



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS  
PROFESIONALES IZTACALA

COMPROBACION DE LA PATOGENICIDAD DE UNA  
CEPA DE Alternaria Nees, Y UNA DE Fusarium  
oxysporum (Schl.) em. Snyder & Hans., COMO  
CAUSANTES DE MAL DE SEMILLEROS EN Pinus  
montezumae Lamb. Y Pinus ayacahuite var.  
veitchii Shaw.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

ROSA ELENA GUARNEROS CARAZA

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEXICO

1989



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

A mis padres:

Ing. Jesús A. Guameros C. y  
Q.F.B. Rosa Idalia C. de Guameros,  
por su constante apoyo y cariño,  
por dame ejemplo en la vida,  
y por ser unos padres maravillosos.

A mi hermano:

Alberto con cariño,  
deseando que pronto esté donde estoy  
ahora.

A mis amigos:

Lydia Sumiko, Joceline, Haydeé, Irasema, Martín y José Luis,  
por compartir su cariño y alegría; brindarme apoyo y amistad  
sincera y porque fueron un factor importante para que lograra  
alcanzar esta meta en mi vida.

A mis abuelitos:

Alfonso † y Dolores Idalia,  
por el gran amor y cariño que les tengo  
y les tendré siempre.

#### AGRADECIMIENTOS.

- Manifiesto mi profundo agradecimiento al Q.B.P. Rodolfo Salinas Quinard, por su valioso asesoramiento y orientación en la presente tesis, así como mi cariño y admiración por ser un verdadero Maestro y una persona extraordinaria.
- A los Biólogos Francisco Reséndiz M., Lupita Macías C. y Elia Gatica, por sus consejos, estímulos constantes, ayuda y amistad sincera.
- Al M. en C. Raúl Muñoz V. con cariño y admiración por compartir sus conocimientos y experiencia. Agradeciendo además sus valiosas correcciones en la bibliografía.
- A Ana Luz, Nora, Maru, Lorenia, Sarita y José Luis por compartir experiencias de trabajo en el laboratorio y por los momentos de alegría.
- A Don Agustín González M. y al Sr. Roberto Villanueva por su ayuda en el trabajo de laboratorio y de vivero.
- Al M. en C. Angel Durán D. por su asesoría en la parte correspondiente al análisis estadístico y al M. en C. Agustín Vargas V. por la realización del mismo mediante métodos computacionales.
- Al Lic. Jorge Díaz Covarrubias por la realización de las gráficas.
- Al C.I.F.A.P., D.F., por permitirme realizar en sus instalaciones mi trabajo de tesis, especialmente al Laboratorio de Patología Forestal y al Laboratorio de semillas por proporcionarme el material requerido.

INDICE.

	Pág.
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS .....	3
ANTECEDENTES .....	3
MATERIALES Y METODOS .....	7
Aislamiento y Determinación de Cepas a Probar .....	8
Análisis Micológico de Semillas .....	9
Análisis Micológico de Suelo del Almacigo .....	11
Preparación del Almacigo .....	11
Lotificación del Almacigo .....	12
Inoculación de la Semilla .....	12
Siembra de Semilla Inoculada .....	14
Aislamiento de los Hongos de Plántulas Infectadas .....	17
RESULTADOS .....	17
Análisis Micológico de Semillas .....	17
Análisis Micológico de Suelo .....	19
Inoculación .....	21
Primera Epoca de Siembra .....	21
Segunda Epoca de Siembra .....	25
Tercera Epoca de Siembra .....	27
DISCUSION .....	37
CONCLUSIONES .....	48
RESUMEN .....	51
BIBLIOGRAFIA .....	52
APENDICE .....	56
Lista de Cuadros y Gráficas.	
Cuadro 1. Análisis Micológico de Semilla No Aseptizada .....	18
Cuadro 2. Análisis Micológico de Suelo del Almacigo .....	20
Cuadro 3. Situación de las Plántulas de <u>P. montezumae</u> Lamb. Observada en Dos Epocas de Siembra .....	22
Cuadro 4. Situación de las Plántulas de <u>Pinus ayacahuite</u> var. <u>veitchii</u> Shaw en la Segunda Epoca de Siembra .....	26
Cuadro 5. Situación de las Plántulas de las Dos Especies de Pino en la Tercera Epoca de Siembra .....	28

Cuadro 5. CONTINUACION .....	29
Gráfica 1. Plántulas Brotadas y Sobrevivientes de <u>P. montezumae</u> Lamb. en las Dos Primeras Epocas de Siembra .....	23
Gráfica 2. Plántulas Sanas y con Otros Daños de <u>P. montezumae</u> Lamb. en las Dos Primeras Epocas de Siembra .....	24
Gráfica 3. Plántulas Brotadas de <u>P. ayacahuite</u> var. <u>veitchii</u> Shaw con los Dos Métodos de Inoculación .....	30
Gráfica 4. Plántulas Sobrevivientes de <u>P. ayacahuite</u> var. <u>veitchii</u> Shaw con los Dos Métodos de Inoculación .....	31
Gráfica 5. Plántulas Sanas y con Otros Daños de <u>P. ayacahuite</u> var. <u>veitchii</u> Shaw con los Dos Métodos de Inoculación .....	32
Gráfica 6. Plántulas Brotadas y Sobrevivientes de <u>P. montezumae</u> Lamb. con los Dos Métodos de Inoculación .....	35
Gráfica 7. Plántulas Sanas y con Otros Daños de <u>P. montezumae</u> Lamb con los Dos Métodos de Inoculación .....	36

## INTRODUCCION.

Dentro de los planes de reforestación es de suma importancia el establecimiento de viveros, ya que éstos son los lugares destinados para la propagación de plantas, donde se les proporcionan los cuidados necesarios para el desarrollo de la planta antes de su traslado al sitio de plantado definitivo.

Sin embargo, las plántulas en los viveros, debido a que poseen tejidos tiernos, suelen presentar dificultades para su establecimiento, suelen ser menos resistentes al ataque por agentes — causantes de enfermedades (Pimentel, 1971) tanto no infecciosos (abióticos) como bióticos, dentro de los que se incluyen a los agentes fúngicos (Boyce, 1961).

Dentro de las enfermedades fungosas la más severa en la etapa juvenil de las plántulas, destaca el "mal de semilleros" o "mal de almácigos" (Gibson y Salinas, 1985) denominado en inglés — "damping-off" (Boyce, 1961; Peace, 1962; Hodges y Ruehle, 1969; Gibson y Salinas, 1985) por la gravedad de daños que causa al suprimir altas cantidades de individuos. El mal de semilleros se considera mundial ya que ataca a una gran cantidad de especies que comprende plantas ornamentales, hortícolas, agrícolas y forestales, afectando tanto especies latifoliadas como de coníferas, pareciendo ser los pinos (Pinus spp.) usualmente más susceptibles a la enfermedad (Gibson, 1978).

El término mal de semilleros se refiere a un grupo de síntomas causados por el ataque de — hongos ya sean habitantes del suelo o invasores durante las primeras semanas después de la siembra (Hodges y Ruehle, 1969).

Boyce (1961) define al mal de semilleros como una invasión fúngica que produce una pudrición temprana y muerte de las plántulas, cuyos tallos son todavía suaves y succulentos.

Este tipo de hongos pertenecen al grupo de los Fungi Imperfecti (Gibson y Salinas, 1985) — viven saprofiticamente en las capas superiores del suelo, siendo calificados como patógenos facultativos (Vaartaja, 1952; Gibson y Salinas, 1985). Entre ellos son comunes algunos miembros de — los géneros Rhizoctonia, Pythium, Fusarium, Phytophthora, Botrytis, Diplodia y Cylindrocladium —

(Baxter, 1952; Boyce, 1961) siendo decisivamente las más destructivas ciertas especies de los dos primeros géneros (Toole, 1964; Peace, 1962; Vaartaja y Cram, 1956). Estos pueden encontrarse afectando a semillas y plántulas con severidad variable según las condiciones medio ambientales, como son el pH, humedad y temperatura de suelo (Toole, 1964), las que conjuntamente favorecen el establecimiento de la enfermedad. Así especies de Fusarium, normalmente saprófitas pueden volverse altamente virulentas (Tint, 1945a). Respecto a Alternaria, se ha relacionado con la enfermedad, más no se tiene definido su papel patogénico (Vaartaja y Cram, 1956).

Se reconocen dos tipos de este mal de semilleros: preemergente y postemergente, independientemente del agente patógeno implicado. El primero se refiere a la pudrición de la semilla o muerte de la plántula antes de su emergencia del suelo (Baxter, 1952; Salinas, 1978; Agricos, 1969; Fisher, 1941) cuyo efecto se revela en la falla de la brotación. El tipo postemergente se presenta una vez ocurrida la emergencia o brote de la plántula sobre la superficie del suelo (Boyce, 1961). Generalmente cuando el hongo ha penetrado a las raíces y se ha desarrollado dentro del tallo, se observa un estrangulamiento en el cuello radicular al nivel del suelo en coníferas y en otras especies se presenta a diferentes alturas (Gómez, 1976).

Boyce (1961) menciona otro tipo de enfermedad: la muerte de las puntas (top-killing). En este caso las yemas terminales sufren el efecto de magullamiento y sobreviene la pudrición (Salinas, 1978) siendo más severa durante las estaciones húmedas en almácigos densos en donde las puntas de las plántulas están en contacto unas con otras (Aut. cit., 1961).

En general la información sobre enfermedades forestales en México, no es muy amplia. Cae en estos términos lo correspondiente al mal de semilleros, a pesar de la magnitud de los proyectos y trabajos de reforestación existentes para establecer bosques artificiales.

Tales trabajos están enfocados principalmente al diagnóstico de microorganismos asociados a la enfermedad y al posible control de ésta. Sin embargo, propiamente hablando se carece de publicaciones sobre estudios profundos para conocer la actividad y amplitud patogénica de los hongos que se han conocido que se asocian con casos de enfermedad en condiciones de vivero. Esto es: no -



se han realizado confirmaciones consistentes de los llamados postulados de Koch, por lo que de aquí que uno más de los intereses para realizar el trabajo sea el de conocer con mayor amplitud aspectos del comportamiento de la enfermedad.

#### OBJETIVOS.

Por lo anterior, el presente proyecto pretendió:

- 1.- Verificar los postulados de Koch para una cepa de Alternaria sp., Nees y una de Fusarium oxysporum (Schl.) em. Snyder & Hans., en plántulas de Pinus montezumae Lamb. y Pinus ayacahuite var. veitchii Shaw.
- 2.- Determinar algunas variantes sintomatológicas.
- 3.- Contribuir a ampliar los conocimientos de la enfermedad incidente en los viveros de México, respecto a los microorganismos propuestos para estudio.

#### ANTECEDENTES.

El problema fue observado en Europa en plántulas de árboles desde el siglo XVIII, volviéndose importante en los Estados Unidos en los primeros años del presente siglo (Boyce, 1961).

Acerca de él se han realizado estudios en el extranjero sobre plántulas de varias especies de Pinus afectadas por este mal y en relación con pruebas para confirmar cualidades patogénicas de los agentes complicados. A continuación se mencionan algunos de los trabajos realizados:

Fisher (1941) al realizar pruebas de inoculación para probar el efecto de germinación de semillas de especies forestales, encontró que Botrytis (cinerea ?), Fusarium spp., Pythium debaryanum, P. ultimum, Rhizoctonia sp., Sphaeropsis ellisii y Verticillium sp., fueron hongos que causaron decaimientos en las radículas, al emerger de las testas, comparativamente con Aspergi-

llus niger, Cylindroccladium sp., Penicillium sp., Rhizopus sp., R. oryzae, R. circinans, Pestalozzia sp., Alternaria brassicae, Chaetomium globosum, Mucor sp. y Thielavia sp., que no causaron pérdidas considerables en las radículas.

Tint (1945a) al realizar pruebas de inoculación con plántulas de Pinus resinosa por el método de tubo con Fusarium spp., tuvo pérdida total de plántulas, comparadas con pruebas realizadas con Rhizoctonia solani. Bajo condiciones de invernadero (20°C - 27°C temperatura media diaria) en pruebas de siembra de P. resinosa en medio de arena, Fusarium redujo la emergencia significativamente, así como Rhizoctonia solani causó severas pérdidas; no así Pythium ultimum y Penicillium spp., los cuales no indujeron disminución de la emergencia ni causaron pérdidas del tipo postemergente. En pruebas de siembra en suelo esterilizado, Fusarium sp., igualaron y ocasionalmente superaron en virulencia a Pythium sp. y Rhizoctonia sp., causando reducción en la emergencia e incrementando las pérdidas por el tipo postemergente.

Este mismo autor (1945b) realizó pruebas sobre la relación entre el pH de suelo con el mal de semilleros en P. resinosa en invernadero (temperatura media diaria de 20° - 24°C y baja humedad. Realizó inoculaciones con Fusarium oxysporum y F. avenaceum, encontrando que el tipo postemergente era bajo en las condiciones de suelo más ácidas; que alcanzaba un punto máximo, en el lado ácido cercano a la neutralidad: que drásticamente disminuía en suelo esterilizado con pH 7.5 y en suelo no esterilizado con pH 8.1; que se tornaba después uniformemente alto, en la mayoría de los substratos alcalinos. Así mismo, al inocular plántulas de diferentes edades con F. oxysporum demostró que la resistencia a la invasión tuvo incremento simultáneo con la edad de las plántulas.

Referente a la relación de la temperatura y luz diurna con la patogenicidad de Fusarium, Tint (1945c) encontró con un equipo de control, que el crecimiento óptimo de F. oxysporum era favorecido por una temperatura de 25°C aproximadamente, así como el incremento de pérdidas de los tipos preemergente y postemergente en P. resinosa estuvieron directamente correlacionados con el aumento de temperatura. La disminución de la luz diurna tuvo una relación directa con las pér-

das por mal de semilleros, en P. resinosa y P. sylvestris. Esta condición fue correlacionada con el aumento de suculencia de los hospederos y el crecimiento de las cepas de Fusarium empleadas en las inoculaciones.

Salisbury en 1952 (cit. Lock, 1973) reportó crecimiento de F. oxysporum más rápido en condiciones de temperatura aproximadamente de 24°C.

Vaartaja (1952) estudiando la influencia de la flora fungosa del bosque y el humus con el mal de semilleros bajo varias condiciones de temperatura y luz en P. sylvestris, en condiciones de campo y laboratorio, concluyó que el humus fértil y una baja intensidad de luz favorecieron el mal. Aisló de plántulas enfermas a Papulospora sp., Fusarium spp., Botrytis-sp. y Mucor ramannianus.

Vaartaja y Cram (1956) en pruebas en plántulas de Pinus banksiana Lamb. y Caragana sp., inoculada en tubo, fueron aislados Rhizoctonia y Pythium de plántulas muertas y representantes de géneros como Alternaria, Phoma, Cylindrocarpum y 8 especies de Fusarium que fueron menos patógenas. Los autores llevaron a cabo también pruebas de inoculaciones en invernadero (80-90% de humedad de suelo y temperaturas de 18°C-30°C durante el día y de 11°C-18°C durante la noche en Abies concolor Lind. & Cord., Abies magnifica A. Murr., Pinus sylvestris L. y Caragana sp., con Rhizoctonia solani, Pythium (debyaranum ?), Fusarium oxysporum var. redolens, Alternaria (tenuis ?), un nemátodo (Panagrolaimus sp.), y una bacteria asociada, en suelo de vivero no esterilizado, encontrando que Rhizoctonia solani fue más agresiva y patógena. Pythium (debyaranum ?) fue ligeramente patógena así como F. oxysporum var. redolens, Alternaria (tenuis ?) y el nemátodo no fueron patógenos en esta prueba.

Wright, Harvey y Bigelow (1956 (?)) en pruebas de invernadero con pino ponderosa, indicaron que F. oxysporum f. pini fue más virulenta con temperatura de suelo 26.6°C y mayores. Esta misma especie predominó en suelo no fertilizado con pH 6.3, así como Alternaria sp., en suelo fertilizado con pH 6.5. Se observó un incremento en el porcentaje de Trichoderma y Penicillium en este suelo fertilizado (pH 6.5) y en suelo mejorado con aserrín (pH 5.8).

Sequeira (1962) menciona que un aumento de Trichoderma y Penicillium puede contribuir a la declinación de la virulencia de Fusarium.

En nuestro país Sánchez (1968) estudió en pruebas de laboratorio, por el método de tubo de cultivo, la actividad patogénica de F. oxysporum y F. solani en P. montezumae, P. patula y P. teocote, concluyendo que las dos especies de Fusarium resultaron altamente patógenas para las tres especies de pinos, siendo F. oxysporum más patógena para P. montezumae.

En referencia al control químico de la enfermedad, Gómez y Yáñez (1978) trabajaron en determinaciones de la sensibilidad in vitro de dos cepas de Fusarium sp. y una de Alternaria sp., siendo una de ellas (Fusarium sp.) potencialmente resistente a la mezcla de los fungicidas Maneb 70- y GyCop 53. Observaron sensibilidad de ambas cepas a los fungicidas Captán 50-H y GyCop 53. Pruebas en campo con los fungicidas mencionados y con Pinus montezumae, previa la determinación de la flora fúngica tanto del suelo no sometido a tratamiento como de semilla almacenada y desinfectada con Captán 50-H así como la realización de exámenes micológicos de plántulas de P. montezumae procedentes de semilleros protegidos y no protegidos, aportaron información valiosa: aislamiento de Pythium sp., Fusarium sp., Alternaria sp., Mucor sp., Verticillium sp., Trichoderma sp., Penicillium sp. y Rhizopus sp., de muestras de suelo; de semillas se determinaron Penicillium sp., Mucor sp., Aspergillus sp. y Rhizopus sp.; de plántulas que mostraron estrangulamiento debido al mal de semilleros se aislaron Rhizoctonia sp., Pythium sp., Fusarium sp., Alternaria sp. y Mucor sp.

Respecto a tratamientos para combate, el fungicida de mayor eficacia para controlar la enfermedad fue el compuesto Captán 50-H.

Vázquez y Sánchez (1961) refirieron el hallazgo de Fusarium sp. y Alternaria sp., en casos de mal de semilleros en Pinus michoacana, P. cocarpa, P. tenuifolia, P. montezumae y P. pseudostrobus y los resultados de pruebas para prevención en plántulas recién trasplantadas a envases, mediante cuatro fungicidas (PCNB, Captán, Manzate-D y Trioxil). No se observaron e-

fectos sobre los patógenos involucrados en la enfermedad.

Báez (1986) en determinaciones de hongos en semillas de Pinus ayacahuite var. veitchii — encontró que Penicillium sp. y Aspergillus sp., ocasionaron daños en los embriones, referibles como malformaciones, adelgazamientos y reblandecimientos relacionables con reducción de la — germinación.

#### MATERIALES Y METODOS.

Para fines del proyecto se inocularon semillas, con el fin de comprobar si sufrían daños y se propiciaba el problema en la etapa preemergente y postemergente de las plántulas. Cabe mencionar que se propuso realizarlo tendiendo a simular lo más cercano posible las condiciones de la — práctica corriente de producción de planta en viveros forestales en México, en las que se presenta la enfermedad.

Esto último es importante bajo la consideración de que la enfermedad se presenta con frecuencia alarmante en los viveros donde la siembra de semilla se efectúa bajo condiciones no controladas (Gómez y Yáñez, 1978).

La parte experimental se realizó en seis etapas:

- 1.- Aislamiento y determinación de cepas a probar.
- 2.- Análisis micológico de semillas (Pinus ayacahuite var. veitchii Shaw y Pinus montezumae Lamb).

- 3.- Análisis micológico de suelo del almácigo, presiembra y postsiembra.
- 4.-Preparación del almácigo.
- 5.- Inoculación y siembra de semilla inoculada: en tres épocas (Noviembre, Marzo y Mayo).
- 6.- Aislamiento de los hongos de plántulas infectadas.

#### Aislamiento y Determinación de Cepas a Probar.

El aislamiento y determinación de Fusarium oxysporum (Schl.) em. Snyder & Hans., fueron logrados a partir de siembras, en placas de Petri, de porciones de plántulas de pino que mostraron síntomas de mal de semilleros. Para ello se obtuvieron muestras de las partes estranguladas de los talluelos, las que asepsizadas durante 1 min. con bicloruro de mercurio al 0.1% y enjuagadas tres veces con agua destilada esterilizada para eliminar el exceso de bicloruro, se secaron con papel filtro estéril para luego efectuar siembras en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (P.D.A.) comercial y subsecuentemente incubarlas en estufa de cultivos en temperatura de 25°C.

En el caso de Alternaria sp., Nees cuyo aislamiento original fue logrado a partir de suelo (de un almácigo, de los ocupados en el vivero de Coyoacán, D.F., para producción de planta), fue cepa obtenida por el método de cuenta total de microorganismos (Báez, 1987) conforme al procedimiento de diluciones y siembra en placa de agar (Clark, 1965). Este método se siguió en el presente trabajo para el análisis micológico del suelo en la tercera etapa anteriormente indicada, y que básicamente consistió en sembrar 1 ml. de las diluciones 1 : 100,000 ; 1 : 1,000,000 y 1 : 10,000,000 en placas de medio de cultivo con agar-extracto-levadura, al que el fueron agregadas 3 gotas de ácido láctico por litro de medio para prevenir el crecimiento de bacterias. Se tuvieron dos repeticiones para cada siembra, las que se incubaron a 25°C, haciéndose observaciones periódicas terciadas para seguir el curso del desarrollo de los cultivos.

La determinación de ambas cepas fue por microscopía apoyada con claves (Barnet, 1960 ; — Gilman, 1963).

#### Análisis Micológico de Semillas.

Para la realización de este análisis se emplearon semillas proporcionadas por el Laboratorio de Semillas del C.I.F.A.P., D.F., registradas como sigue:

Pinus ayacahuite var. veitchii lote 619 A, recolectada en Septiembre de 1977 en el Campo Experimental Forestal en San Juan Tetla, Puebla, utilizada en la siembra de la primera época.

Semilla de este misma especie y variedad recolectada en Noviembre de 1987, en la misma localidad, empleada en la segunda y tercera épocas de siembra.

Semilla de Pinus montezumae, lote 655 recolectada en 1978 en la localidad Rancho Nuevo, en Mitzintón, Chiapas, empleada en la primera y segunda épocas.

Semillas de esta misma especie, lote 828 recolectada en Diciembre-Enero de 1985 en el Campo Experimental Forestal mencionado, empleada en la tercera época de siembra.

Todos los lotes de semillas, excepto el recolectado en Noviembre de 1987, estuvieron en las condiciones de almacenamiento usuales en el C.I.F.A.P., D.F., (temperatura,  $\pm$  4°C; humedad relativa 60-70%, y contenido de humedad de la semilla 8-10%) antes de ser empleada. Cabe señalar que en el periodo de su almacenamiento ocurrieron algunos accidentes en la cámara de almacenamiento referibles como fallas más o menos prolongadas de energía eléctrica, o en el funcionamiento del refrigerador.

Cada lote de semillas fue sometido al siguiente proceso:

Examen exterior de semillas con el fin de encontrar daños preexistentes, visibles.

Análisis Micológicos: consistieron en lavar la semilla con agua corriente, agitáolas por rotación en un vaso de precipitados, para separar y eliminar las flotantes; luego, separación de 80 semillas de las sedimentadas, enjuagadas con agua estéril tres veces y secadas con papel fil-

tro estéril.

De estas porciones de 80 semillas, se formaron tres sublotes: dos de 20 semillas y uno de 40.

Uno de los sublotes de 20 semillas fue asepticado con peróxido de hidrógeno al 30% por 10 min. (Trappe, 1961 ; Neal et al., 1967) ; la eliminación del exceso de asepticante se realizó secando la semilla con papel filtro estéril. De estas porciones se hizo la siembra de cinco semillas por placa de P.D.A. comercial, teniéndose así 20 repeticiones, considerando que cada semilla correspondía a una repetición.

El segundo sub lote de 20 semillas, no fue asepticado. Se sembraron cinco muestras (semillas) por placa de P.D.A. comercial, teniéndose también 20 repeticiones.

El lote de 40 semillas se asepticó mediante peróxido de hidrógeno al 30% aplicado por 10 min. El exceso de peróxido se eliminó secando la semilla en papel filtro esterilizado.

Subsecuentemente se procedió a la separación de testas y embriones de las semillas del lote de 40, empleando un triturador de semillas en Pinus ayacahuite var. veitchii, y mediante disección con pinzas y bisturí en P. montezumae. En ambos casos se asepticó la mitad de testas y de embriones obtenidos, mediante peróxido de hidrógeno al 30% durante 10 min. Las otras mitades no se asepticaron.

Para la siembra de todas las muestras de testas y embriones, éstas fueron distribuidas en número de 5 por placa de P.D.A. comercial, teniéndose nuevamente 20 repeticiones.

Todas las muestras de los tres sublotes fueron llevadas a incubación de 25°C, en estufa. Se programaron observaciones terciadas, determinándose los microorganismos contaminantes de semillas, por microscopía apoyada con las claves anteriormente citadas.

Este análisis preliminar se hizo con el fin de conocer la preexistencia de microorganismos contaminantes en las semillas a emplear y si de ellos alguno pudiera coincidir en identidad con —



los inoculados experimentalmente.

#### Análisis Micológico de Suelo del Almacigo.

Con propósitos similares para el caso de la semilla, el suelo a emplear para la obtención de plantas en el almacigo fue así mismo examinado antes y después de cada siembra en las tres épocas mencionadas.

El plan de análisis comprendió determinaciones tanto de suelo sin aseptizar como aseptizado, con objeto de corroborar la presencia o ausencia de los hongos prueba introducidos con las semillas inoculadas y hacer la distinción de algún otro posible hongo semejante y/o de alguno diferente sospechosamente patógeno. Para el caso se aplicó el mismo método anteriormente descrito para el aislamiento de cepas a partir de suelo de vivero (Báez, 1987).

#### Preparación del Almacigo.

Para el caso, el procedimiento fue el siguiente:

Se utilizó un almacigo de 0.94 m de anchura X 14 m de longitud, ubicado en las instalaciones del C.I.F.A.P., D.F., en su Campo Experimental en Coyoacán.

El almacigo estuvo provisto de un piso de ladrillo con el fin de mejorar el drenado del mismo.

Como preparación de la siembra, el almacigo fue llenado con tierra de la ya existente y utilizada en siembras anteriores, completada con tierra nueva procedente de monte.

Se construyó un "invernadero" rústico con tela plástica, soportada por un amazón de estacas de madera y cordón de polipropileno (rafia), formando así una cubierta de dos aguas para dar corriente al agua de lluvia, semejando una "tienda de campaña". Los costados del "invernadero" no se fijaron, con objeto de poder levantarlos periódicamente para airear el almacigo. Este dispositi

vo se hizo con el fin de proteger al almácigo de la lluvia y de los animales.

Para propiciar ventilación adecuada y constante y protección simultánea, se colocaron lateralmente marcos de madera de 0.60 m de ancho X 1.20 m de largo con malla de alambre para gallinero. En la primera época estos dispositivos cubrieron sólo la mitad de un costado; en la segunda y tercera épocas, todo un costado y mitad del opuesto (Ver apéndice, fig 1).

Antes de cada una de las siembras se asepticó el suelo con formaldehído al 39%, diluído en proporción de 1 parte de formaldehído por 5 de agua corriente (dilución final 6.5%), regando al suelo con dicha solución, mediante regadera. Inmediatamente después se cubrió todo el suelo del almácigo con tela plástica, poniendo tierra húmeda y ladrillos en los bordes para evitar la fuga del asepticante (Sharville, 1969 ; Hartmann y Kester, 1985).

Se mantuvo así durante dos días, retirando el plástico al tercero y removiendo ligeramente la tierra con ayuda de una pala; en esta condición se dejó ventilar durante 12 días al cabo de los cuales se efectuaron las siembras (Byrde, 1969 ; Hartmann y Kester, 1985).

#### Lotificación del Almácigo.

El almácigo así preparado fue dividido en compartimentos con láminas de material acrílico, formando 32 lotes de 45.71 cm X 85.71 cm; de los cuales 16 se destinaron a cada especie de pino con sus cuatro respectivos tratamientos y repeticiones (v. apéndice, fig. 1).

Tanto los tratamientos como las especies de pino estudiadas fueron distribuídos al azar.

#### Inoculación de la Semilla.

Para llevar a cabo la primera siembra se realizó una prueba preliminar de inoculación en condiciones asépticas, probando como posibles adherentes de esporas una solución de gelatina sin sabor y agua esterilizada, con el fin de conocer cuál de estos vehículos podrían utilizarse con mayor seguridad.

Para ésto se tomaron 40 semillas de pino, lavadas y asepticadas según el método descrito para el análisis micológico de semillas:

20 semillas se humedecieron con agua esterilizada ; 10 de éstas se revolcaron por agitación un minuto y medio en placas de cultivo P.D.A. comercial con Alternaria sp. y las otras 10 en placas con F. oxysporum. Unas y otras se sembraron separadamente poniendo cinco semillas por placa de P.D.A. comercial incubando a 25°C.

Las semillas, restantes igualmente lavadas y asepticadas, se apartaron para humedecerse con solución de gelatina preparada con 1.46 g. de polvo sin sabor disueltos en 100 ml de agua hirviendo.

Por motivo de similitud de comportamiento de ambos adherentes se escogió el agua esterilizada, por su menor costo y mayor facilidad de manejo.

Para la inoculación final, se lavó semilla de cada especie con agua corriente para eliminar a la semilla vana flotante.

Se tomaron 1,344 semillas lavadas (supuestamente viables) de cada una de las especies y se lavaron nuevamente tres veces con agua esterilizada, secándose cerca del mechero. Posteriormente fueron asepticadas con peróxido de hidrógeno al 30% durante 10 min, eliminando el exceso del asepticante secando la semilla con papel filtro esterilizado. Humedecidas con agua esterilizada, se revolcaron en el micelio de las cepas a probar, por agitación durante un minuto y medio. Las cepas, sembradas en P.D.A. comercial, tuvieron en promedio un mes de crecimiento.

Se revolcaron 336 semillas para la inoculación con Alternaria sp. y otras tantas (336) para la inoculación con F. oxysporum.

En el caso de la inoculación con mezcla de las dos cepas, se revolcaron 336 semillas primero en una cepa, y luego en la otra.

Otras 336 semillas estuvieron libres de inoculación, teniéndose entonces cuatro tratamien-

tos para cada especie, identificables como sigue:

- 1.- Inoculación con Alternaria sp., ( $H_1$ ).
- 2.- Inoculación con Fusarium oxysporum ( $H_2$ ).
- 3.- Inoculación con ambas especies ( $H_1 + H_2$ ).
- 4.- Testigo, libre de inoculación ( $H_0$ ).

#### Siembra de Semilla Inoculada.

Se colocaron 84 semillas inoculadas por caja Petri esterilizada, etiquetada, teniéndose así cuatro repeticiones por tratamiento.

Transportadas al almácigo fueron sembradas al voleo en el lote correspondiente, en áreas de siembra de 25.71 cm X 65.71 cm (incluidos en los lotes de siembra) dejándose un margen libre de 10 cm alrededor de cada área para prevenir influencia de humedad proveniente de las paredes del almácigo.

Posteriormente se cubrió la semilla con una capa fina de tierra y se les aplicó un riego, ligero de agua.

Se realizaron observaciones y riegos de los lotes aproximadamente cada tercer día, proporcionándoles sólo humedad.

La primera época de siembra correspondió a la última semana de Noviembre de 1967; la segunda a la última de Marzo (aproximada a la época común, Abril, de siembra en el D.F.) y la tercera a la última semana de Mayo del siguiente año.

La tercera siembra se realizó con fin comprobatorio, con objeto de obtener información sobre comportamientos en cuanto a posibles causas de deficiencias en los mecanismos experimentales, que hubiesen podido explicar ciertas fallas en los resultados. Para el objeto se probaron dos tipos de inoculación: la originalmente propuesta, es decir, la referida al humedecimiento de la semilla e inoculando por agitación, y otra consistente en germinar semilla in vitro en presencia de la cepa correspondiente a probar.

Para ello se ocupó el mismo almácigo y el suelo remanente de las pruebas precedentes, pero sin aseptizar.

La distribución de los tratamientos fue como en las pruebas anteriores, en cuanto a que se sembró en cada lote el mismo número de semilla de las especies de pino, e inoculando la misma cepa probada en las dos ocasiones anteriores; solamente que los diferentes tipos de inoculación se distribuyeron al azar (v. apéndice, fig. 2).

Para la inoculación original se empleó la mitad del número de lotes del almácigo, es decir 16, así como la mitad de semilla empleada en las dos pruebas anteriores, esto es 672 semillas.

Se siguió la metodología original, teniendo para esta prueba dos repeticiones por tratamiento.

Para la prueba con la modalidad de inoculación, se utilizó el resto de los lotes del almácigo. Esta innovación consistió en lavar y aseptizar otra 672 semillas según la metodología original. Una vez hecho lo anterior, una cuarta parte de semilla (168) destinada para el tratamiento libre de inoculación (testigo) fueron germinadas a una temperatura de 22°C en cajas Petri estériles conteniendo papel filtro estéril humedecido.

Otra cuarta parte reservada para el tratamiento con Alternaria sp., fue dividida a su vez en dos porciones de 84 semillas cada una. Una de éstas se germinó del mismo modo que los testigos; la otra se colocó en caja Petri que contenía P.D.A. casero (Molina, 1957), conteniendo desarrollos de Alternaria sp., de 3-4 semanas en término medio.

En el caso de F. oxysporum se realizó exactamente lo mismo.

Respecto al tratamiento de las semillas en el que se mezclaron las dos cepas de hongos las 168 semillas empleadas fueron también divididas en dos partes: una (84 semillas) fue puesta a germinar como los testigos; la otra, a su vez dividida en dos porciones de 42 semillas cada una, se dejó germinar in vitro en presencia de la cepa correspondiente a probar.

A los 7 días después de germinadas las semillas de P. ayacahuite var. veitchii y los 5 días de germinada la semilla de P. montezumae, se procedió a sembrarlas al voleo en los lotes correspondientes (dos repeticiones), cuidando de no maltratar las radículas y procurando acomodarlas y enterrarlas en su caso, con precaución. Al terminarse cubrir con una capa fina de suelo, se aplicó un riego ligero a las camas.

En las tres épocas de siembra el tiempo de duración de cada una de las pruebas fue de seis semanas, contadas a partir de iniciada la brotación de las plántulas en el almácigo.

En las tres pruebas se anotó el número de semillas sembradas; se tomaron lecturas periódicas de temperatura atmosférica y de suelo, pH del suelo; número de plántulas brotadas, sobrevivientes, sanas, enfermas por mal de semilleros y con otro tipo de daños.

En la segunda y tercera pruebas (épocas de siembra), además de los datos mencionados fue posible tomar humedad del suelo del almácigo. La temperatura atmosférica fue registrada con un termómetro "ASSISTENT" de 100°C colocado en el interior y al centro del "invernadero". Para lecturas de temperatura de suelo, el termómetro fue introducido directamente en el suelo, a una profundidad máxima de 6 cm.

En ambos casos los registros se hicieron al medio día (11 a 12 hrs.).

La humedad del suelo se determinó mediante un higrómetro para suelo "Ag Tronics".

Los datos de pH de suelo fueron determinados mediante un potenciómetro digital Beckman Zeronatic IV, utilizando una relación de una parte de suelo tamizado con un cernidor número 140 (malla 0.0041 pulgadas) contra dos de agua destilada con un pH de 7.

Por otra parte se realizó un análisis estadístico solamente para P. montezumae pues se carecieron de datos en la primera época de siembra para P. ayacahuite var. veitchii. El proceso comprendió un análisis de varianza (anovas) para dos factores (inóculo y época de siembra) teniendo el primer factor cuatro niveles (Alternaria sp., F. oxysporum, mezcla de cepas y testigo) y el segundo dos (primera y segunda época de siembra).

En cuanto a la tercera época de siembra, se aplicaron anovas para tres factores (especie de pino, método de inoculación e inóculo) teniendo cada factor respectivamente, 2, 2 y 4 niveles.

Para las determinaciones de anovas se utilizaron los datos registrados de las plántulas brotadas, sobrevivientes, sanas y con otro tipo de daños. Las plántulas enfermas por mal de semilleros no se incluyeron, por las razones que se explican en la parte correspondiente a la discusión.

#### Aislamiento de los Hongos de Plántulas Infectadas.

El aislamiento de los hongos de plántulas infectadas se realizó de la misma manera que el aislamiento y determinación de F. oxysporum, explicada en la primera etapa de la parte experimental.

### RESULTADOS.

#### Análisis Micológico de Semilla. (CUADRO 1.)

De acuerdo a la metodología seguida, el examen exterior de los lotes de semilla, la de P. montezumae lote 655 tuvo en su mayoría manchitas café y algunas pocas mostraron además algunas perforaciones. La de P. ayacahuite var. veitchii lote 619 A no tuvo semillas manchadas ni perforadas. En el resto de los lotes la semilla de ambas especies tuvo buenas condiciones y mejor aspecto.

Los exámenes micológicos primarios de semillas de P. ayacahuite var. veitchii de los dos lotes empleados arrojaron los siguientes datos: en semillas enteras sin asepticar, se encontró Phizopus sp.; en embriones sin asepticar, Penicillium sp.

Respecto a P. montezumae se encontraron tres cepas de Aspergillus spp., en semillas enteras sin asepticar. Del lote 655 se encontró además Phizopus sp., y del lote 828 Penicillium sp., Trichoderma sp. y un hongo indeterminado.

En términos generales, en embriones lote 655, se encontró Penicillium sp. y Alternaria sp.

## CUADRO 1. ANALISIS MICOLOGICO DE SEMILLA NO ASEPTIZADA.

(NUMERO DE CEPAS AISLADAS).

Pinus ayacahuite var. veitchii Shaw.							
Lote 619 A, colectado en 1977, en el Campo Experimental Forestal en San Juan Tetla, Pue.				Colectada en Noviembre de 1967, en el Campo Experimental Forestal en San Juan Tetla, Pue.			
Hongo \ Muestra	Enteras	Testas	Embriones	Hongo \ Muestra	Enteras	Testas	Embriones
<u>Rhizopus</u> sp.	19	0	0	<u>Rhizopus</u> sp.	20	0	0
<u>Penicillium</u> sp.	0	0	4	<u>Penicillium</u> sp.	0	0	1
				<u>Aspergillus</u> sp.*	1	0	0
Pinus montezumae Lamb.							
Lote 655, colectado en 1978, en Rancho Nuevo Mitzintón, Chis.				Lote 828, colectado en Dic-Ene. de 1985, en el Campo Experimental Forestal Sn. Juan Tetla, Pue.			
Hongo \ Muestra	Enteras	Testas	Embriones	Hongo \ Muestra	Enteras	Testas	Embriones
<u>Rhizopus</u> sp.	6	0	0	<u>Aspergillus</u> sp.3	1	0	0
<u>Aspergillus</u> sp. 1	1	0	0	<u>Penicillium</u> sp.	1	0	0
<u>Aspergillus</u> sp. 2	1	0	0	<u>Trichoderma</u> sp.	1	0	0
<u>Penicillium</u> sp.	0	0	1	Indeterminado	1	0	0
<u>Alternaria</u> sp.	0	0	1				

\* El único hongo aislado de semilla aseptizada con peróxido de hidrógeno al 30%.



En ninguna de las especies de pino se encontraron microorganismos en las testas sin asepticar.

Referente a las muestras asepticadas, solamente en una semilla entera de P. ayacahuite var. veitchii de colecta en Noviembre de 1987, se encontró Aspergillus sp. En el resto de las muestras asepticadas de ambas especies de pino no se encontraron microorganismos.

Análisis Micológico de Suelo. (CUADRO 2).

Conforme a los seis análisis realizados de suelo del almácigo, sus resultados indicaron las siguientes situaciones: de suelo sin asepticar, antes de la primera siembra, señaló la presencia de representantes de 10 géneros de hongos, además de dos cepas del orden Mucorales, dos de los Sphaeropsidales y cinco hongos indeterminados.

En el segundo análisis de suelo asepticado, antes también de la primera siembra, solamente indicó presencia de Phoma sp. y Gliocladium sp., no encontrándose los hongos anotados en el cuadro referido.

En los cuatro análisis restantes, en términos generales predominaron los géneros Penicillium y Trichoderma. Así mismo fueron encontrados hongos de géneros que no se aislaron en ocasiones anteriores, como los casos de Cladosporium y Diplocladium (?), determinados en el análisis posterior a la primera siembra; Monocillium, del suelo asepticado antes de la segunda siembra, y Zygodessmus del último análisis de suelo.

Tocante a las cepas inoculadas, solamente en dos ocasiones fue encontrada la especie Fusarium oxysporum identificable con la inoculada. Aún cuando se encontró una cepa de Fusarium proveniente del análisis de suelo al término de la segunda siembra, ésta resultó morfológicamente distinta a F. oxysporum.

Por otra parte hongos inoculados o posibles preexistentes en el suelo correspondiente a Alternaria sp., no fueron aislados en ninguna de las muestras de suelo analizadas.

CUADRO 2. ANALISIS MICROLOGICO DE SUELO DEL ALMACIGO.

Sin asepticar pre-primera siembra.	Aseptizado pre-primera siembra.	Posterior a la primera siembra.	Aseptizado pre-segunda siembra.	Posterior a la segunda siembra.	Posterior a la tercera sin asepticar.
		<u>P. ayacahuite</u> var. <u>veitchii</u> .		<u>P. ayacahuite</u> var. <u>veitchii</u> y <u>P. montezumae</u> .	
				<u>Testigos</u>	<u>Testigos</u>
. <u>Penicillium</u> sp. 16 cepas.	. <u>Phoma</u> sp.	. <u>Penicillium</u> sp.	. <u>Penicillium</u> sp.	. <u>Penicillium</u> sp.	. <u>Penicillium</u> sp.
. <u>Phoma</u> sp.		. <u>Trichoderma</u> sp.		. <u>Trichoderma</u> sp.	. <u>Trichoderma</u> sp.
. <u>Homodendrum</u> sp.	. <u>Gliocladium</u> sp.	. <u>Fusarium oxysporum</u> .	. <u>Monocillium</u> sp.	. <u>Trichoderma</u> sp.	. Dos hongos indeterminados ( $H_7 + H_8$ ).
. Micoral 2 cepas.		. <u>Diplocladium</u> sp. (?)			<u>Tratamiento H<sub>1</sub></u>
. <u>Botrytis</u> sp.					. <u>Penicillium</u> sp.
. <u>Gliocladium</u> sp.					. <u>Trichoderma</u> sp.
. <u>Chaeropsidales</u> 2 cepas					. Hongo ind. ( $H_9$ ).
. <u>Cephalosporium</u> sp.		<u>P. montezumae</u> .			<u>Mezcla de Ambas Cepas</u> ( $H_1 + H_2$ )
. <u>Fusarium</u> sp. 3 cepas					<u>Tratamiento H<sub>2</sub></u>
. <u>Trichoderma</u> sp.		. <u>Trichoderma</u> sp.			. <u>Penicillium</u> sp.
. <u>Mortierella</u> sp. (?)		. <u>Penicillium</u> sp.		. <u>Penicillium</u> sp.	. <u>Trichoderma</u> sp.
. <u>Pullularia</u> sp. (?)		. <u>Cladosporium</u> sp.		. <u>Trichoderma</u> sp.	. <u>Zygodermus</u> sp.
. Hongos indeterminados				. <u>Fusarium</u> sp. (no inoculado).	<u>Tratamiento H<sub>1</sub> + H<sub>2</sub></u>
H <sub>1</sub>		. Hongo indeterminado ( $H_6$ )			. <u>Penicillium</u> sp.
H <sub>2</sub>					. <u>Trichoderma</u> sp.
H <sub>3</sub>					. <u>F. oxysporum</u> .
H <sub>4</sub>					
H <sub>5</sub>					

### Inoculación.

En la prueba preliminar de la inoculación donde se emplearon adherentes como gelatina sin-sabor y agua esterilizada, se obtuvieron resultados positivos, ya que todas las semillas inoculadas con las cepas de prueba mostraron crecimiento fungoso en las placas de P.D.A. comercial probándose así que hubo adherencia de esporas.

### Primera Época de Siembra.

Los resultados obtenidos en esta primera época de siembra, de los pinos P. ayacahuite var. veitchii y P. montezumae, corresponden a condiciones de temperatura atmosférica media de 24.19°C y de suelo 21.61°C y promedio de pH de suelo de 6.3 (su humedad no fue posible medirla) prevalentes en el lapso de comprobación de la capacidad patogénica de las cepas de F. oxysporum y de Alternaria sp., utilizadas.

La semilla de P. ayacahuite var. veitchii falló en su germinación, careciéndose por lo tanto de datos comparables concluyentes.

Los resultados de P. montezumae (Cuadros 3A y 3B; gráficas 1 y 2) considerando globalmente — los lotes de siembra respectivos, en resumen fueron:

El tratamiento con inóculo de Alternaria sp., tuvo mayor promedio de brotadas (64), sobrevivientes (63) y sanas (59) respecto a otros tratamientos, aunque no hubo comparativamente una diferencia muy marcada. El tratamiento donde ocurrieron más plántulas enfermas por mal de semilleros (7 plántulas) fue el de inoculación con F. oxysporum, el que mostró principalmente el tipo postemergente y en menor número el tipo preemergente y muerte de las puntas. Siguieron en importancia (3 plántulas en cada caso) los tratamientos con Alternaria sp., con los tres tipos de sintomatología, y con la mezcla de cepas, sin el tipo postemergente. No hubieron plántulas enfermas en el testigo.

Cabe señalar que no se logró el aislamiento de F. oxysporum de todas las plántulas supuestamente inoculadas y que mostraron síntomas de enfermedad. Así de 7 enfermas sólo se logró aislar — el hongo de 4, y de una de las tres restantes se aisló una cepa de Alternaria sp. ajena al —

CUADRO 3. SITUACION DE LAS PLANTULAS DE Pinus montezumae Lamb. OBSERVADA  
EN DOS EPOCAS DE SIEMBRA.

A. PROMEDIOS.

Erotadas.

Tratamiento Epoca de Siembra	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>1</sub> +H <sub>2</sub>	H <sub>0</sub>	Total.
I	64	61	63	63	251
II	44	52	52	50	198

Sobrevivientes.

Tratamiento Epoca de Siembra	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>1</sub> +H <sub>2</sub>	H <sub>0</sub>	Total.
I	63	58	61	61	243
II	44	52	51	50	197

Sanas.

Tratamiento Epoca de Siembra	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>1</sub> +H <sub>2</sub>	H <sub>0</sub>	Total.
I	59	57	51	56	223
II	43	48	49	46	186

Plántulas con Otro Tipo de Daños.

Tratamiento Epoca de Siembra	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>1</sub> +H <sub>2</sub>	H <sub>0</sub>	Total.
I	5	5	8	6	24
II	1	3	3	3	10

B. NUMERO DE PLANTULAS ENFERMAS POR MAL DE SEMILLEROS.

Tratamiento Epoca de Siembra	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>1</sub> +H <sub>2</sub>	H <sub>0</sub>	Total.
I	3	7	3	0	13
II	0	0	0	0	0

Epoas de Siembra.

I: Noviembre de 1987 (Otoño-Invierno)

II: Marzo a Mayo de 1988 (Primavera).

Tratamientos.

H<sub>1</sub>: Alternaria sp. H<sub>0</sub>: Testigo.

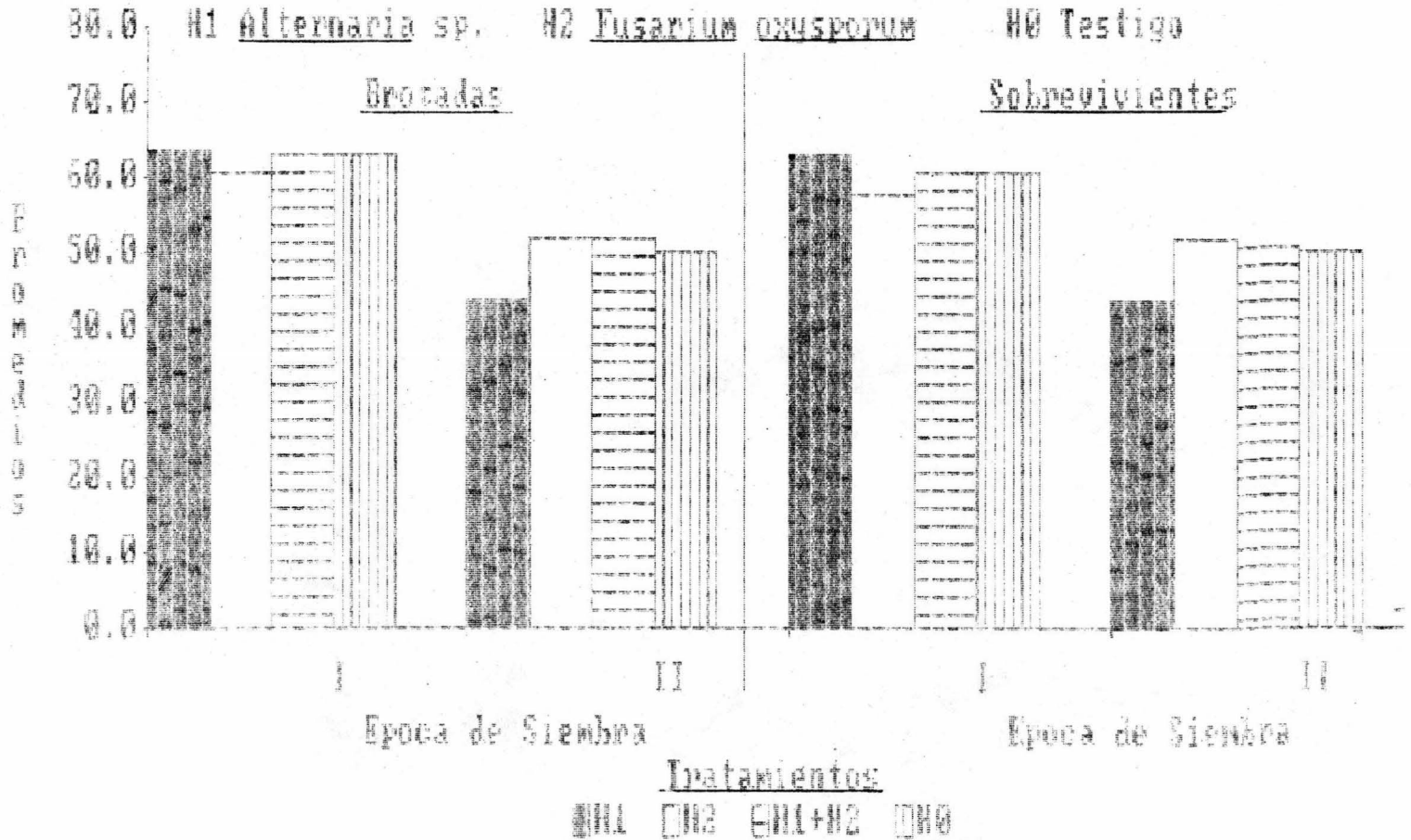
H<sub>2</sub>: Fusarium oxysporum.

H<sub>1</sub> + H<sub>2</sub>: Alternaria sp. y

F. oxysporum.

GRAFICA 1.

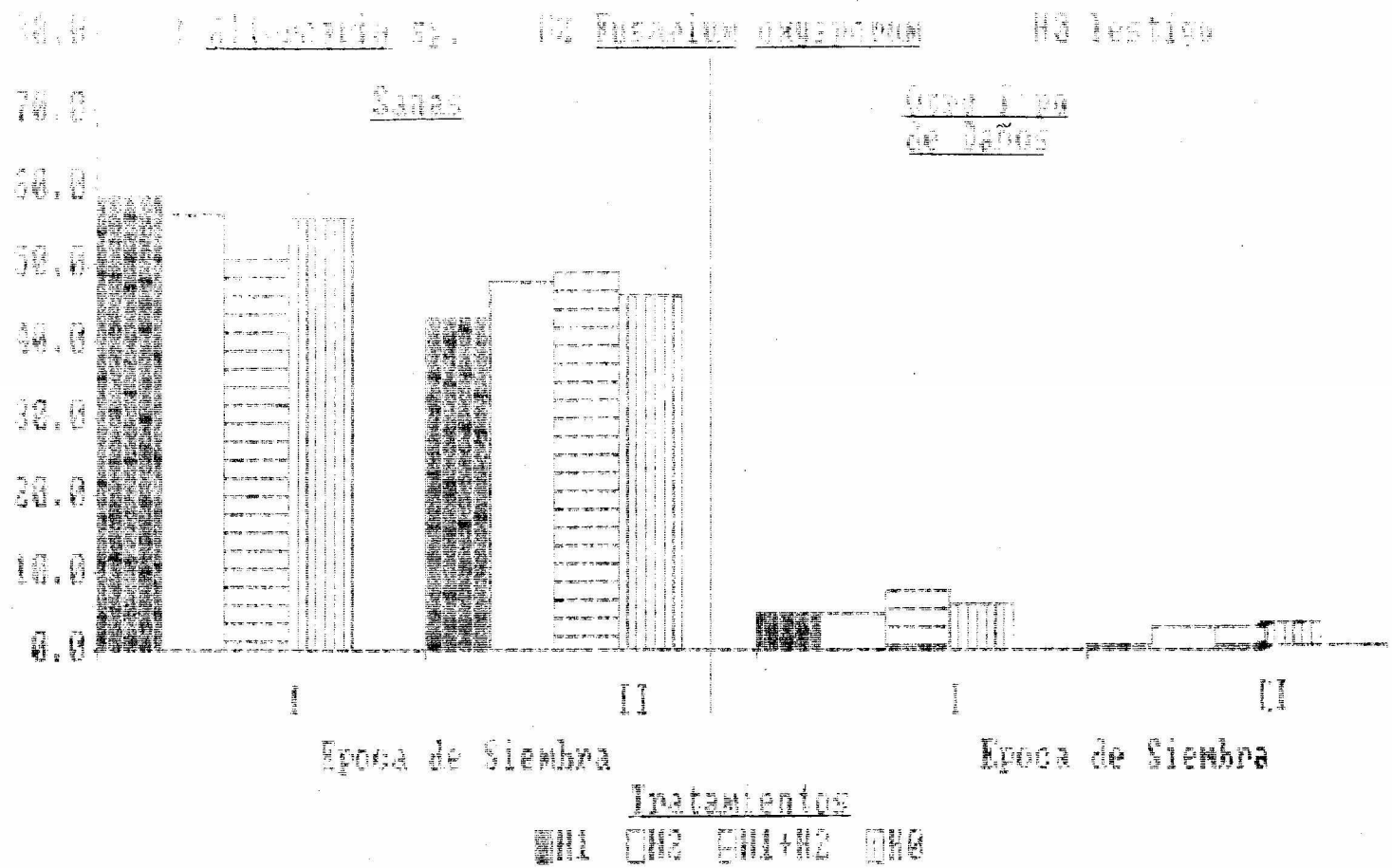
Pinus montezumae Lamb.



GRAFICA 1.

GRAFICA 2.

Curvas Notoxímicas (años)



inóculo y distinta a la Alternaria inoculada.

De las plántulas enfrentadas a Alternaria sp., sólo de dos fue posible el aislamiento; y de la mezcla de inóculos únicamente de una plántula se realizó a F. oxysporum.

Por último, hubo en todos los tratamientos incluyéndose el testigo, incidencia en mayor o menor grado de alguno o varios otros daños (cuadro 3A; gráfica 2) como amarillamiento, secamiento de puntas, defoliación total y/o parcial causada por orugas, puntas amarillas, lesiones por orugas, deformaciones, albinismos, traumatismos por accidentes imprevistos, así como plántulas con mal de semilleros de etiología no común. Estos daños no señalaron relación definida con los hongos inoculados; la situación con mezcla de inóculos, fue de ocurrencia, en promedio de un número mayor (8) de plántulas con estos daños, siendo de ellos predominante el amarillamiento.

#### Segunda Época de Siembra.

Esta segunda época correspondió a condiciones ambientales de temperaturas atmosféricas medias de 27.3°C; del suelo 21.76°C de temperatura, 30% de humedad promedio y pH 5.78.

Se encontró (cuadro 4A y 4B) para P. ayacahuite var. veitchii, que en los tratamientos con F. oxysporum y la mezcla de cepas, hubo un mayor promedio de plántulas brotadas (71). En el tratamiento con mezcla de cepas aparte de haber habido más sobrevivientes (71) se tuvo mayor promedio (69) de plántulas sanas. Solamente ocurrieron dos casos de mal de semilleros de tipo postemergente del tratamiento con Alternaria sp., habiéndose logrado satisfactoriamente el reaislamiento de esta cepa.

Respecto al grupo de plántulas que presentaron diversidad de daños como los enumerados (excepto albinismo, defoliación parcial y lesiones por orugas) fueron encontrados 3 casos como mayor promedio distribuido en diversos tipos de daños, predominantemente el amarillamiento de puntas en los tratamientos con F. oxysporum y con mezcla de inóculos.

Para P. montezumae (cuadro 3A y 3B; gráficas 1,2) la mayor brotación de plántulas fue en promedio 52, de las semillas tratadas con F. oxysporum y con mezcla de cepas. El mayor número promedio de sobrevivientes (52) de semillas inoculadas ocurrió con F. oxysporum. El promedio mayor de

CUADRO 4. SITUACION DE LAS PLANTULAS DE Pinus ayacahuite var. veitchii Shaw.

EN LA SEGUNDA EPOCA DE SIEMBRA.

A. PROMEDIOS.

Brotadas.

Epoca de Siembra	Tratamiento		H <sub>1</sub> +H <sub>2</sub>	H <sub>0</sub>	Total
	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>			
I	0	0	0	0	0
II	69	71	71	67	278

Sobrevivientes.

Epoca de Siembra	Tratamiento		H <sub>1</sub> +H <sub>2</sub>	H <sub>0</sub>	Total
	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>			
I	0	0	0	0	0
II	68	70	71	67	276

Senas.

Epoca de Siembra	Tratamiento		H <sub>1</sub> +H <sub>2</sub>	H <sub>0</sub>	Total
	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>			
I	0	0	0	0	0
II	66	68	69	66	269

Plántulas con Otro Tipo de Daños.

Epoca de Siembra	Tratamiento		H <sub>1</sub> +H <sub>2</sub>	H <sub>0</sub>	Total
	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>			
I	0	0	0	0	0
II	2	3	3	1	9

B. NUMERO DE PLANTULAS ENFERMAS POR MAL DE SEMILLEROS.

Epoca de Siembra	Tratamiento		H <sub>1</sub> +H <sub>2</sub>	H <sub>0</sub>	Total
	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>			
I	0	0	0	0	0
II	2	0	0	0	2

Epoca de Siembra.

I: Noviembre de 1967.

II: Marzo-Mayo de 1968 (Primavera).

Tratamiento.

H<sub>1</sub>: Alternaria sp.      H<sub>0</sub>: Testigo.

H<sub>2</sub>: Fusarium oxysporum.

H<sub>1</sub>+H<sub>2</sub>: F. oxysporum.



plántulas sanas (49) se observó proveniente de semillas inoculadas con la mezcla de cepas. En ningún tratamiento ocurrieron plántulas enfermas de mal de semilleros. Otro tipo de daños (observándose solamente amarillamiento total y de puntas, defoliación total y albinismo) tuvieron mayor incidencia, promedio de 3, en los tratamientos correspondientes a inoculación con *F. oxysporum*, a inoculación con la mezcla de cepas y al testigo, siendo el principal daño el amarillamiento.

Comparando el comportamiento del *P. montezumae* se encontró que en la primera época de siembra, en relación a la segunda (cuadro 3A y 3B), hubo promedio mayor de brotación (251), sobrevivientes (243), sanas (223), plántulas con incidencia de otro tipo de daños (24) así como número de plántulas enfermas (13) por mal de semilleros; no encontrándose diferencias significativas ( $P > .05$ ) entre los tratamientos con los diferentes inóculos, de acuerdo con los resultados obtenidos en el anova de los dos factores, inóculo y época de siembra (v. apéndice). En contraste se encontraron diferencias significativas ( $P < .05$ ) entre las dos épocas de siembra, en cuanto a las plántulas brotadas y las sobrevivientes ( $P < .000$ ), las sanas ( $P < .012$ ) y aquellas que mostraron otro tipo de daños ( $P < .017$ ) en el mismo anova, significando ésto que la época de siembra tuvo influencia entre las variables consideradas para *P. montezumae*.

#### Tercera Época de Siembra.

Con base en los resultados obtenidos en las dos épocas de siembra precedentes, se realizó esta tercera siembra con fines comprobatorios, tratando de precisar posibles causas de diferencia en los resultados experimentales, precedentes.

Para el caso, las semillas fueron inoculadas por dos métodos: el originalmente empleado y una modalidad; la siembra en el mismo suelo, remanente de las pruebas precedentes, sin asepticar, efectuada bajo condiciones de temperaturas medias atmosféricas de 21.53°C y del suelo 19.07°C, 60% de humedad del suelo y pH de suelo de 5.53.

Los resultados de la siembra de *P. avacahuite* var. *veitchii* (cuadro 5A y 5B; gráficas 3,4,5), empleando el método original de inoculación, señalaron que hubo un promedio mayor (78) de brotadas, sobrevivientes y sanas en el tratamiento con la mezcla de cepas. Ninguna plántula fue afectada por mal de semilleros, ni presentó algún otro tipo de daños.

CUADRO 5. SITUACION DE LAS PLANTULAS DE LAS DOS ESPECIES DE PINO  
EN LA TERCERA EPOCA DE SIEMBRA (Mayo - Julio de 1988).

A. PROMEDIOS

P. ayacahuite var. veitchii Shaw.

P. montezumae Lamb.

Brotadas.

Met. de Inoculación \ Tratamiento	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>1</sub> +H <sub>2</sub>	H <sub>0</sub>	Total
Original	72	73	78	74	297
Modalidad	74	67	72	73	286

Met. de Inoculación \ Tratamiento	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>1</sub> +H <sub>2</sub>	H <sub>0</sub>	Total
Original	76	70	72	77	295
Modalidad	66	57	66	61	250

Sobrevivientes.

Met. de Inoculación \ Tratamiento	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>1</sub> +H <sub>2</sub>	H <sub>0</sub>	Total
Original	72	73	78	74	297
Modalidad	72	65	66	73	276

Met. de Inoculación \ Tratamiento	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>1</sub> +H <sub>2</sub>	H <sub>0</sub>	Total
Original	76	68	72	76	292
Modalidad	53	54	53	60	220

Sanas.

Met. de Inoculación \ Tratamiento	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>1</sub> +H <sub>2</sub>	H <sub>0</sub>	Total
Original	72	73	78	74	297
Modalidad	72	56	65	73	266

Met. de Inoculación \ Tratamiento	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>1</sub> +H <sub>2</sub>	H <sub>0</sub>	Total
Original	73	64	68	73	278
Modalidad	48	51	45	60	204

Plántulas con Otro Tipo de Daños.

Met. de Inoculación \ Tratamiento	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>1</sub> +H <sub>2</sub>	H <sub>0</sub>	Total
Original	0	0	0	0	0
Modalidad	2	10	6	1	19

Met. de Inoculación \ Tratamiento	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>1</sub> +H <sub>2</sub>	H <sub>0</sub>	Total
Original	3	5	4	5	17
Modalidad	19	6	21	1	47

## CUADRO 5. CONTINUACION.

Pinus ayacahuite var. veitchii Shaw.Pinus montezumae Lamb.

## B. NUMERO DE PLANTULAS ENFERMAS POR MAL DE SEMILLEROS

Tratamiento Met. de Inoculación	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>1</sub> +H <sub>2</sub>	H <sub>0</sub>	Total
Original	0	0	0	0	0
Modalidad	1	3	3	0	7

Tratamiento Met. de Inoculación	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>1</sub> +H <sub>2</sub>	H <sub>0</sub>	Total
Original	1	2	0	0	3
Modalidad	0	1	1	0	2

Método de Inoculación.

- . Original.
- . Modalidad de Inoculación.

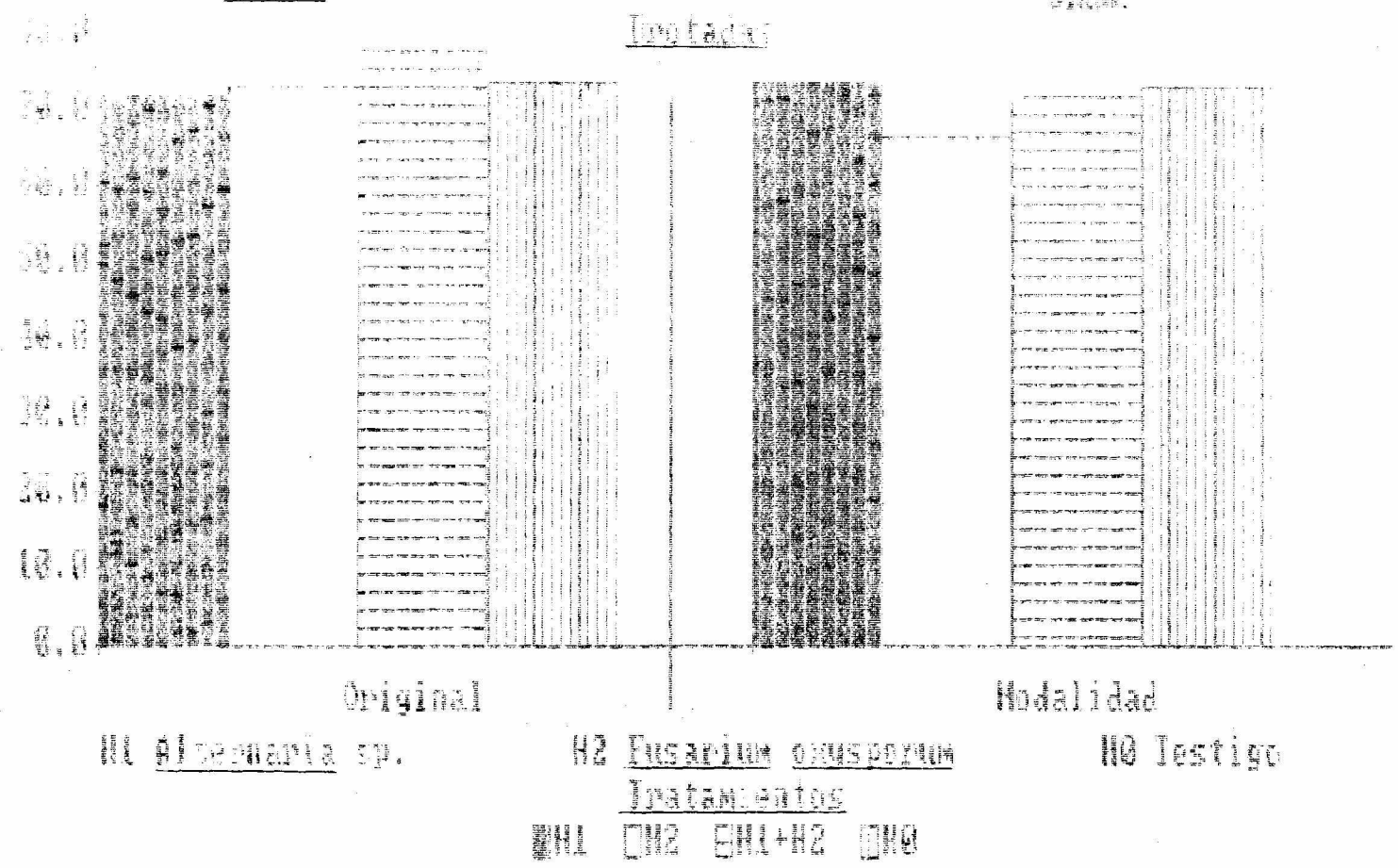
Tratamiento.

- H<sub>1</sub>: Alternaria sp.
- H<sub>2</sub>: Fusarium oxysporum.
- H<sub>1</sub> + H<sub>2</sub>: F. oxysporum y Alternaria sp.
- H<sub>0</sub>: Testigo.

GRAFICA 3.

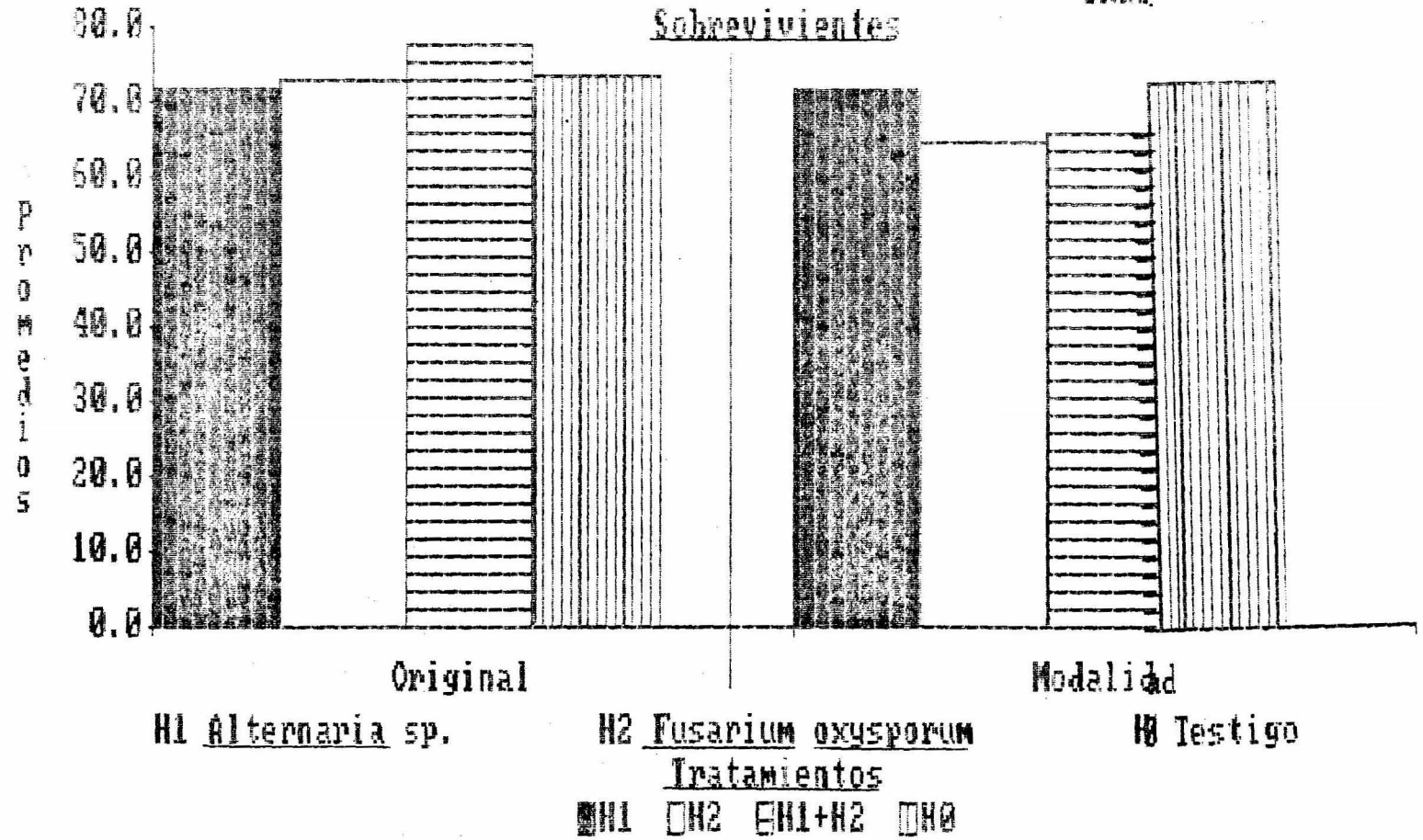
Pinus ayacahuite var. veruculifera

Shaw

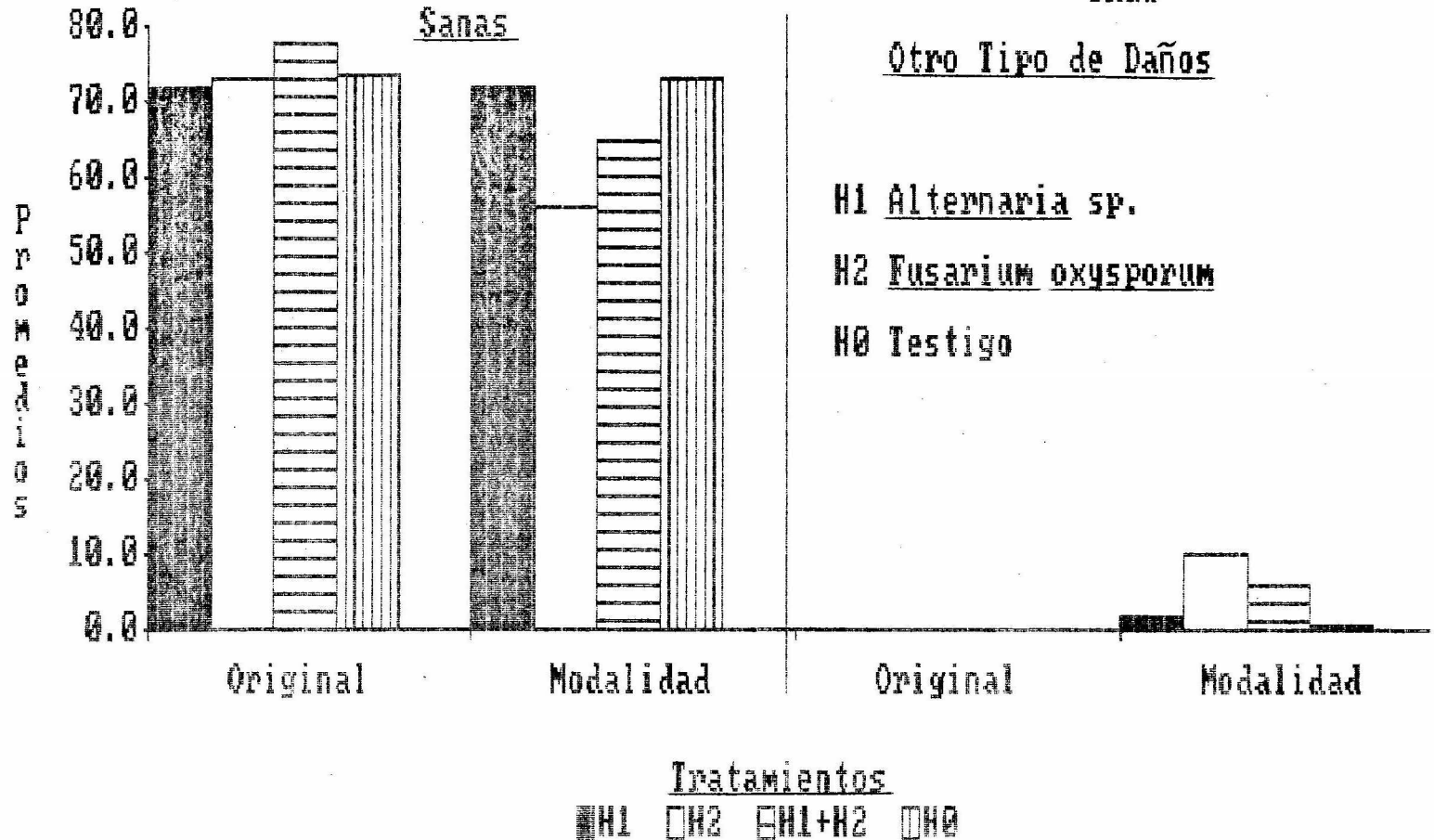


GRAFICA 4.

Pinus ayacahuite var. veitchii Sham  
Supervivientes



GRAFICA 5.

Pinus ayacahuite var. veitchii Shaw

De la modalidad de inoculación (cuadros 5A y 5B ; gráficas 3,4,5), resultó una brotación de plántulas de promedio mayor (74) con Alternaria sp. El testigo tuvo mayores promedios de plántulas sobrevivientes y sanas (73). Se encontraron 7 plántulas enfermas por mal de semilleros postemergente con sintomatología típica y raíz chupada; una de ellas procedente del tratamiento con Alternaria sp., 3 de F. oxysporum y 3 de la mezcla de cepas. De todas las plántulas enfermas se logró reaislar a los hongos inoculados; de las inoculadas con mezcla de cepas sólo se reaisló a Fusarium.

También se encontraron plántulas con otro tipo de daños (excepto amarillamiento, albinismo, lesiones y defoliación parcial) pero apareció raquitismo, siendo el tratamiento con F. oxysporum el que dió mayor daño en promedio (10) por raquitismo.

Respecto a los resultados de P. montezumae empleando el método de inoculación original (cuadro 5A y 5B; gráficas 6 y 7), se obtuvo mayor brotación en promedio en el testigo (77). En el tratamiento con Alternaria sp. y en el testigo se tuvieron los mayores promedios de sobrevivientes (76) así como de plántulas sanas (73). Se encontraron plántulas enfermas del tipo postemergente, dos procedentes del tratamiento con F. oxysporum (reaislado de una de ellas) y una del tratamiento con Alternaria sp.

De las plántulas afectadas por otro tipo de daños (cuadro 5A; gráfica 7) observándose solamente defoliación total de plántulas y deformaciones) observándose además raquitismo, así como plántulas dobladas por exceso de agua; se tuvieron los mayores promedios (5) de dañadas en el tratamiento con F. oxysporum y en el testigo con incidencia principalmente de raquitismo.

Respecto a los resultados de la aplicación de la modalidad de inoculación, para P. montezumae (cuadro 5A y 5B; gráficas 6 y 7), se encontró mayor promedio de brotadas (66) en los tratamientos con Alternaria sp. y con la mezcla de cepas; mayor promedio (60) de sobrevivientes y plántulas sanas en el testigo. Solamente hubieron dos plántulas enfermas por mal de semilleros postemergente, procedentes éstas del tratamiento con F. oxysporum y con la mezcla de cepas, de las cuales se reaisló el hongo F. oxysporum. Por último el número promedio mayor de plántulas (21) con otro tipo de daños (excepto secamiento y amarillamiento de puntas, albinismo, defoliación parcial y deformaciones) apareciendo además plántulas dobladas por exceso de agua, e individuos con raquitismo, fue -

encontrado en el tratamiento con la mezcla de cepas, en gran proporción como plántula totalmente defoliada.

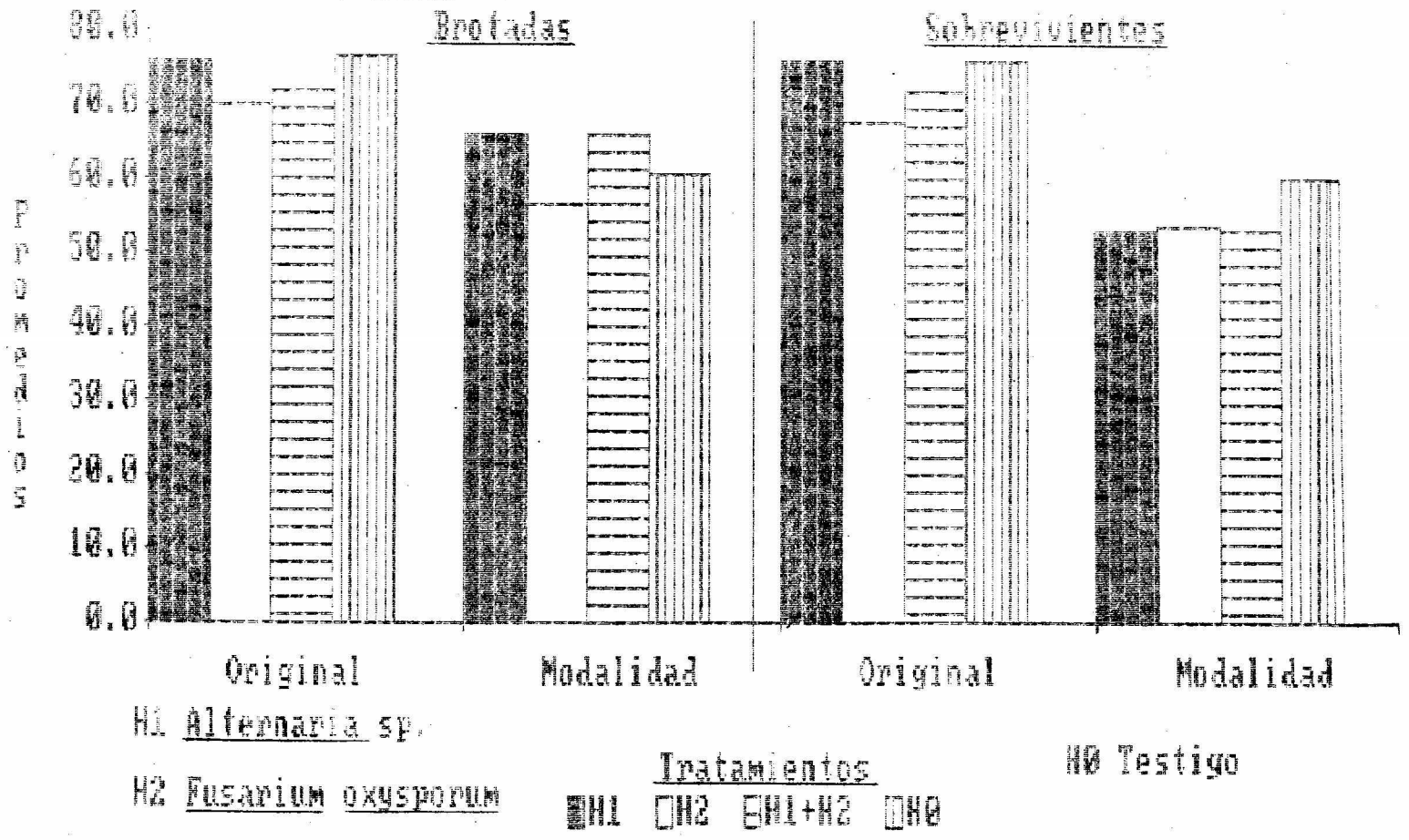
Concluyendo resultados de la tercera época de siembra (cuadro 5A y 5B): la especie de P. avacahuite var. veitchii tuvo, por el método de inoculación original respecto a la modalidad empleada, en promedio mayor brotación (297), sobrevivientes (297) y sanas (297); con el otro método hubieron también en promedio más dañadas (19) y número de enfermas por mal de semilleros (7).

En forma similar la especie de P. montezumae (cuadro 5A y 5B), tuvo también de la inoculación original, en promedio mayor brotación (295), sobrevivientes (292) y sanas (278) y más número de plántulas enfermas por mal de semilleros (3). Con la modalidad se presentaron más plántulas dañadas en promedio (47) y sólo dos enfermas por mal de semilleros.

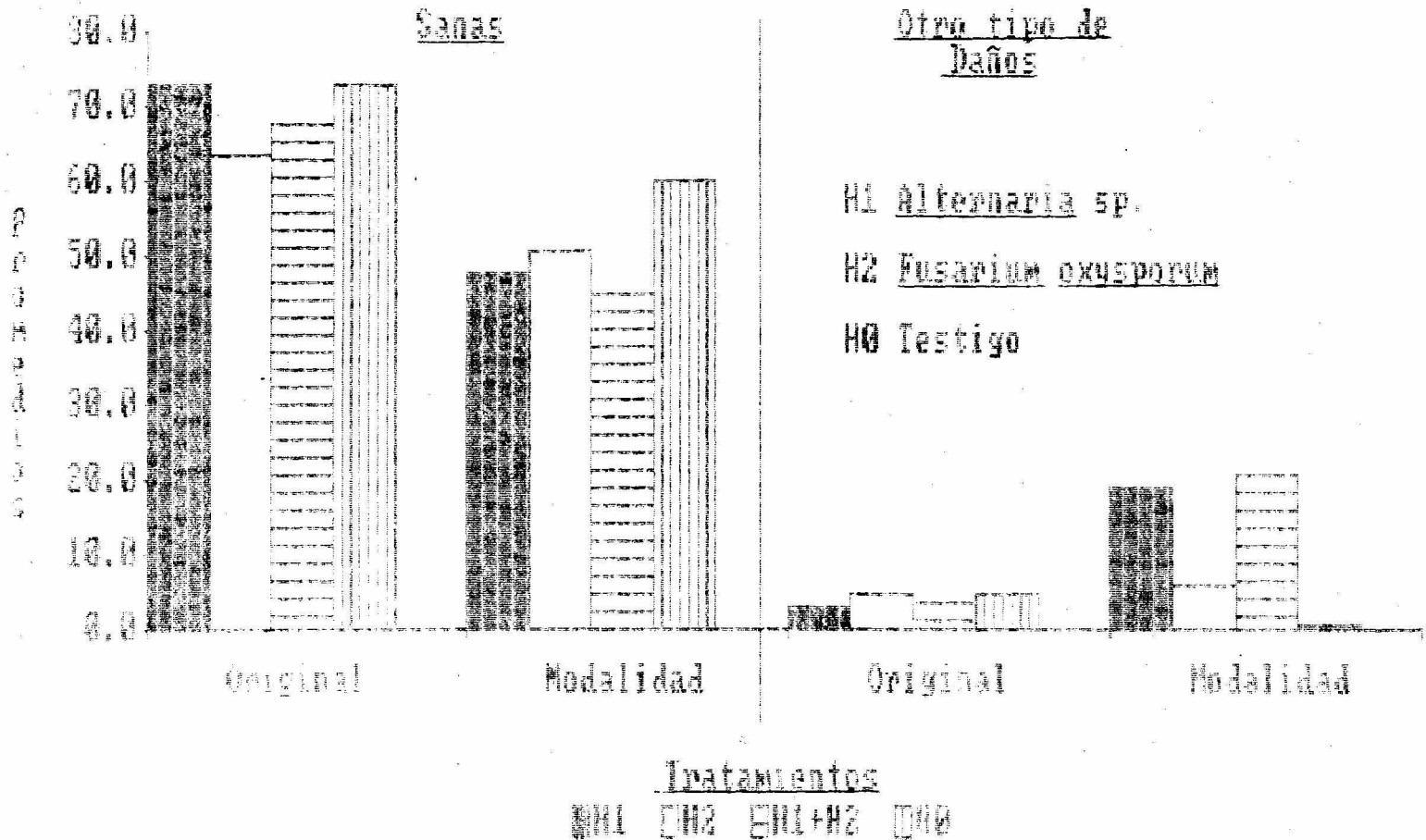
Tocante a los resultados de la aplicación del anova de tres factores, especie de pino, método de inoculación e inóculo, (v. apéndice) se encontraron diferencias significativas ( $P < .05$ ) entre las dos especies de pino, en cuanto a plántulas sanas, con otro tipo de daños ( $P < .000$ ) y sobrevivientes ( $P < .012$ ). Así hubieron diferencias significativas ( $P < .05$ ) entre los métodos de inoculación en cuanto a plántulas sanas, otro tipo de daños ( $P < .000$ ), plántulas sobrevivientes ( $P < .001$ ) y plántulas brotadas ( $P < .015$ ). Hubieron también diferencias significativas entre los inóculos respecto a plántulas con otro tipo de daños ( $P < .021$ ) y no significativas ( $P > .05$ ) para el resto de las variables dependientes.



GRAFICA 6. Pinus montezumae Lamb.



GRAFICA 7.

Pinus montezumae Lamb.

## DISCUSION.

De acuerdo con los objetivos planteados y forma de trabajo efectuada, los resultados obtenidos fueron circunstanciales por haberse realizado las siembras en diferentes épocas, empleando semillas cosechadas en épocas muy distantes y procedentes de distintas localidades, sometidas o no a condiciones de almacenamiento, y utilizado cepas de hongos de distinto origen; así mismo porque el trabajo se llevó en condiciones prácticamente naturales, estando así la prueba expuesta a influencias múltiples del ambiente, o a accidentes imprevistos.

Bajo tales situaciones los resultados no fueron como se esperaban, puesto que hubo falla en la germinación de la semilla de P. ayacahuite var. veitchii (lote 619 A) en la primera época de siembra; en las tres épocas de siembra fue nula o baja la proporción de plántulas de ambas especies de pino con síntomas de mal de semilleros; en algunos casos de plántulas enfermas de este mal no se logró la recuperación o reaislamiento de los inóculos introducidos, y de los hongos aislados de éstas plántulas con sintomatología típica ninguno se reconoce con cualidades patogénicas propias, ni alguno fue identificable con cualquiera de los inoculados.

El hecho de haber empleado en la primera siembra semilla de P. ayacahuite var. veitchii con 10 años transcurridos a partir de su recolección, pudo haber sido causa determinante de la falla en su germinación. Es por consecuencia excluible que esta falla fuera debida a algún tipo de latencia en la semilla, puesto que se considera que las semillas del género Pinus en términos generales no caen en las características de semillas de difícil germinación de modo que requieran de algún tratamiento para romper su latencia, tal como sucede en otras especies (Villagómez y Carrera, 1979; Musálem, 1984) además de haberse confirmado en los resultados de buena germinación ocurrida en la semilla fresca de esta misma especie.

A pesar de que las semillas de los pinos empleados pudieron estar dentro de su período de vida bajo condiciones óptimas (Ewart, 1925, cit. Patiño et al., 1983) y conservar su calidad mesobiótica (de viabilidad de 3 a 15 años) las respuestas de las semillas del P. ayacahuite var. veitchii (lote 619 A) en comparación con las del segundo lote de ésta misma especie y los lotes de -

P. montezumae fueron definitivamente distintas siendo probable que la falla en la germinación del primer lote de P. ayacahuite fuera causada también por influencia de las condiciones ambientales de almacenamiento incontrolado respecto al mantenimiento del contenido de humedad de la semilla, lo que pudo haber afectado su viabilidad (Patiño et al., 1983; Moreno, 1984).

Los hongos aislados de semillas en el análisis micológico, tampoco prestan argumento justificante de la falla aludida; así Penicillium sp., aislado de embriones, aunque se asocia con deterioro de semillas (Christensen y Kaufmann, 1969, cit. Moreno, 1984); Báez, 1986) se desconoce que tenga un papel patogénico definido (Fisher, 1941; Tint, 1945a); el representante de Rhizopus sp., encontrado como contaminante superficial de semillas enteras sin aseptizar fue suprimido por el tratamiento de asepsia y por lo tanto queda fuera de consideración ligarlo a algún proceso patológico, por lo menos en lo correspondiente al trabajo realizado.

La situación de que de una semilla entera aseptizada fuera aislada una cepa de Aspergillus sp., no es dato suficiente para dudar sobre el efecto del aseptizante, ya que quizás la semilla al estar en contacto con las demás, no fue plenamente bañada por el aseptizante o fue insuficiente el tiempo de acción.

El hecho de que uno de los lotes de semilla de P. ayacahuite var. veitchii y los de P. montezumae empleados no presentaran problemas en la germinación, conduce a asegurar que las semillas estuvieron en tal aspecto en buenas condiciones, puesto que dieron una buena proporción de plántulas brotadas cuyas fallas en esta etapa no son atribuibles en su totalidad a deficiencias en la germinación, sino a factores externos del suelo o del ambiente.

Las diferencias en brotación entre lotes de P. montezumae (cuadros 3A y 5A; gráficas 1 y 6) se estiman debidas a que entre las fechas de colecta respecto a la siembra hubieron lapsos relativamente largos (9 a 10 años) siendo el más corto de 3, aunque en ambos casos la semilla permaneció en condiciones similares de almacenamiento y por consecuencia debió de estar sometida uniformemente a su influencia proyectada en el tiempo. Esto en alguna forma y proporción pudo haber afectado la viabilidad de las semillas o repercutir en la vigorosidad de las plántulas generadas. La disminución cuantitativa de la brotación de semilla del lote 655 de P. montezumae en la segunda época

de siembra (cuadro 3A; gráfica 1) comparativamente con la de la primera época, apoyada por la anova de dos factores (v. apéndice), se interpreta en el sentido de que los cuatro meses transcurridos entre cada época de siembra fueron suficientes para provocar un decremento considerable de la viabilidad en esta semilla, acumulativo a un largo tiempo de almacenamiento desde el momento de su recolección.

Respecto a las diferencias en brotación en la tercera época de siembra, especialmente en P. montezumae, fueron posiblemente debidas a que al sembrar semilla ya germinada pudo ocurrirle un estado de "shock", no adaptándose al cambio brusco al que fue sujeta al pasar de su sustrato a otro. También puede pensarse en el probable daño causado por el manejo de las mismas al momento de la siembra. Aunque estadísticamente hubo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los métodos de inoculación respecto a las plántulas brotadas (v. apéndice) esa diferencia no fue originada por los inóculos, sino por haberse sembrado la semilla pregerminada y quedar sujeta a las circunstancias mencionadas.

Como en el caso de la variedad de P. ayacahuite, se descarta la posibilidad de que los hongos encontrados en los dos análisis micológicos de las semillas de P. montezumae fueran causa de la disminución de plántula brotada. En efecto, la presencia de Penicillium sp., carente de significado patogénico definido, y el aislamiento de una sola cepa de Alternaria sp. de embriones de semilla del lote 655, confirma una condición sanitaria interna cuantitativamente aceptable, aún cuando ésto no excluya la posibilidad de que otros contaminantes endóicos de semillas —como los reconocidos en los aislamientos preliminares— puedan tener cualidades patogénicas potenciales desconocidas, hayan resistido la desinfección de la semilla y llegado a ocasionar daños en las plántulas, —como fue el caso del aislamiento de una cepa de Alternaria sp. distinta a la inoculada con F. oxysporum, señalando ésto una alta posibilidad de que el microorganismo provino del interior de la semilla, ya que mostró similitud morfológica con la cepa aislada de embrión (cuadro 1).

La existencia de una baja proporción de plántulas con síntomas de mal de semilleros hace suponer que pudo haber alguna dificultad en la actividad de los inóculos (Alternaria sp. y F. oxysporum) sobre las plántulas. Es importante señalar la posibilidad de que alguna alteración en los

resultados respecto a la determinación de la patogenicidad de las dos cepas se haya debido a que no se siguió un procedimiento directo de inoculación a las semillas o a las plántulas, sino que se utilizó la posibilidad de infección únicamente por el inóculo adherido a la semilla, tal como podría esperarse que ocurriera en forma natural, al entrar las semillas en contacto con el suelo.

La adhesión de esporas a las superficies de las semillas, comprobada por los resultados positivos de la inoculación preliminar, no es garantía de que en las pruebas definitivas la proporción de esporas infectantes sea suficiente, de que todas hubieron estado maduras y viables y en condiciones óptimas de germinación; en otras palabras, que la capacidad para colonizar atribuible a un supuesto alto potencial de inóculo —explicado éste como la energía de crecimiento del parásito fungal inoculado disponible para la infección (Garret, 1960)— resultó sin embargo insuficiente.

El hospedero (semilla o plántula en su caso) puede a su vez presentar algún grado de resistencia física y química a la penetración fungal (Garret, 1960; Agrios, 1969) de modo que la oportunidad mayor de penetración exitosa en el hospedero, habrá de tenerse cuando haya: 1) presencia de un parásito suficientemente infectivo, 2) presencia de la planta hospedera receptiva y 3) ocurrencia de condiciones ambientales apropiadas para la penetración, colonización y desarrollo de la infección en la planta hospedera (Garret, 1960; Sharvelle, 1969) de modo que la falta de cualquiera de estos postulados constituye una causa de "escape" de las plántulas, a contraer la enfermedad.

En el trabajo que se trata pudo ocurrir alguna falla en términos de receptividad de las plántulas, deficiencia infectante de los inóculos o adversidad de clima, siendo entonces pocas las posibilidades de ocurrencia del mal de semilleros en las especies de pino trabajadas.

Al tomar en cuenta que en términos generales la influencia de ciertos factores ambientales como la temperatura tanto atmosférica como en el suelo, así como la humedad y pH de suelo, influirían importantemente propiciando la enfermedad (Tint, 1945b,c; Toole, 1964; Sharvelle, 1969) quedó implicado que podía ocurrir el establecimiento de mal de semilleros en las épocas de siembra. Sin embargo en las pruebas realizadas no ocurrió así, dado que aparte de los factores comúnmente concurrentes estuvieron complicados otros más, incidentales, que en alguna forma hubieron de influir sobre los resultados.

La confrontación de los resultados del presente trabajo con los de trabajos similares desarrollados en el extranjero bajo condiciones distintas, obedece a las circunstancias de que no existe información de esta naturaleza en México; así que conforme a esta reflexión se plantean las siguientes consideraciones:

Examinados algunos de esos factores comparativamente con fines críticos por haberse tomado como parámetros en el trabajo, se encuentran discrepancias leves o muy marcadas en otros, según lo que diferentes autores mencionan y lo que fue personalmente observado. Así las temperaturas medias de suelo registradas fueron menores a la de 26.6°C que indican Wright et al., (1956 ?) ya que en condiciones de almácigo parcialmente abierto, fluctuaron desde 21.61°C en la primera época de siembra, 21.76°C en la segunda y 19.07°C en la tercera.

Las temperaturas atmosféricas medias registradas en el almácigo en Coyoacán ( 24.19°C; 27.3°C y 21.53°C ) con poca variación son comparables a las reportadas por Tint en 1945a (20 a 27°C) y 1945c (25°C) y por Salisbury en 1952 cit. Lock, 1973, (24°C) con cultivos de Fusarium. Apoyando esto último Lock (1973) refiriéndose a F. oxysporum como un hongo de altas temperaturas. Como la información bibliográfica referida corresponde a la de pruebas controladas en las que las temperaturas tuvieron que ser prácticamente constantes durante todo el día, los datos correspondientes no prestan punto de apoyo comparativo para el presente trabajo, el que fue efectuado bajo condiciones no controladas, con registro de temperatura sólo al medio día, no durante todo el tiempo ni con anotación continua. Es pues factible que las condiciones térmicas atmosféricas en Coyoacán no fueron suficientes para causar un incremento importante en la temperatura del suelo, hasta grado de dar las condiciones favorables para la implantación de los inóculos y el desarrollo de la enfermedad.

Considerando el aspecto de mayor incidencia del mal de semilleros en P. montezumae en la primera época de siembra, en relación a la segunda, contrariamente a lo esperado, (cuadro 3B), se piensa que la condición prevaleciente en el almácigo influyó de alguna manera en la humedad ambiental dentro del mismo, ya que en esta época solamente hubo ventilación parcial pero constante (medio costado del almácigo descubierto fig. 1) ventilándose completamente sólo los días de observación y colecta de muestras, en contraste con la segunda época en la que siempre estuvo abierto todo un

costado del almácigo. Siendo así, es presumible que hubieron lapsos variables de concentración de la humedad en la atmósfera interna del almácigo producida por el vapor de agua circulante dentro — del dispositivo, como resultado de la evaporación del agua condensada en las paredes de la tela — plástica por efecto del calentamiento por el sol. Combinados los factores humedad y temperatura se dieron las condiciones apropiadas para que hubiera mayor incidencia de plántulas enfermas con muerte de puntas, situación común en ambientes húmedos en el mal de semilleros postemergente (Boyce, — 1961).

Si se consideran los trabajos de Vaartaja y Cram (1956) referidos a inoculaciones experimentales en condiciones de porcentajes de humedad de suelo fluctuantes de 80-90%, para el caso que se discute —pese a no haber sido medidas las humedades en forma continua— dieron sin embargo informae—ción, especiada en el tiempo, de dos épocas de siembra en que los valores de humedad (30 y 60%) — conforme a los conceptos de Agrios (1969) pudieron favorecer la germinación de esporas, la implantación y colonización en el hospedero y su dispersión de una plántula a otra; pero ser sin embargo bajos para propiciar la enfermedad, aparte de la interacción de otros factores, en las condiciones de trabajo en Coyoacán.

La situación de la sintomatología que mostraron las plántulas enfermas (raíz chupada) fue — indicio de la alta humedad (60%) del suelo que prevaleció en la tercera etapa.

En relación con el pH, este factor puede ser considerado invariable, teniendo en cuenta la — misma procedencia del suelo, su permanencia en el almácigo y que no fue sometido a tratamiento mo—dificador severo. En las tres épocas de siembra hubo reacción ácida (6.3; 5.78 y 5.53) condición que se considera desfavorable para el desarrollo del mal de semilleros (Jackson, 1940 ; Tint, 1945 b; Baxter, 1952) especialmente cuando alcanza valores cercanos al 5.5 (Tint, 1945c ; Boyce, 1961). Cabe señalar que el valor 6.3 registrado está cercano al punto de neutralidad y que este punto ha—sido determinado óptimo para el crecimiento de Fusarium spp., en condiciones de laboratorio (John—son, 1923, cit. Tint, 1945b; Moore, 1924, cit. Tint, 1945b) confirmado por Wright et al., (1956 ?). Hay entonces explicación al hecho de que en esta primera época hubiera habido mayor número de plán—tulas de pino enfermas.



Aparte de los factores mencionados se refieren los otros que se dice que favorecen a la enfermedad como son sombreado excesivo (Vaartaja, 1952), siembra densa (Baxter, 1952 ; Boyce, 1961)- intercambio de suelo entre los semilleros o aplicación de fertilizantes (Baxter, 1952; Boyce, 1961; Gómez, 1976) entre otros, los cuales no tuvieron participación en el caso que se trata.

Los análisis micológicos de suelo confirmaron el hecho de que no hubo condiciones apropiadas para la completa dispersión de los inóculos probados a través del sustrato. Consecuentemente puede pensarse que por ello disminuyeron las oportunidades de propagación de la enfermedad a otras plántulas, aunque queda considerar que el hecho de que el inóculo se disperse oportunamente no garantiza que sea infectivo. El haber logrado el reaislamiento de F. oxysporum solamente en análisis de suelo posteriores a la primera y a la tercera épocas de siembra, y en ninguno el el Alternaria, (cuadro 2), induce la idea de que las cepas correspondientes tuvieron respectivamente, baja o nula dispersión, siendo ésto causa probable de reducción cuantitativa de la población de enfermas. No se tiene explicación clara, de las causas que determinaron que de suelo asepticado, F. oxysporum fuera aislado al final de la primera época de siembra y no al final de la segunda (cuadro 2) pero es sospechable que al tomar la muestra de suelo del centro del lote (por no haber planta) aumentó la posibilidad de aislar al inóculo, ya que éste no se dispersó por todo el área de siembra hasta la orilla de la misma, donde fue tomada la muestra de la segunda época.

La solución de formaldehído al 6.5% aplicada al suelo como asepticante no fue de ninguna manera causante de la muerte o inactivación de los inóculos, puesto que la metodología seguida para la asepticación del suelo fue igual o muy similar a la seguida por varios autores (Sharville, 1969; Byrde, 1969).

Incluso se ha sugerido (Hartmann y Kester, 1985, cit. De la Garza, 1987) la aplicación de formol al 15%, siendo ésta una concentración mucho más alta que la empleada en el trabajo. Coinciden las informaciones al respecto en que la aireación del suelo es muy importante, habiendo sido esta práctica debidamente cumplida.

El formaldehído evidenció su eficacia al haber eliminado a casi a todos los hongos original

mente aislados del primer análisis de suelo, excepto a los que aparecieron resistentes al asepticizante, Phoma sp., Gliocladium sp., Penicillium sp. y Monocillium sp. (cuadro 2). Esto no excluye que en algún momento puedan aislarse hongos incluso que no se determinaron antes del uso del asepticizante (casos de Diplocladium sp. (?), Cladosporium sp., Monocillium sp. y Zygodessmus sp.) que no volvieron a encontrarse ni en suelo ni en plántulas, los cuales no constituyen causas de daños a las plántulas, aunque pudieron tener posibilidades de serlo.

La cepa de Fusarium distinta a la inoculada (cuadro 2) que no fue aislada de alguna plántula enferma o de la semilla empleada no tuvo evidente relación con la enfermedad; se considera que pudo haber provenido de vectores como el aire o el agua.

La predominancia de las cepas de Penicillium sp. y Trichoderma sp. (cuadro 2) al final de cada época de siembra confirma que bajo las condiciones de pH ácido que prevalecieron y a pesar de la asepticización con formaldehído estos géneros mostraron tener suficiente capacidad de dispersión y proporcionalidad (Wright, et al., aut. cit.) y respecto a Trichoderma, además, rapidez para colonizar el suelo (Warcup, 1951, cit. Sussman, 1968). Estos dos últimos géneros, especialmente Trichoderma, son considerados microorganismos antagonistas de Fusarium (Sequeira, 1962; Agrico, 1969) — siendo por lo tanto esta cualidad otro factor más que pudo interactuar junto con los mencionados e influir en la acción de los inóculos determinando así los resultados experimentales.

El reaislamiento inconstante de los hongos inoculados conduce a considerarlo debido a que los agentes patógenos no necesariamente estuvieron presentes en las plantas enfermas, sino que estando en el suelo actuaron a distancia mediante la difusión de ciertos de sus metabolitos capaces éstos de producir la misma sintomatología que los organismos directamente infectantes (Wheeler, 1968); por otra parte, pudieron incidir problemas de contaminación con otros microorganismos en los cultivos del material supuestamente infectada, que enmascararon la presencia de los hongos de interés e impidieron su aislamiento.

En la tercera época de siembra, no hubo una respuesta relevante en el número de plántulas enfermas al ser éste bajo en ambas especies como se puede observar en el cuadro 5B.

En la siembra en suelo sin asepticar, no hubo planta enferma por mal de semilleros en una - proporción importante, tal como pudiera haberse esperado; pero el hecho no excluye la conveniencia del uso del formaldehído, puesto que como se vió en los resultados, se confirma lo dicho sobre la - nula acción del formol sobre los inóculos. De igual manera se infiere que no hubo efecto del asepticante sobre las plántulas ya que no se encontró información referente al daño que puede ocasionar el uso de éste en almácigos, tal como se atribuye a otros fungicidas (bromuro de metilo y otros) - que causan clorosis y retardo del crecimiento en las plántulas (Wright, et al., 1956 ? ).

El peligro de eliminación de propágulos micorrícicos del suelo, por efecto del formaldehído, es improbable (Gibson y Salinas, 1985) como lo evidenció la presencia de micorrizas en las plántulas que permanecieron en el almácigo durante un mes (P. montezumae) hasta 5 (las dos especies de pinos) después de concluída la prueba.

El no haberse calculado la anova de dos factores para el número de plántulas de P. montezumae con mal de semilleros, ni la anova de tres factores para el número de plántulas con mal de semilleros en la tercera época, fue debido a que no hubo plántula enferma de P. montezumae en la segunda época ni de P. ayacahuite var. veitchii inoculada por el método original en la tercera época de siembra. Este cálculo evidentemente que habría determinado resultados significativos para los - casos donde aparecieron plántulas enfermas. Pero independientemente del hecho, los resultados objetivamente permitieron la observación de que la planta no siguió el patrón de comportamiento supuesto y que los inóculos no tuvieron sobre esas poblaciones el efecto esperado.

La observación de incidencia de otro tipo de daños como amarillamiento, mal de semilleros de etiología no común, defoliación, raquitismo entre otros, fueron ajenos en algunos casos a la actividad patogénica de los inóculos de prueba; así por ejemplo las defoliaciones, ya fueran parciales o totales, como algunas lesiones, tuvieron por causa la actividad de larvas de insectos; ciertos traumatismos se originaron por accidentes imprevistos como el golpe de agua de lluvia infiltrada al almácigo a través de rajaduras de la cubierta de plástico o de las mallas de tela de gallinero causó el doblamiento de plántulas y el reblandecimiento del suelo y sus consecuencias.

Otros daños (amarillamiento, secamiento de puntas, etc.) tampoco tuvieron indicadores de rela

ción patogénica de los hongos prueba, si se tiene presente que los lotes testigos, libres de inóculo ( $H_0$ ) se encontraron plántulas con alguno o varios de estos daños (cuadros 3A, 4A y 5A; gráficas 2, 5 y 7).

Los daños en los testigos fueron similares o menores en comparación con el resto de los tratamientos, eliminando con ello cualquier efecto de los inóculos, apoyando ésto la primera anova — calculada (v. apéndice). Aún que en la segunda anova sí hubieron diferencias significativas (v. apéndice) en este sentido desde el punto de vista biológico ésto no se cumple ya que no todos los daños tuvieron relación con los inóculos, como se mencionó anteriormente.

Los daños manifestados como amarillamiento, secamiento de puntas, albinismo, raquitismo, deformaciones, son explicables más con relación a la calidad de la semilla, como deficiencias fisiológicas intrínsecas. Esto es confirmado por la circunstancia de que el amarillamiento de las plántulas de *P. montezumae*, por ejemplo, se presentó en las dos épocas de siembra cuando se utilizó semilla colectada de 9 a 10 años antes, no presentándose en contraste en la siguiente siembra, correspondiente a semilla menos vieja.

En cuanto al raquitismo, además de lo antes expuesto, posiblemente hubo deficiencia de vigorosidad radicular, insuficiente para cumplir las funciones en el aporte de agua (Bidwell, 1979) — causada por una condición inadecuada de una alta humedad en el suelo.

Las plántulas que mostraron mal de semilleros de etiología no común o típica de la enfermedad, de las que no fue posible el aislamiento de los hongos inoculados ni de algún otro patógeno conocido, pero de las que se logró aislar a hongos identificables, como *Penicillium* sp. y *Trichoderma* sp., ponen en duda que éstos se relacionen directamente con la enfermedad (Riffle y Strong, 1960, cit. Gómez y Yáñez, 1978) como entidades patogénicas, tal como ocasionalmente ha sido mencionado, puesto que se les desconoce algún papel patogénico francamente decisivo y más bien se califican como saprófitos (concepto personal).

El incremento de plántulas de *P. montezumae* dañadas (cuadro 5A; gráfica 7) en los tratamientos con *Alternaria* sp., y con la mezcla de cepas con la modalidad de inoculación fue debida a la —

ubicación de los lotes en el almácigo (fig. 2) donde en alguno de los lotes, incidieron factores de otra naturaleza.

Por otra parte resulta obvio que en una población dada un aumento del número de plántulas dañadas y enfermas por mal de semilleros presenta relativamente la disminución del número de plántulas sanas y sobrevivientes, cualquiera que haya sido causa del aumento aludido (v. cuadros y gráficas relativas).

La defoliación total, plántulas con mal de semilleros típica y de etiología no común, y lesiones traumáticas por causas imprevistas, sumaron sus efectos numéricos reflejándose en el promedio original de plántulas brotadas y de sobrevivientes que existió en algunos casos (v. cuadros y gráficas).

Es importante señalar que aunque las plántulas sanas estuvieron dentro de las sobrevivientes, esto no significa que todas las sobrevivientes estuvieron sanas por no presentar algún tipo de daño en el momento de conteo, siendo éste un punto importante ya que en un tiempo futuro esta condición puede repercutir negativamente en el establecimiento de la planta, calidad y progenie de la misma; así como las incipientemente enfermas por mal de semilleros puedan contagiar al resto y representar un riesgo de magnitud impredecible.

En términos generales, en las tres épocas de siembra, las plántulas sobrevivientes y sanas de ambas especies de pino, fueron semejantes entre los tratamientos, observándose nuevamente una nula acción de los inóculos probados, como lo apoyó la primera anova (v. apéndice).

P. montezumae fue la especie en donde la diferencia de los promedios de plántulas brotadas, sobrevivientes y sanas fue mayor entre los dos métodos de inoculación, posiblemente porque las plántulas no lograron adaptarse al cambio de sustrato, además de haber incidido diversos daños.

Independientemente del experimento, fue posible observar los pinos una vez concluida la tercera prueba, durante 5 meses más. En general puede decirse que un número de plántulas de ambas especies de pinos mostraron recuperación de algunos de los daños sufridos (amarillamiento, doblamiento) como algunos otros (P. montezumae) que presentaron raquitismo no lograron su recuperación.

## CONCLUSIONES.

De lo anteriormente expuesto, se pueden concluir los siguientes puntos:

- 1.- No se comprobó en toda su amplitud la actividad patogénica de Fusarium oxysporum (Schl.) em. - Snyder. & Hans., como causante de mal de semilleros, en ninguna de las especies de pino sembradas -- (Pinus montezumae Lamb., y Pinus ayacahuite var. veitchii Shaw).
- 2.- Queda en duda el papel patogénico de la cepa de Alternaria sp., Nees sobre ambas especies de pino.
- 3.- Hubo inoculación, aunque no en la proporción que se esperaba, manifiesta en el número de plántulas enfermas por mal de semilleros.
- 4.- No hubo la influencia esperada de los inóculos sobre plántulas sobrevivientes, sanas, brotadas y dañadas.
- 5.- No hubo influencia patogénica sobre la población de plántula atribuible a la modalidad de inoculación.
- 6.- Es sospechable una deficiencia de los inóculos influenciada por acciones referibles a temperatura, humedad, pH, microorganismos antagonistas, incluso a falta de sincronización entre la receptividad de la planta y agresividad del inóculo.
- 7.- F. oxysporum (Schl.) em. Snyder. em. Snyder. & Hans., fue la cepa más frecuentemente recuperada de plántula enferma, incluidas las inoculadas con la mezcla de cepas.
- 8.- Fue confirmable la sensibilidad a la enfermedad del P. montezumae Lamb., especialmente cuando el agente causal fue F. oxysporum (Schl.) em. Snyder. & Hans., (Sánchez, 1968) así como su predisposición a presentar otro tipo de daños estando supuestamente implicada la edad de la semilla.
- 9.- El mayor número de plántulas enfermas por mal de semilleros, contrariamente a lo esperado bajo las condiciones invernales existentes, ocurrió en la primera época de siembra (Noviembre de 1987).
- 10.- Algunos de los daños (anarillamiento, secamiento de puntas, albinismo, raquitismo y deforma

ciones) estuvieron relacionados más con la calidad de la semilla que con los inóculos.

11.- Daños como defoliación, lesiones, traumatismos por accidentes imprevistos, doblamiento de plántulas por exceso de agua, fueron ajenos a los inóculos.

12.- Los promedios de sobrevivientes y sanas fueron directamente influenciados por la incidencia de plántulas enfermas por mal de semilleros, así como por las que presentaron otro tipo de daños.

13.- A pesar del bajo número de plántula enferma, desde el punto fitopatológico, un caso puede representar riesgo de magnitud impredecible en un lapso futuro.

14.- La falla en la germinación de *P. ayacahuite* var. *veitchii* Shaw lote 619 A fue causada por el tiempo transcurrido a partir de su recolección, así como por las condiciones ambientales de almacenamiento incontroladas.

15.- *P. montezumae* Lamb., fue más sensible que *P. ayacahuite* var. *veitchii* Shaw al trasplante de semilla pregerminada sufriendo disminución el promedio de plántula brotada y sobrevivientes.

16.- La asepsización de la semilla con peróxido de hidrógeno al 30% se cumplió óptimamente, no habiendo disminuido la germinación (Trappe, 1961).

17.- A pesar de que durante la realización del trabajo hubo que sortear algunas dificultades originadas por la problemática existente en una institución oficial como donde se desarrolló este trabajo referible con carencias de reactivos, material biológico y equipo, se considera que en el trabajo se cumplieron hasta donde fue posible los objetivos planteados así como se obtuvo información valiosa como sigue:

-La probabilidad de obtener planta bajo ciertas condiciones de siembra, fuera de la época común de producción en México, D.F. (Abril).

- Bajo las condiciones en las que se llevó a cabo el trabajo, fueron insignificantes las pérdidas de planta, por efectos del mal de semilleros.

- Es importante disponer de semilla de buena calidad, como es también importante observar el manejo y cuidado de la planta obtenida en almácigo.

-Es conveniente realizar análisis de semilla y del suelo de los almácigos a emplear, previamente a la siembra, para prevenir posibles pérdidas en viveros.

- El método de aseptización del suelo, habiendo sido efectivo, abre posibilidades para el uso del formaldehído como fungicida, para prevenir el mal de semilleros. Además se confirmó el hecho de que el formaldehído no elimina los propágulos micorrícicos del sustrato.

- Los aislamientos de Penicillium sp. y Trichoderma sp., de plántulas con mal de semilleros sugiere la conveniencia de realizar pruebas específicas con estos hongos para dilucidar su papel.

- La escasez de trabajos de este tipo en México, sugiere la necesidad de continuar y hacer estudios sobre el tema, ya que las pérdidas son muchas y afectan en gran medida la reforestación en nuestro país (Gómez y Yáñez, 1978).



## RESUMEN.

En el presente trabajo se propuso verificar el carácter patogénico de una cepa de Alternaria sp., Ness y una de Fusarium oxysporum (Schl.) em. Snyder & Hans., en la etapa de crecimiento de plántulas en camas de almácigos, correspondiente al lapso de riesgo de desarrollo del "mal de almácigos" o "damping-off".

Para el fin propuesto se emplearon dos cepas de las especies mencionadas, inoculadas en semillas de P. ayacahuite var. veitchii Shaw y P. montezumae Lamb., por dos procedimientos (exposición de semillas no germinadas y exposición de semillas previamente germinadas) constituyendo este material el de prueba en almácigo. Para la siembra en almácigos se realizaron pruebas preliminares para determinar la presencia natural endoica de los hongos mencionados mediante cultivos "in vitro" de las semillas de pino, así como análisis micológicos del suelo del almácigo antes y después de cada siembra, habiendo sido efectuadas tres respectivamente en tres épocas (Noviembre, Marzo y Mayo) en almácigo lotificado para 4 tratamientos con 4 repeticiones cada uno (para semilla inoculada con Alternaria sp., inoculada con F. oxysporum, mezcla de cepas y testigos, no inoculados). Antes de efectuar las primera y segunda siembras, se asepsizó el suelo del almácigo mediante formaldehído al 6.5%. En todo caso se registraron datos de número de plántulas brotadas, sobrevivientes, sanas y con otro tipo de daños. También se tomaron lecturas periódicas de temperatura atmosférica y de suelo, así como pH de suelo (la humedad de suelo sólo fue posible tomarla en Marzo y Mayo).

En base a los resultados, el bajo número de plántula enferma de mal de semilleros de ambas especies de pino, sugirió una posible deficiencia de los inóculos, influenciada por acciones referibles a temperatura, humedad, pH, microorganismos antagonistas, incluso a falta de sincronización entre la receptividad de la planta y la agresividad del inóculo, lo que concurrió a que no se comprobara en su totalidad la patogenicidad de F. oxysporum como causante de mal de semilleros, en ninguna de las especies de pino sembradas. Queda en duda el papel patogénico de la cepa de Alternaria sp., sobre ambas especies de pino. De ambos hongos hubo ciertamente inoculación, aunque no en la proporción que se esperaba, pero no hubo la influencia esperada de los inóculos sobre plántulas sobrevivientes, sanas, brotadas y dañadas, siendo en cambio confirmable la sensibilidad del P. montezumae a la enfermedad, especialmente cuando el agente causal fue F. oxysporum.

## BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Agricola, G.N. 1969. Plant pathology. Academic Press, N.Y. U.S.A. 629 P.
- 2.- Báez, O.M.G. 1986. Determinación de hongos en semillas de Pinus ayacahuite var. veitchii Shaw. TESIS. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. U.N.A.M. 59 P.
- 3.- Báez, O.M.G. 1987. Comunicación personal.
- 4.- Barnett, H.L. 1960. Illustrated genera of Imperfect Fungi. Second edition. Burgess Publishing Company. U.S.A. 225 P.
- 5.- Baxter, V.D. 1952. Pathology in forest practice. Second edition. John Wiley & Sons, Inc. N.Y. U.S.A. 601 P.
- 6.- Bidwell, R.G.S. 1979. Fisiología vegetal. AGT editor, S.A. México. 784 P.
- 7.- Boyce, S.J. 1961. Forest pathology. Third edition. McGraw Hill N. Y. U.S.A. 572 P.
- 8.- Byrde, R.J.W. 1969. Nonaromatic organics. Fungicides. Chemistry and physiology. Tongeson, D.C. (Ed.) Academic Press, U.S.A. 2: 531-578.
- 9.- Clark, F.E. 1965. Agar-plate method for total microbial count. Methods of soil analysis. Black, C.A. (Ed.) American Society of Agronomy, INC. Publisher. U.S.A. 2:1460-1466.
- 10.- De la Garza, L.P. 1987. Variación geográfica en estructuras reproductivas y crecimiento temprano de Pinus montezumae Lamb. TESIS. Fac. de Ciencias. U.N.A.M. 142 P.
- 11.- Fisher, P.L. 1941. Germination reduction and radicle decay of conifers caused by certain fungi. J. Agr. Research 62 (2): 87-95.
- 12.- Garret, S.D. 1960. Biology of root-infecting fungi. Cambridge University Press. London, G.B. 293 P.
- 13.- Gibson, I.A.S. 1979. Nursery root diseases. in. Diseases of forest trees widely planted as exotics in the tropics and Southern Hemisphere. Plant Pathology Commonwealth Micological - Institute. Surrey, England.:5-8.
- 14.- Gibson, I.A.S., y R. Salinas Q. 1985. Notas sobre enfermedades forestales y su manejo. Bol. Téc. Inst. Nal. Invest. For. (106). 196 P.

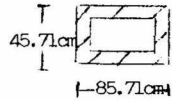
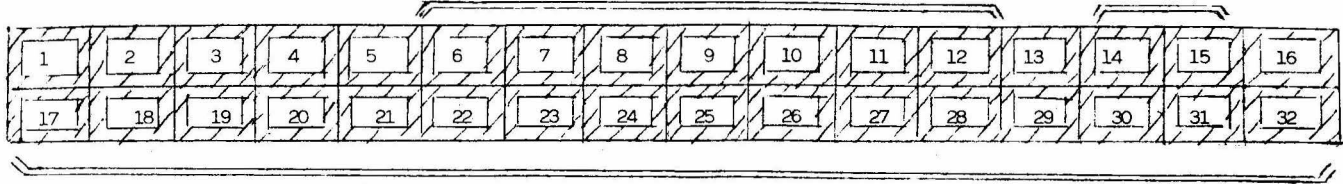
- 15.- Gilman, J.C. 1963. Manual de los hongos del suelo. Compañía Editorial Continental, S.A. México. 572 P.
- 16.- Gómez, N.M.S. 1976. Combate del "damping-off" en semilleros forestales. Bol. Div. Inst. Nal. Invest. For. (42) 13P.
- 17.- Gómez, N.M.S., y O. Yáñez M. 1978. Damping-off en Pinus montezumae Lamb. y su combate. Bol. Téc. (7) S.AaR.H. 31 P.
- 18.- Hartmann, H.T., y D.E. Kester. 1985. Propagación de plantas; principios y prácticas. C.E.C.S.A. México, 814 P.
- 19.- Hodges, C.S., y J.L. Rühle. 1969. Nursery diseases of southern pines. USDA Forest Serv. Forest Pest Leaflet (32): 1-8.
- 20.- Jackson, L.W.R. 1940. Effects of H-ion and Al-ion concentrations on damping-off of conifers and certain causative fungi. Phytopathology 30: 563-579.
- 21.- Lock, W. 1973. Fusarium root rot of Douglas fir nursery seedlings. Forest Insect & Diseases. Survey Pest Leaflet (61): 1-7.
- 22.- Molina, L.M. 1957. Microbiología de suelos y técnicas fitopatológicas. Ed. Universitaria, Guatemala, 287 P.
- 23.- Moreno, M.E. 1984. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología. U.N.A.M. 383 P.
- 24.- Musálem, S.M.A. 1984. Effect of environment factors on regeneration of Pinus montezumae Lamb. in a temperate forest of México. TESIS. Yale University. U.S.A. 244 P.
- 25.- Neal, J.L., Jr., J. M. Trappe, K.C. Lu, y W.B. Bollen. 1967. Sterilization of Red Alder seed coats with hydrogen peroxide. E. Science 13 (1): 104-105.
- 26.- Patiño, V.F., P. De la Garza L., Y. Villagómez A., J. Talavera A., y F. Canacho M. 1983. Guía para la recolección y manejo de semillas de especies forestales. Bol. Div. Inst. Nal. Invest. For. (63). 181 P.
- 27.- Peace, T.R. 1962. Pathology of trees and shrubs. Oxford University Press. Great Britain. 753 P.
- 28.- Pimentel, B.L. 1971. Viveros, semilleros portátiles y el trasplante anticipado. Bosques 8(3): 4-26.

- 29.- Salinas, Q.R. 1978. Problemas de enfermedades de especies forestales en viveros y plantaciones. Plantaciones Forestales, Primera Reunión Nacional. Dirección General de Investigación - Capacitación Forestales. Memorias. S.A.R.H. : 181-185.
- 30.- Sánchez, P.J.F. 1968. Actividad patogénica de Fusarium oxysporum Schlecht. ex Fr. y F. solani (Mart.) Apple y Wr. en Pinus montezumae Lamb., P. patula Schl., et Cham., y P. teocote Schl., et Cham. TESIS. Fac. de Ciencias. U.N.A.M. 70 P.
- 31.- Sequeira, L. 1962. Influence of organic amendments on survival of Fusarium oxysporum f. cubense. Phytopathology 52: 976-982.
- 32.- Sharville, E.G. 1969. Chemical control of plant diseases. University Publishing, Texas, U.S.A. 340 P.
- 33.- Sussman, A.S. 1968. Longevity and survivability of fungi. The fungi. Ainsworth, G.C., y A.S. Sussman (Eds.). Academic Press, U.S.A. 3: 447-486.
- 34.- Tint, H. 1945a. Studies in the Fusarium damping-off of conifers. I. The comparative virulence of certain Fusaria. Phytopathology: 35: 421-439.
- 35.- \_\_\_\_\_. 1945b. Studies in the Fusarium damping-off of conifers. II Relation of age of host, pH and some nutritional factors to the pathogenicity of Fusarium. Phytopathology 35: 440-457.
- 36.- \_\_\_\_\_. 1945c. Studies in the Fusarium damping-off of conifers. III. Relation of temperature and sunlight to the pathogenicity of Fusarium. Phytopathology 35: 498-510.
- 37.- Toole, E.R. 1964. Hardwood nursery diseases. PROCEEDINGS REGION & FOREST NURSERYMENS' CONFERENCES: 148-150.
- 38.- Trappe, J.M. 1961. Strong hydrogen peroxide for sterilizing coats of tree seed and stimulating germination. J. Forest 59 (11): 828-829.
- 39.- Vaartaja, O. 1952. Forest humus quality and light conditions as factors influencing damping-off. Phytopathology 42: 501-506.
- 40.- Vaartaja, O., y W.H. Cram. 1956. Damping-off of conifers and of Caragana in Saskatchewan. Phytopathology 46: 391-397.
- 41.- Vázquez, C.I., y R. Sánchez R. 1981. Identificación y control químico de damping-off en el vivero forestal "Lázaro Cárdenas". Ciencia Forestal 6(30): 3-19.

- 42.- Villagómez, A.Y., y M.S. Carrera S. 1979. Efectos de la estratificación de semillas en tres especies del género Pinus. Ciencia Forestal 4(17): 31-52.
- 43.- Wheeler, B.E.J. 1968. Fungal parasites of plants. The fungi. Ainsworth, G.C., y A.S. Sussman - (Eds.). Academic Press, U.S.A. 3: 179-210.
- 44.- Wright, E., G.M. Harvey, y C.A. Bigelow. 1956 (?). Tests to control Fusarium root rot of ponderosa pine in the Pacific Northwest. Tree Planters' Notes (59): 15-20.

APENDICE.

Fig. 1.. DISTRIBUCION DE LOS PINOS E INOCULOS EN EL ALMACIGO.



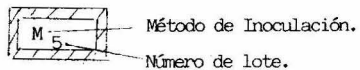
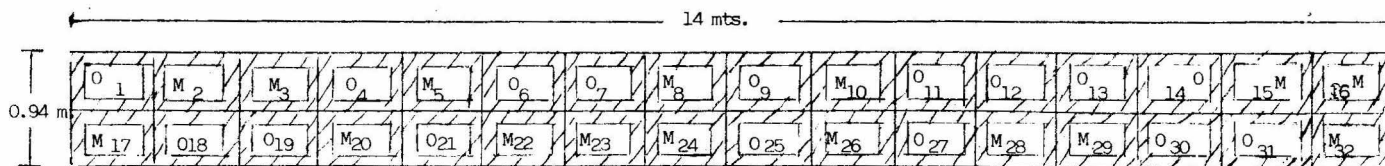
□ Area de Siembra.  
 ▨ Margen libre de 10 cm.

▨ Cuadros con tela de gallinero.

DESCRIPCION	CLAVE.
<i>P. montezumae</i> Lamb.	Pm
<i>P. avacahuite</i> var. <i>veitchii</i> Shaw.	Pav
<i>Alternaria</i> sp. Nees.	H <sub>1</sub>
<i>F. oxysporum</i> (Schl.) em Syd. & Hans.	H <sub>2</sub>
Mezcla de Cepas.	H <sub>1</sub> + H <sub>2</sub>
Testigo.	H <sub>0</sub>

Número de Lote.	Clave.	Número de Lote.	Clave.
• 1	PmH <sub>0</sub>	• 17	PmH <sub>1</sub> + H <sub>2</sub>
• 2	PmH <sub>2</sub>	• 18	PavH <sub>1</sub> + H <sub>2</sub>
• 3	PavH <sub>1</sub>	• 19	PavH <sub>2</sub>
• 4	PavH <sub>0</sub>	• 20	Pm H <sub>1</sub> + H <sub>2</sub>
• 5	PavH <sub>1</sub> + H <sub>2</sub>	• 21	PmH <sub>2</sub>
• 6	PmH <sub>1</sub>	• 22	PmH <sub>0</sub>
• 7	PavH <sub>2</sub>	• 23	PavH <sub>1</sub>
• 8	PavH <sub>0</sub>	• 24	PavH <sub>1</sub> + H <sub>2</sub>
• 9	PmH <sub>1</sub> + H <sub>2</sub>	• 25	PmH <sub>0</sub>
• 10	PavH <sub>2</sub>	• 26	PmH <sub>1</sub>
• 11	PavH <sub>1</sub>	• 27	PavH <sub>0</sub>
• 12	PavH <sub>1</sub> + H <sub>2</sub>	• 28	PmH <sub>2</sub>
• 13	PmH <sub>1</sub>	• 29	PmH <sub>0</sub>
• 14	PavH <sub>1</sub>	• 30	PmH <sub>1</sub> + H <sub>2</sub>
• 15	PavH <sub>0</sub>	• 31	PmH <sub>2</sub>
• 16	PmH <sub>1</sub>	• 32	PavH <sub>2</sub>

Fig. 2. DISTRIBUCION DE LOS METODOS DE INOCULACION EN EL ALMACIGO.



Método de Inoculación.

O : Método original de inoculación (agitación).

M : Modalidad de inoculación (germinación de semilla in vitro junto con la cepa a probar)

En cada uno de los lotes se sembró la misma especie de pino  
y se inoculó al mismo hongo mostrado en la figura 1.



TABLA DE ANOVA 1.

*P. montezumae* Lamb. PRIMERA Y SEGUNDA SIEMBRAS.

<u>Plántulas Brotadas.</u>					
<u>Fuente</u>	<u>SC</u>	<u>G° 1</u>	<u>CM</u>	<u>F calculada</u>	<u>Prob. de rechazo.</u>
. Hongos	51.594	3	17.198	.280	.839 NS
. Siembras	1,417.781	1	1,417.781	23.120	.000 ***
. Hongos-Siembras	152.344	3	50.781	.828	.491 NS
. Error	1,471.750	24	61.323		

<u>Plántulas Sobrevivientes.</u>					
<u>Fuente</u>	<u>SC</u>	<u>G° 1</u>	<u>CM</u>	<u>F calculada</u>	<u>Prob. de rechazo.</u>
. Hongos	35.125	3	11.708	.187	.904 NS
. Siembras	1,128.125	1	1,128.125	17.996	.000 ***
. Hongos-Siembras	185.125	3	61.708	.984	.417 NS
. Error	1,504.500	24	62.688		

<u>Plántulas Sanas.</u>					
<u>Fuente</u>	<u>SC</u>	<u>G° 1</u>	<u>CM</u>	<u>F calculada</u>	<u>Prob. de rechazo.</u>
. Hongos	24.344	3	8.115	.091	.964 NS
. Siembras	657.031	1	657.031	7.383	.012 **
. Hongos-Siembras	197.594	3	65.865	.740	.539 NS
. Error	2,135.750	24	88.990		

<u>Plántulas con Otro Tipo de Daños.</u>					
<u>Fuente</u>	<u>SC</u>	<u>G° 1</u>	<u>CM</u>	<u>F calculada</u>	<u>Prob. de rechazo.</u>
. Hongos	25.094	3	8.365	.587	.629 NS
. Siembras	94.531	1	94.531	6.639	.017 **
. Hongos-Siembras	15.094	3	5.031	.353	.787 NS
. Error	341.750	24	14.240		

Hongos; inóculos.	Siembras: épocas de siembra (primera y segunda).
-------------------	--

TABLA DE ANOVA 2.  
AMBAS ESPECIES DE PINO EN LA TERCERA SIEMBRA.

<u>Plántulas Brotadas.</u>					
<u>Fuente</u>	<u>SC</u>	<u>G°l</u>	<u>CM</u>	<u>F calculada</u>	<u>Prob. de rechazo</u>
A Pino	175.781	1	175.781	3.362	.085 NS
B Hongo	159.844	3	53.281	1.019	.410 NS
C Met. de Inoculación	385.031	1	385.031	7.365	.015 **
A-B	23.344	3	7.781	.149	.929 NS
A-C	148.781	1	148.781	2.846	.111 NS
B-C	38.094	3	12.698	.243	.865 NS
A-B-C	67.844	3	22.615	.437	.733 NS
Error	836.500	16	52.281		

<u>Plántulas Sobrevivientes.</u>					
<u>Fuente</u>	<u>SC</u>	<u>G°l</u>	<u>CM</u>	<u>F calculada</u>	<u>Prob. de rechazo</u>
A Pino	480.500	1	480.500	8.025	.012 **
B Hongo	137.375	3	45.792	.765	.530 NS
C Met. de Inoculación	1,058.000	1	1,058.000	17.670	.001 ***
A-B	16.000	3	5.333	.089	.965 NS
A-C	325.125	1	325.125	5.430	.033 *
B-C	50.500	3	16.833	.281	.838 NS
A-B-C	82.375	3	27.458	.459	.715 NS
Error	958.000	16	59.875		

<u>Plántulas Sanas.</u>					
<u>Fuente</u>	<u>SC</u>	<u>G°l</u>	<u>CM</u>	<u>F calculada</u>	<u>Prob. de rechazo</u>
A Pino	810.031	1	810.031	19.358	.000 ***
B Hongo	354.844	3	118.281	2.827	.072 NS
C Met. de Inoculación	1,391.281	1	1,391.281	33.249	.000 ***
A-B	90.344	3	30.115	.720	.555 NS
A-C	215.281	1	215.281	5.145	.038 *
B-C	127.094	3	42.365	1.012	.413 NS
A-B-C	196.594	3	65.531	1.566	.236 NS
Error	669.500	16	41.844		

CONTINUACION TABLA DE ANOVA 2.

Plántulas con Otro Tipo de Daños.

<u>Fuente</u>	<u>SC</u>	<u>G°l</u>	<u>CM</u>	<u>F calculada</u>	<u>Prob.de rechazo.</u>
A Pino	242.000	1	242.000	20.272	.000 ***
B Hongo	154.250	3	51.417	4.307	.021 *
C Met. de Inoculación	276.125	1	276.125	23.131	.000 ***
A-B	141.250	3	47.083	3.944	.028 *
A-C	15.125	1	15.125	1.267	.277 NS
B-C	178.625	3	59.542	4.988	.012 **
A-B-C	189.625	3	63.208	5.295	.010 **
Error	191.000	16	11.937		

<u>Pino</u>	<u>Hongo</u>	<u>Método de Inoculación.</u>
. <u>Pinus montezumae</u> Lamb.	. <u>Alternaria</u> sp. ( $H_1$ ).	. Original.
. <u>Pinus ayacahuite</u> var. <u>veitchii</u> Shaw.	. <u>F. oxysporum</u> ( $H_2$ ).	. Modalidad.
	. Mezcla de cepas ( $H_1 + H_2$ )	
	. Testigo ( $H_0$ ).	