para el grupo - Deuteromycetes; sin embargo se presenta un aumento de las poblaciones de microorganismos en las semillas del lote correspondiente al lapso intermedio de cosecha, posiblemente por efecto de las condiciones de las mismas semillas.
4. Es probable que las deficiencias de manipulación de semillas, desde su colecta hasta su colocación en recipientes de almacenamiento, hayan inducido variaciones en la incidencia de Zygomycetes, particularmente en testas, debido a que esta parte de la semilla es la mas expuesta.

5. No se define en que condición de desarrollo embrionario prevalece la incidencia de Zygomycetes y Deuteromycetes aislados de embriones y testas.
6. La frecuencia de los Deuteromycetes o de los Zygomycetes es independiente de los daños inducidos; a pesar de ser mínima la frecuencia de los primeros los daños observados (reblandecimiento de embriones) estuvieron definitivamente asociados con este grupo. En contraste con la mayor frecuencia del segundo grupo que no indujo daños como los señalados.
7. Es probable que la incidencia de algunos de los miembros de la clase de los Deuteromycetes aislados de embriones no desarrollados y de sus testas correspondientes (semilla vana), haya sido causa decisiva del deterioro de la semilla.
8. La influencia del asepticante hipoclorido de sodio fué definida como factor limitante de la frecuencia de aislamientos, tanto del material de embriones como de testas. Excepcionalmente se apreció ineffectividad del producto, atribuible a fallas técnicas imponderables.
9. Las condiciones y medios de trabajo impidieron precisar cuándo los microorganismos aislados provinieron de las partes externas o internas de la semilla.

10. Se confirma que los microorganismos identificados provinieron de la semilla y no de contaminaciones de laboratorio, por una parte por el hecho de haber sido aislados con cierta frecuencia de embriones y testas; por otra parte, con apoyo en la literatura, porque diferentes autores refieren algunos de los géneros (como los hallados en este trabajo) siendo componentes de la micoflora de otras especies forestales.

VIII. SUGERENCIAS

Siendo poco conocida la Micoflora de semillas de especies forestales y dada su importancia, se sugiere la continuidad de investigaciones sobre muchos aspectos que faltan por conocer, algunos de los cuales son referibles a determinaciones de Micoflora de diversidad de especies de coníferas, desde la colecta de los conos, hasta el almacenamiento de las semillas.

El conocimiento de los microorganismos incidentes en las partes componentes de la semilla y la realización de pruebas de patogenicidad mediante inoculaciones comprobatorias de los microorganismos aislados, permitirán tener importante información acerca de posibilidades para prevenir daños ocasionables por los microorganismos, en el lapso del almacenamiento de las semillas y durante su manejo en los viveros forestales; información que habrá de reforzar la realización de análisis fitosanitarios de semillas, como integración de pruebas rutinarias de Laboratorio, para respaldar el establecimiento de un sistema de certificación sanitaria de semillas, con el que aún no se cuenta en México.

IX. BIBLIOGRAFIA

Angnihotri, P. y Vaartaja, O. 1958. Seed exudates from Pinus resinosa and their effects on growth and zoospore germination of Pythium afertile. CANADIAN JOURNAL OF BOTANY 46:1135-1141.

Ainsworth, C. y Sussman, S. 1965. The fungi. Vol. I-III. ACADEMIC PRESS. New York-London.

Alexopoulos, C. J. 1976. Introducing Mycology 3a. Ed. JOHN WILEY and SONS. New. York.

Angello, L. y Kaplan, W. 1963. Laboratory manual of medical Mycology. GOVERNMENT PRINTING Washinton.

Barnett, L. H. 1960. Illustrated genera of imperfect fungi. 2a Ed. BURGESS PUBLISHING COMPANY.

Bloomberg, J. W. 1966. The occurrence of endophytic fungi in Douglas-fir seedling and seed. CANADIAN JOURNAL OF BOTANY 44 (10):413-420.

_____ 1969. Disease of Douglas-Fir seed during cone storage. FOREST SCIENCE 15 (2): 176-181.

Bramlett, L. y Belcher, W. 1976. Cone analysis of southern pines. GENERAL TECHNICAL 13.

Caballero, D. M. 1967. Efectos del tamaño de la semilla y tres tipos de sustrato en la germinación y desarrollo inicial de Pinus pseudostrobus var. oaxacana. BOLETIN TECNICO # 23. INIF Méx.

_____ 1973. Estadística práctica para dasomos. Publicación # 26 Subsecretaría Forestal y de la Fauna. Sag.

Caballero, D. y Toral. 1967. Efectos del tamaño de la semilla y tres tipos de sustrato en la germinación y desarrollo inicial de Pinus pseudostrobus var. oaxacana Martínez. BOLETIN TECNICO # 23. INIF. México.

Chiu-Chang, Chen y Shung-Chang, J. 1964. Interaction of seed borne and soil-borne microorganisms in relation to Damping off disease of conifers. BOTANICAL BULLETIN OF ACADEMIA SINICA 7 (7):1-13.

_____ 1964. Factors affecting the isolation of microorganisms associated with conifers seed. BOTANICAL BULLETIN OF ACADEMIA SINICA 6 (7):106-115.

_____ 1966. Microflora of coniferous seed in Taiwan. BOTANICAL BULLETIN OF ACADEMIA SINICA 7 (2): 75-81.

Christensen, C. M. 1978. Fungi and seed quality OUTLOOK AGRICULTURE 9 (5):209-213.

Christensen C. M. y López, L. C. 1962. Daños que causan en México los hongos a los granos almacenados Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas Sag. FOLLETO TECNICO # 44.

Christensen C. M. y Kaufman, H. H. 1976. Contaminación por hongos en granos almacenados la. Ed. FAX-MEXICO. México, D.F.

Cox, R. S. 1953. Etiology and control of serious complex of diseases of conifer seedling ABSTR. IN PHYTHOPATHOLOGY 43 (9): 469.

Crocker, W. 1948. Growth of plants. REINHOLD PUBLISHING CORPORATION New. York.

1957. Physiology of seed. 2a. Ed. CRONICA BOTANICA. U. S. A.

Donough, T. W. 1977. Seed Physiology. RANGE SCI. 4: 155 - 184.

Eguiluz, P. T. 1978. Ensayo de integración de los conocimientos sobre al género Pinus en México, Tesis U. A. C. H.

Eppers, Z. 1964. A new psychrophilic fungus causing germination failure of conifer seeds. CANADIAN JOURNAL OF BOTANY 42 (12): 1589 - 1604.

Fisher, L. P. 1941. Germination reduction and radicle decay of conifers caused by certain fungi. JOURNAL AGRICULTURAL RESEARCH 52 (2): 87 - 95.

Funder, S. 1953. Practical Mycology manual for identification of fungi. 2a. Ed. BROGGERS BOHTRYHERI A - S.

Gibson, I. A. S. 1957. Saprophytic fungi as destroyers of germinating pine seeds. EAST AFRICAN AGRICULTURE JOURNAL 22 (4): 203 - 206.

Gilman, C. J. 1963. Manual de hongos del suelo. 2a Ed. CONTINENTAL.

Gómez, N. 1967. Exámen morfológico comparativo de especímenes de Rhizoctonia aislados de semilleros forestales. BOLETIN TECNICO # 21. INIF. México.

1976. Combate de Damping - off en semilleros forestales BOLETIN DIVULGATIVO # 42 INIF. México.

Groves, W. y Skolko, J. 1944. Notes on seed-borne fungi I Stemphylium. CANADIAN JOURNAL RESEARCH 22: 190 - 199.

1944. Notes on seed-borne fungi II Alternaria.
CANADIAN JOURNAL RESEARCH 22:217-234.

Harvey, B. y Carpenter, R. 1975. Fungi on stored Douglas-fir cones a problem. TREE PLANTER'S NOTES 26 (4).

Hazen, L. E. y Reed, C. F. 1960. Laboratory identification of pathogenic fungi simplifies. 2a. Ed. CHARLES. C. THOMAS.

Holmes, D. y Buszewicz, G. 1958. The storage of seed of temperate forest tree species. FORESTY ABSTRACTS 19 (3):313-322.

Janarette, A. C. 1979. The pathogenicity of fungi isolated from sugar maple seed. TREE PLANTERS NOTES 30 (2):12-14.

Langeron, M. 1945. Précis de Mycologie. MASON et C^{ie} 467-468.

Leukel, R. W. y Martfn, J. 1943. Seed rot and seedling blight of sorghum. DEP. AGRIC. TECH. BULL. 849.

Macdonal, C. 1961. Strogen hidrogen peroxide for sterilizing coats of tree seed stimulating germination. JOURNAL OF FORESTRY 59 (11).

Malone, P. y Muskett, E. 1964. Description of 77 fungus species. Handbook on Seed Health Testing 4 (1):198-338 (INT. SEED. TEST ASS. 29 (2):198-338). -

Manns, F. T. y Adams, F. 1923. Parasitic fungi internal of seed corn. JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH 23 (7):495-524.

Martínez, M. 1948. Los pinos de México. BOTAS.

Mason, N. y Van, A. 1978. Fungi associate with *Pinus taeda* seed development. *PLANT DISEASE REPORTER* 62 (10):864-867.

McGee, C. y Brandt, L. 1980. Seed mycoflora of soybeans relative to fungal interactions, seedling emergence and carry over of pathogens to subsequent crops *PHYTOPATHOLOGY* 70 (7): 615-617.

Mirou, T. N. 1967. The genus *Pinos*. THE RONALD PRESS COMPANY New. York.

Molina, LL. M. 1957. *Micología de suelos y técnicas fitopatológicas*. UNIVERSITARIA.

Motgomery, C. D. 1976. Design and analysis of experiments. JOHN WILEY - JONES.

Munjal, L. y Sharma, D. A. 1976. Mycoflora of conifer seeds. *INDIAN JOURNAL OF MYCOLOGY AND PLANT PATHOLOGY* 5 (2):145-148.

_____ 1976. Effect of seed mycoflora on pre- and -post emergence seedling rots of some important conifers in the Himachal Pradesh. *INDIAN JOURNAL OF MYCOLOGY AND PLANT PATHOLOGY* 5 (1):27-31.

_____ 1976. Control of seed mycoflora and some important conifers. *INDIAN JOURNAL OF MYCOLOGY AND PLANT PATHOLOGY* 5 (2): 135-139.

Ogawa, M. y Gilpatrick, D. 1978. Variations in fungal growth on various preparations of Potato - Dextrose - Agar media. *PLANT DISEASE REPORTER* 62 (5): 437-441.

Ostle, B. 1968. *Estadística Aplicada*. LIMUSA.

Padgett, W. H. 1958. Fungi associated with diseased pine seedling in Alabama forest nurseries. *J. Ala. Acad. Sci.* 30 (2): 8-9 (ABSTR. IN REV. APPL. MYCOL. 40: 49-, 1961.

Patiño, V. y Garza, P. 1963. Guía para la recolección y manejo de semillas de especies forestales. *BOLETIN DIVULGATIVO* # 63 INIF. México.

Peace, R. T. 1962. *Pathology of trees and shrubs*. OXFORD UNIVERSITY PRESS.

Portlock, F. y Dought, T. 1979. Improving a valuable resource. *CANADIAN FORESTRY SERVICE* 6 (3): 1-8.

Prisyazhnyuk, A. A. 1960. Fungus diseases of the seed and cones of conifer. ABSTR. IN REV. APPL. MYCOL. 41: 66, 1962.

Rangel, S. J. 1972. Efecto de los hongos y condiciones de almacenamiento sobre la viabilidad híbrida de maíz. Tesis UNAM. México.

Rathbun, G. A. 1931. Germination loss of coniferous seeds due to parasitism. *JOURNAL AGRICULTURAL RESEARCH* 42: 71-92.

Ridell, R. W. 1950. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *MYCOLOGIA* 42: 265-270.

Rocas, N. A. Semillas forestales. *BOLETIN TECNICO* # 11. DEPTO. DE BOSQUES. Chapingo, México.

S, Martínez. P. 1980. ¿ Conservan su calidad las semillas almacenadas? *ICA - INFORMA* (2) 26-30.

Salinas, Q. R. 1978. Problemas de enfermedades de especies forestales en viveros y plantaciones forestales. Plantaciones Forestales la. Reunión Nacional SARH.

Salisbury, J. P. 1965. Molds of Douglas-Fir seed in British Columbia Canada. INTERIM REPORT 1954 (8) Forest Biology Laboratory. Victoria B. C. Canada.

Salt, A. G. 1974. Etiology and morphology of Geniculodendron pyriforme, a pathogen of conifer seeds TRANSACTION BRITISH MYCOLOGY SOCIETY 63 (2): 339 - 351.

Seenepa, M. y Stobbs, W. 1980. Aspergillus colonization of Indian red pepper during storage. PHYTOPATHOLOGY 70: 218 - 222.

Sharma, D. A. 1980. Seed mycoflora of Chycory its significance and control. INDIAN JOURNAL OF MYCOLOGY AND PLANT PHYTOPATHOLOGY 10 (2): 161 - 165.

_____ 1980. Fungi associated with conifer Pinus roxburghii seed. INDIAN JOURNAL OF MYCOLOGY AND PLANT PATHOLOGY 10 (1): 106 - 107.

Shaw, R. G. 1906. The Pinus of México. J. R. BULTER-Co.

Sholberg, L. y Ogawa, M. 1981. Nitrogen source corrects a Potatoe - Dextrose - Agar medium deficient supporting mycelial growth of Monilinia spp. PLANT DISEASE 65 (8); 649 651.

Snedecor, W. G. 1961 Statistical methods. 5a Ed. The Iowa State University Press AMES. USA.

Steel, D. y Torrie, H. 1960. Principles and procedures of statistic. MC. GRAW-HILL BOOK New York.

Thakur, V. y Sharma, D. A. 1981. Seed mycoflora of Raphanus sativus its pathology and control from Indian. INDIAN JOURNAL OF MYCOLOGY AND PLANT PATHOLOGY 11 (2):161 - 163.

Timonin, I. M. 1964. Interaction of seed-coat microflora and soil microorganisms and its effects on pre- and - post emergence of some conifer seedling. CANADIAN JOURNAL OF MYCROBIOLOGY 10 (1): 17 - 22.

Tuite, F. y Christensen, M. 1955. Grain storage studies XVI. influence of storage conditions upon the fungus flora of barley seed. CEREAL CHEMISTRY 32 (1): 1 - 11.

Urosevic, B. CSc. 1961. The influence of saprophytic and semi-parasitic fungi on the germination of Norway spruce and Scots Pine seeds. PROCEEDING INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION 26 (3); 537 - 556.

Vaartaja, D. 1952. Forest humus quality and light conditions as factors influencing Damping-off PHYTOPATHOLOGY 42 (9): 501 - 505.

_____ 1953. Seedling diseases of conifers in Saskatchewan. Bim. Progr. Rep. Div. For. Biol. Dept Agric. Can 2 (5): 2 (ABSTR. IN REV. APPL. MYCOL. 34: 688, 1955).

Verna, L. C. y Herrero, F. J. 1952. Micologia. ATENEO.

Walter, F. T. 1955. Experimental desings. Mc. MILLAN COMPANY New York.

Whittle, M. A. 1977. Mycoflora of cones and seeds of Pinus sylvestris TRANSACTION BRITSH MYCOLOGY SOCIETY 69 (1): 47 - 57.

X. A P E N D I C E

Lámina I. Aparatos para selección de semillas.

Fig.1. Triturador

Fig.2. Separador. (Portlock, F. y Dought, T.
op. cit.)

Lámina II. Grados de desarrollo embrionario.

Fig. 3. Embriones completamente desarrollados

Fig. 4. Embriones poco desarrollados

Fig. 5. Embriones no desarrollados

Preparación del medio PDA, casero (Verna y Herrero,
F. op. cit.)

Lámina III. Siembra y Distribución de semillas.

Fig. 1. Embriones poco desarrollados

Fig. 2. Testas de embriones poco desarrollados

Lámina IV. Desarrollo de microorganismos.

Fig. 1. Embriones poco desarrollados

Fig. 2. Testas de embriones poco desarrollados

Lámina V. Aislamiento de microorganismos.

Fig. 1. Embriones poco desarrollados

Fig. 2. Testas de embriones poco desarrollados

Técnicas de Microcultivo.

Cultivo en Bloque: (Ridell, R. W. 1950).

Cultivo en Lámina: (Langeron, M. 1945).

Lámina VI. Morfología de colonias de Zygomycetes

Fig. 1, 2. Mucor

Fig. 3 Rhizopus

Lámina VII. Morfología de colonias de Deuteromycetes.

Figs. 1 a 5: Aspergillus.

Lámina VIII. Morfología de colonias de Deuteromycetes.

Fig. 1. Trichoderma

Fig. 2. Hormodendrum

Fig. 3. Alternaria

Fig. 4. Helminthosporium

Fig. 5. Stemphylium

Lámina IX. Morfología de colonias de Deuteromycetes.

Figs. 1 a 3 Penicillium

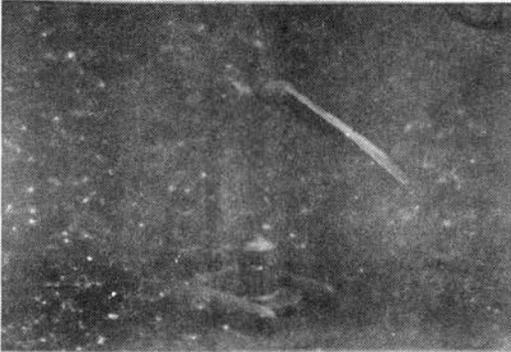
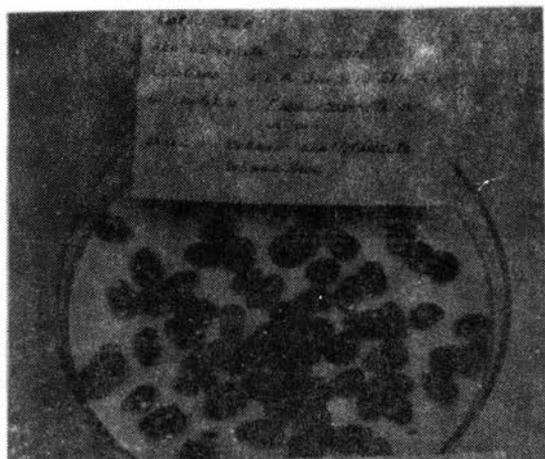
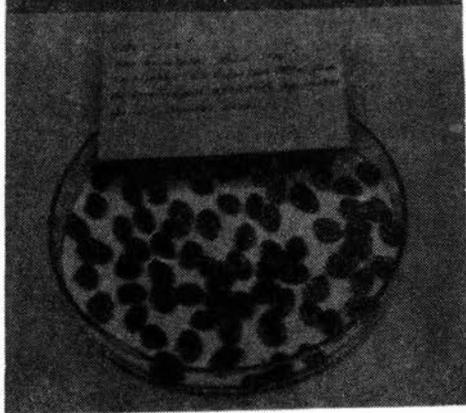
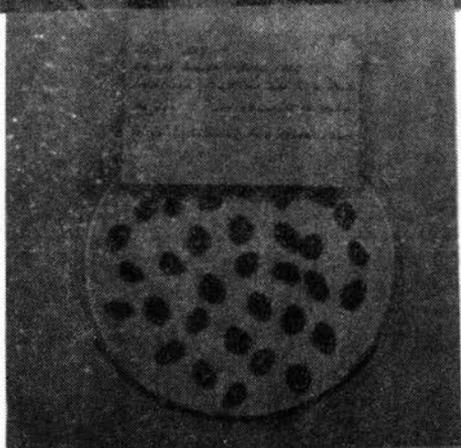


Fig. 1 Aparato triturador

Fig. 2 Selector de semilla
(seed - blower)



3



5

Fig. 3 Embriones completamente desarrollados, Fig. 4 Embriones poco desarrollados, Fig. 5 Embriones no desarrollados.

Preparación del medio de cultivo casero

(Papa - Dextrosa - Agar)

- a. *Pesar 250gr. de papa cruda.*
- b. *Lavarla con agua corriente y jabón. Enjuagar profusamente con agua destilada.*
- c. *Pelar con un utensilio limpio y picar en trozos de aproximadamente 1cm.*
- d. *Colocar el material picado en solución de hipoclorito de sodio al 1% durante diez minutos. Enjuagar profusamente con agua destilada.*
- e. *Mantener la muestra a punto de ebullición durante una hora y cuarto.*
- f. *Dejar enfriar suficientemente el matríz que contiene la papa y tapanlo con un algodón limpio o esterilizado.*
- g. *Dejar macerar la papa en el refrigerador durante 24hrs.*
- h. *Filtrar con gasa esterilizada y recoger el filtrado en un matríz limpio esterilizado, completando con agua hasta mil centímetros cúbicos.*
- i. *Agregar 10gr. de glucosa, 20gr. de agar y una pequeña cantidad de sulfato de magnesio; calentando y agitando constantemente hasta fusión completa del agar.*
- j. *Tapar el recipiente con un algodón esterilizado, y con capuchón de papel manila o kraft atado al cuello con hilo. Colocarlo en autoclave para la esterilización a 15 libras, durante 15 minutos.*
- k. *Dejar enfriar el medio hasta 40-50° C. soportable en la mano, y vaciar en placas y tubos previamente esterilizados. Ya solidificado el medio en estos recipientes llevarlo a incubación a 25° C. durante 24hr. para prueba de esterilidad.*

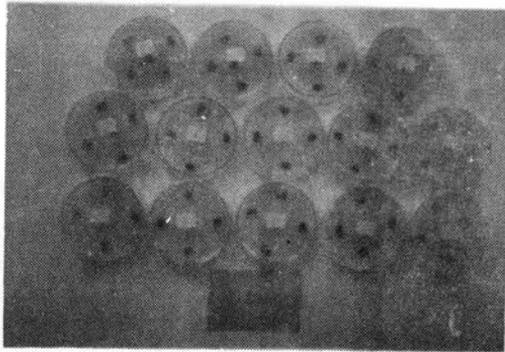
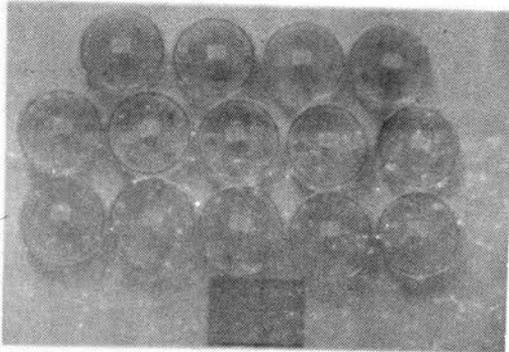
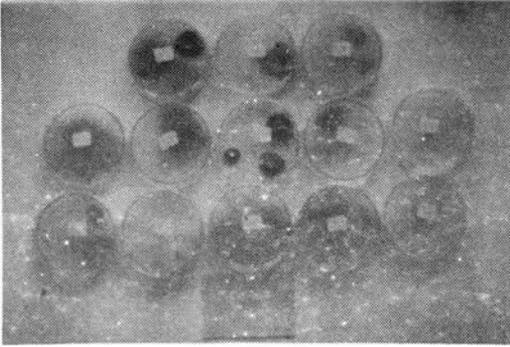


Fig. 1 Embriones poco desarrollados, Fig. 2 Testas de embriones poco desarrollados.



2

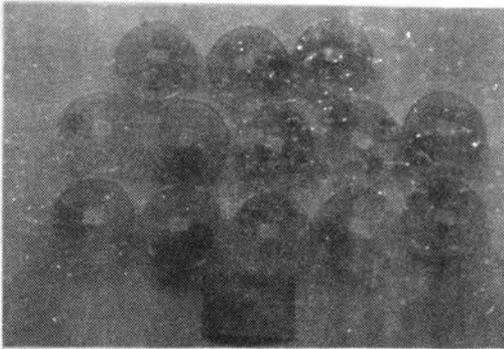


Fig. 1 Embriones poco desarrollados, Fig. 2 Testas de embriones poco desarrollados.

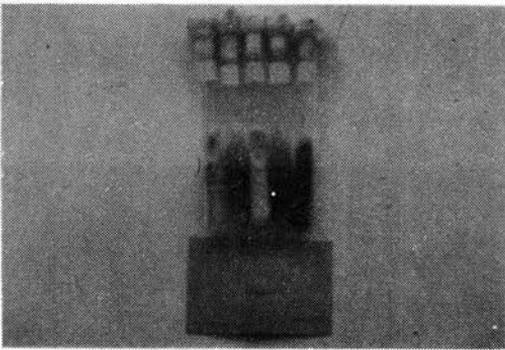
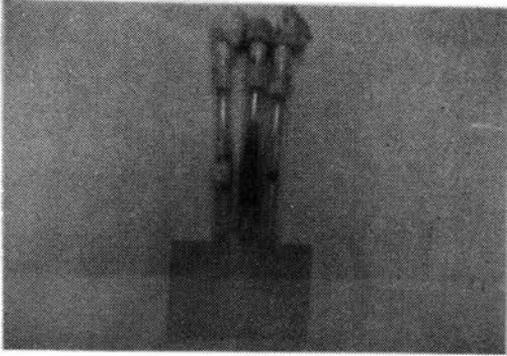


Fig. 1 Embriones poco desarrollados, *Fig. 2* Testis de embriones poco desarrollados.

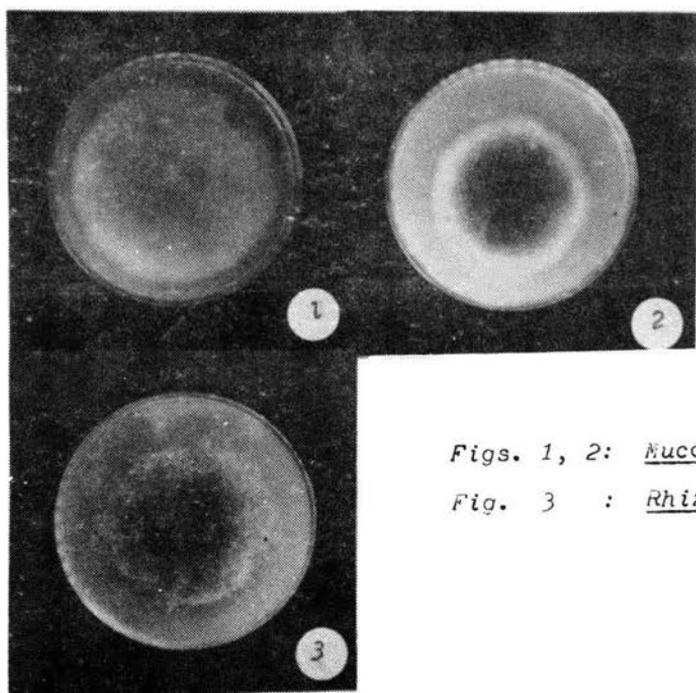
Técnica de cultivo en bloque

- a. De una placa de agar, cortar con un bisturí estéril bloques de 1cm. de superficie por 3mm. de espesor.
- b. Colocar los bloques en un portaobjetos previamente esterilizados en una caja Petri y sobre una varilla de vidrio doblado en V.
- c. Inocular con una pequeña muestra de micelio de la colonia, en el centro de cada uno de los lados del bloque de agar, y poner sobre éste un cubreobjetos (previamente esterilizado) presionado ligeramente.
- d. Agregar 10ml. de glicerol al 10%, e incubar a 28° C. Hacer observaciones cada 24hrs.

Método de Rivalier y Seydel

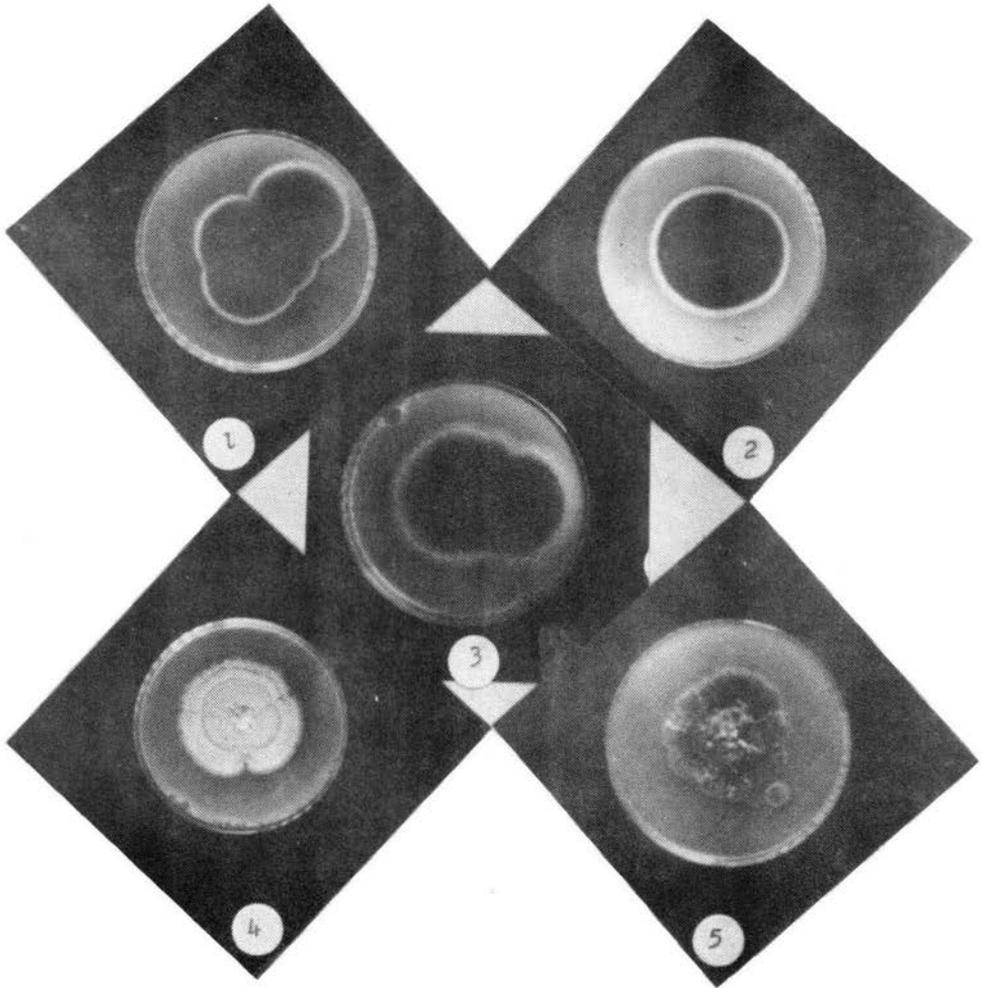
- a. Verter en una caja Petri previamente esterilizada, 15ml de medio de cultivo fundido.
- b. Introducir en condiciones de esterilidad a una temperatura de 60° un portaobjetos esterilizado en medio de cultivo fundido, humedeciendo con el medio una de sus caras. Se deja escurrir y se coloca sobre una varilla en V, colocada dentro de una caja Petri previamente esterilizada, procurando que la capa de medio quede hacia arriba.
- c. Una vez solidificado el agar, inocular las láminas gelosadas en tres puntos, con la cepa de hongo que se desee estudiar.
- d. Colocar las láminas en vasos Coplin previamente esterilizados, a los que se le hayan agregado 5ml de agua esterilizada; se tapa el vaso y se sella con cinta "durex" o tela adhesiva, para prevenir la rápida desecación.

e. Incubar a 28° C. efectuando observaciones a los siete, diez, y catorce días, fijando los desarrollos de hongos con etanol y teñéndolos con critrocina, ó azul de algodón o azul de triano; deshidratando por pasos con diferentes grados de alcohol etílico hasta xilol, montar en Bálsamo de Canada.



Figs. 1, 2: Mucor

Fig. 3 : Rhizopus



Figs. 1, 2, 3, 4, 5: Aspergillus

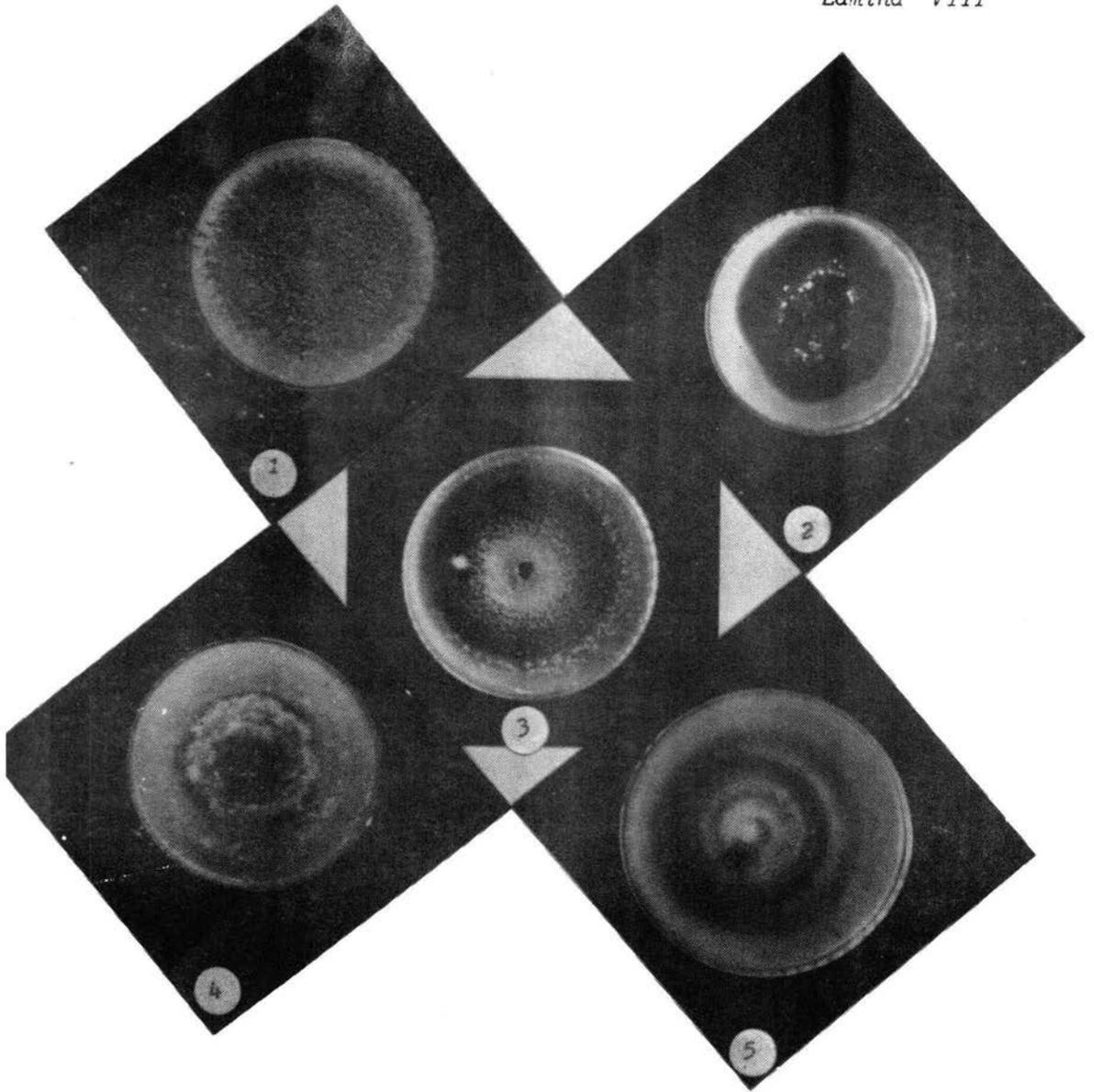
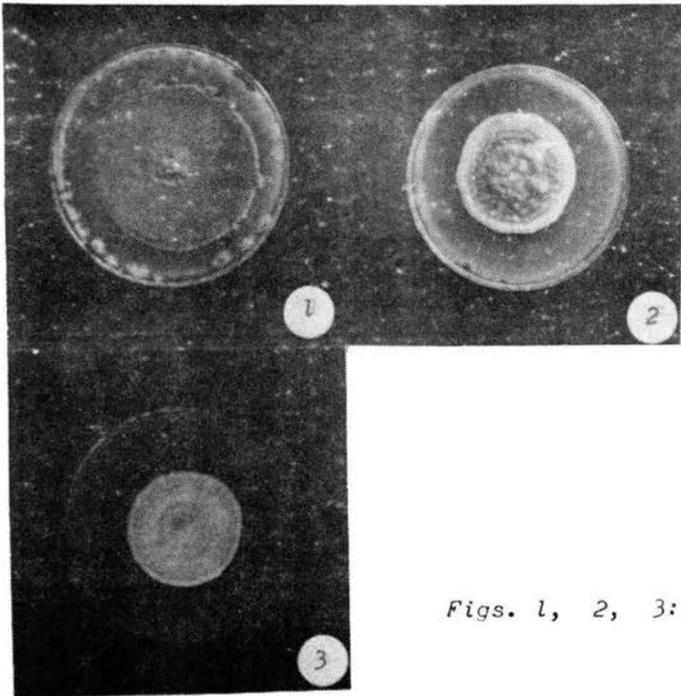


Fig. 1 Trichoderma, Fig. 2 Hormodendrum,
Fig. 3 Alternaria, Fig. 4 Helminthosporium,
Fig. 5 Stemphylium.



Figs. 1, 2, 3: Penicillium