

23
2 ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

ESTUDIO DE LOS HONGOS DE LA
ENDORRIZOSFERA DE PLANTAS DE CULTIVO
Y ARVENSES DE LA ZONA DE MONTECILLO,
MEX.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
JUANA MEDINA PALACIOS



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

ÍNDICE

	PÁGINA
Resumen.	1
I. Introducción.	4
II. Revisión de Literatura.	
2.1. La Raíz.	7
2.2. La Rizósfera.	9
2.2.1. Exudados de la Rizósfera.	12
2.2.2. Factores que Influyen en la Producción de Exudados.	16
2.2.3. Microorganismos de la Rizósfera.	17
2.2.4. Endorrizósfera.	20
2.3. Las Endomicorrizas Vesículo-Arbusculares (V-A).	22
2.4. Interacción entre los Microorganismos.	25
2.4.1. Antagonismo.	27
2.4.2. Antibiosis.	29
2.4.3. Micoparasitismo.	30
2.4.4. Neutralismo.	33
III. Objetivos.	35
IV. Hipótesis.	36
V. Materiales y Métodos.	
5.1. Muestreo de Raíces.	37
5.2. Evaluación de la Colonización Micorrizica V-A nativa.	38
5.3. Aislamiento de Hongos Filamentosos de la Endorrizósfera.	39
5.4. Porcentaje de colonización por Hongos Filamentosos.	40
5.5. Purificación de los Hongos Aislados de la Endorrizósfera.	40
5.6. Identificación de los Hongos Filamentosos.	41

	PÁGINA
5.7. Cinética de Crecimiento de los Hongos Aislados de la Endorrizósfera.	42
5.8. Macroscopía de la Interacción de los Hongos Aislados de la Endorrizósfera versus <i>Pythium</i> 19-10.	43
5.9. Microscopía del Micoparasitismo entre los Hongos Aislados de la Endorrizósfera versus <i>Pythium</i> 19-10.	44
VI. Resultados y Discusión.	
6.1. Taxonomía de las Plantas y Arvenses Muestreadas.	45
6.2. Colonización por Hongos Endomicorrizicos V-A.	46
6.3. Colonización por Hongos Filamentosos en la Endorrizósfera.	54
6.4. Cinética de Crecimiento de los Hongos Aislados de la Endorrizósfera.	59
6.5. Macroscopía de la Interacción de los Hongos Aislados de la Endorrizósfera versus <i>Pythium</i> 19-10.	61
6.5.1. Neutralismo.	63
6.5.2. Antibiosis.	66
6.5.3. Micoparasitismo.	73
6.6. Microscopía del Micoparasitismo.	76
6.7. Modo de Micoparasitismo.	80
VII. Conclusiones.	98
VIII. Bibliografía.	101
IX Apéndices.	116

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA

PÁGINA

1	Diagrama de una raíz (de Arnett y Braungart, 1970. Citado por Bridwell, 1970).	8
2	Regiones de diferenciación entre la raíz y la rizósfera. Diagrama de G. E. Rinder y R. M. Shunter (tomado de Foster <i>et al.</i> , 1983).	11
3	Cambios morfológicos en la raíz cuando está enmicorrizada y los efectos de estos cambios sobre el desarrollo de la micorrizósfera (tomado de Linderman (1988)).	24
4	Porcentaje de la colonización endomicorrizica V-A en plantas de cultivo.	47
5	Porcentaje de la colonización endomicorrizica V-A en arvenses.	51
6	Porcentaje de colonización por hongos filamentosos en la endorrizósfera de plantas de cultivo.	55
7	Porcentaje de colonización por hongos filamentosos en la endorrizósfera de arvenses.	57
8	Cinética de crecimiento del hongo C6s, dado el diámetro de la colonia en cm por día transcurrido.	60
9	Cinética de crecimiento del hongo C6J, dado el diámetro de la colonia en cm por día transcurrido.	60
10	Cinética de crecimiento del hongo C6-4, dado el diámetro de la colonia en cm por día transcurrido.	60
11	Día de inoculación de Cgl y <i>Pythium</i> 19-10 para que ambas colonias se encuentren en el centro de la caja de Petri.	62
12	Antibiosis media entre ambas colonias de hongos, el crecimiento de <i>Pythium</i> es inhibido por la producción	64

- de antibióticos de la colonia del hongo C6-4 y se forma un halo de antibiosis.
- 13 Micoparasitismo macroscópico, donde la colonia de C9e crece sobre la colonia de *Pythium* 19-10 impidiendo el crecimiento de la última. 64
 - 14 Porcentaje de hongos de la endorrizósfera de plantas de cultivo, que presentaron efectos antagónicos frente a *Pythium* 19-10. 65
 - 15 Porcentaje de hongos de la endorrizósfera de arvenses, que presentaron efectos antagónicos frente a *Pythium* 19-10. 65
 - 16 Antibiosis débil, donde el crecimiento de *Pythium* 19-10 es inhibido por *Fusarium* sp., formando un estrecho halo de antibiosis entre ambas colonias. 68
 - 17 Antibiosis fuerte, en este caso la colonia C6p inhibe notablemente el crecimiento de *Pythium* 19-10 y se forma un amplio halo de antibiosis entre ambas colonias. 68
 - 18 Porcentaje de hongos aislados de cultivos, que presentaron diferentes tipos de antibiosis frente a *Pythium* 19-10. 69
 - 19 Porcentaje de hongos aislados de arvenses, que presentaron diferentes tipos de antibiosis frente a *Pythium* 19-10. 69
 - 20 Micoparasitismo microscópico de *Agyriella nitida*. a) Morfología microscópica de *A. nitida*. b) Haustorio (flecha) de *A. nitida* penetrando las hifas de *Pythium* 19-10. c) Hifa de *Pythium* 19-10 fuertemente atacada por hifas de *A. nitida*. P=parásito, H=hospedero. 81
 - 21 Micoparasitismo microscópico. a) Donde *Pullularia* sp. penetra a las hifas de *Pythium* 19-10 y vive dentro de 84

éste. b) Las hifas de C5n forman apresorios (flecha) que llegan y abrazan a las hifas de *Pythium* 19-10. c) El hongo C7k, que pertenece al género *Trichoderma*, penetra las hifas de *Pythium* 19-10 y crece en el interior de éstas. P=parásito, H=hospedero.

- 22 Micoparasitismo microscópico. a) ABf forma prolongaciones parecidas a haustorios simples que abrazan y penetran a *Pythium* 19-10. b) Las hifas de ABf se adosan a las hifas de *Pythium* 19-10, las penetran y provocan su degradación. c) Las hifas de *Alla* forman pinzas (flechas) que atrapan a las hifas de *Pythium* 19-10 y las penetran. P=parásito, H=hospedero. 87
- 23 Micoparasitismo de *Pullularia* sp. a) Morfología microscópica de *Pullularia* sp. b) Adosamiento de las hifas de *Pullularia* sp. a las hifas de *Pythium* 19-10. c) Formación de un haustorio (flecha) por parte de *Pullularia* sp. sobre una hifa de *Pythium* 19-10. d) Crecimiento interno de *Pullularia* sp. en las hifas de *Pythium* 19-10. P=parásito, H=hospedero. 89
- 24 Micoparasitismo microscópico. a) Formación de un haustorio por A15x sobre una hifa de *Pythium* 19-10. b) Multienrollamiento de A15-4 sobre las hifas de *Pythium* 19-10. P=parásito, H=hospedero. 90

RESUMEN

La endorrizósfera es una región de la rizósfera que está localizada en el córtex de la raíz, la cual está habitada por diversos microorganismos. Entre éstos se encuentran los hongos filamentosos y los endomicorrizicos V-A. Los hongos filamentosos de raíces sanas han sido poco estudiados y se desconoce el papel que desempeñan en la endorrizósfera de la planta. En el presente estudio, dichos hongos fueron aislados de la endorrizósfera de plantas de cultivo y de arvenses con raíces sanas, observándose que las arvenses fueron las menos colonizadas por tal variedad de hongos.

Al realizarse la evaluación de la colonización endomicorrizica V-A, se pudo observar que algunas plantas, como el maíz, son capaces de albergar altos porcentajes de estos hongos, así como de hongos filamentosos. Algunas otras plantas, como las de la familia *Chenopodiaceae* y *Cruciferae*,

no tuvieron colonización endomicorrizica V-A y presentaron colonizaciones muy bajas de hongos filamentosos. La gramínea *Bromus carinatus* tampoco presentó colonización de hongos endomicorrizicos, pero tuvo un alto porcentaje de colonización de hongos filamentosos (70%). Al aplicarse la técnica estadística de correlación entre la colonización de hongos filamentosos de la endorrizósfera y la colonización de hongos endomicorrizicos V-A en ambos tipos de plantas, fue encontrado que la correlación no es significativa.

El 70% de los hongos aislados de la endorrizósfera de cultivos y el 50% de la de arvenses presentaron efecto de antibiosis frente al patógeno radical *Pythium* 19-10. El 20% de los hongos aislados de plantas de cultivo y el 27% de arvenses tuvieron efecto neutro hacia el patógeno y el 10% de hongos de plantas de cultivo y el 23% de arvenses fueron micoparásitos del mismo.

Del total de hongos aislados de la endorrizósfera, macroscópicamente sólo 45 hongos resultaron ser micoparásitos de *Pythium* 19-10. 15 fueron aislados de plantas de cultivo y 30 de arvenses. De éstos hongos, 17 pertenecen a la especie *Agyrella nitida* (16 de arvenses y 1 de plantas de cultivo).

En forma microscópica, pudo observarse que *A. nitida* provocó a *Pythium* 19-10 un micoparasitismo de grado 2 (ligeramente susceptible), 12 hongos más, que en su mayoría

fueron del género *Trichoderma*, tuvieron micoparasitismo de grado 3 (i.e., susceptible). Sólo 7 especies, entre las cuales se encuentra *Pullularia* sp., provocaron micoparasitismo de grado 4 (i.e., muy susceptible) y 7 especies más, como algunos hongos del género *Rhizoctonia*, no provocaron micoparasitismo microscópico, aunque macroscópicamente fueron clasificados como micoparásitos.

Por los resultados obtenidos, se puede decir que es alta la probabilidad de que sea factible el control biológico de patógenos radicales mediante el uso de algunos hongos que habitan la endorrizósfera, debido a que un buen número de éstos provocaron antibiosis, y un número más reducido provocó micoparasitismo sobre *Pythium* 19-10, aunque es necesario comprobar si estos hongos no causan daño en lo absoluto a las raíces de las plantas para que puedan ser potencialmente utilizados en el combate de hongos patógenos de la raíz.

I. INTRODUCCIÓN

Las raíces de las plantas tienen gran efecto sobre los microorganismos del suelo, debido a que producen exudados que promueven o inhiben la actividad microbiana. Al volumen del suelo que es influenciado por las raíces de las plantas se le llama rizósfera. Esta región no es homogénea, y, por tanto, no se conocen sus límites exactos. No obstante, han sido definidas tres zonas que son habitadas por los microorganismos: la zona más interior, que corresponde al córtex de la raíz (endorrizósfera); le sigue la interfase raíz-suelo (rizoplano) y la zona más exterior, que corresponde al suelo próximo a las raíces (exorrizósfera) (Lynch, 1986).

La endorrizósfera es la parte de la rizósfera que está más influenciada por las raíces de las plantas, debido a que se sitúa en el tejido cortical de la raíz. De acuerdo a los estudios realizados respecto a la endorrizósfera, se ha

encontrado que las plantas aparentemente sanas soportan una considerable población de hongos dentro de la raíz. Gran parte de la endorrizósfera está invadida por hongos saprófitos, patógenos y simbióticos.

Los hongos patógenos que habitan la endorrizósfera de las plantas provocan daño a la raíz, incluso llegan a causar la muerte a la planta. Estos microorganismos han sido ampliamente estudiados por los fitopatólogos, por ser causa de grandes pérdidas en cosechas. Dentro de los hongos que forman simbiosis con la planta y que habitan la endorrizósfera, se encuentran los hongos endomicorrizicos V-A. Este tipo de hongos estimulan el crecimiento, el desarrollo y la nutrición de la planta. Se desconoce el papel que desempeñan muchos de los hongos que habitan la endorrizósfera de raíces sanas. Algunos de estos hongos pueden beneficiar a la planta por presentar ciertos efectos antagónicos como antibiosis, lisis, inhibición, competencia, fungistasis o micoparasitismo frente a hongos patógenos. Al parecer, muchos de los hongos de la endorrizósfera no benefician en nada a la planta; simplemente, viven de los desechos de la raíz.

Para conocer más sobre la micoflora de la endorrizósfera, el presente trabajo fue enfocado hacia el estudio de los hongos que habitan la endorrizósfera de raíces sanas de plantas de cultivo y de arvenses, y a conocer el

papel que desempeñan en la raíz, ello logrado mediante la determinación de la capacidad micoparasitica o de antibiosis que puedan tener frente a patógenos radicales.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 LA RAIZ.

La raíz asegura la fijación de la planta en el suelo, absorbe y pone en circulación el alimento que encuentra y puede acumular reservas nutricionales.

La estructura de la raíz comienza a definirse cuando la semilla germina; entonces la raíz embrionaria o radícula crece debido a la división o elongación de las células, hasta formar la raíz primaria. Ésta puede dividirse en tres regiones: la región meristemática, la región de alargamiento o diferenciación y la región de maduración (Figura 1). Aún cuando por su morfología existen diversos tipos de sistemas radicales, la estructura de todas las raíces incluye tales regiones (Bridwell, 1979; Rost *et al.*, 1985).

El extremo de la raíz está cubierto y protegido por la cofia o caliptra, y las células de ésta son formadas por el

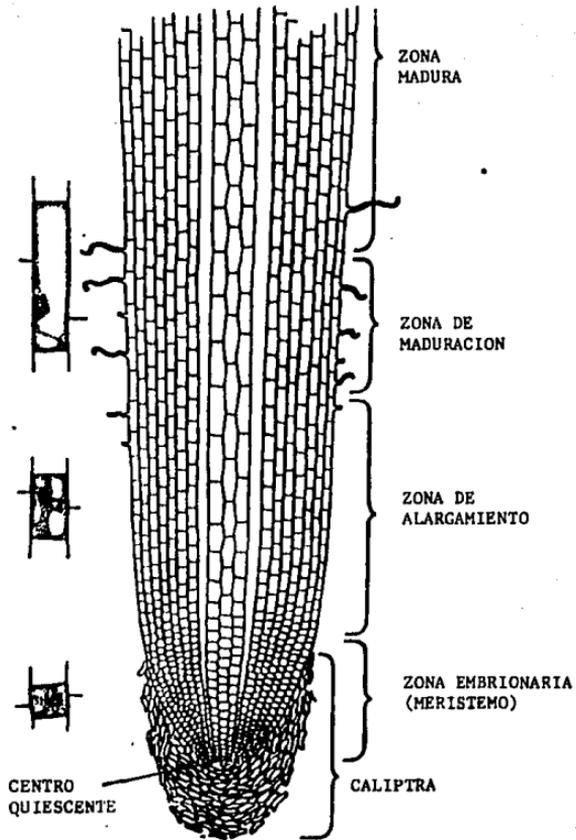


Figura 1. Diagrama de una raíz (Arnett y Braungart, (1970)). Citado por Bridwell (1979).

meristemo apical, que contiene una reserva de células embrionarias que se dividen con lentitud (Russell, 1975). Debido a la producción de células del meristemo se origina la zona de elongación, que se encuentra por arriba de la cofia y se presenta como una región caracterizada por células de pared delgada en proceso de diferenciación. Finalmente, se tiene la zona de maduración, que se encuentra por arriba de la zona de elongación y se caracteriza porque en su superficie externa presenta pelos absorbentes y en su interior se forman los tejidos vasculares primarios (Rost *et al.*, 1985; Weiner *et al.*, 1983).

Las raíces de las plantas tienen diferentes maneras de distribuirse en el suelo y en éstas influyen diversos factores, tales como: la estructura del suelo, la accesibilidad del agua y de los nutrimentos. Por su parte, la raíz influye en el suelo produciendo condiciones físicas y químicas especiales que contribuyen a la creación de un hábitat particular alrededor de ella, denominado rizósfera (García, 1986).

2.2. LA RIZÓSFERA.

El sistema de raíces que se desarrollan en el suelo altera el microambiente de éste. Los compuestos orgánicos e inorgánicos exudados de las raíces de las plantas estimulan

el desarrollo y actividad de los microorganismos del suelo, particularmente de bacterias y de hongos. A esta zona del suelo sujeta a la influencia de raíces vivas se le denomina rizósfera (Hoagland y Williams, 1985). El concepto de rizósfera fue introducido en 1904 por L. Hiltner, quien observó que los microorganismos son más abundantes en suelos que rodean las raíces de las plantas que en suelos apartados de ellas (Davey y Rovira, 1974; Richards, 1974). La extensión de la rizósfera no tiene límites exactos; parte de la población de la rizósfera penetra la capa superficial de la raíz, parte se extiende en el suelo próximo, y la población disminuye a distancias alejadas de las raíces (Rovira, 1965). Como la superficie de la raíz no es del todo plana, los límites de la rizósfera pueden ser engañosos, ya que los filamentos de las raíces en algunos casos se extienden 1 mm o más de sus puntos de origen, creando una interfase muy compleja. Esta complejidad aumenta con la presencia de microorganismos vivos y muertos, de tejido que muda la planta, de exudados de raíces y de varios productos de degradación originados por plantas y microorganismos (Old y Nicholson, 1978).

No obstante, en la rizósfera se han definido tres zonas que son habitadas por los microorganismos (Figura 2):

- 1) La rizósfera externa o exorrizósfera, que comprende la región del suelo que rodea la raíz y que tiene poblaciones

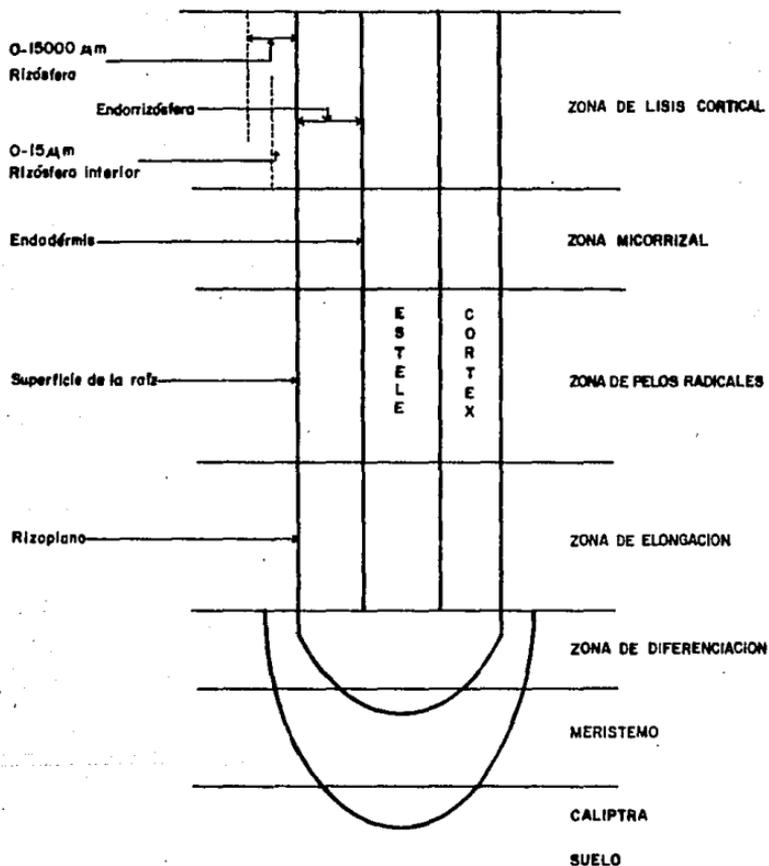


Figura 2. Regiones de diferenciación entre la raíz y la rizósfera diagrama de G.E. Rinder y R.M. Schunfer (Tomado de Foster et al., 1983)

estimuladas de microorganismos; 2) El rizoplasma, que está constituido por la superficie de la raíz y los microorganismos que viven en ella; y 3) La endorrizósfera, la cual corresponde al tejido cortical de la raíz, invadida y colonizada por microorganismos saprófitos y simbióticos (Bottner y Billes, 1987; Lynch, 1986).

2.2.1 EXUDADOS DE LA RIZÓSFERA.

Windels *et al.* (1985) realizaron estudios en semillas de maíz y de chícharo, y encontraron que éstas, al germinar, liberan sustancias dentro de la rizósfera que inhiben, alrededor de ella, el desarrollo de algunos hongos patógenos.

Se tiene conocimiento de que durante la germinación y la elongación radicular se producen no sólo antibióticos, sino también algunos otros tipos de exudados, como compuestos volátiles, incluyendo alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos, que estimulan el desarrollo de diversos microorganismos. Por esto se dice que la iniciación de la rizósfera comienza con la germinación de la semilla (Hoagland y Williams, 1985; Curl, 1982).

Con relación al estudio de la rizósfera, el término exudado es aplicado a todas las sustancias orgánicas que penetran al suelo provenientes de raíces que no han sido

dañadas por patógenos u otras causas (Russell, 1977). Los exudados radicales son usualmente considerados como responsables de la proliferación de organismos de la rizósfera y juegan un papel importante en la estimulación de organismos alrededor de las plantas (Rovira, 1965).

De manera esquemática, en la raíz es posible distinguir diversas zonas de producción de exudados:

- En la zona de la cofia o caliptra, se secreta una capa altamente mucilaginosa rica en carbohidratos, que está usualmente desprovista de microorganismos, puesto que las células de la caliptra son continuamente renovadas por dentro y mudan en el interior del suelo (Foster, 1982; Bottner y Billes, 1987).
- En la zona de elongación, se secretan mucilagos, y al igual que la caliptra está relativamente libre de microorganismos. Sin embargo, es evidente que algunos patógenos son atraídos específicamente por carbohidratos expuestos durante la extensión de la raíz, o por los exudados que se escapan en cantidades relativamente grandes dentro de esta región (Foster, 1985; Bottner y Biller, 1987).
- En la zona de pelos absorbentes existe la producción de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, tales como azúcares y aminoácidos. Estos compuestos son perdidos fácilmente, favoreciendo con ello la proliferación de

microorganismos en esta zona, principalmente de bacterias, algunas de las cuales pueden fijar nitrógeno o secretar hormonas que influyen en la morfología de las raíces; tales bacterias también prosperan en los espacios intercelulares del córtex de la raíz.

Los exudados de la raíz incluyen aminoácidos, carbohidratos, enzimas, algunas proteínas de bajo peso molecular, ácidos orgánicos, fitohormonas, glúcidos, auxinas, nucleótidos, flavonoides, saponinas y un gran número de sustancias que atraen nemátodos, estimulan la eclosión de huevecillos y la germinación de esporas o inhiben el desarrollo de hongos (Curl, 1982; Garskins et al., 1984; Smucker y Safir, 1986).

Los productos de exudación varían de planta a planta, y se han caracterizado algunas de estas sustancias, pero la lista está muy lejos de ser completa. En el Cuadro 1 se presentan algunos compuestos identificados en los exudados de la raíz.

La abundancia de microorganismos en la rizósfera depende ampliamente de los productos de carbono de la raíz y de los sustratos energéticos que son fuente de alimento para los microorganismos. Debido a que las raíces liberan muchas sustancias orgánicas, exudados lisantes y mucilagos (50-100 mg/g de raíz por planta), y como el coeficiente de mantenimiento microbiano es bajo (0.3 mg/g/día), los

microorganismos en contacto con la raíz y sus vecinos inmediatos son ampliamente estimulados en su actividad metabólica y de reproducción.

CUADRO I. Productos excretados por plantas cultivadas bajo condiciones asépticas (Alexander, 1980).

Aminoácidos	Esencialmente todos los aminoácidos que existen naturalmente.
Ácidos orgánicos	Acético, butírico, cítrico, fumárico, glicólico, láctico, málico, oxálico, propiónico, succínico, tartárico, valérico.
Carbohidratos	Arabinosa, desoxirribosa, fructosa, glucosa, maltosa, manosa, oligosacáridos rafinosa, ramnosa, ribosa, sacarosa y xilosa.
Derivados de ácidos nucleicos	Adenina, citidina, guanina y uridina
Factores de crecimiento	p-Aminobenzoato, biotina, colina, inositol, ácido nicotínico, pantotenato, piridina, tiamina.
Enzimas	Amilasa, invertasa, fosfasa, proteasa.
Otros compuestos	Auxina, glutamina, glucósidos, HCN, hidroxibenzoato, péptidos, saponinas, escopoletina.

Muchos estudios describen la contribución hecha por los exudados de la raíz en el desarrollo de los

microorganismos. Baber y Lynch (1977) muestran cómo el número de microorganismos es mayor en presencia de plantas que cuando éstas están ausentes; la causa de ello son los exudados. Cada gramo de raíz puede soportar 36 mg de bacteria (2×10^{10} células), aunque la cifra anterior no se alcanza normalmente, porque no todos los puntos de la raíz están en contacto con el suelo.

En general, la rizósfera es una zona de alta actividad metabólica generada por la interfase suelo—raíz (Merckx *et al.*, 1986), zona en la que proliferan diversos microorganismos, tales como hongos, flagelados, amibas, bacterias y nemátodos (Foster *et al.*, 1983; Richards, 1974).

Otros de los hechos que ocurren en las raíces de las plantas son: el desprendimiento de las células corticales muertas o senescentes de la raíz, la producción de desechos o lisantes y la colonización por diversos microorganismos de la superficie celular (Foster, 1982; Foster, 1985; Bottner y Billes, 1987).

2.2.2. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRODUCCIÓN DE EXUDADOS.

La producción de exudados por parte de las raíces puede ser alterado por factores bióticos y abióticos (Hoagland y Williams, 1985). Dentro de los factores bióticos se encuentra la especie, la nutrición y edad de la planta y

la actividad microbiana en la superficie radical. Los factores abióticos que influyen en la exudación son: la naturaleza y abundancia de la materia orgánica, la deficiencia de fósforo y, en general, la fertilidad del suelo, el tipo de suelo y sus características físicas, el tipo y la cantidad de luz. Generalmente, alguna clase de estrés sobre el desarrollo de la planta también puede inducir al incremento de la exudación (Russell, 1977; Smuker y Safir, 1986; Hale y Moore, 1979).

2.2.3. MICROORGANISMOS DE LA RIZÓSFERA.

La población de microorganismos en la rizósfera incluye actinomicetos, bacterias, hongos, algas, microartrópodos y protozoarios (Curl, 1982). La biomasa microbiana es considerada una fracción importante de la materia orgánica del suelo y responde fácilmente a los cambios del ambiente físico y químico del mismo (Merckx y Martin, 1987). Los organismos que componen dicha masa microbiana han sido investigados intensamente por medio de la microscopia, técnicas bioquímicas y de cultivo. Las características microscópicas son de considerable valor, porque además de mostrar los tipos de organismos presentes, también se aprecia la asociación física con la superficie de los tejidos exteriores de la raíz. Las técnicas bioquímicas

usadas en la investigación de la rizósfera son numerosas y están diseñadas para medir un cambio específico llevado a cabo por la planta o la microflora. Dentro de los métodos de cultivo, la técnica más usada es la del plaqueo, la cual se expresa a menudo como «efecto rizósfera», estimación que puede expresarse usando la relación R:S. La proporción R:S está definida como el número de microorganismos por unidad de peso de suelo de la rizósfera (R) contra el número de microorganismos por unidad de peso en el suelo adyacente (no rizosférico) (S) (Alexander, 1980; Burges y Raw, 1971).

De acuerdo al método de determinación empleado, la población microbiana estimada en la rizósfera varía. Diversas razones cuentan para la discrepancia entre métodos; la rutina de la técnica en placa puede detectar sólo 0.1-1% de organismos presentes, en cambio, la técnica de micrografías electrónicas permite detectar todos los microorganismos embebidos en el gel de la superficie de la raíz, además de establecer si todos los microorganismos son viables (Foster, 1985).

Foster (1988) menciona qué número de microorganismos existen en el suelo: 10^7 bacterias, 10^6 actinomicetos, 10^5 hongos y 10^4 algas por gramo de suelo seco.

Un amplio rango de especies de bacterias, hongos y actinomicetos son aislados de la raíz. Las bacterias que son ampliamente estimuladas por los exudados radicales incluyen

membros de los géneros *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Brevibacterium* (Alexander, 1980).

Oyaizu-Masuchi y Komagata (1988) han encontrado en la rizósfera de plantas de arroz diversas especies de bacterias fijadoras de nitrógeno, especialmente del género *Azospirillum* y otras bacterias de vida libre de los géneros *Enterobacter*, *Erwinia* y *Xantobacter*.

En contraste con los efectos sobre las bacterias, las raíces no tienen influencia semejante sobre el número total de hongos, aunque puede ocurrir que géneros específicos de éstos sean muy estimulados. Ha sido demostrado que el efecto de la rizósfera sobre los hongos es más cualitativo que cuantitativo, por lo que frecuentemente el coeficiente R/S de los hongos es menor que el de las bacterias (Newman, 1985).

Garret (1970) encuentra que diversos géneros de hongos están en interacción con la raíz, tales como: *Fusarium*, *Botrytis*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Fomes lignosus* y *F. annosus*, que atacan a las raíces de árboles adultos. También se encuentran los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Mucor*, *Ceratobasidium*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Cylindrocarpon*, *Embellisia*, *Gaeumannomyces*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Syncephalis* y *Verticillium* (Foster et al., 1983).

2.2.4. ENDORRIZÓSFERA.

Se ha mencionado antes que la rizósfera es una estructura continua, que incluye a la población microbiana que penetra en el córtex de la raíz (Old y Nicholson, 1978). La colonización del córtex comienza en la caliptra de la raíz y en los mucilagos de la pared primaria de las células epidérmicas; más tarde, el córtex entero es colonizado y también las partes maduras de la raíz a través de agujeros que los microorganismos hacen en la pared de las células epidérmicas o a través de heridas ocasionales. Tal invasión microbiana puede afectar a toda la corteza de una raíz viva (Dommergues y Krupa, 1978; Barea y Azcón-Aguilar, 1982).

Gran parte del córtex es invadido por saprófitos, o sea por aquellos microorganismos que viven a expensas del tejido muerto que se desprende de la raíz. Además de los saprófitos, existe otro tipo de microorganismos que habitan la endorrizósfera: los simbióticos, que benefician a la planta hospedera, y los patógenos que perjudican al hospedero (Barea y Azcón-Aguilar, 1982; Foster *et al.*, 1983).

Dentro de las relaciones con los microorganismos benéficas para la planta se encuentran las micorrizas ectotróficas, que colonizan el córtex de la raíz, las cuales mejoran la asimilación de nutrientes a través de la raíz y

protegen a ésta de parásitos y de las condiciones adversas del suelo. Las micorrizas ectotróficas también estimulan la producción de hormonas que promueven el desarrollo de la raíz, modifican morfológicamente a la raíz y contribuyen a la supervivencia del hospedero (Hayman, 1980). También benefician a la planta las bacterias fijadoras de nitrógeno y actinomicetos, que la proveen de nitrógeno y ocasionan que la planta sea más independiente del nitrógeno del suelo.

Dentro de los organismos que viven en la endorrizósfera y que dañan a la raíz, están incluidos los parásitos que invaden el tejido del hospedero y viven de la fuente de nutrientes de la raíz, o digieren cualquier tejido muerto en el hospedero y forman toxinas que afectan a la planta hospedera como lo hacen diversos hongos patógenos (Foster et al., 1983). Chambers et al., (1987) encontraron que 20 diferentes especies de hongos estaban asociadas a la producción de la raíz de maíz en Sudáfrica, y los hongos que se presentaron con mayor frecuencia fueron *Helminthosporium pedicellatum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma* spp. y *Macrophomina phaseolina*. Sin embargo, muchos otros cultivos son atacados por diferentes especies de hongos que habitan la endorrizósfera de la planta.

2.3. LAS ENDOMICORRIZAS VESÍCULO-ARBUSCULARES (V-A).

Entre los hongos de la endorrizósfera se encuentran los que forman endomicorrizas V-A. Estas micorrizas son las más extendidas e importantes de los simbioses radicales. Se encuentran prácticamente en todas las familias de las angiospermas, gimnospermas y pueden encontrarse en pteridofitas y briofitas (Gerdemann, 1968). Se ha estimado que solamente como el 3% de las fanerógamas forman ectomicorrizas y la inmensa mayoría de las especies restantes forman endomicorrizas V-A (Meyer, 1973). En este tipo de asociación simbiótica, los organismos se benefician mutuamente; son los hongos los que absorben elementos minerales del suelo y los transfieren a la planta hospedera, y, por su parte, la planta suministra al hongo fuentes de carbono provenientes del producto de la fotosíntesis, además de proporcionarle un nicho ecológico protegido de los fenómenos de antagonismo microbiano que se presentan en la rizósfera (Safir, 1980; Le tacon, 1985; Azcón y Barea, 1980).

Los hongos que forman las endomicorrizas V-A pertenecen a la clase de los zigomicetos, orden Endogonales, familia Endogonoceae, con los géneros *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Sclerocystis* y *Scutellospora* (Schenk y Pérez, 1987). De los géneros formadores de micorrizas, *Gigaspora* y *Scutellospora* sólo

producen vesículas en el exterior de la raíz, también en este caso denominadas células auxiliares, mientras que *Glomus* puede formarlas intra o extrarradicalmente (Carling y Brown, 1982; Schenck y Smith, 1982).

En las endomicorrizas V-A existen dos redes miceliales, una externa y otra interna. También se forman dos estructuras características que son las vesículas y los arbuscúlos. La formación de dichas estructuras comienza desde que el micelio penetra en la raíz, y posteriormente en las células corticales, en donde se forman minúsculas arborescencias muy ramificadas, que son los arbuscúlos; éstos aseguran una gran superficie de contacto entre ambos asociados (Dexheimer, 1982). Las vesículas son estructuras en forma ovalada o esférica que contienen en el interior gotas de lípidos y que actúan como estructuras de reserva (Gerdemann, 1975).

La endomicorriza V-A no provoca cambios morfológicos en la estructura externa de la raíz del hospedero que puedan percibirse a simple vista. No presenta un manto fúngoso externo, y las hifas entran en las células corticales sin causar daño al invadir las raíces (Tinker, 1980; Safir, 1980). No obstante, haciendo observaciones más minuciosas, en las raíces se pueden notar cambios morfológicos (Figura 3).

RAIZ NO MICORRIZADA

ENDOMICORRIZA

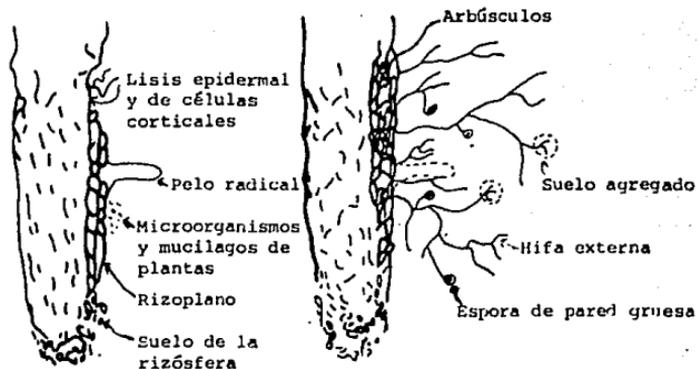


Figura 3. Cambios morfológicos en la raíz cuando ésta es micorrizada y los efectos de estos cambios sobre el desarrollo de una micorriza (Tomado de Linderman (1988)).

2.4. INTERACCIÓN ENTRE MICROORGANISMOS.

Existen diversas relaciones entre los microorganismos del suelo, las cuales son muy complejas. En la rizósfera los fenómenos de sinergismo y antagonismo entre las poblaciones microbianas son particularmente intensas.

Las posibles interacciones entre dos poblaciones diferentes de microorganismos son (Cuadro 2) (Campbell, 1987; Barea-Azcón Aguilar, 1982; Odum, 1985):

— **Comensalismo.** Por lo general, las relaciones comensales son asociaciones no tan estrechas, en las cuales una población modifica el medio para el beneficio de otro, sin que se afecte a sí misma.

— **Protocooperación.** En este caso, dos poblaciones se asocian y se benefician de tal asociación, pero no siendo las relaciones obligadas.

— **Mutualismo.** Ésta es una relación en que ambas poblaciones se benefician entre sí, no pudiendo subsistir solas en condiciones naturales, aunque se extiende el caso en el que las ventajas o desventajas de una de las dos no siempre es evidente.

— **Neutralismo.** Es la interacción en la que ninguna de las dos poblaciones es afectada por su asociación con la otra.

— **Competencia.** Consiste en que cada población afecta

perjudicialmente a la otra en la lucha por recursos a breve plazo.

— **Amensalismo.** Ocurre cuando una de las poblaciones es cohibida en tanto que la otra no se ve afectada, debido a la producción de tóxicos por parte de una de las dos poblaciones.

CUADRO 2. Interacción entre poblaciones de microorganismos.

		POBLACION	
		A	B
Positivas	Comensalismo	+	0
	Protocooperación	+	+
	Mutualismo	+	+
Nulas	Neutralismo	0	0
	Competición	-	-
Negativas	Amensalismo	-	0
	Depredación	-	+
	Parasitismo	-	+

+ La población se beneficia.

- La población se perjudica.

0 Ausencia de efecto.

— **Parasitismo y Depredación.** En este caso, una de las dos poblaciones afecta a la otra mediante el ataque directo, pero depende con todo de ella. Por lo general, una diferencia entre el parasitismo y la depredación radica en el tamaño del que ataca. En muchas de las veces, en el parasitismo el atacante es de menor tamaño que el atacado y en la depredación el de mayor tamaño es el atacante (Odum, 1985; Campbell, 1987).

De entre todos los tipos de interacción mencionados, en el presente trabajo se pone especial énfasis a la relación simbiótica endomicorriza V-A (hongo-planta). También se estudian las interacciones que pueden presentarse entre diferentes hongos, como los efectos antagónicos: antibiosis (amensalismo) y micoparasitismo (parasitismo), o si no existe ningún efecto entre ellos (neutralismo). En sí, la búsqueda de hongos antagónicos (de la endorrizósfera) hacia hongos fitopatógenos de la raíz, es importante como primer paso en la aplicación de un control biológico.

2.4.1. ANTAGONISMO.

En ecología de microorganismos, el término antagonismo es aplicado a todas las formas de acción microbiana en poblaciones mixtas, que resultan de la inhibición o efecto desfavorable de un microorganismo sobre otro (Curl y

Truelove, 1986).

El antagonismo está presente en la mayoría de los grupos de hongos. El estudio de las interacciones antagónicas entre los hongos (micoparasitismo, lisis, inhibición, competencia, antibiosis y fungistasis) son particularmente importantes en el control biológico de hongos fitopatógenos (Baker *et al.*, 1974).

En el suelo existe una gran diversidad de hongos antagónicos. Esto ha sido comprobado al inocular hongos ajenos al suelo natural y que no logran establecerse. Sin embargo, es fácil el establecimiento si el suelo es esterilizado antes de la adición del inóculo, debido a la eliminación de los organismos que producen efectos antagónicos frente a los nuevos habitantes (Griffin, 1972).

Se ha encontrado que también en la rizósfera existe diversidad de organismos antagónicos. Neal *et al.* (1970) encontraron que en la rizósfera de trigo resistente a *Cochliobolus sativus*, el 20% de microorganismos inhiben el desarrollo de patógenos, mientras que en un suelo no cultivado con trigo sólo el 7% son organismos inhibitorios y en la rizósfera de una variedad de trigo susceptible a *C. sativus* no se encontraron organismos inhibitorios.

2.4.2. ANTIBIOSIS.

La antibiosis es una categoría del antagonismo, que ocurre cuando una población microbiana produce antibióticos o sustancias tóxicas que a bajas concentraciones suprimen el desarrollo de otra población. Algunas de estas sustancias tienen amplio espectro de acción, no sólo sobre microorganismos, sino también sobre plantas y animales (Harttori, 1973; Curl y Truelove, 1986; Vacura, 1986).

Los antibióticos, en general, son considerados como compuestos orgánicos de bajo peso molecular producidos por microorganismos. A bajas concentraciones, los antibióticos afectan el desarrollo o actividad metabólica de otros microorganismos. Muchos antibióticos son producidos por microorganismos que habitan el suelo (Gottlieb y Shaw, 1970; Favel, 1988).

Algunos hongos manifiestan efectos de antibiosis frente a ciertos hongos fitopatógenos; por ejemplo, los reportados por Perusquia *et al.* (1987), donde *Chaetomium globosum*, *Ch. sominonus* y *Ch. piluliferum* producen antibióticos e inhiben el desarrollo de *Phymatotrichum omnivorum*, *Curvularia lunata* y *Alternaria tenuis*. Los antibióticos son producidos no sólo por hongos sino también por actinomicetos, bacterias y algunos microorganismos de otros grupos (Brian, 1957).

2.4.3. MICOPARASITISMO.

Por lo general, los hongos se comportan como saprófitos o como parásitos. Los hongos saprófitos colonizan a las plantas y a los animales muertos, y también pueden absorber sustancias orgánicas solubles que liberan los organismos vivos o muertos. Los hongos parásitos se alimentan de plantas y de animales vivos o bien de otros hongos (Deverall, 1974).

A la capacidad que tienen algunos hongos para parasitar a otros hongos se le denomina micoparasitismo o hiperparasitismo (Barnett y Lilly, 1962; Boosalis, 1964). El micoparasitismo puede ser clasificado en dos grandes grupos: el necrotrófico, llamado también destructivo, y el biotrófico, aquel que mantiene una relación de equilibrio con el hospedero. La clasificación está basada en el modo de micoparasitismo y en el efecto sobre el hospedero (Barnett y Brinder, 1973).

Un micoparásito necrotrófico se caracteriza por destruir a los hongos susceptibles que se encuentran creciendo junto a él y no requiere de las sustancias de otro organismo para su subsistencia; se podría considerar como un parásito oportunista. Por lo general, los micoparásitos necrotróficos se comportan más como saprófitos que como parásitos, y sólo bajo condiciones especiales expresan el

comportamiento de estos últimos (Cooke, 1978; Ferrera-Cerrato, 1976).

De entre los organismos necrotróficos, *Trichoderma* spp. es uno de los más frecuentemente estudiados. Durell (1968) encontró que *Trichoderma viride* exuda antibióticos y atrae hongos para parasitarlos (especialmente Ficomycetos). Este hongo penetra directamente en las hifas del hospedero y digiere su contenido citoplasmático.

Otro hongo que frecuentemente se comporta como parásito necrotrófico es *Fusarium oxysporum*, que puede parasitar a *Aspergillus luchuensis*, desarrollando sus hifas dentro de las hifas y conidios de este último (Chaturvedi y Dwivedi, 1985). *Fusarium oxysporum* también puede parasitar a *Rhizoctonia solani* y provoca un típico parasitismo hifal (Gupta et al., 1979).

Existen diversos basidiomicetos que también pueden actuar como micoparásitos. De la Cruz y Hubbell (1975) publicaron fotografías donde muestra que un basidiomiceto (no identificado) forma haustorios que penetran las hifas de *Macrophomina* spp. Ferrera-Cerrato (1977) encontró que los mucorales eran más susceptibles a ser parasitados por el basidiomiceto estudiado por de la Cruz y Hubbell (1975). En estudios más detallados, Ferrera-Cerrato (1981) observó el ataque del mismo basidiomiceto a las hifas y a otras estructuras de *Mucor rouxi*. Otros casos de micoparasitismo

atribuidos a basidiomicetos son reportados por Griffith y Barnett (1967).

De acuerdo a la fisiología y a la ecología de los micoparásitos necrotróficos, éstos pueden ser usados en el biocontrol de hongos patógenos de plantas. El control biológico depende de muchos factores, principalmente de la densidad de población del hospedero, de la temperatura, del pH y de la humedad. Por tanto, los micoparásitos que pueden ser utilizados en el control biológico en la agricultura conducen a la investigación de los requerimientos específicos del ambiente (Baker, 1987).

Los micoparásitos biotróficos obtienen nutrimentos de las células vivas del hospedero, sin tomarlos del medio sintético, si es que se encuentran desarrollándose en éste, ya que para su subsistencia requieren obligatoriamente tomar nutrimentos del hospedero (Barnett, 1963).

Los micoparásitos biotróficos pueden ser de tres tipos: internos, por contacto, y micoparásitos haustoriales. Los micoparásitos internos, como su nombre lo dice, se desarrollan y reproducen dentro de las células del hongo hospedero (Mulling y Barsdale, 1965). En el caso de los micoparásitos por contacto, las hifas tocan la superficie de la pared del hospedero, y parece que tienen la capacidad de aumentar la permeabilidad de la membrana, permitiendo de esta forma un aporte de sustancias para el parásito

(Boosalis, 1964). En cambio, el micoparasitismo haustorial inicia cuando los exudados del hospedero estimulan la germinación de las esporas del parásito. Una vez que las esporas del parásito y del hospedero entran en contacto, comienza el fenómeno infectivo, formando un apresorio, seguido de una invasión por una pequeña prolongación de una hifa digitiforme que penetra en la célula hospedera, con una ramificación posterior que da lugar a una estructura absorbente llamada haustorio (Barnett, 1973).

El estudio del micoparasitismo biotrófico es complejo, por la necesidad de cultivar a los parásitos en presencia del hospedero. Este es un campo no muy bien explorado, por lo que es difícil el control biológico por medio de éste tipo de micoparásitos (Mangenot y Diem, 1979).

2.4.4. NEUTRALISMO.

Como ya ha sido mencionado, el neutralismo implica que dos poblaciones de organismos carecen de interacción. El neutralismo es evidente *in vitro*, pero la demostración de éste en vivo es mucho más difícil. La frecuencia y significancia del neutralismo en comunidades microbianas naturales tienen que ser todavía evaluadas (Alexander, 1976; Curl y Truelove, 1986).

El neutralismo no se presenta cuando poblaciones

diferentes ocupan un nicho común dentro de la comunidad y es más probable entre poblaciones microbianas con diferencias extremas en capacidad metabólica, que entre poblaciones con capacidad similar. También ocurre cuando dos poblaciones de microorganismos no interactúan porque tienen una muy baja densidad de población, cuando el abasto de alimentos es abundante o cuando los requerimientos para el desarrollo de las dos poblaciones son tan diferentes que entre ellas no existe competencia por nutrientes limitantes. El efecto neutro también es favorecido por las condiciones ambientales que permiten el desarrollo de la actividad microbiana (Atlas y Bartha, 1981; Vacura, 1986).

Cooke (1978) considera a algunos hongos como simbioses neutrales. Éstos se encuentran asociados con un hospedero del que son absolutamente dependientes, pero en él no causan daño aparente o efecto benéfico.

III. OBJETIVO GENERAL

ESTUDIAR LA MORFOLOGIA, TAXONOMIA, CAPACIDAD MICOPARASITARIA Y DE ANTIBIOSIS DE LOS HONGOS ENDORRIZOSFÉRICOS DE PLANTAS DE CULTIVOS Y ARVENSES.

OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Aislar los hongos filamentosos de la endorrizósfera de plantas de cultivo y arvenses, y en las raíces de éstas determinar el porcentaje de colonización de endomicorrizas V-A.

2.- De los hongos aislados de la endorrizósfera, determinar el efecto que presentan frente al hongo patógeno *Pythium* 19-10: neutralismo, antibiosis y micoparasitismo.

3.- Caracterizar taxonómicamente a los hongos que presentaron antibiosis y micoparasitismo frente a *Pythium* 19-10.

4.- Estudiar el modo de parasitismo de los hongos que resultaron ser parásitos de *Pythium* 19-10.

IV. HIPÓTESIS

1.- Las cualidades y cantidades de los hongos filamentosos aislados de la endorrizósfera varían de acuerdo a la especie de planta de la que son aislados, lo mismo ocurre con el porcentaje de colonización endomicorrizica V-A. No obstante, esto también responde a otros factores como el clima y el suelo.

2.- En la endorrizósfera existen diversas especies de hongos que producen antibiosis y micoparasitismo frente al hongo patógeno *Pythium* 19-10, por lo que dichos hongos pueden ser utilizados para el control de patógenos en la raíz.

3.- Los hongos que habitan la endorrizósfera de plantas sanas son hongos saprófitos en su mayoría.

4.- Algunos de los hongos de la endorrizósfera que micoparasitan a *Pythium* 19-10 son parásitos necrotróficos.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MUESTREO DE RAÍCES.

Se tomaron 8 muestras de raíces de diferentes plantas de cultivo y 16 muestras de diferentes arvenses, en terrenos pertenecientes al Colegio de Posgraduados, Montecillo, México (apéndice I). En los cultivos fueron muestreadas las raíces de 5 plantas, en un área de 16 m², variando la forma de obtención de acuerdo a la especie de la planta, su estado de desarrollo, la topografía del terreno y profundidad del suelo (Sieverding, 1983). De las arvenses, se colectaron 5 muestras de cada especie de planta, y 2 de la planta completa para su identificación posterior. Sólo se tomaron en cuenta a aquellas plantas con raíces sanas.

De acuerdo con Bohm (1979), para la mejor obtención de las raíces, los pastos y las hierbas, se excavó a una distancia del tallo de 20-80 cm; esto dependió también de la especie y del estado de desarrollo de la planta. Las raíces

fueron colocadas en bolsas de plástico y fueron llevadas al laboratorio para el posterior aislamiento de los hongos.

El muestreo se realizó en los meses de Abril a Junio.

5.2. EVALUACIÓN DE LA COLONIZACIÓN MICORRIZICA V-A NATIVA

Algunas de las raíces muestreadas fueron lavadas con agua y colocadas en cápsulas de plástico esterilizable, se aclararon con KOH al 10% durante 10 minutos a 10 lb de presión. El KOH fue eliminado y las raíces fueron enjuagadas con agua destilada. Durante 3 minutos, fueron dejadas en H_2O_2 al 10%, y después de decantar, se enjuagaron con agua. En seguida, se agitaron por 3 minutos más dentro de una solución de HCl al 10%, siendo después retirado el ácido. La tefidura se realizó agregando azul de tripano al 0.05% en lactoglicerol durante 10 minutos a 10 lb de presión. Fue retirada la solución colorante y se añadió lactoglicerol limpio (Phillips y Hayman, 1970).

Los segmentos radicales, ya teñidos, fueron colocados en laminillas, acomodados paralelamente unos de otros, agregándoles unas gotas de lactoglicerol; posteriormente, se pusieron cubreobjetos sobre los preparados, eliminando las burbujas de aire; fue eliminado el exceso de lactoglicerol y se selló con esmalte de uñas. Se observó la presencia de

estructuras fungosas con ayuda del microscopio óptico con objetivo de inmersión. El porcentaje de colonización fue obtenido a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Colonización} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de campos colonizados}}{\text{N}^\circ \text{ total de campos observados}} \times 100$$

5.3. AISLAMIENTO DE HONGOS FILAMENTOSOS DE LA ENDORRIZÓSFERA.

Las raíces de las plantas muestreadas se lavaron con abundante agua para eliminar los residuos del suelo. Con unas tijeras, se cortaron segmentos de 1.0 a 1.5 cm de longitud y se seleccionaron 50 segmentos, procurando obtener una muestra representativa de las raíces de las plantas en estudio.

Para la desinfección superficial de los segmentos de raíz, éstos fueron colocados por 1 minuto en etanol al 70%. Posteriormente, se lavaron con agua destilada estéril y se pasaron a cloramina-T al 1% durante 3 minutos. Finalmente, se les dieron 6 enjuagues con agua destilada estéril. Estos últimos pasos, se realizaron en una cámara de flujo laminar (Martínez, 1986). Todo esto con el fin de eliminar bacterias y hongos que pudieran estar en la superficie de la raíz, puesto que los hongos de interés en el presente estudio se

encontraron en el interior de la raíz.

Posteriormente, se colocaron los 50 segmentos de raíz de cada especie vegetal en cajas de Petri que contenían medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar, apéndice II) con 70 µg/ml de estreptomycin, para inhibir el desarrollo de bacterias. Se colocaron 5 fragmentos de raíz por cada caja de Petri. Ulteriormente, las cajas fueron incubadas a 28°C y se vigiló la aparición y desarrollo de los hongos.

5.4. PORCENTAJE DE COLONIZACIÓN POR HONGOS FILAMENTOSOS.

Este porcentaje se obtuvo tomando en cuenta el número de segmentos de raíz sembrados en medio de cultivo PDA, que fueron 50 para cada especie de planta. Se contó el número de segmentos a partir de los cuales se desarrollaron hongos en el medio de cultivo PDA y se obtuvo el porcentaje de hongos filamentosos aislados de la endorrizósfera, con base en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de hongos filamentosos aislados de la endorrizósfera} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de segmentos con hongo}}{50} \times 100$$

5.5. PURIFICACIÓN DE LOS HONGOS AISLADOS DE LA ENDORRIZÓSFERA.

Los hongos aislados fueron resembrados varias veces

hasta obtener cultivos puros y, posteriormente, fueron empleados para los estudios de cinética de crecimiento, micoparasitismo, antibiosis, neutralismo y para su identificación.

5.6. IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS.

Para la identificación de los hongos aislados de la endorrizósfera se tomaron en cuenta las características macroscópicas de cada colonia y se prepararon microcultivos empleando la técnica descrita por Ridell (1950), modificada por Ferrera-Cerrato (1976).

En este método se empleó una caja de Petri que contenía un soporte de vidrio en forma de V o de U y un portaobjetos, todo esto estéril: sobre el portaobjetos se colocó un disco de agar de 1 cm de diámetro, el cual se obtuvo con un sacabocado; el disco se inoculó con el hongo en dos extremos opuestos, y se puso encima de éste un cubreobjetos estéril. Para mantener la humedad se adicionó a la caja de 10 a 15 ml de glicerol al 10%. Los microcultivos se incubaron a 28°C, y fueron observados en forma periódica hasta la aparición de esporulación característica del hongo. Al cabo de este tiempo, se eliminó el glicerol con una pipeta Pasteur y se sustituyó con formol al 10% (en agua), el cual se dejó actuar como fijador durante 3 horas. El

portaobjetos se sacó de la caja separando el cubreobjetos y eliminando los restos de agar.

Posteriormente, los cubreobjetos provenientes de los microcultivos realizados se colocaron en portaobjetos limpios, a los cuales se les adicionó una gota de azul de algodón lactofenol (apéndice III), quedando así adherida la preparación. Finalmente, se selló con esmalte de uñas. La identificación se basó en claves como las de Barnett *et al.* (1972) y Gilman (1971), y fue realizada en el Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Chapingo.

5.7. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LOS HONGOS AISLADOS DE LA ENDORRIZÓSFERA.

Cada uno de los hongos aislados del interior de la raíz, incluyendo al patógeno *Pythium* 19-10, se dejó desarrollar en cajas de Petri que contenían medio PDA. Se incubaron a 28°C. Diariamente se observó el desarrollo de las colonias y se midió el diámetro que alcanzaron por día transcurrido. Se realizaron tres repeticiones por cada especie de hongo.

(NOTA: la cepa del hongo *Pythium* 19-10 utilizada en este estudio, fue catalogada por Granados (1989) como causante de la pudrición radical y marchitamiento del maíz, además de inhibir en gran medida la germinación de la

semilla. Por las características de este hongo, se consideró importante evaluar los efectos antagónicos que le provocaron cada uno de los hongos aislados).

5.8. MACROSCOPÍA DE LA INTERACCIÓN DE LOS HONGOS AISLADOS DE LA ENDORRIZÓSFERA VERSUS *Pythium* 19-10.

Para poder determinar el neutralismo, micoparasitismo y antibiosis de los hongos endorrizosféricos frente al patógeno radical, se tomó un pequeño disco de agar con crecimiento activo de *Pythium* 19-10, y se colocó en un extremo de una caja de Petri que contenía 25 ml de medio PDA; en el otro extremo de la caja se inoculó con uno de los hongos endorrizosféricos. Las cajas inoculadas se incubaron a 28°C y se hicieron observaciones diarias para detectar el tipo de interacción entre los hongos inoculados. Cada uno de los hongos aislados de la endorrizósfera se puso frente a *Pythium* 19-10. El neutralismo se determinó cuando no existió ninguna interacción entre las colonias de hongos, la antibiosis fue detectada al observar un halo de inhibición del hongo a ensayar frente al hongo patógeno y el micoparasitismo fue evidente cuando, al tener en contacto a las dos colonias de hongos, una de ellas crecía sobre la otra, evitando, de esta manera, el crecimiento de ésta.

5.9. MICROSCOPIA DEL MICOPARASITISMO ENTRE LOS HONGOS AISLADOS DE LA ENDORRIZÓSFERA Y *Pythium* 19-10.

Para observar con mayor detalle la forma de micoparasitismo de los hongos aislados frente a *Pythium* 19-10 y poder percibir diferentes estructuras (como hifas, conidióforos, conidios, clamidosporas, etc.) se usó la técnica de Riddell modificada por Ferrera-Cerrato (1976). En este caso, un disco de agar se inoculó en un extremo con *Pythium* 19-10 y en el lado opuesto con el hongo endorrizosférico por probar. Se puso sobre el disco de agar un cubreobjetos, se introdujo en una caja de Petri que contenía un soporte de vidrio (todo esto estéril) y se adicionó glicerol al 10% para mantener húmeda la cámara. Se incubaron a 28°C durante 5 días. Los cubreobjetos provenientes de los microcultivos realizados se colocaron sobre un portaobjetos limpio, al cual se le adicionó una gota de azul de algodón lactofenol y quedó de esta manera adherida la preparación y se selló con esmalte para uñas.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 TAXONOMÍA DE LAS PLANTAS DE CULTIVO Y ARVENSES MUESTREADAS.

En los Cuadros 3 y 4 están enlistadas las diferentes plantas muestreadas.

Las plantas de cultivo, en su mayoría, fueron gramíneas y leguminosas, que son de importancia económica en el país, sobre todo el maíz y el frijol, por constituir parte muy importante en la dieta de los mexicanos.

Las arvenses presentaron diversas especies, predominando aquéllas de las familias *Gramíneae*, *Crustiferae*, *Quenopodaceae*, *Leguminosae* y *Compositae*. Muchas de estas arvenses son importantes en la comunidad rural, debido a que algunas de ellas tienen un alto valor como especies forrajeras, tal es el caso de: *Brasica campestris* L., *Melilotus indicus* (L.) All. *Medicago polymorpha* var.

Vulgaris (Benth.) Shinnery y *Chenopodium album* L. Algunas otras arvenses son empleadas como alimento para el hombre, como *Sisymbrium irio* L. y, nuevamente, *Chenopodium album* L. (Espinoza, 1987). También son usadas como plantas medicinales, que es el caso de *Taraxacum officinale* Weber (Ferrera-Cerrato y Jaen, 1989).

6.2 COLONIZACIÓN POR HONGOS ENDOMICORRIZICOS V-A.

La mitad de las plantas de cultivo presentaron porcentajes altos de colonización endomicorrizica V-A (de aquí en adelante CEV-A). El más alto porcentaje de colonización lo tuvieron las dos variedades de maíz (*Zea mays* y *Zea mays* var. Pancho Villa), ambas con un 100%, predominando los arbusculos, con un porcentaje entre 80-90 y las vesículas de 15-35% (Figura 4). Comparando con otros trabajos, en maíz se han reportado colonizaciones tan altas como de 95% en diferentes agroecosistemas (Ferrera-Cerrato, 1983), valor muy próximo al aquí reportado. Los cultivos de cebolla (*Allium cepa*) y girasol (*Helianthus annuus*) también presentaron una alta colonización micorrizica, sobre todo en la cebolla, con un 89.5%, predominando en ambos cultivos los arbusculos y, en menor porcentaje, se presentan las vesículas.

El nivel de colonización endomicorrizico para frijol

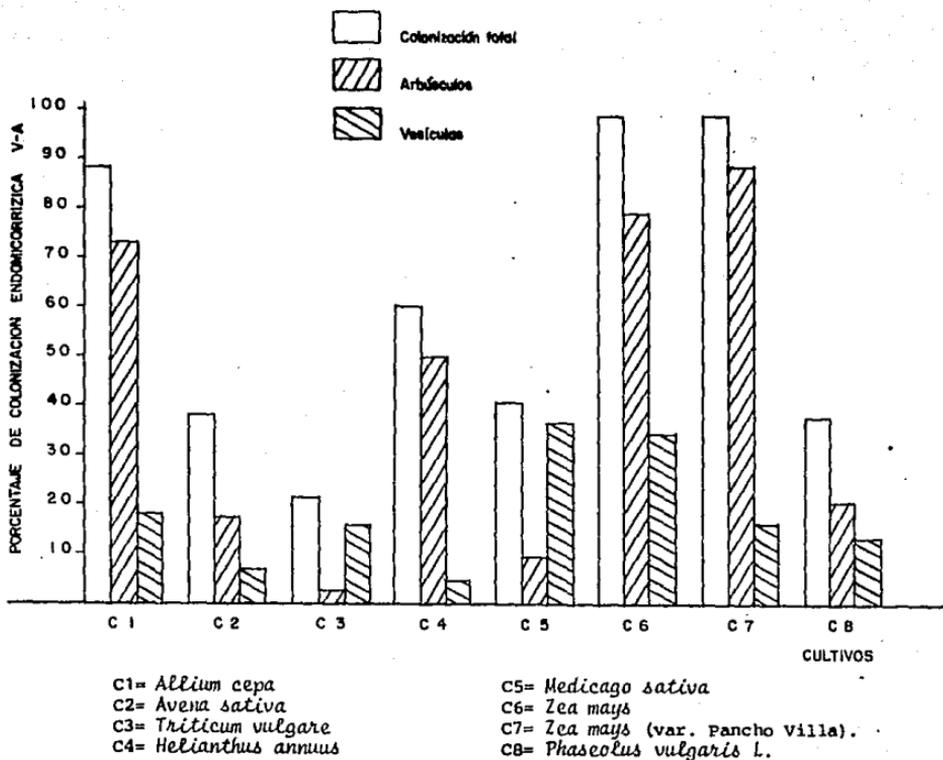


Figura 4.- Porcentaje de colonización endomicorrizica V-A en plantas de cultivo.

fue bajo con respecto a los valores reportados en otros trabajos, que son de 55 hasta 100% en diferentes agroecosistemas (Ferrera-Cerrato, 1983).

CUADRO 3. Plantas de cultivo muestreadas y su clasificación taxonómica.

CLAVE	NOMBRE COMUN	NOMBRE CIENTIFICO
C1	Cebolla	<i>Allium cepa</i>
C2	Avena	<i>Avena sativa</i>
C3	Trigo	<i>Triticum vulgare</i>
C4	Girasol	<i>Helianthus annuus</i>
C5	Alfalfa	<i>Medicago sativa</i>
C6	Maíz	<i>Zea mays</i>
C7	Maíz	<i>Zea mays</i> (var. Pancho Villa)
C8	Frijol	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.

Los cultivos de alfalfa (*Medicago sativa*) y de avena (*Avena sativa*) presentaron porcentajes de colonización relativamente bajos y muy similares, predominando en la alfalfa las vesículas y en avena los arbusculos. Dentro de las plantas de cultivo, el trigo mostró el más bajo

CUADRO 4. Arvensus muestreadas y su clasificación taxonómica.

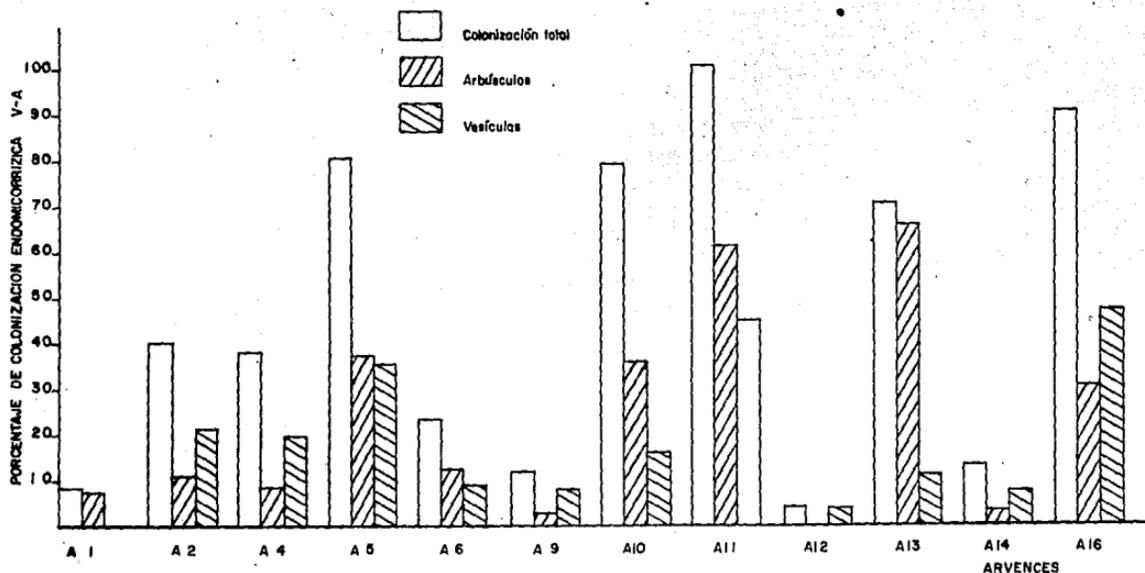
CLAVE	NOMBRE COMUN	NOMBRE CIENTIFICO
A1	Nabo.	<i>Brassica campestris</i> L.
A2	Pasto	<i>Hordeum jobatum</i> L.
A3	Quelite cenizo	<i>Chenopodium album</i> L.
A4	Meliloti	<i>Melilotus indicus</i> (L) All.
A5	Carretilla	<i>Medicago poliphorma</i> var. <i>Vulgaris</i> (Benth) Shinners
A6	Malva	<i>Malva parriflora</i> L.
A7	Nabo morado	<i>Sisymbrium irio</i> L.
A8	Romero	<i>Suaeda torreyana</i> Wats.
A9	Pasto	<i>Stipa clandestina</i> Hack
A10	Lechugilla	<i>Taraxacum officinale</i> Weber
A11	Lengua de vaca	<i>Plantago major</i> L.
A12	Lenteja	<i>Lepidium virginicum</i> L.
A13	Duraznillo	<i>Solanum rostatum</i> Dunal
A14	Carricillo	<i>Reseda luteola</i> L.
A15	Pasto	<i>Bromus carinatus</i> Hook & Sherff
A16	Té de campo	<i>Bidens aurea</i> (Ait) Sherff

* Identificadas en el Herbario del Centro de Botánica del Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.

porcentaje de colonización endomicorrizica. Villarreal (1990) reporta para trigo porcentajes de 40.5% cuando es inoculado con *Glomus* sp. y de 26.5% cuando es doblemente inoculado con *Glomus* sp. y *Azospirillum* sp. Este último valor es muy cercano al aquí encontrado (22%).

En la Figura 5 aparecen los porcentajes de CEV-A para arvenses. *Plantago major* L. es la que presenta el porcentaje más alto; otras arvenses, como *Medicago polymorpha* var. *Vulgaris* (Benth) Shinnery, *Solanum rostratum* Dunal. y *Bidens aurea* (Ait) Sherff, registraron porcentajes mayores a 50%, y algunas de estas plantas no mostraron colonización micorrizica, como: *Ch. album* L., *S. irio* L., *S. torreyana* Wats. y *B. carinatus* Hook & Sherff.

Gerdemann (1975) indica que las familias tales como *Chenopodiaceae*, *Cyperaceae*, *Cruciferae* y *Juncaceae* no son susceptibles de ser colonizadas por hongos micorrizicos V-A. De acuerdo a esto, se esperaba que las plantas muestreadas de la familia *Cruciferae* y *Chenopodiaceae* no presentaran colonización de este tipo. En la crucifera *Sisymbrium irio* L. no se encontró colonización endomicorrizica, en *Brassica campestris* L. y *Lepidium virginicum* L. (ambas de la familia *Cruciferae*) fue determinada una colonización de 8 y 4%, respectivamente. Los niveles de colonización que presentaron estas arvenses, aunque muy bajos, resultan de especial interés, porque se



A1= *Brassica campestris* L.

A2= *Hordeum jobatum* L.

A4= *Melilotus indicus* (L) All.

A5= *Medicago polymorpha* var. *vulgaris* (Benth) Shiners.

A6= *Malva parviflora* L.

A9= *Stipa clandestina* Hack.

A10= *Taraxacum officinale* Weber.

A11= *Plantago major* L.

A12= *Lepidium virginicum* L.

A13= *Solanum rostratum* Dunal.

A14= *Reseda luteola* L.

A16= *Bidens aurea* (Ait) Sherff.

Figura 5.- Porcentaje de colonización endomicorrizica V-A en arvences.

sabe que estas plantas no son capaces de formar la simbiosis endomicorrízica V-A. Ocampo *et al.* (1980) reportaron para *B. campestris* L. un porcentaje de colonización muy bajo, y lo atribuyeron a que fue inducida por las plantas que crecían junto a esta arvense. La *B. campestris* L. estudiada en el presente trabajo, análogamente a la estudiada por Ocampo, mostró CEV-A, que aquí puede ser atribuida a la inducción debida a las raíces de avena, que tuvieron un 39.9% de colonización. Peterson *et al.*, (1985) reportaron a *L. virginicum* L. como una de las crucíferas que presentan CEV-A, lo que pudo comprobarse en el presente trabajo.

Los ejemplares de la familia *Chenopodiaceae* que fueron examinados (*Chenopodium album* L. y *Suaeda torreyana* Wats) no presentaron CEV-A. En el interior de la raíz de estas arvenses, sólo fueron observadas hifas de hongos filamentosos, pero no fueron encontradas vesículas ni arbuscúlos. No obstante, Tester *et al.* (1987) citan a tres autores diferentes que reportan CEV-A en *Ch. album*. Y también ha sido registrada colonización en otras chenopodiáceas, como en el caso de *Atriplex gardneri* que llega a tener hasta un 78% (Allen, 1983).

Otra de las arvenses que no tuvo CEV-A fue *B. carinatus* Hook & Sherff; por ser gramínea se esperaba colonización. Pacios (1983) reporta para *Bromus brevis* una colonización de 6%, lo que nos indica que, probablemente, es

un género que no suele ser muy susceptible a ser colonizado por hongos micorrizicos. Sin embargo, en el interior de la raíz de *B. carinatus* fueron encontradas muchas hifas septadas y esporas de hongos filamentosos.

Tester *et al.* (1987) mencionan algunas causas por las cuales muchas plantas no son colonizadas por hongos endomicorrizicos V-A. Algunas especies de *Brassica* producen un exudado volátil que reduce el rango de germinación de las esporas de hongos endomicorrizicos, además de producir exudados sulfurosos que reducen la CEV-A. Una de las razones de la baja CEV-A en algunas chenopodiáceas es la escasa producción de exudados. Otras causas muy importantes que habría que tomar en cuenta, son: la especie vegetal, el estado fenológico y edad de la planta, el medio y las condiciones ambientales, debido a que éstas influyen en la liberación de exudados radicales (Barea y Azcón-Aguilar, 1982).

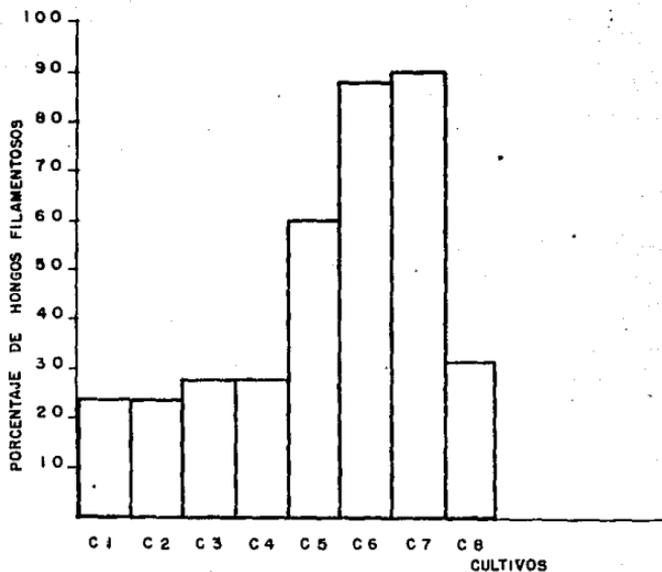
Las arvenses *Taraxacum officinale* L. y *Bidens aurea* (Ait) Sherff, ambas de la familia *Compositae*, tuvieron los más altos porcentajes de CEV-A. Ferrera-Cerrato y Jaen (1989) reportan para *T. officinale* una colonización de 77%, similar a la obtenida en el presente estudio, que fue de 79.66%. Los mismos autores registran porcentajes de colonización de otras especies de plantas de la familia *Compositae*, y, precisamente, son las que tienen los valores

más altos de CEV-A de todas las plantas medicinales analizadas por ellos, por lo que se podría decir que esta familia es altamente colonizable por hongos endomicorrizicos V-A. Las arvenses de la familia Leguminosae también tuvieron porcentajes altos de colonización, sobre todo *Medicago polymorpha* var. *Vulgaris* (Benth) Shinnars con un porcentaje de 80.9%. Un 100% de colonización fue encontrado en *Plantago major* L.

6.3. COLONIZACIÓN POR HONGOS FILAMENTOSOS EN LA ENDORRIZÓSFERA.

El número de cepas de hongos aislados de la endorrizósfera de plantas de cultivo y de arvenses fue de 148 y 153, respectivamente, sumando un total de 301 cepas. Muchas de esas colonias tuvieron características diferentes de color, textura, velocidad de crecimiento y forma de crecimiento.

La colonización por hongos filamentosos en la endorrizósfera de plantas de cultivos y arvenses está representada en las Figuras 6 y 7, respectivamente. En la figura 6 puede ser observado que la endorrizósfera de las dos variedades de maíz es la más colonizada por hongos filamentosos. Asimismo, estos cultivos mantienen una alta CEV-A, lo que indica que es factible que la raíz de maíz



C1= *Allium cepa*
 C2= *Avena sativa*
 C3= *Triticum vulgare*
 C4= *Helianthus annuus*

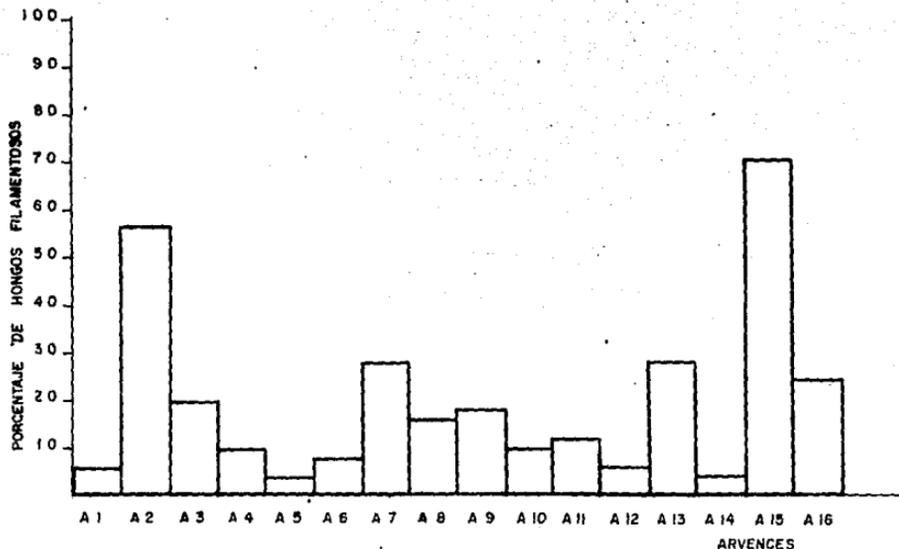
C5= *Medicago sativa*
 C6= *Zea mays*
 C7= *Zea mays* (var. Pancho Villa)
 C8= *Phaseolus vulgaris* L.

Figura 6. Porcentaje de colonización por hongos filamentosos en la endorricósfera en plantas de cultivos.

pueda tolerar una alta colonización de hongos tanto filamentosos como endomicorrizicos V-A. La alfalfa (*M. sativa*) también tuvo uno de los más altos porcentajes de colonización de hongos filamentosos, el cual fue de 60%, aunque su CEV-A no fue tan alta como en el caso del maíz. El resto de los cultivos está menos colonizado por hongos filamentosos; sus porcentajes estuvieron entre 24 y 32%, no observándose grandes diferencias entre ellos.

En la Figura 7 puede observarse que, en general, las arvenses no son muy colonizadas por hongos filamentosos, ya que de un total de 16 arvenses, 14 tienen porcentajes menores de 30, y algunas con porcentajes tan bajos como los que presentan *M. polymorpha* var. *Vulgaris* y *Reseda luteola* L., que tuvieron un 4%. En contraste, sólo las gramíneas *Hordeum javatum* L. y *B. carinatus* presentaron porcentajes mayores a 50.

Las crucíferas mostraron una muy baja colonización de hongos filamentosos, al igual que bajo porcentaje de CEV-A, o como el caso de *Sisymbrium irio* L. que careció de esta última. El mismo comportamiento lo tienen las chenopodiáceas, al presentar bajos porcentajes de colonización de hongos filamentosos y no tener CEV-A. La baja colonización de hongos filamentosos en la endorrizósfera de estas plantas, probablemente se deba a las mismas razones ya mencionadas para el caso de los hongos



- | | | |
|---|---|---|
| A1= <i>Brassica campestris</i> L. | A6= <i>Malva parviflora</i> L. | A12= <i>Lepidium virginicum</i> L. |
| A2= <i>Hordeum jobatum</i> L. | A7= <i>Sisymbrium irio</i> L. | A13= <i>Solanum rostratum</i> Dunal. |
| A3= <i>Chenopodium album</i> L. | A8= <i>Suaeda torreyana</i> Wats. | A14= <i>Reseda luteola</i> L. |
| A4= <i>Melilotus indicus</i> (L) All. | A9= <i>Stipa clandestina</i> Hack. | A15= <i>Bromus carinatus</i> Hook & Sherff. |
| A5= <i>Medicago polymorpha</i> var. <i>vulgaris</i> (Benth) Shinnars. | A10= <i>Taraxacum officinale</i> Weber. | A16= <i>Bidens aurea</i> (Nit) Sherff. |
| | A11= <i>Plantago major</i> L. | |

Figura 7. Porcentaje de colonización por los hongos filamentosos en la endocriodera de arvences

endomicorrizicos V-A.

En general, fue observado que el porcentaje de colonización de hongos filamentosos en la endorrizósfera difiere en función de la especie de planta. Esto corresponde a lo reportado por Bilalil (1967), que encontró que las raíces de algunas arvenses presentaban diferencias en las especies de hongos aisladas y en la abundancia de éstas. Probablemente, la respuesta que se obtuvo se deba a que el desarrollo de los hongos en la endorrizósfera depende de los exudados de la raíz, y como cada planta exuda compuestos característicos de su especie, entonces sólo es estimulado el desarrollo de hongos específicos. En esto también influye el número de microorganismos presentes en el suelo y los factores físicos y químicos del mismo, los cuales alteran la difusión de sustancias liberadas por la raíz (Campbell, 1987).

En el presente trabajo se pudo comprobar que es extensa la población de hongos que habitan la endorrizósfera de plantas sanas y que la composición cualitativa y cuantitativa de la flora fungosa varía de acuerdo a la especie de planta.

Por los resultados obtenidos, surgió la duda de que si el porcentaje de hongos filamentosos influye en la CEV-A, o viceversa. Para dar respuesta a esta duda, se calculó la correlación que podría existir entre los valores ya

mencionados y se realizaron las gráficas de dispersión tanto para plantas de cultivo como de arvenses. De acuerdo al tratamiento estadístico aplicado, no se presentó correlación significativa entre la colonización de hongos filamentosos y endomicorrízicos V-A en ninguno de los tipos de plantas aquí analizados, ya que para dos cultivos $r = 0.635$, pero no es significativa por presentar una $\alpha = 0.0907$; en las plantas de cultivo ocurre lo mismo, debido a que $r = -0.0185$ y $\alpha = 0.492$.

Todas las plantas se muestrearon en la etapa de floración, pero cada una presentó diferente colonización de hongos. Sería interesante observar el comportamiento de una sola especie de planta en diferentes etapas fenológicas para comprobar si efectivamente los dos tipos de colonización de hongos no influyen entre sí, además conocer a qué edad la planta comienza a ser colonizada y por qué tipo de hongos.

6.4. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LOS HONGOS AISLADOS DE LA ENDORRIZÓSFERA.

Se determinó la cinética de crecimiento de las 301 cepas de hongos aislados, incluyendo a *Pythium* 19-10. Las Figuras 8, 9 y 10 muestran la cinética de crecimiento de algunos hongos aislados, en donde se da el diámetro de la colonia en centímetros por día transcurrido. En general, los

C6s

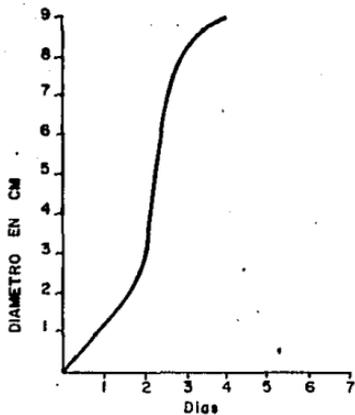


Figura 8. Cinética de crecimiento del hongo C6s dado el diámetro de la colonia en cms por día transcurrido

C6J

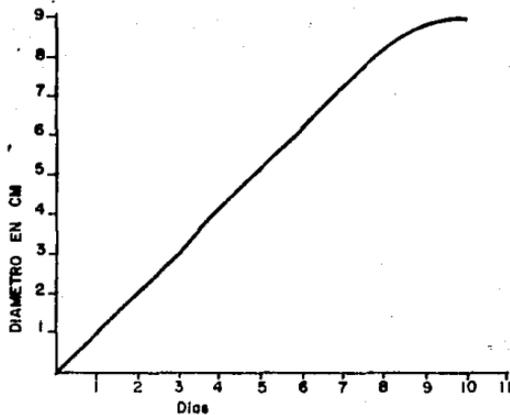


Figura 9. Cinética de crecimiento del hongo C6J dado el diámetro de la colonia en cms por día transcurrido.

C6A

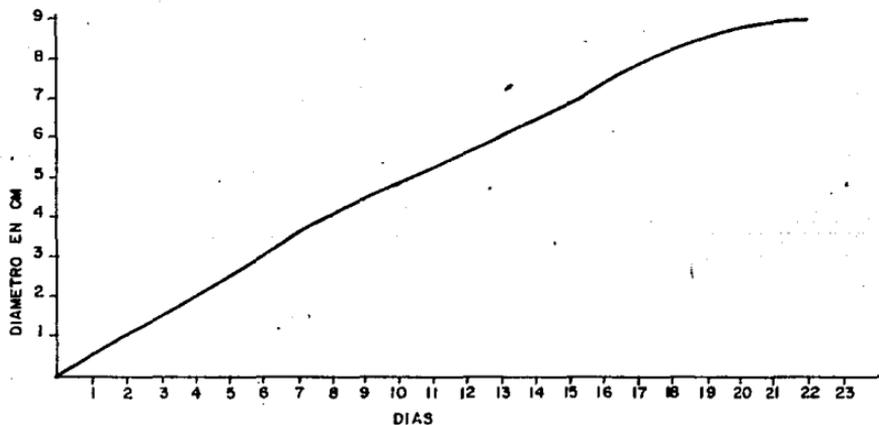


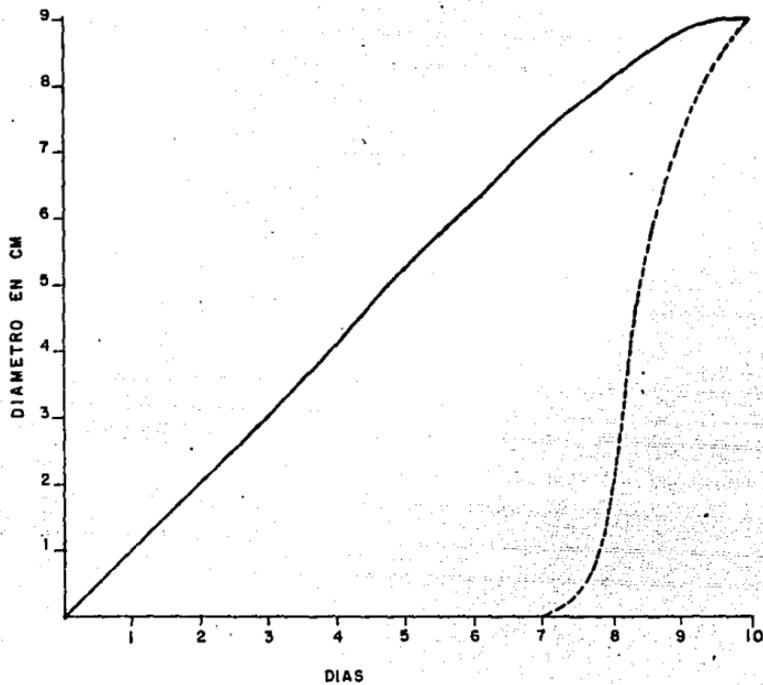
Figura 10. Cinética de crecimiento del hongo C6A, dado el diámetro de la colonia en cm por día transcurrido.

hongos aislados de la endorrizósfera se comportan de tres formas: el 8% tuvo un crecimiento muy rápido (v. gr., C6s de la Figura 8), el 58% fueron de velocidad de crecimiento media (v. gr., C6J de la Figura 9), y el 34% tuvo un crecimiento muy lento (v. gr., C6u de la Figura 10).

Estas gráficas de cinética de crecimiento fueron útiles para determinar macroscópicamente el neutralismo, la antibiosis y el micoparasitismo de los hongos endorrizosféricos frente a *Pythium* 19-10. Con la gráfica de crecimiento, fue posible establecer el día de inoculación del hongo, de manera que éste arribara al centro de la caja de Petri en el mismo momento en que lo hiciera *Pythium* 19-10. De este modo, fue observado más claramente el tipo de antagonismo que existió entre los hongos. Ejemplo de ello está plasmado en la Figura 11.

6.5. MACROSCOPIA DE LA INTERACCIÓN DE LOS HONGOS AISLADOS DE LA ENDORRIZÓSFERA VERSUS *Pythium* 19-10.

Algunos de los hongos aislados no presentaron efecto frente a *Pythium* 19-10, ya que al crecer junto a éste, ninguno influyó en el crecimiento del otro, o sea, presentaron efecto neutro. Otros hongos provocaron efectos antagónicos frente al patógeno; estos efectos fueron: antibiosis y micoparasitismo. La antibiosis se estimó cuando



— C6J
 - - - PYTHIUM 19-10

Figura 11. Día de inoculación de C6J y PYTHIUM 19-10 para que ambos se encuentren en el centro de la caja de petri.

el hongo aislado a probar inhibió el crecimiento de *Pythium* 19-10 y formó un halo de separación entre ambas colonias causado por la producción de antibióticos (Figura 12). El micoparasitismo se evaluó cuando el micelio del hongo aislado a probar impidió el crecimiento de *Pythium* 19-10 al formar frente a éste una red miceliar que incluso creció sobre él, dependiendo del tipo de parásito (Figura 13).

La mayoría de los hongos aislados de la endorrizósfera de plantas de cultivo (70%), presentaron antibiosis frente a *Pythium* 19-10; en menor proporción, se manifestó el neutralismo, y el porcentaje más bajo lo tuvo el micoparasitismo. Este mismo comportamiento lo tienen los hongos aislados de arvenses, pero con un porcentaje de antibiosis no tan alto (45%), como el de las plantas de cultivo (Figuras 14 y 15).

6.5.1. NEUTRALISMO.

Los hongos que presentaron neutralismo frente a *Pythium* 19-10, fueron aislados tanto de plantas de cultivo como de arvenses. En general, los hongos aislados que manifestaron este efecto produjeron un micelio hialino y cenocítico; se cree que se trata del mismo hongo o de especies muy parecidas por tener características macroscópicas muy similares, como su cinética de

Figura 12. Antibiosis media entre, ambas colonias de hongos, el crecimiento de *Pythium* es inhibido por la producción de antibióticos de la colonia del hongo C6-4 y se forma un halo de antibiosis.

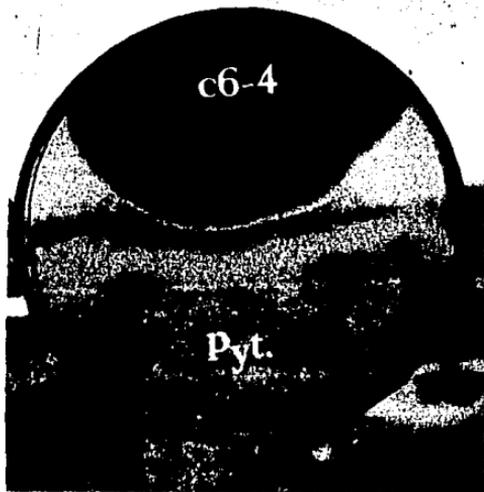


Figura 13. Micoparasitismo macroscópico, donde la colonia de C9e crece sobre la colonia de *Pythium* 19-10 impidiendo el crecimiento de la última.



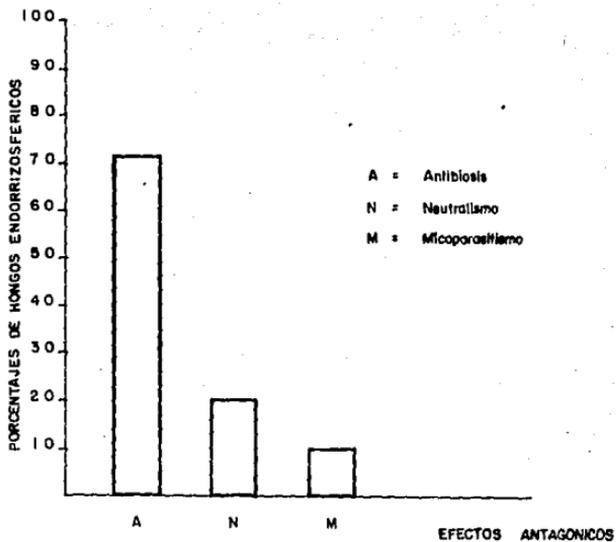


Figura 14. Porcentaje de hongos de la endorrizosfera de plantas de cultivo que presentan efectos antagonicos frente al PYTHIUM 19-10

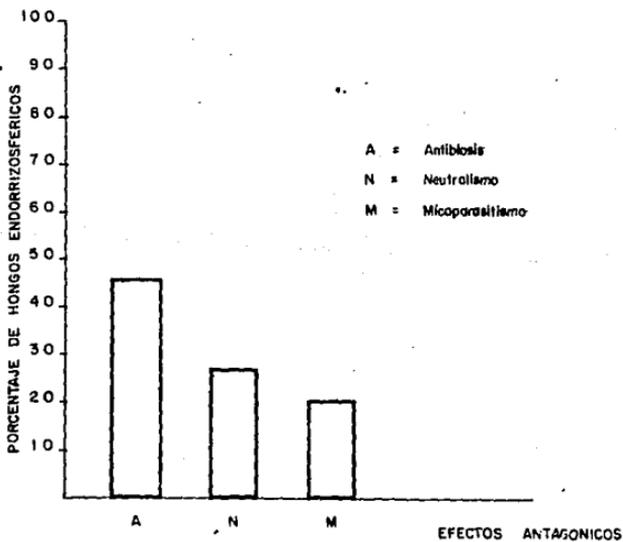


Figura 15. Porcentaje de hongos de la endorrizosfera de arveces que presentan efectos antagonicos frente al PYTHIUM 19-10

crecimiento, la forma irregular de su colonia, el color blanco y la textura algodonosa de la colonia. Pero no pudieron ser identificados al no esporular en los medios probados, que fueron PDA, jugo de tomate-agar, Czapek-Dux-Agar y Agua-Agar. De estos hongos con efecto neutro hacia *Pythium* 19-10, se puede decir que es común encontrarlos en la endorrizósfera, ya que fueron aislados de diversas especies de plantas a las que, aparentemente, no les causa ningún daño radical. Probablemente, este tipo de hongos no le causen algún efecto a *Pythium* 19-10 porque *in vitro* ambos hongos tenían suficiente alimento para su desarrollo (precisamente esta es una de las causas por las cuales se presenta el neutralismo (Atlas y Barta, 1981)). Restaría demostrar si los hongos que presentaron neutralismo *in vitro* también lo presentan *in vivo*, probar qué efecto tienen sobre otros hongos fitopatógenos y comprobar si es que causan o no daño a otras plantas.

6.5.2. ANTIBIOSIS.

Los hongos antibióticos tuvieron distinta intensidad de antibiosis, la cual se dividió en tres categorías: antibiosis débil, media y fuerte. Las categorías de antibiosis se determinaron de acuerdo a la amplitud del halo de inhibición que provocaron los hongos ante *Pythium*

19-10. Para dar una idea más clara de la antibiosis débil se ilustra en la Figura 16, la antibiosis media ya observada en la Figura 12 y la fuerte en la Figura 17. De acuerdo a la Figura 18, se tiene que la mayoría de cepas de hongos antibióticos aislados de plantas de cultivo presentaron antibiosis débil (54%), es menor la antibiosis media (34%) y la antibiosis fuerte manifiesta el porcentaje más bajo (12%). Para el caso de los hongos aislados de arvenses, en la Figura 19 se observa que la antibiosis media fue la que mostró mayor porcentaje (50%), le sigue la antibiosis débil (34%) y nuevamente el porcentaje más bajo lo tuvo la antibiosis fuerte (13%).

Entre de los hongos que manifiestan ésta característica, se encontraron hongos del género *Fusarium*, éstos provocaron ante *Pythium* 19-10 antibiosis débil. Sólo uno de los hongos del género *Fusarium* se logró identificar hasta especie y fue *Fusarium oxysporum*, conocido como un hongo que se encuentra ampliamente distribuido, es muy común en el suelo y perjudica a gran cantidad de plantas agrícolas (Romero, 1988). Sin embargo, el *F. oxysporum* aquí aislado se considera no patogénico, por haberse obtenido de raíces sanas de diferentes plantas. Gerik y Huisman (1985) reportan variedades no patogénicas de *F. oxysporum*, las cuales, en su mayoría, fueron aisladas con relativa abundancia de la superficie radical de plantas de algodón y unas pocas del



Figura 16. Antibiosis débil, donde el crecimiento de *Pythium* 19-10 es inhibido por *Fusarium* sp., formando un estrecho halo de antibiosis entre ambas colonias.

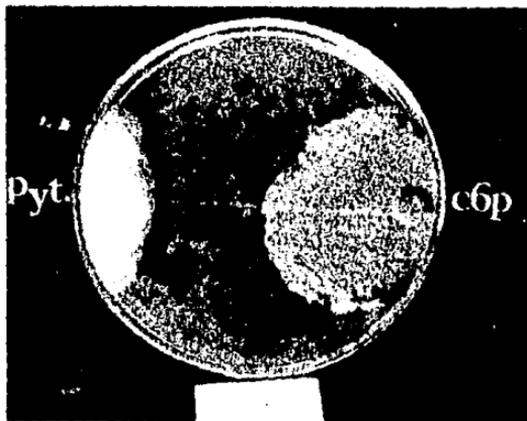


Figura 17. Antibiosis fuerte, en este caso la colonia C6p inhibe notablemente el crecimiento de *Pythium* 19-10 y se forma un amplio halo de antibiosis entre ambas colonias.

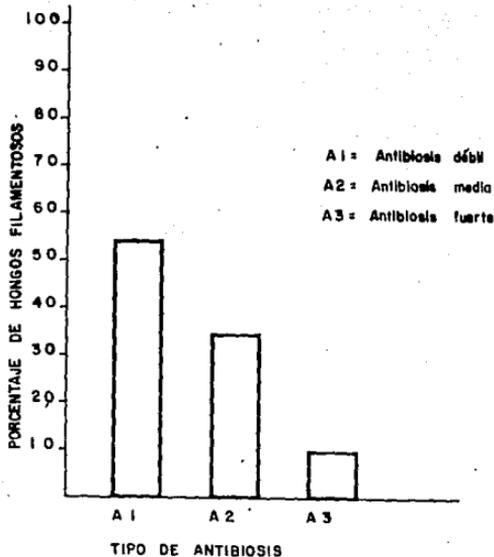


Figura 18.- Porcentaje de hongos aislados de cultivos, que presentaron diferentes tipos de antibiosis frente a PYTHIUM 19-10

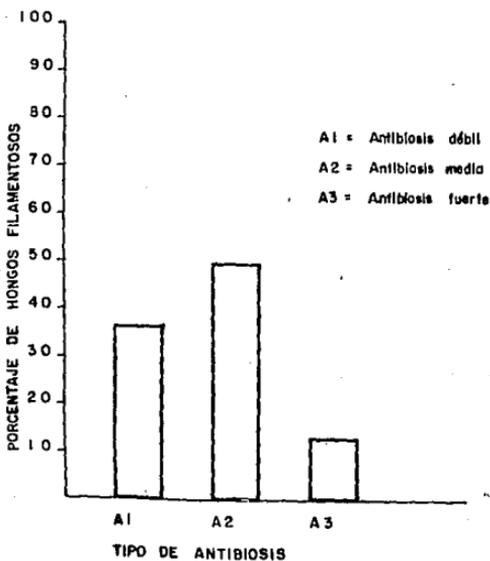


Figura 19.- Porcentaje de hongos aislados de cereales, que presentaron diferentes tipos de antibiosis frente a PYTHIUM 19-10

interior del córtex. Estas variedades no patógenas son particularmente interesantes por causar efectos antagónicos, como la antibiosis y el micoparasitismo frente a patógenos (Chaturvedi y Dwivedi, 1985). Por esto, dichas variedades de *F. oxysporum* pueden emplearse con éxito en el control biológico de enfermedades.

Los hongos que provocaron antibiosis media tuvieron, en general, un micelio hialino tabicado fuliginoso y fueron de crecimiento lento, alcanzando un diámetro de 9 cm entre los 20 y 30 días. Ninguno de estos hongos fue identificado debido a que no esporularon en los medios probados. Como ya ha sido mencionado, un alto porcentaje de hongos aislados de arvenses manifestaron antibiosis media ante *Pythium* 19-10.

La mayoría de los hongos que provocaron antibiosis fuerte frente al patógeno, resultaron con micelio hialino tabicado fuliginoso y, tanto en plantas de cultivo como en arvenses, presentaron los porcentajes más bajos en comparación con los otros tipos de antibiosis. De estos hongos que provocaron antibiosis fuerte, se identificó a *Helminthosporium turcicum*, que fue aislado del pasto *Stipa clandestina* Hack. De acuerdo a Sprague (1950), este hongo también ha sido aislado de sorgo y de maíz, cultivos en los que provoca lesiones de escaldadura en sus hojas. Aparentemente, *H. turcicum* no daña a *S. clandestina* y no se

tienen registros de que afecte a este pasto, pero es destructor potencial de otros pastos, como el pasto Sudán y el Jhonson (Sprague, 1950). Aún cuando este hongo inhiba in vitro en gran medida el crecimiento de *Pythium* 19-10, para que pueda ser empleado en el control biológico, es necesario realizar estudios más detallados que ayuden a determinar si este hongo afecta a cultivos como maíz y sorgo, o se trata una forma especial de *H. turcicum*, ya que en la literatura se reporta como patógeno de algunas gramíneas y dentro de las de importancia se encuentran maíz y sorgo.

Por la gran cantidad de hongos aislados que provocaron antibiosis al patógeno *Pythium* 19-10, se cree que en la endorrizósfera la principal causa de que algunos patógenos no se establezcan en la raíz de una planta, son los hongos autóctonos que provocan algún efecto antagónico a los patógenos. Por tanto, se tendría que favorecer el desarrollo de los hongos nativos para evitar enfermedades en las plantas. De hecho, el control biológico que se desarrolla en el suelo consiste en desviar el equilibrio a favor de la flora saprofítica y en contra del patógeno (Schippers y Gams, 1979). Además, para el control biológico de hongos patógenos deberían ser tomados en cuenta, principalmente, los hongos y no otros microorganismos que se desarrollan en la endorrizósfera, debido a que algunos géneros muy virulentos, como *Pythium* y *Fusarium*, son más sensibles a los

antibióticos producidos por los hongos, que a aquéllos que producen las bacterias (Campbell, 1989). No obstante, no hay que descartar del todo a algunos otros microorganismos que puedan ser útiles para tal fin.

Sería fundamental conocer si *in vitro* los antibióticos producidos por los hongos endorrizoféricos son lo suficientemente efectivos como para inhibir el desarrollo de hongos fitopatógenos. Si se obtiene una respuesta positiva, el control biológico utilizando hongos aislados, resultaría más efectivo que tratar de conocer y aislar los antibióticos que producen y aplicarlos a las plantas enfermas, ya que en un suelo normal, al aplicar antibióticos, éstos desaparecen rápidamente por ser fácilmente metabolizables o absorbidos (Mangenot y Diem, 1979). También sería conveniente determinar si la producción de antibióticos que inhiben el crecimiento de *Pythium* 19-10 es mayor o menor en diferentes medios. Wipps (1987) estudió a algunos hongos patógenos creciendo junto a hongos antagonistas en tres diferentes medios de cultivo, y encontró que los antagonistas inhiben el desarrollo de los patógenos en menor o mayor grado, dependiendo del medio de cultivo. Por tanto, concluyó que el medio usado, además de tener efecto en cuanto al rango de desarrollo del hongo y a su morfología, también influye en la producción de antibióticos volátiles y no volátiles y en la respuesta de los patógenos ante la antibiosis.

6.5.3. MICOPARASITISMO.

El porcentaje de hongos que presentó micoparasitismo macroscópico con *Pythium* 19-10 fue bajo en plantas de cultivo y en arvenses (Figuras 14 y 15). En total fueron 45 hongos micoparásitos, 15 de plantas de cultivo y 30 de arvenses. El micoparasitismo se observó en forma macroscópica cuando el micoparásito creció sobre *Pythium* 19-10. Algunos micoparásitos incluso esporularon sobre este último.

En el Cuadro 5 se observa que en la endorrizósfera de cebolla, alfalfa y maíz existían hongos antibióticos, micoparásitos y neutrales ante *Pythium* 19-10. Con excepción de la avena, todos los demás cultivos tuvieron hongos que provocaron antibiosis débil, y, aparte de los hongos aislados de frijol, el resto de los hongos aislados de plantas de cultivo presentaron neutralismo. Los demás cultivos mostraron hongos que, por lo menos, causaron una característica antagónica. Y únicamente de tres cultivos se aislaron hongos con la capacidad de producir antibiosis fuerte.

En el Cuadro 6 se observa que en las arvenses, sólo del pasto 3 (*B. carinatus*) se aislaron hongos que presentaron antibiosis fuerte, media y débil, micoparasitismo y neutralismo. Muy pocas arvenses hospedan

Cuadro 5. Efectos que provocan ante *Pythium* 19-10 los hongos aislados de cada uno de los cultivos

	Antib. Fuerte	Antib. Media	Antib. Débil	Neutralismo	Micoparasit.
Cebolla	+	+	+	+	+
Avena	-	+	-	+	-
Trigo	-	-	+	+	-
Girasol	-	-	+	+	-
Alfalfa	+	+	+	+	+
Maíz	+	+	+	+	+
Maíz enano	-	+	+	+	+
Frijol	-	-	+	-	+

+ Presencia.

- Ausencia.

Cuadro 8. Efectos que provocan ante *Pythium* 19-10 los hongos aislados de cada especie de arvenses.

	Antib. Fuerte	Antib. Medio	Antib. Débil	Neutralismo	Micoparasit.
Nabo	-	+	+	-	-
Pasto 1	+	+	-	+	+
Guelite cenizo	-	+	+	+	-
Meliloti	-	-	+	+	-
Carretilla	+	-	+	-	-
Malva	-	-	+	+	-
Nabo morado	-	+	+	+	-
Romero	-	+	+	+	+
Pasto 2	+	+	-	+	+
Lechugi- lla	-	+	+	-	-
Lengua de vaca	+	-	-	-	+
Lenteja	-	+	-	-	-
Duraznillo	-	+	+	+	-
Carricillo	-	+	-	-	-
Pasto 3	+	+	+	+	+
Té de campo	-	+	+	+	+

+ Presencia.
- Ausencia.

hongos que producen antibiosis fuerte y micoparasitismo. En su mayoría, las arvenses hospedan hongos con la característica de producir antibiosis media al patógeno.

6.6. MICROSCOPIA DEL MICOPARASITISMO.

De cada uno de los hongos que provocaron micoparasitismo en forma macroscópica, se realizaron microcultivos duales para determinar al microscopio, con un aumento de 20X y de 40X, el grado de micoparasitismo sobre *Pythium* 19-10. El grado de micoparasitismo varió de 0 a 4, utilizando la escala de Buller (1957) (0=inmune, 1=resistente, 2=ligeraamente susceptible, 3=susceptible y 4=muy susceptible). En los Cuadros 7 y 8 se presentan los hongos aislados de plantas de cultivos y de arvenses, que micoparasitaron a *Pythium* 19-10, y el grado de micoparasitismo que le provocaron.

En los Cuadros 7 y 8 se observa que del total de 45 hongos micoparásitos, macroscópicamente 17 son de las especies *Agyriella nitida*, 13 de éstos fueron aislados de *B. carinatus*, y en forma microscópica presentaron un micoparasitismo de grado 1. De los hongos micoparásitos, 12 tuvieron micoparasitismo de grado 3. 9 de éstos pertenecen al género *Trichoderma*, de los cuales 5 fueron aislados de plantas de cultivo y 4 de arvenses. Sólo 7 especies, entre

Cuadro 7. Hongos aislados de la endorrizósfera de plantas de cultivo que micoparasitan a *Pythium* 19-10.

CLAVE DEL HONGO	NOMBRE CIENTIFICO	PLANTA DE LA QUE SE AISLO	GRADO DE PARASITISMO
C1h	<i>Agyriella nitida</i>	<i>Allium cepa</i>	Lig. Resistente
C4a	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Helianthus annuus</i>	Inmune
C4b	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Helianthus annuus</i>	Inmune
C4f	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Helianthus annuus</i>	Inmune
C4g	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Helianthus annuus</i>	Inmune
C4j	No identificado	<i>Helianthus annuus</i>	Inmune
C4q	<i>Trichoderma lignorum</i>	<i>Helianthus annuus</i>	Susceptible
C4d	No identificado	<i>Helianthus annuus</i>	Inmune
C5h	<i>Pullularia</i> sp.	<i>Medicago sativa</i>	Muy susceptible
C5n	No identificado	<i>Medicago sativa</i>	Susceptible
C6s	No identificado	<i>Zea Mays</i>	Muy susceptible
C7c	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Zea mays</i> var. Pancho Villa	Susceptible
C7k	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Zea mays</i> var. Pancho Villa	Susceptible
C7p	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Zea mays</i> var. Pancho Villa	Susceptible
C8d	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Zea mays</i> var. Pancho Villa	Susceptible

Cuadro B. Hongos aislados de la endorrizadura de arvenses que micoparasitan a *Pythium* 19-10.

CLAVE DEL HONGO	NOMBRE CIENTIFICO	PLANTA DE LA QUE SE AISLO	GRADO DE PARASITISMO
A2m	No identificado	<i>Hordeum jovatum</i>	Muy susceptible.
ABf	No identificado	<i>Suaeda torreyana</i>	Susceptible
A9b	<i>Agryiella nitida</i>	<i>Silpa clandestina</i>	Resistente
A9d	No identificado	<i>Silpa clandestina</i>	Resistente
A9e	No identificado	<i>Silpa clandestina</i>	Susceptible
A9f	No identificado	<i>Silpa clandestina</i>	Resistente
A9i	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Silpa clandestina</i>	Susceptible
A9k	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Silpa clandestina</i>	Susceptible
A11a	No identificado	<i>Plantago major</i>	Susceptible
A11b	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Plantago major</i>	Susceptible
A15b	<i>Agryiella nitida</i>	<i>Bromus carinatus</i>	Resistente
A15d	<i>Agryiella nitida</i>	<i>Bromus carinatus</i>	Resistente
A15g	<i>Agryiella nitida</i>	<i>Bromus carinatus</i>	Resistente
A15h	<i>Agryiella nitida</i>	<i>Bromus carinatus</i>	Resistente

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Cuadro 8. CONTINUACION.

CLAVE DEL HONGO	NOMBRE CIENTIFICO	PLANTA DE LA QUE SE AISLO	GRADO DE PARASITISMO
A15l	<i>Agyriella nitida</i>	<i>Bromus carinatus</i>	Resistente
A15o	<i>Agyriella nitida</i>	<i>Bromus carinatus</i>	Resistente
A15r	<i>Agyriella nitida</i>	<i>Bromus carinatus</i>	Resistente
A15s	<i>Agyriella nitida</i>	<i>Bromus carinatus</i>	Resistente
A15u	<i>Agyriella nitida</i>	<i>Bromus carinatus</i>	Resistente
A15v	<i>Pullularia</i> sp.	<i>Bromus carinatus</i>	Muy susceptible
A15w	<i>Agyriella nitida</i>	<i>Bromus carinatus</i>	Resistente
A15x	No identificado	<i>Bromus carinatus</i>	Muy susceptible
A15φ	<i>Agyriella nitida</i>	<i>Bromus carinatus</i>	Resistente
A15α	<i>Agyriella nitida</i>	<i>Bromus carinatus</i>	Resistente
A15β	<i>Agyriella nitida</i>	<i>Bromus carinatus</i>	Resistente
A15μ	No identificado	<i>Bromus carinatus</i>	Muy susceptible
A16a	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Bidens aurea</i>	Susceptible
A16h	<i>Agyriella nitida</i>	<i>Bidens aurea</i>	Resistente
A16j	No identificado	<i>Bidens aurea</i>	Inmune
A16k	<i>Agyriella nitida</i>	<i>Bidens aurea</i>	Inmune

las cuales se encuentra *Pullularia* sp., provocaron micoparasitismo de grado 4. Otras 7 especies, entre las que están incluidas diferentes *Rhizoctonias*, no provocaron daño alguno al patógeno (esto es, micoparasitismo de grado 0).

6.7. MODO DE MICOPARASITISMO.

Gracias a los microcultivos duales, se pudo visualizar la interacción de los hongos a un nivel microscópico, observándose que el patógeno *Pythium* 19-10 fue micoparasitado de diferentes formas por los hongos filamentosos aislados (Cuadro 7 y 8). *Pythium* 19-10 presentó mayor o menor susceptibilidad, dependiendo del tipo de hongo que lo micoparasitaba y de la virulencia de éste.

A) El micoparásito *A. nitida* (Figura 20a) creció adosado a las hifas del hospedero (*Pythium* 19-10) (Figura 20b) y formó, ocasionalmente, estructuras de penetración como apresorios y pequeñas prolongaciones de hifas que son consideradas haustorios (Figura 20c). El citoplasma de las hifas atacadas se granuló y finalmente se degradó, debido, posiblemente, a que el micoparásito se alimentó del contenido citoplasmático del hospedero.

B) Los hongos C4u, C4b, C4f y C4g, pertenecientes al género *Rhizoctonia*, no micoparasitaron a *Pythium* 19-10. No se observó adosamiento, enrollamiento o penetración en las

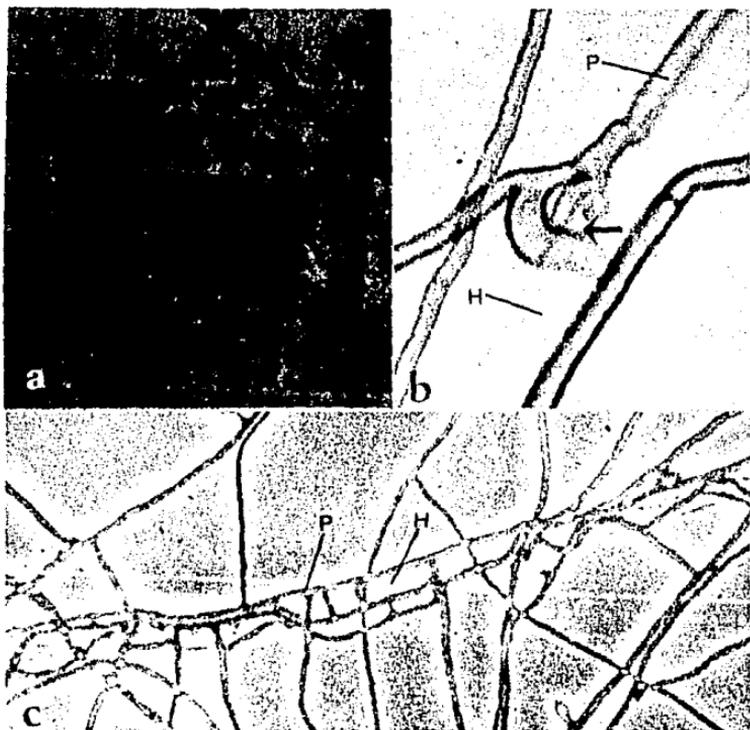


Figura 20. Micoparasitismo microscópico de *Agyriella nitida*. a) Morfología microscópica de *A. nitida*. b) Haustorio (flecha) de *A. nitida* penetrando las hifas de *Pythium 19-10*. c) Hifa de *Pythium 19-10* fuertemente atacada por hifas de *A. nitida*. P = parásito, H = hospedero.

hifas del patógeno, pero sí se apreció la destrucción de algunas hifas del hospedero, probablemente por la producción de antibióticos.

C) El hongo C4j, que no fue identificado, no parasitó a *Pythium* 19-10. Más bien, se observó que *Pythium* 19-10 actuó como micoparásito de C4j, formando apresorios, penetrando y adosándose a sus hifas, aunque esto ocurrió con poca frecuencia.

D) El hongo C4q, identificado como *Trichoderma lignorum*, enrolla y penetra las hifas de *Pythium* 19-10 y crece dentro de éste, provocando en sus hifas una coloración más oscura. Las hifas del hospedero se granulan y el micoparásito se alimenta del contenido citoplasmático hasta quedar sólo el fantasma de las hifas del hospedero.

E) El hongo C5h, identificado como *Pullularia* sp., forma apresorios y estructuras parecidas a haustorios muy simples, en ocasiones las hifas del micoparásito llegan a las hifas de *Pythium* 19-10 y las penetran y crecen dentro del hospedero, el cual empieza a septarse como una defensa ante el micoparásito (Figura 21a). Se observó que cada vez que C5h se encontraba con el hospedero, lo micoparasitaba en forma masiva.

F) El hongo C5n, no identificado, se enrolló a las hifas de *Pythium* 19-10 y formó apresorios (Figura 21b). Se observó que algunas veces penetró y degradó a las hifas del

hospedero, y en otras ocasiones creció a la orilla de éste, pero nunca se observó que existiera crecimiento interno en las hifas de este último.

G) C6s, hongo no identificado, parasita intensamente a las hifas de *Pythium* 19-10, formando estructuras de penetración, pero muy pequeñas, que no pueden considerarse como haustorios. Fue muy común encontrar a las hifas del micoparásito creciendo a un lado de las hifas del hospedero.

H) C7c, C7K y C7p son hongos del género *Trichoderma*. En este caso, se considera que los tres aislamientos corresponden al mismo hongo, puesto que presentaron estructuras muy semejantes y la forma de parasitar a *Pythium* 19-10 es similar. *Trichoderma*, formó prolongaciones cortas que abrazaron al hospedero y lo enrollaron, en ocasiones se observó multienrollamiento. También el micoparásito formó apresorios que penetraron al hospedero (Figura 21c), y degradó las hifas de éste.

I) Algunas de las hifas de C8d (*Trichoderma* sp.) crecieron adosadas a las hifas del hospedero, presentaron enrollamiento y multienrollamiento. Las hifas así atacadas, mostraron un citoplasma granular y finalmente se degradaron. También hubo formación ocasional de apresorios y de pequeñas estructuras de penetración (como dedos), que extrajeron el contenido citoplasmático de las hifas del hospedero.

J) El hongo A2m, no identificado, formó estructuras

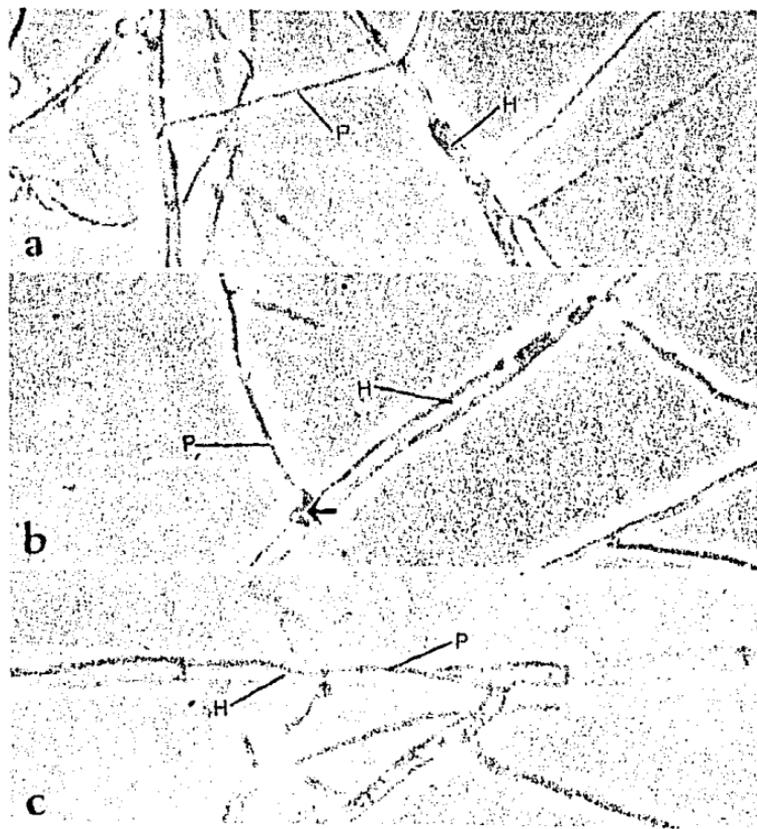


Figura 21. Micoparasitismo microscópico. a) Donde *Pullularia* sp. penetra a las hifas de *Pythium* 19-10 y vive dentro de éste. b) Las hifas de C5n forman apresorios (flecha) que llegan y abrazan a las hifas de *Pythium* 19-10. c) El hongo C7k, que pertenece al género *Trichoderma*, penetra las hifas de *Pythium* 19-10 y crece en el interior de éstas. P=parásito, H=hospedero.

parecidas a haustorios simples y múltiples apresorios en forma de "Y" o de pinzas, que atraparon a las hifas del hospedero, lo penetraron y extrajeron su contenido citoplasmático. También el micoparásito enrolló masivamente a las hifas del hospedero y ocurrió una degradación posterior de éstas.

K) Las hifas del micoparásito ABf (no identificado) crecieron a un lado de las hifas de *Pythium* 19-10. El micoparásito formó estructura de penetración que fueron pequeñas prolongaciones que se internaron en las hifas del hospedero (Figura 22a) y extrajeron el contenido citoplasmático de éste, provocando una degradación posterior (Figura 22b).

L) El hongo A9d, que no fue identificado, creció adosado a las hifas de *Pythium* 19-10 y formó ramificaciones que abrazaron al hospedero y, ocasionalmente, apresorios. Las hifas del hospedero presentaron granulación.

M) El hongo A9e, el cual no fue identificado, creció adosado a las hifas de *Pythium* 19-10, formó especie de haustorios muy simples que penetraron en las hifas del hospedero y extrajeron su contenido citoplasmático, hasta que las hifas fueron totalmente degradadas. También el micoparásito formó apresorios y una especie de ganchos que abrazaron a las hifas del hospedero y, en algunos sitios, ocurrió multienrollamiento de este último.

N) Las hifas del hongo A9f, no identificado, crecieron a un lado de las hifas de *Pythium* 19-10 y las rodeó con prolongaciones pequeñas. También ocurrió la formación de apresorios que penetraron a las hifas del hospedero y le provocaron granulación.

O) Se observó que el hongo A9i (*Trichoderma* sp.) se enrollaba en las hifas de *Pythium* 19-10, penetró sus hifas y creció en el interior de éstas provocándoles una coloración oscura. En algunas regiones, el micoparásito creció a las orillas del hospedero y con pequeñas prolongaciones penetró a sus hifas, alimentándose del contenido citoplasmático.

P) El hongo A9K (*Trichoderma* sp.) micoparasitó a *Pythium* 19-10, formando prolongaciones cortas que abrazaron al hospedero y lo enrollaron, en algunas partes sucedió un multienrollamiento. También hubo formación de apresorios que penetraron al hospedero.

Q) La mayoría de las hifas del hongo A11a. (no identificado) crecieron adosadas a *Pythium* 19-10, pero algunas hifas del hospedero fueron atacadas por el micoparásito, formando pinzas que lo abrazaron y penetraron (Figura 22c).

R) El hongo A11b (*Trichoderma* sp.) formó estructuras de penetración parecidas a haustorios simples y apresorios múltiples sobre las hifas de *Pythium* 19-10. Se observó que el micoparásito creció internamente y en la periferia de las



Figura 22. Micoparasitismo microscópico. a) ABf forma prolongaciones parecidas a haustorios simples que abrazan y penetran a *Pythium* 19-10. b) Las hifas de ABf se adosan a las hifas de *Pythium* 19-10, las penetran y provocan su degradación. c) Las hifas de *Alia* forman pinzas (flechas) que atrapan a las hifas de *Pythium* 19-10 y las penetran. P = parásito, H = hospedero.

hifas del hospedero, posteriormente se enrolló en este último y algunas veces se formó superenrollamiento.

S) El hongo A15v fue identificado como *Pullularia* sp. (Figura 23a). Las hifas de este hongo se adosaron y enrollaron a las hifas de *Pythium* 19-10 (Figura 23b), provocándole una gran septación y granulación. Esto también ocurrió como respuesta a la formación de apresorios y de haustorios y a la invasión interna del hospedero (Figuras 23c y 23d).

T) El hongo A15x (no identificado) creció adosado a las hifas de *Pythium* 19-10, formando, algunas veces, estructuras de penetración parecidas a haustorios muy simples (Figura 24a). Muy frecuentemente, formó apresorios múltiples, que penetraron a las hifas del hospedero, creció el micoparásito dentro de ellas y se alimentó del citoplasma, usándolo casi en su totalidad.

U) El hongo A15μ (no identificado) formó estructuras cortas de penetración y provocó un enrollamiento masivo (Figura 24b), que causó la granulación y degradación total de las hifas del hospedero. Las hifas del micoparásito crecieron muy juntas a las hifas del hospedero (*Pythium* 19-10).

V) El hongo A16a (*Trichoderma* sp.) micoparasitó a *Pythium* 19-10, formando prolongaciones cortas que penetraron y crecieron dentro de las hifas del hospedero, provocándole

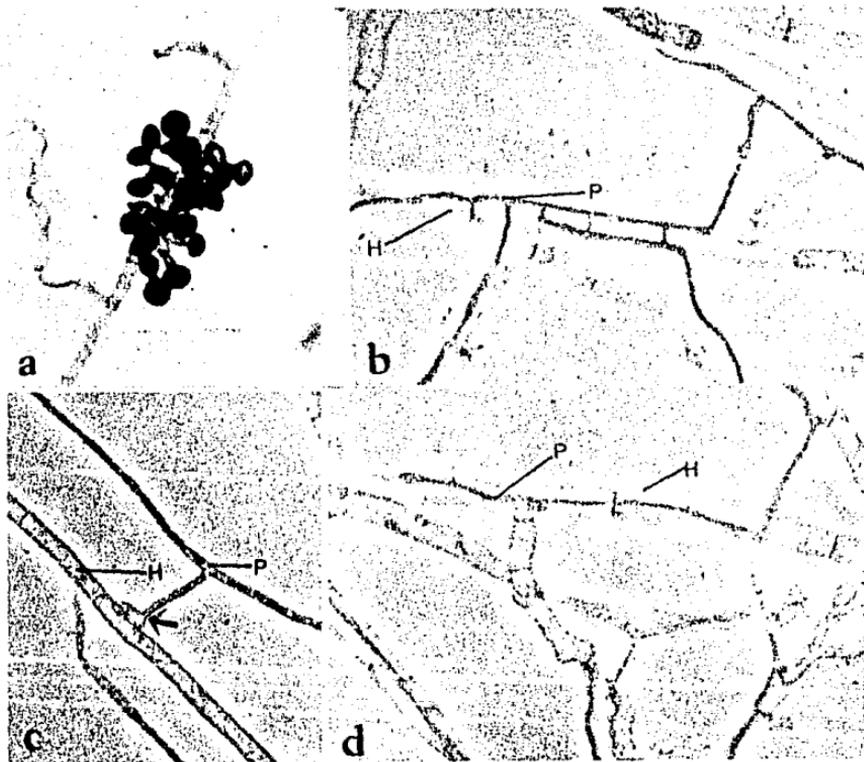


Figura 23. Micoparasitismo de *Pullularia* sp. a) Morfología microscópica de *Pullularia* sp. b) Adosamiento de las hifas de *Pullularia* sp. a las hifas de *Pythium* 19-10. c) Formación de un haustorio (flecha) por parte de *Pullularia* sp. sobre una hifa de *Pythium* 19-10. d) Crecimiento interno de *Pullularia* sp. en las hifas de *Pythium* 19-10. P = parásito, H = hospedero.

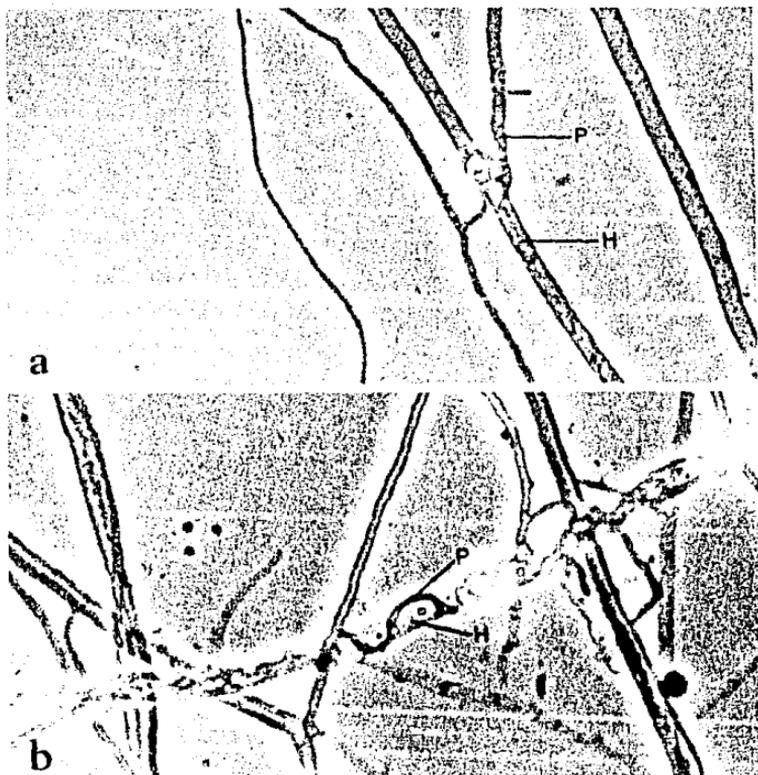


Figura 24. Micoparasitismo microscópico. a) Formación de un haustorio por A15x sobre una hifa de *Pythium* 19-10. b) Multienrollamiento de A15x sobre las hifas de *Pythium* 19-10. P = parásito, H = hospedero.

granulación y una coloración más oscura. También hubo la formación de apresorios que penetraron al hospedero.

W) Los hongos A16j y A16k (no identificados) no micoparasitaron a *Pythium* 19-10, pero se observó un ligero daño en las hifas de este último, probablemente por la producción de algunos antibióticos.

En la mayoría de los casos, como mecanismo de defensa el hospedero *Pythium* 19-10 formó septas abundantemente para evitar ser penetrado por los micoparásitos. Casi todos los micoparásitos formaron estructuras de penetración parecidas a haustorios, y sólo A15v presentó haustorios ramificados, que algunos autores señalan como haustorios verdaderos, los cuales se presentan por lo general en micoparásitos biotróficos (Boosalis, 1964).

Se registraron 7 hongos con micoparasitismo de grado 4, en estos casos se considero de tal grado porque las hifas del hospedero fueron parasitadas masivamente, pero no presentaron la capacidad de destruir las estructuras reproductivas de *Pythium* 19-10, porque dichas estructuras no se observaron en el medio empleado (PDA). Ferrera-Cerrato (1981) reportó a un basidiomiceto no identificado, que atacaba estructuras reproductivas de algunos de sus hospederos, como *Mucor rouxi*, del que parasita sus hifas, sus esporangióforos y sus esporangiosporas. Por lo que dicho autor concluyó que este basidiomiceto se podría emplear

exitosamente para fines de control biológico. El efecto que los micoparásitos pueden tener sobre las estructuras reproductivas de patógenos es un aspecto que debería ser estudiado más a fondo en los hongos aislados de cultivos y de arvenses, ya que nos daría mayor claridad sobre la efectividad de estos micoparásitos en el control biológico de patógenos.

Un aspecto que nos revelaría más sobre la relación hospedero-parásito de los hongos, es el estudio de la influencia de los diferentes nutrientes del medio de cultivo. Ferrera-Cerrato (1977) encontró que concentraciones altas de glucosa y bajas de extracto de levadura en el medio, estimulaban el micoparasitismo provocado por el basidiomiceto BHF. Whipps (1987) reporta que en diferentes medios el modo de micoparasitismo varía en los antagonistas *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *Gliocladium roseum*, *Coniothyrium minutans*, *Pythium oligandrum* sobre los fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Pyrenochaeta lycopersici*, *Phonopsis sclerotioides*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Botrytis cinerea*.

Como se había mencionado con anterioridad, *A. nitida* fue uno de los hongos que se encontraron presentes con mayor abundancia en la endorrizósfera de las plantas en estudio. Sin embargo, no se tiene algún antecedente de que este hongo sea micoparásito, pero se observó que atacaba a *Pythium*

19-10. Hecho interesante por poder utilizarse en el control biológico. El tipo de micoparasitismo que provocó fue de grado 1, aunque existió la formación de apresorios y estructuras de penetración muy simples. *A. nílida* fue aislado de 4 diferentes especies de plantas, por lo que, al parecer es un hongo que habita fácilmente la endorrizósfera de algunas plantas y, además, las protege de otros hongos que puedan provocar enfermedad en la raíz.

El hongo *Pullularia* sp., reportado como saprófito, y en ocasiones como parásito débil, es muy común en el suelo (Barnett y Hunter, 1972), pero no se tienen antecedentes de que actúe como micoparásito. Este hongo fue aislado del interior de la raíz de *Bromus carinatus* y de *Medicago sativa*. No se observó que *Pullularia* sp. dañara a las estructuras reproductivas de *Pythium* 19-10, debido a que éstas no se desarrollaron en PDA. Dichas estructuras se logran desarrollar mejor en medio de jugo de tomate-Agar, medio de cultivo en el que se recomendaría realizar las pruebas de micoparasitismo para observar si *Pullularia* sp. atacan a las estructuras reproductivas de *Pythium* 19-10. Aun así, este hongo puede recomendarse como un buen candidato para ser utilizado en el control biológico de patógenos de plantas, además de tener la característica de producir gran cantidad de esporas, siendo fácil la propagación del inóculo.

Las especies del género *Trichoderma* que fueron aisladas formaron estructuras de penetración, apresorios, crecieron internamente y destruyeron las hifas del hospedero.

Quizá los mejores micoparásitos que se conocen son los hongos del género *Trichoderma*, los cuales se han sugerido como agentes de biocontrol de muchos patógenos del suelo, además es uno de los pocos productos presentes comercialmente con el fin de combatir enfermedades en las plantas (Chet y Henis, 1985). Dentro de los hongos del género *Trichoderma*, el que ha sido más ampliamente estudiado es *Trichoderma viride*, el cual presenta la doble capacidad de ser micoparásito y de producir antibióticos. Ferrera-Cerrato (1976) encontró que *T. viride* parasitaba a 14 diferentes hongos, de los géneros *Alternaria*, *Cunninghamella*, *Rhizopus*, *Rhizoctonia*, *Mucor*, *Macrophomina* y *Syncephalastium*. Se ha encontrado que otras especies, como *T. harzianum*, controlan enfermedades de las plantas provocadas por hongos fitopatógenos. Lifshitz et al. (1986) reportaron que *T. harzianum* reduce la incidencia de «damping-off» en chícharo provocado por *Pythium* sp.; las posibles causas que producen la reducción de dicha enfermedad fueron la competencia por nutrientes, la producción de antibióticos y el micoparasitismo. Estos autores descartaron en su trabajo la primera posibilidad, la antibiosis resultó efectiva y el micoparasitismo se mostró poco operativo. No obstante, otros

autores sugieren que el micoparasitismo es el principal mecanismo, mediante el cual otras especies de *Trichoderma*, como *T. hamatum*, controlan el «damping-off» causado por *Pythium* sp. (Harman et al., 1980).

Para determinar cuál es la manera más adecuada de utilizar las cepas de *Trichoderma* aisladas en el control de enfermedades provocadas por hongos, es necesario realizar estudios más profundos, tomando en cuenta no sólo el efecto de micoparasitismo, sino también de antibiosis, debido a que diversas especies de *Trichoderma*, frecuentemente provocan antibiosis frente a algunos hongos patógenos.

En este estudio, se encontró que el hongo C4j fue ligeramente parasitado por *Pythium* 19-10. Las hifas de este último formaron apresorios que se adosaron a las hifas de C4j, aunque nunca se observó degradación de las mismas, y el micoparásito fue poco frecuente. Los resultados obtenidos son importantes debido a que muestran que *Pythium* 19-10, además de ser un patógeno agresivo de la raíz de maíz, también puede actuar como un micoparásito débil de, precisamente, aquellos hongos que habitan la raíz. También diversas especies de *Pythium* pueden actuar como micoparásitos de otros hongos. Ha sido reportado que *Pythium oligandrum* Prechs. es un micoparásito agresivo, sobre todo de otras especies de *Pythium* sp. Usualmente, *P. oligandrum* es un patógeno débil de muchas plantas. Se ha aislado de

plantas lesionadas y, en ocasiones, con otras especies de *Pythium* sp. que actúan como patógenos agresivos de la raíz de algunas plantas (Deacon y Henry, 1978; Foley y Deacon, 1986).

Granados (1989) encontró que algunas especies de *Trichoderma*, de *Rhizoctonia* y de *Fusarium* colonizaban a la raíz de maíz sin causarle ningún daño a la planta, además de comportarse como los hongos micorrízicos debido a que estimulaban el crecimiento de la planta. También otros trabajos destacan que algunas especies de *Fusarium* y *Rhizoctonia* aisladas de la raíz favorecen el desarrollo de algunas plantas (Sneh *et al.*, 1985; Khrusheva, 1967). Por lo que existe la posibilidad de que algunos de los hongos aislados, además de no causarle daño a la planta de la que se aislaron, también la beneficien al estimular el desarrollo de ésta. Este aspecto tendría que ser ampliamente estudiado, porque de actuar así estos hongos, existe la posibilidad de propagar inóculos en cultivos convencionales, propiedad que no comparten los hongos endomicorrízicos V-A. Además, podría darnos algunas respuestas sobre el aspecto evolutivo de las micorrizas. Malloch (1987) propone que muchos hongos que inicialmente eran parásitos de plantas, debido a las condiciones ambientales llegaron a un balance mutualista con su hospedero. Así, probablemente algunos hongos que han sido considerados como saprófitos

lleguen a actuar como micorrizicos. O como lo considera Heath (1987) que la planta fue la que evolucionó hasta la resistencia a los hongos que la invadían. Tal vez, la evolución fue tanto de la planta como del hongo, al grado que al final ambos resultaron beneficiados al establecerse entre ellos una relación mutualista.

VII. CONCLUSIONES

— La composición cualitativa y cuantitativa de los hongos filamentosos en la endorrizósfera de plantas sanas, varía de acuerdo a la especie de planta. No obstante, en estudios posteriores debería de tomarse en cuenta otros factores, como las condiciones físicas y químicas del suelo, estación del año, edad de la planta, etc.

— En forma general, las arvenses fueron menos colonizadas por hongos filamentosos que las plantas de cultivo. En las arvenses sólo dos plantas, de un total de 16, tuvieron porcentajes mayores a 50, y en los cultivos 4 plantas de un total de 8.

— Todas las plantas de cultivo muestreadas presentaron colonización endomicorrizica V-A. Algunas de las arvenses no fueron colonizadas o tuvieron colonizaciones muy bajas debido a que pertenecían a familias como la *Quenopodaceae* y la *Cruciferae*, que suelen no ser colonizadas

por este tipo de hongos.

— No hubo correlación significativa entre la colonización de hongos filamentosos de la endorrizósfera y la colonización de hongos endomicorrízicos V-A en los dos tipos de plantas aquí estudiados.

— Tanto en plantas de cultivo como en arvenses se aisló un mayor número de hongos con propiedades antibióticas ante *Pythium* 19-10 (70 y 48%); en menor grado aparecen hongos neutrales frente al patógeno (20 y 29%) y fueron pocos los que provocaron micoparasitismo al mismo hongo (10 y 13%). De acuerdo con esto, es alta la probabilidad del control biológico de patógenos radicales por parte de los hongos antibióticos.

— El hongo fitopatógeno *Pythium* 19-10, además de dañar a la raíz del maíz, puede actuar como micoparásito débil de otros hongos que habitan la raíz, debido a que se encontró que micoparasitaba, con grado 1 (resistente), a C4j, un hongo no identificado aislado del girasol.

— Se aislaron especies como *Pullularia* sp. y *Agyrella nítida* que micoparasitaron a *Pythium* 19-10, y que anteriormente no habían sido registrados como micoparásitos de algún hongo.

— De todos los hongos que fueron aislados en el presente trabajo, habría que hacer estudios sobre el efecto benéfico o perjudicial que cada uno de ellos puedan tener

sobre plantas de importancia agrícola, y de este modo conocer si los que resultaron ser antagónicos con *Pythium* 19-10 pueden ser utilizados en el control biológico de patógenos radicales. Y también, determinar si algunos de estos hongos endorrizoféricos, además de no causarle daño a la planta, estimulen el desarrollo de ésta y actúen de alguna manera como los hongos micorrizicos. .

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, M. 1976. *Microbial Ecology*. John Wiley & Sons, New York. pp. 224-364.
- ————. 1980. *Introducción a la Microbiología del Suelo*. AGT Editor, México. pp. 417-462.
- Allen, M. F. 1983. Formation of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae in *Atriplex gardneri* (*Chenopodiaceae*): Seasonal Response in a Culd Desert. *Mycologia* 75: 773-776.
- Atlas, R. M. y Bartha, R. 1981. *Microbial Ecology - Fundamentals and Applications*. Addison-Wesley Reding, Mass. pp. 249-283.
- Azcón, G. C. y Barea, J. M. 1980. Micorrizas. *Investigación y Ciencia* 47: 8-16.
- Baber, A. D. y Lynch, J. M. 1977. Microbial Growth in the Rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 9: 305-308.
- Baker, K. F., Cook, R. C. y Garrett, S. D. 1974. *Biological Control of Plant Pathogens*. Freeman, San Francisco. 433 p.
- Baker, R. 1987. Mycoparasitism: Ecology and Physiology. *Can. J. Plant Pathol.* 9: 370-379.
- Barea, J. M. y Azcón-Aguilar, C. 1982. La Rizosfera: Interacciones Microbio-Planta. *Am. Edaf. y*

- Agrobiol. XLI (7-8): 1517-1532.
- Barnett, H. L. 1963. The Nature of Mycoparasitism by Fungi. Ann. Rev. Microbiology 17: 1-14.
 - Barnett, H.L. y Hunter, B. 1972. Ilustred Genera of Imperfect Fungi. Burges Publishing Co.
 - Barnett, H. L. y Brinder, F. L. 1973. The Fungal Host-Parasite Relationship. Ann. Rev. Phytopathol. 11: 273-291.
 - Barnett, H. L. y Lilly, V. G. 1962. A Destructive Mycoparasite *Gliocadium roseum*. Mycologi. 54: 72-77.
 - Bilai, V. I. 1967. Symbiotic Properties of *Fusarium* Species and other Soil Fungi. En: Mycotrophy in Plants. Izdatel'stvo Akademii Nauk S.S.S.R. Minkva. Monson. Jerulasen. pp. 129-139.
 - Bohm, W. 1979. Methods of Studying Root Systems. Springer-Verlag, New York. 188 p.
 - Boosalis, M. G. 1964. Hyperparasitism. Ann. Rev. Phytopathol. 2: 263-276.
 - Bottner, P. y Billes, G. 1987. La Rhizosphere: Site D'interactions Biologiques. Rev. Ecol. Biol. Sol. 24: 369-388.
 - Brian, P. W. 1957. The Ecological Significance of Antibiotic Production. Microbial Ecology (7^o Symposium of the Society for General Microbiology).

University Press, Cambridge. pp. 168-188.

- Bridwell, R. G. S. 1979. *Fisiologia Vegetal*. AGT Editor, México. pp. 83-86.
- Burgers, N. A. y Raw, F. 1971. *Biología del Suelo*. Omega, Barcelona. pp. 522-551.
- Butler, G. E. 1957. *Rhizoctonia solani* as a Parasite of Fungi. *Mycologia* 49: 354-374.
- Campbell, R. 1987. *Ecología Microbiana*. Limusa. México. pp. 229-253.
- ————. 1989. *Biological Control of Microbial Plant Pathogens*. Cambridge University Press. New York. pp. 1-35.
- Carling, D. E. y Brown, M. F. 1982. *Anatomy and Physiology of Vesicular-Arbuscular and Nonmycorrhizal Roots*. *Phytopathology* 72: 1108-1114.
- Chambers, C. A., Smith, B. E. y Smith, F. A. 1980. *Effects of Ammonium and Nitrate Ions On Mycorrhizal Infection, Modulation and Growth of Trifolium subterraneum*. *New Phytologist* 85: 47-62.
- Chaturvedi, A. P. y Dwivedi, R. S. 1985. *Mycoparasitic Behaviour of Fusarium Oxysporum Schkechten dahl Towards Aspergillus luchuensis*. *Inui. Plant and Soil* 84: 419-422.
- Chet, I. y Henis, Y. 1985. *Trichoderma* as Biocontrol Agent Against Soilborne Root Pathogens. In: *Ecology*

- and Management of Soilborne Plant Pathogens. Ed.: C. A. Parker et al. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society. pp. 110-112.
- Cooke, R. 1978. *The Biology of Symbiotic Fungi*. John Wiley & Sons, New York. pp. 257-270.
- Curl, E. A. 1982. *The Rhizosphere: Relation to Pathogen Behavior and Root Disease*. *Plant Dis.* 66: 624-630.
- Curl, E. A. y Truelove, B. 1986. *The Rhizosphere*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 140-166.
- Davey, C. B. y Rovira, D. A. 1974. *Biology of the Rhizosphere*. In: *The Plant Root and its environment*. Ed.: E. W. Carlson. University Press of Virginia. pp. 152-204.
- Deacon, S. W. y Henry, C. M. 1978. *Mycoparasitism by *Pythium oligandium* and *P. acanthicum**. *Soil Biol. Biochem.* 10: 409-415.
- De la Cruz, R. E. y Hubbell, D. H. 1975. *Biological Control of the Charcoal Root Rot Fungus *Macrophomina phaseolina* On Slash Pine Seedlings by a hyperparasite*. *Soil Biol. Biochem.* 7: 25-30.
- Deverall, B. J. 1974. *Fungal Parasitism*. Comelot Press Ltd., Southampton, London. pp. 1-37.
- Dexhemier, J. 1982. *Utilization of Mycorrhizal Fungi in Agriculture*. *J. Botany.* 61: 1015-1024.

- Dommergues, R. Y. y Krupa, V. S. 1978. Interacciones Between Nonpathogenic Soil Microorganisms and Plant. Elsevier Scientific Publishing Company, New York. pp. 243-268.
- Durell, L. W. 1968. Hyphal Invasion by *Trichoderma viride*. Mycopathol. Mycol. Appl. 35: 138.
- Espinoza, A. V. 1987. Caracterización, Distribución y Uso de las Arvenses en las Diferentes Clases de Tierras Campesinas del Ejido de Atenco, México. Tesis Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.
- Favel, D. R. 1988. Role of Antibiosis in the Biocontrol of Plant Diseases. Ann. Rev. Phytopathol. 8: 371-402.
- Ferrera-Cerrato, R. 1976. Hiperparasitismo de *Trichoderma viride* (Fungi Hyphomycetes) Sobre Hongos Fitopatógenos y Saprofíticos. Rev. Lat. amer. Microbiol. 18: 77-81.
- ————. 1977. Estudio de Hiperparasitismo de Algunos Basidiomicetos *in vitro*. Tesis de Doctor en Ciencias (Microbiología). E.N.C.B. Instituto Politécnico Nacional, México. 135 p.
- ————. 1981. Hiperparasitismo de un Basidiomiceto Sobre *Mucor rouxii*. Rev. Mex. Fitopatología 1: 25-31.

- _____. 1983. La Micorriza Vesículo -
Arbuscular en los Diferentes Agroecosistemas. En:
Simposium Semana de la Hierba. La Sequía y su
Impacto en la Agricultura. U.A.CH.
- Ferrera-Cerrato, R. y Jaen, C. D. 1989. Estudio de la
Endomicorriza Vesículo-Arbuscular en las Plantas
Medicinales del Valle de México. Memoria del XXII
Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo.
Montecillo, México. pp. 151.
- Foley, M. F. y Deacon, J. N. 1986. Susceptibility of
Pythium sp. and Other Fungi to Antagonism by the
Mycoparasite *Pythium oligandrum*. Soil. Biol.
Biochem. 18: 91-95.
- Foster, R. C. 1982. The Ultrastructure and Histochemistry
of the Rhizosphere. New Phytol. 89: 263-273.
- _____. 1985. The Biology of the Rhizosphere. In:
Ecology and Management of Soilborne Plant
Pathogens. Eds: Parker, C. A., Rovira, A. D.,
Moore, K. J. and Wong, P. T. E. The American
Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. pp.
75-79.
- _____. 1988. Microenvironment of Soil
Microorganisms. Biol. Fertil Soil. 6: 189-203.
- Foster, R. C., Rovira, A. D. y Cock, T. W. 1983.
Ultrastructure of the Root-Soil Interface. The

- American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. pp. 1-11.
- García, N. T. 1986. Ecología de las Raíces. Rev. Mex. Fitopatología 5: 128-136.
- Garrett, S. D. 1970. Soil Fungi and Soil Fertility. Pergamon Press. The McMillan Company, New York. pp. 133-159.
- Garskins, H., Albrecht, S. L. y Hubbell, D. H. 1984. The Rhizosphere. Rev. Ecosystems Environment. 12: 99-110.
- Gerdemann, J. M. 1968. Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae and Plant Growth. Ann. Rev. Phytopathology 6: 397-418.
- . 1975. Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae. In: The Development and Function of Roots. Eds: Torres, E. J. y Clarkson, D. T. Academic Press, London. pp. 575-591.
- Berik, J. S. y Huisman, O. C. 1985. Mode of Colonization of Roots by *Verticillium* and *Fusarium*. In: Ecology and Management of Soilborne Plant Pathogens. Eds.: C. A. Parker et al. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. pp. 80-83.
- Gilman, J. C. 1971 A Manual of Soil Fungi. The Iowa State University Press, Ames, Iowa.

- Gottlieb, D. y Shaw, P. D. 1970. Mechanism of Action of Antifungal Antibiotics. *Ann. Rev. Phytopathol.* 8: 371-402.
- Granados, A. N. 1989. La Rotación con Leguminosas como Alternativa para Reducir el Daño Causado por Fitopatógenos del Suelo y Elevar la Productividad del Agroecosistema Maíz en el Trópico Húmedo. Tesis Maestría en Ciencias Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.
- Griffin, D. M. 1972. *Ecology of Soil Fungi*. Chapman and Hall, London. pp. 44-53.
- Griffith, N. T. y Barnett, H. S. 1967. Micoparasitism by Basidiomycetes in Culture. *Mycologia* 59:149-154.
- Gupta, R. C., Upadhyay, R. S. y Bharat Rai. 1979. Hyphal Parasitism and Chlamidospore Formation by *Fusarium oxysporum* On *Rhizoctonia solani*. *Mycopathology* 67: 147-151.
- Hale, M. G. y Moore, L. D. 1979. Factors Affecting Root Exudation II: 1970-1978. *Adv. Agronomy*. 31: 93-120.
- Harman, G. I., Chet, I. y Baker, R. 1980. *Trichoderma hamatum* On Seeding Disease Induced in Radish and pea by *Pythium* spp. or *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 76: 720-725.
- Hattori, T. 1973. *Microbial Life in the Soil*. Marcel Bakker. Inc., New York. pp. 170-180.

- Hayman, D. S. 1980. Mycorrhizae and Production of Crops. *Nature* 287: 487-488.
- Heath, M. C. 1987. Evolution of Plant Resistance and Susceptibility to Fungal Invaders. *Can. Journal of Plant Patol.* 9: 389-397.
- Hoagland, R. E. y Williams, R. D. 1985. The Influence of Secondary Plant Compounds On the Associations of Soil Microorganisms and Plant Root. *American Chemical Society* pp. 301-325.
- Johnson, L. F. y Curl, E. A. 1972. *Methods for Research On the Ecology of Soil-Borne Plant Pathogens.* Burgess Publishing Company, Minnesota. pp. 189.
- Khrusheva, E. P. 1967. Mycorrhizae Agricultural Plants. In: *Mycotrophy in Plants.* Eds.: Rabonovitz, E. Israel Program for Scientific Translations, LTD. Jerusalem, Israel. pp. 142-151.
- Le Tacon, F. 1985. Las Micorrizas: una Cooperación entre Plantas y Hongos. *Mundo Científico* 5: 776-784.
- Lifshitz, R., Windham, M. T. y R. Baker. 1986. Mechanism of Biological Control of Preemergence Damping-off of Peas by Seed Treatment with *Trichoderma* spp. *Phitopathology* 70: 1107-1172.
- Linderman, R. G. 1988. Mycorrhizal Interaction with the Rhizosphere Microflora: the Mycorrhizal Effect. *The American Phytopathological Society, St. Paul,*

Minnesota. pp. 1-11.

- Lynch, J. M. 1986. Rhizosphere Microbiology and its Manipulation. Biological Agriculture and Horticulture 3: 143-152.
- Malloch, D. 1987. The Evolution of Mycorrhizae. Can. Journal of Plant Pathol. 9: 398-402.
- Mangenot, F. y Diem, H. G. 1979. Fundamentals of Biological Control. En: Ecology of Root Pathogens. Eds.: Dommengues, Y. R. y Krupa, S. V. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam. pp. 207-265.
- Martinez, J. E. 1986. Estudio de las Relaciones *Azospirillum lipoferum* sp. 59 *Azospirillum* sp. con Cultivo de Tejidos de Maíz. Tesis Profesional. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Martinez, J. M. 1973. Estudio de los Hongos Fitopatógenos Aislados del Río Coatzacoalcos en la Zona Comprendida Entre Minatitlán y Coatzacoalcos. E.N.C.B. Instituto Politécnico Nacional, México. pp. 13.
- Merckx, R., Binkel, J. H., Sinnaeve, J. y Cremens, A. 1986. Plant Induced Changes in the Rhizosphere of Maize and Wheat. Plant and Soil. 96: 85-93.
- Merckx, R. y Martin, J. L. 1987. Extraction of Microbial Biomass Components from Rhizosphere Soil. Soil

Biol. Biochem. 19: 371-376.

- Meyer, F. H. 1973. Distribution of Ectomycorrhizae in Native and Man-made Forest. En: Ectomycorrhizae. Eds.: Marks, G. C. y Kozlowki, T. T. Academic Press, London.
- Mulling, J. T. y Barsdale, A. M. 1965. Parasitism of the Chytrid *Dictyomorpha dioica*. Mycologia 57: 352-359.
- Neal, J. L., Atkinson, T. G. y Larson, R. I. 1970. Changes in the Rhizosphere Microflora of Spring Wheat Induced by Diosomic Substitution of Chromosome. Can. J. Microbiol. 16: 153-158.
- Newman, E. I. 1985. The Rhizosphere: Carbon Source and Microbial Publications. En: Ecological Populations in Soil. Eds: Atkinson, D., Read, D. J. y Usher, M. B. Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 107-121.
- Ocampo, J. A., Martin, J. y Haymon, S. 1980. Influence of Plant Interactions On Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Infections. II. Crop Rotations and Residual Effects of Non-Host Plants. New Phytol. 87: 333-343.
- Odum, E. P. 1985. Ecologia. Ed. Interamericana, México. pp. 179-259.
- Old, K. K. y Nicholson, T. H. 1978. The Root Cortex as Part of a Microbial Continuum. En: Microbial

- Ecology. Eds.: Loutit, M. W. y Miles, J. A. R.
Springer-Verlag, New York. pp. 291-294.
- Oyaizu-Masuchi, Y. y Komagata, K. 1988. Isolation of
Free-Living Nitrogen-Fixing Bacteria from the
Rhizosphere of Rice. J. Gen. Appl. Microbiol. 34:
127-164.
- Pacios, P. M. C. 1983. Micorrizas Vesículo-Arbusculares
en Plantas Adventicias Desarrolladas Sobre Suelo
Antrópico de Buenos Aires. Ciencia del Suelo 1:
33-38.
- Perusquia, S. J., Samaniego, J. A. y Pérez-Silva, E.
1987. Efectos Antagónicos de Algunas Especies de
Chaetomium Hacia Otros Hongos. Rev. Mex.
Fitopatología 5: 46-53.
- Peterson, R. L., Ashford, A. E. y Allawa, W. G. 1985.
Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Associations of
Vascular Plants On Heron Island, a Great Barrier
Reef Coral Cay. Aust. J. Bot. 33: 669-676.
- Phillips, J. G. y Hayman, D. S. 1970. Improved Procedures
for Clearing and Staining and Vesicular-Arbuscular
Mycorrhizal Fungi for Rapid Assessment of Infection.
Trans. Brit. Mycol. Soc. 55: 158-160.
- Richards, B. N. 1974. Introduction to the Soil Ecosystem.
Logman Inc., New York. pp. 166-184.

- Romero, C. S. 1988. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Rost, T. L., Barbour, M. G., Thorton, R. M., Weier, T. E. y Stocking, C. R. 1985. Introducción a la Biología Vegetal. Limusa, México. pp. 105-113.
- Rovira, A. D. 1965. Interaction Between Plant Root and Soil Microorganisms. Ann. Rev. Microbial. 19: 241-266.
- Russell, E. J. y Russell, W. E. 1968. Las Condiciones del Suelo y el Crecimiento de las Plantas. Aguilar, Madrid. pp. 228-278.
- Russell, N. H. 1975. Introduction to Plant Science Humanistic and Ecological Approach. West Publishing Co., New York. pp. 69-75.
- Russell, S. R. 1977. Plant Root Systems: their Function and Interaction with the Soil. Mc Graw-Hill, London. pp. 113-135.
- Safir, R. G. 1980. Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae and Crop Productivity. In: The Biology of Crop Productivity. Ed.: P. Carlson. Academic Press. Inc., a Subsidiary of Harcourt Brace Jou Anovich. Publishers. pp. 231-249.
- Schenck, N. C. y Pérez, Y. 1987. Manual for the Identification of VA Mychorhizal Fungi. University of Florida, Florida. 245 p.

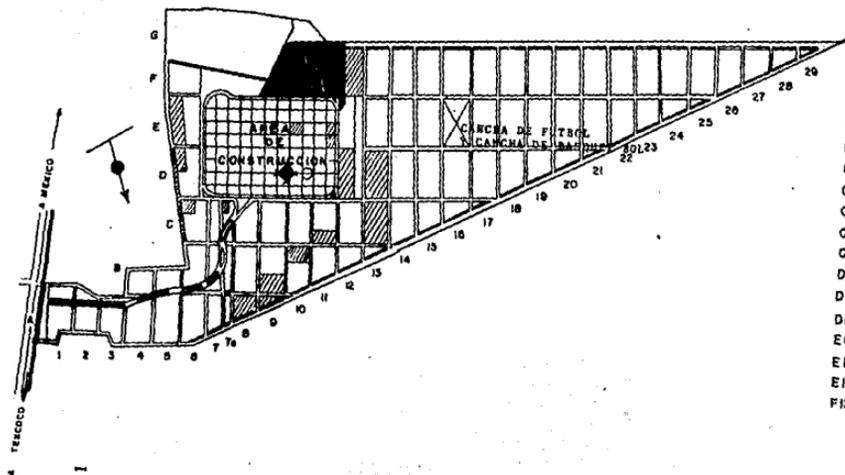
- Schippers, B. y Gams, W. 1979. *Soil-Borne Plant Pathogens*. Academic Press. London.
- Sieverding, E. 1983. *Manual de Métodos para la Investigación de la Micorriza Vesicular-Arbuscular en el Laboratorio*. CIAT., Cali.
- Smucker, A. J. M. y Safir, G. R. 1986. *Root and Soil Microbial Interactions which Influence the Availability of Photoassimilable Carbon to the Rhizosphere*. En: *Microflora and Faunal Interactions in Natural and Agro-Ecosystems*. Eds.: Nakas, J. P. y Mitchel, M. J. Martinus Nijhoff/Dr. W. Jonk Publishers, Netherlands. pp. 203-244.
- Sneh, M. B., Zeidan, I., Bura, H. y Kaltin, Y. 1985. *Increased Growth Response in Plants Induced by Non-Pathogenic *Rhizoctonia solani**. En *Abstracts at the 1985. Annual Meeting of the Am. Phytopathol. Soc. Phytopathol. 75: 1272-1385*.
- Sprague, R. 1950. *Diseases of Cereals and Grasses in Northamerica*. The Ronald Press Comp. New York. pp. 393-396.
- Tester, M., Smith, S. E. y Smith, F. A. 1987. *The Phenomenon of "Nonmycorrhizal" Plants*. *Can. Jour. of Bot.* 65: 419-431.
- Tinker, P. B. 1980. *Root-Soil Interaction in Crop Plants*. En: *Soil and Agriculture*. Ed.: Par Tekder, P. B.

Blackwell Publications Critical Reports On Applied
Chemistry 2: 151.

- Ulloa, M. y Hanlin, R. T. 1978. Atlas de Micología
Básica. Concepto. México. pp. 161-177.
- Vacura, V. 1986. Microbial Interactions in Soil,
Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae.
Paris. pp. 189-195.
- Villarreal, R. M. 1990. Efecto de la Doble Inoculación
Azospirillum sp. Endomicorriza (V-A) en la
Producción de Trigo (*Triticum aestivum*, L.). Tesis
M. en C. Colegio de Postgraduados; Montecillo,
México.
- Weiner, T. E., Stocking, C. R. y Barbour, M. G. 1983.
Botánica. Limusa, México. pp. 161-177.
- Windels, C. E., Kommedahl, T., Sarboni, G. y Wiley, H. B.
1985. The Role of Speeds in the Delivery of
Antagonists into the Rhizosphere. En: Ecology and
Managamente of Soilborne Plant Pathogens. Eds.:
Paeker, C. A., Rovira, A. D., Moore, K. y Wong, P.
T. W. The Am. Phytopath. Society. St. Paul,
Minnesota. pp. 75-79.
- Whipps, J. M. 1987. Effect of Medium On Growth and
Interactions Between a Range of Soil-Borne
Glasshouse Pathogens and Antagonistic Fungi. New
Phytol. 107: 127-142.

IX. APENDICES

SITIOS DE MUESTREO
 COLEGIO DE POSTGRADUADOS MONTECILLO, MEX.



- AB. LECHUGUILLA
- A9. QUELITE CENIZO
- B9. AVENA Y NABO
- B10. TRIGO
- C6. GIRASOL
- C6 y D6. TE DE CAMPO
- C7a. CEBOLLA
- C11. NABO MORADO Y LENTEJA
- C13. PASTO 3 Y CARRICILLO
- D6. MAIZ ENANO
- D12. PASTO 1, ROMERO Y LENGUA DE VACA
- D13. PASTO 2 Y CARRETILLA
- E6. FRIJOL Y MAIZ
- E10. MALVA Y MELILOTI
- E11. DURAZNILLO
- F12. ALFALFA

APÉNDICE II

PAPA-DEXTROSA-AGAR (PDA).

Papa (pelada y rebanada)	200 g
Dextrosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Las papas se cuecen en 500 ml de agua destilada durante 40 minutos en autoclave. Al jugo de la papa obtenido, se le agrega la dextrosa y se afora a 1 litro con agua. Se ajusta el pH entre 5.5 y 6.0. El agar se añade antes de que se meta el medio al autoclave para esterilizar, durante 18 minutos a 18 libras de presión (Johnson y Curl, 1972; Ulloa, 1978).

APÉNDICE III

AZUL DE ALGODÓN LACTOFENOL

Fenol	20 g
Acido Láctico	20 ml
Glicerina	40 ml
Agua destilada	20 ml

Disolver en baño maría el fenol, agregando posteriormente el Acido láctico y la glicerina.

A los 80 ml del aclarante se le adiciona 0.05 g de colorante azul de algodón y se filtra antes de usarse (Martínez, 1973).