



UNAM IZTACALA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA

400282  61060

ENSAYOS SOBRE LA PATOGENICIDAD Y LA SENSIBILIDAD AL FUNGICIDA MONCEREN M.R. (BAYER), DE UNA CEPA DE *Rhizoctonia solani* Kühn CAUSANTE DEL DAMPING-OFF EN *Pinus pseudostrobus* Lindl.

2011/11/20

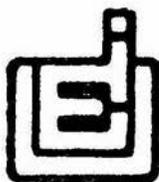
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A ;

MARIA DEL SOCORRO SANCHEZ CORREA





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**Por el tiempo, el amor y la fuerza
compartidos**

A René.

Quiero expresar mi agradecimiento a las siguientes personas por su colaboración en la realización de este trabajo.

Al Biólogo Francisco Reséndiz Martínez por los conocimientos compartidos.

Al Sr. José Manuel Bonilla Camacho por su valioso apoyo en el trabajo de laboratorio.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias Campo Experimental Coyoacán por las facilidades otorgadas en cuanto a utilización de material y espacios.

ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO
EN EL LABORATORIO DE FITOPATOLOGÍA
FORESTAL DEL CENID - COMEF DEL
INSTITUTO NACIONAL DE
INVESTIGACIONES FORESTALES Y AGROPECUARIAS
BAJO LA DIRECCIÓN DEL BIÓLOGO
FRANCISCO RESÉNDIZ MARTÍNEZ

ÍNDICE

	Pág.
Resumen	I
Introducción	1
Antecedentes	8
Objetivos	11
Metodología	12
-Semillas de <i>Pinus pseudostrabus</i>	12
- <i>Rhizoctonia solani</i>	12
-Aislamiento e identificación de micromicetos de las semillas de <i>P. pseudostrabus</i>	13
- Aseptización de las semillas	14
-Patogenicidad de <i>R. solani</i>	14
-Prueba de sensibilidad	15
-Inhibición del Damping-off por el fungicida	18
Resultados	20
-Aislamiento e identificación de micromicetos de las semillas de <i>P. pseudostrabus</i>	20
-Patogenicidad de <i>R. solani</i>	21
-Efecto de <i>R. solani</i> sobre la germinación	21
- <i>R. solani</i> como causante del damping-off preemergente (<i>in vitro</i>)	21
- <i>R. solani</i> como causante del damping-off postemergente (<i>in vitro</i>)	24
-Prueba de sensibilidad	24
-Inhibición del damping-off por el fungicida	27
-Patogenicidad de <i>R. solani in vivo</i>	27
-Inhibición del damping-off por el fungicida <i>in vivo</i>	27
Discusión	35
Conclusiones	40
Bibliografía	41
Apendice	45

RESUMEN

En todo el mundo el damping-off, causado por *Rhizoctonia solani*, es una enfermedad que origina grandes pérdidas de plantas utilizadas en agricultura, fruticultura, horticultura, así como de especies forestales ya sea en viveros o bajo condiciones naturales; debido a esto se hace necesario el estudio de las condiciones a través de las cuales se pueda lograr el control de la enfermedad. Por ello en este trabajo se realizaron pruebas sobre la patogenicidad de *R. solani* en semillas de *Pinus pseudostrabus* y se determinó también la sensibilidad del hongo al fungicida Monceren M.R. (Bayer).

No se registró efecto alguno de *R. solani* sobre la germinación de las semillas de *P. pseudostrabus*, pero en cambio se observó una alta patogenicidad del hongo sobre las plántulas, causando el damping-off postemergente tanto *in vitro* como *in vivo*. En cuanto a la sensibilidad del hongo al fungicida se obtuvieron muy buenos resultados en el ensayo *in vitro*, al inhibirse el crecimiento del mismo a concentraciones muy bajas (25 µg/ml) comparadas con las reportadas para otros fungicidas. Los resultados anteriores se corroboraron con los obtenidos en el ensayo *in vivo*, pues la aparición de la enfermedad en el tratamiento control fue notoriamente más alta (85.5 %), comparada con el tratamiento al cual se le agregó el producto químico en cuyo caso solamente se registró el 9.7 % de mortalidad de las plántulas.

INTRODUCCIÓN

La mayor parte de la superficie del territorio mexicano se encuentra ocupado en su mayoría por matorrales y selva baja caducifolia, siendo de los primeros de los que se obtiene la mayor parte de los recursos forestales no maderables (ceras, fibras, hojas, etc.). En menor proporción tenemos los bosques de clima templado-frío (bosques de coníferas), en los que predominan los géneros *Pinus* y *Quercus*, siguiendo en importancia los bosques de clima cálido-húmedo (caracterizados por la presencia de especies latifoliadas). De estos dos tipos de bosque se obtiene toda la producción maderable, siendo el de mayor aporte el bosque de coníferas (Madrigal, 1978).

Los bosques de coníferas son frecuentes en las zonas templado-frías de la zona norte del país, aunque se distribuyen por todo el territorio nacional excepto en la península de Yucatán, donde solamente se les encuentra en las partes montañosas de Quintana Roo. Maximino Martínez consigna para México 39 especies del género *Pinus*, aunado a estas se encuentran tres más descubiertas después de su muerte, totalizando 42 especies (Mas, 1978). Esta aparente abundancia se ve afectada por el mal uso de los bosques, por ejemplo, según el Inventario Nacional Forestal, para 1980 se estimaba una tasa de deforestación de 200,000 ha por año, además de otros problemas de índole "natural" como incendios, plagas, enfermedades, etc. Debido a esta problemática se hace necesario el establecimiento de programas de reforestación para evitar la destrucción de la riqueza forestal de nuestro país. Dentro de estos programas está el establecimiento de plantaciones forestales (INIF, 1981). La definición de plantación forestal según la Comunidad

Británica es: "cultivo forestal establecido artificialmente, ya sea por plantación de árboles pequeños, de plantas obtenidas vegetativamente o por siembra directa de semillas" (Rodríguez, 1985). En la actualidad el método más utilizado es la plantación de árboles obtenidos en viveros forestales, definiéndose el término vivero en el caso de la silvicultura como el sitio especialmente escogido y preparado para desarrollar con seguridad y bajo condiciones controladas las plantas necesarias para la repoblaciones requeridas. Por lo tanto, el objetivo de todo viverista consiste en producir plántulas útiles y de calidad según las necesidades físicas de la plantación, de acuerdo a un calendario previsto y a un costo razonable (Ortiz, 1983).

En cuanto a las especies forestales que son utilizadas para forestar o reforestar algún área en particular, tenemos que éstas deben reunir ciertas características las cuales podrían agruparse de la siguiente manera:

- Velocidad de crecimiento rápida
- Resistencia a las variaciones en las condiciones ambientales, sobre todo en los primeros estadios de desarrollo.
- Resistencia a las enfermedades
- Caracteres adecuados de acuerdo a la finalidad de la plantación ya sea producción de madera de uso comercial, para postes, leña, uso industrial, restauración de hábitats, etc. (Martínez, 1987).

Por lo que respecta a las especies de coníferas que son más utilizadas en México para las repoblaciones forestales se tienen a *Pinus ayacahuite*, *P. montezumae*, *P. greggii*, *P. michoacana*, *P. patula*, *P. radiata* y *P. pseudostrabus* (Cuevas, com. per).

No obstante que uno de los objetivos del establecimiento de viveros es la obtención de plantas bajo condiciones controladas, dichas condiciones frecuentemente no se cumplen, derivandose de ello diversos problemas, siendo los más comunes las enfermedades ya sea causadas por factores abióticos como luz, humedad, temperatura, etc., (sobre todo cuando no se conocen con precisión las condiciones apropiadas para el crecimiento de las plantas), o por factores bióticos en los que se incluyen insectos, virus, bacterias y hongos. Particularmente en este último grupo se encuentra una amplia gama de patógenos causantes de muchas enfermedades que pueden atacar en cualquier estadio de desarrollo de las plantas (Agrios, 1969).

Entre las enfermedades más devastadoras se encuentra el "Damping-off" o "mal de semilleros", cuyos agentes causales son hongos pertenecientes a los géneros *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Fusarium*, y *Phytophthora*, siendo decisivamente las más destructivas algunas especies de los dos primeros géneros (Toole, 1964).

Los síntomas que caracterizan al Damping-off varían de acuerdo con la edad y el estado de desarrollo de la planta infectada, sin embargo, por lo general las lesiones son visibles cuando el hipocotilo toma un color pardo oscuro a rojo oscuro, aunque pueden manifestarse daños también a nivel de raíz (Iacobelis, 1987).

La infección ocurre cuando se siembran semillas de plantas susceptibles a la enfermedad en suelos contaminados con el patógeno, en otras ocasiones debido al carácter de algunas especies de ser parásitas facultativas, como saprobios pueden entrar en contacto con la semilla, manifestando su presencia

una vez iniciada la germinación. Es en esta etapa cuando se causan más daños, sin embargo, plantas de mayor edad también son susceptibles al ataque del patógeno, aunque en la mayoría de los casos solo les causan pequeñas lesiones en los tallos, en algunos casos la infección puede ser tan severa que cause la muerte de los individuos. Si la enfermedad se manifiesta en la etapa inicial de la germinación, esto es, cuando la testa ha abierto y la plántula comienza a emerger, se le llama Damping-off preemergente. Por otra parte, cuando la infección ocurre en plántulas que ya han emergido y en el caso de las especies leñosas no se ha producido la gruesa pared celular del xilema y en ese momento se manifiesta la enfermedad, se le llama Damping-off postemergente. En ambos casos las células del hongo penetran a las células de la planta invadiendo y matándolas muy rápidamente; debido a esta penetración las células vegetales se colapsan dejando una apariencia de exceso de agua en el tejido del tallo a la altura del nivel del suelo, con la coloración mencionada anteriormente (Agrios, ob. cit.).

Dentro del género *Rhizoctonia* se encuentran varias especies causantes del Damping-off. Este género se caracteriza por poseer solamente hifas vegetativas, ramificaciones que parten del polo distal de las células jóvenes, con formación de un septo de tipo doliporo en el origen de dicha ramificación y sin formación de fibulas. Este género se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, tanto en suelos cultivados como no cultivados. Las especies del género *Rhizoctonia* viven saprofiticamente en las capas superiores del suelo, incluyendo las especies que han sido reportadas como parásitas facultativas (Gibson y Salinas, 1985), entre las que se encuentran *R. solani*, *R. zaeae*, *R. oryzae* (Carling, 1990), *R. endophytica* y *R. dichotoma* (Gómez, 1976), entre otras. De las especies citadas se reconoce a *R. solani* como uno de los

patógenos más severos y causante de más estragos tanto en plantaciones y viveros forestales como en especies usadas en la agricultura (col, papa, jitomate), horticultura (crisantemo), etc.

Muchas cepas de esta especie han sido aisladas de plantas enfermas y suelos, diferenciándose en cuanto a morfología y patogenicidad, así como en sus características fisiológicas en cultivo. Con base en estas diferencias se han descrito muchos grupos intraespecíficos, incluyendo los grupos de anastomosis, definidos por el comportamiento de dos colonias de la misma especie confrontadas *in vitro*. Ya sea que no se logre la unión de las células (anastomosis) o si ésta se lleva a cabo, dependerá del comportamiento posterior a dicha unión el que se agrupen ambas cepas dentro de uno u otro grupo de anastomosis (Ogoshi, 1987).

Para prevenir la aparición de la enfermedad se recomiendan varias acciones, como el tratamiento del suelo por algún método de esterilización ya sea químico o físico y desinfectar las semillas que se vayan a utilizar, aunque muchas veces son atacadas igualmente por los patógenos cuando ya se han sembrado, para evitar lo cual se sugiere la micorrización del vivero (Padilla, 1983)

El método de control más usado contra el Damping-off y quizá el más adecuado para sistemas artificiales como lo es un vivero, en el caso de plantaciones forestales y antes del establecimiento en campo de los árboles, para asegurar que lleguen completamente libres de patógenos, es el control químico.

La aplicación de fungicidas debe estar restringida al cuidado de la especificidad cuando es posible y a la cantidad que debe aplicarse para evitar problemas de toxicidad a las plantas y contaminación de suelos (Agrios, 1985). De ahí la necesidad de realizar estudios en estos aspectos además de evaluar el grado de efectividad de cada nuevo producto para el control de cualquier enfermedad.

De acuerdo con estos criterios y con lo recomendado por la Secretaría de Desarrollo Social (SEDESOL) para los productos químicos de este tipo, el que se adecua para el control del Damping-off causado por *R. solani* es el fungicida Monceren M.R. (Bayer), ya que ha mostrado ser específico para esta especie. Su ingrediente activo es el Pencycuron y se presenta como polvo humectable al 25 %, pertenece a la categoría toxicológica IV, es poco persistente (permanece de 4 a 26 semanas en el suelo), es un fungicida de contacto, es decir actúa al ser absorbido por los tejidos externos de la plaga. Su uso hasta ahora ha sido exclusivamente agrícola, para controlar la enfermedad de la viruela de la papa (*Solanum tuberosum* L.) causada por *R. solani*. El único efecto adverso reportado de este fungicida sobre el ambiente es la toxicidad sobre peces (CICOPLAFEST, 1993), al respecto SEDESOL establece las siguientes medidas tendientes a evitar dicho efecto:

- Evitar la aplicación del plaguicida en campos irrigados, en donde el agua pueda llegar a arroyos, canales u otros cuerpos de agua.
- Informar a los agricultores del riesgo para los peces o para la vida acuática, que implica regar los campos después que han sido tratados con el plaguicida.
- No efectuar aspersiones o espolvoreos si los vientos pueden conducir el plaguicida a los receptores o cuerpos de agua.

- No verter sobrantes de plaguicidas o lavar los equipos de aplicación en donde haya riesgo de contaminar los receptores o cuerpos de agua.

ANTECEDENTES

El Damping-off en México ha sido poco estudiado en comparación con lo hecho en el extranjero. Se le conoce en nuestro país como "mal de almácigos" o "mal de semilleros", como describen Cid y Bergman (1960).

Boyce (1948) reporta esta enfermedad presente en Europa desde el siglo XVIII, la cual pasó a los Estados Unidos de América en los primeros años de este siglo, afectando plántulas de coníferas. Baker (1950) describió al Damping-off como una enfermedad extremadamente destructiva en el período suculento de las plántulas causando grandes pérdidas, afectando también plántulas en el bosque, aunque aquí la magnitud e incidencia del daño es baja, en comparación con los invernaderos; tal vez debido a que en el bosque, respecto a los semilleros, la densidad de población vegetal es menor y consecuentemente la difusión de la enfermedad es menos probable.

En cuanto a la sensibilidad de los patógenos causantes de la enfermedad a distintos tratamientos, los estudios mencionados a continuación están dentro de los más representativos.

Riker (1954) reportó como efectivo para el control del damping-off al fungicida Captán aplicado directamente a semilleros de pinos y Teakle (1956) lo sugirió como efectivo para el tratamiento de semillas. Schonhar (1959) propone para llevar a cabo el control de la enfermedad una mezcla del fungicida mencionado con una sal básica de cobre.

Por lo que respecta a México, Plascencia y Banda (1952) obtuvieron resultados satisfactorios aplicando la solución Cheshunt directamente a semilleros de pinos, posteriormente Gómez y Yáñez (1963), en el trabajo titulado "Damping-off en *Pinus montezumae* Lamb. y su combate", encontraron una efectividad de control de casi un 100% utilizando los fungicidas Captan y Gy-Cop; y Gómez (1976) hace un análisis de las condiciones que propician la aparición del Damping-off, así como los diferentes métodos de control, reportando como el más efectivo la aplicación de Captan 50 al momento de la siembra, con aplicaciones posteriores, aunque no refiere la concentración más efectiva.

English et. al. (1986) caracterizaron al hongo *Rhizoctonia solani* como causante del tizón de las plántulas de *Pinus palustris* y realizaron estudios sobre la patogenicidad del hongo así como del impacto de la enfermedad. Poco después, Iacobelis y DeVay (1987) describen al patógeno *R. solani* como un complejo de especies incluyendo biotipos que difieren en cuanto a su patogenicidad, y hacen estudios de algunas enzimas pécticas del hongo con efecto fitotóxico. Ogoshi (1987), reporta diferencias en cuanto a aspectos de ecología y patogenicidad de varias cepas de *R. solani* determinando que se trata de grupos intraespecíficos.

Carling et. al. (1990) sometiendo varias cepas de *Rhizoctonia*, incluido *R. solani*, a tratamiento de control con varios fungicidas, encontró una alta sensibilidad a hexaconazol para esta especie.

Rosas (1990) realizó pruebas de sensibilidad a los fungicidas Baytan y Dorin, de varias especies de *Fusarium*, cuya metodología sirvió de base para la realización de este trabajo, y reportó una alta sensibilidad de los hongos a ambos fungicidas.

OBJETIVOS

Generales

- Determinar la patogenicidad de una cepa de *Rhizoctonia solani* sobre semillas y plántulas de *Pinus pseudostrabus* como capacidad de causar el Damping-off pre y postemergente.
- Establecer la sensibilidad de la misma cepa de *R. solani* al fungicida Monceren M.R. (Bayer).

Particulares

- Conocer el estado sanitario de las semillas de *P. pseudostrabus* utilizado en este estudio, a través del aislamiento e identificación de los micromicetos presentes en ellas.
- Determinar la capacidad de *R. solani* de causar el Damping-off pre y postemergente en *P. pseudostrabus* *in vitro* e *in vivo*.
- Evaluar el potencial de control del Damping-off causado por *R. solani* a través de la aplicación del Fungicida Monceren M.R. (Bayer).

METODOLOGÍA

-Semillas de *P. pseudostrabus*

Para el cumplimiento de los objetivos planteados se utilizó el siguiente material: Las semillas se obtuvieron del Banco de Germoplasma del CENID-COMEF de la SARH, éstas fueron colectadas de un lote de 10 árboles en la localidad de Tetela, Puebla. Durante su almacenamiento se protegieron del ataque de patógenos adicionando el fungicida Captan y manteniéndolas a una temperatura de 5°C.

El lote de 2500 semillas se liberó de la cubierta de fungicida enjuagando una sola vez con alcohol al 10% y varias veces con agua destilada estéril. Se separaron del lote las semillas que resultaron vanas de acuerdo al método de flotación, el cual consistió en sumergir las semillas en agua durante 24 horas, tiempo suficiente para que las que presentaran esta característica flotaran en la superficie y de esta forma se pudieran separar del resto de las sanas. También se realizó una prueba de germinación alterna colocando 100 semillas sobre papel filtro humedecido con agua destilada y dentro de cajas petri previamente esterilizadas.

-*Rhizoctonia solani*

Por otra parte la cepa del patógeno *Rhizoctonia solani* que se empleó para este trabajo se obtuvo de la Colección de Hongos del Laboratorio de Patología Forestal del CENID-COMEF de la SARH. La cepa se encuentra registrada en el Catálogo de la Colección de Cultivos de Hongos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales con el número 34360, la cual fue aislada

del suelo de almácigos donde se registró la muerte por Damping-off de *Pinus pseudostrabus* en los viveros del INIF Coyoacán. La cepa se resembró en cajas petri que contenían medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA), preparado en proporción de 39 g. por litro de agua destilada y esterilizándolo en autoclave a 15 lb de presión por pulgada cuadrada y 121°C durante 15 minutos.

Una vez obtenido este material se procedió a la realización de las siguientes pruebas:

-Aislamiento e identificación de micromicetos de las semillas de *P. pseudostrabus*

Para detectar la presencia de micromicetos patógenos o saprobios en las semillas se aplicaron los tratamientos que se muestran en el siguiente cuadro:

	Peróxido de Hidrógeno al 30% /50 min	Bicloruro de Mercurio al 0.1% /3 min	Sin desinfección
Semillas	200	-	200
Plántulas	-	200	200

La elección de estos tratamientos se hizo en base a lo reportado por Graham (1983) quien recomienda para la desinfección de semillas de pinos una solución de peróxido de hidrógeno al 30 %, aplicada durante 50 minutos; y de Chi-Chang y Sung-Chang (1964) que recomiendan el empleo de bicloruro de mercurio en solución acuosa al 0.1 % para desinfección de tejidos vegetales tiernos.

Una vez terminado el tiempo del tratamiento para su desinfección, tanto semillas como embriones se enjuagaron en tres ocasiones con agua destilada estéril y se secaron colocándolas dentro de cajas petri que contenían discos de papel absorbente previamente esterilizados, para quitar el exceso de agua.

Posteriormente, semillas y embriones se colocaron dentro de cajas petri que contenían medio de cultivo PDA en grupos de 10 por caja con 20 repeticiones por ensayo. Al registrarse el crecimiento micelial se recurrió al aislamiento en cultivo puro de cada hongo, determinando el género al que pertenecen con base en sus características macro y microscópicas, como color y forma del micelio, morfología de hifas y esporas, etc. Con estos datos se estableció el porcentaje de incidencia de cada género sobre las semillas.

-Desinfección de las semillas

Para desinfectar las semillas utilizadas en todos los ensayos posteriores se empleó una solución de hipoclorito de sodio al 10%, sumergiéndolas durante 20 min.; al término de los cuales se enjuagaron en tres ocasiones con agua destilada estéril y se colocaron en cajas petri que contenían papel secante previamente esterilizado, para eliminar el exceso de agua.

-Patogenicidad de *R. solani*

Para determinar el grado de patogenicidad de la cepa de *R. solani* se tomó un lote de 200 semillas, el cual después de su desinfección, se colocó en grupos de 10 semillas en uno de los extremos del interior de las cajas petri que contenían medio PDA. Cinco días después, utilizando un sacabocado, se obtuvieron cilindros de 0.7 cm de medio de cultivo PDA colonizado con *R. solani* y se colocaron en el otro extremo de la caja (con la parte colonizada

hacia abajo). Todas las cajas se incubaron de 20°C a 22°C en oscuridad. Se registró periódicamente el número de semillas germinadas, plántulas vivas o todavía erguidas y plántulas muertas con evidencia de ahogamiento en la base del tallo o en la raíz.

En el siguiente ensayo, para evaluar la patogenicidad de *R. solani* ahora a nivel de plántulas, se empleó también un lote de 200 semillas, el cual después de desinfectado se sometió a prueba germinación, colocando las semillas dentro de cajas petri que contenían discos de papel absorbente humedecido con 30 ml de agua destilada previamente esterilizadas y se colocaron en oscuridad a una temperatura de 25°C durante 10-15 días. Una vez emergidas las plántulas se colocaron en cajas petri por grupos de 10 ubicándolas en un extremo de la caja, mientras que en el otro extremo se colocó un cilindro de medio de cultivo de 0.7 cm colonizado por *R. solani*. Posteriormente se realizó el registro de las plántulas infectadas, no infectadas y muertas después de 5, 8, 11, 14 y 17 días después de la inoculación.

-Prueba de sensibilidad

La sensibilidad del hongo *R. solani* al fungicida Monceren M.R. (Bayer), cuyo ingrediente activo es el compuesto químico llamado Pencycuron, se evaluó midiendo el crecimiento de las colonias, expuestas a tratamiento con diferentes concentraciones del compuesto. Para ello se prepararon las siguientes soluciones:

Solución Stock A: 6.7 g de producto comercial en 250 ml de agua destilada

Solución Stock B: 13.4 g del producto comercial en 50 ml de agua destilada

Se tomaron diferentes volúmenes de soluciones stock A y B y se adicionaron a 100 ml de PDA para obtener diferentes concentraciones del fungicida como se muestra en el cuadro 1, tomando en cuenta que el ingrediente activo (Pencycurón) representa solamente el 25% del producto comercial. La adición se hizo en el medio de cultivo fundido a 40°C aproximadamente y la mezcla se vertió en cajas petri en proporción de 20 ml de agar por caja, formándose lotes de 10 cajas (10 repeticiones) por concentración de fungicida; dentro de éstas una vez solidificado el agar se colocaron cilindros de medio de cultivo de 0.7 cm de diámetro colonizados por *R. solani*, ubicándolos en el centro de la caja con la parte colonizada hacia abajo. Las cajas petri se incubaron en oscuridad a 25°C. Se tomaron medidas del crecimiento radial después de 4, 7 y 11 días de efectuada la inoculación.

Volumen de solución stock/100 ml de agar	Concentración final del fungicida (µg/ml)
Control (sin fungicida)	0
Solución stock A	
A1 - 0.1 ml	1
A2 - 0.5 ml	5
A3 - 2.5 ml	25
A4 - 5.3 ml	50
Solución stock B	
B - 2.0 ml	980

Cuadro 1. Cantidades del fungicida Monceren usadas para obtener las concentraciones finales del ingrediente activo (Pencycuron) utilizadas en el estudio *in vitro*.

-Inhibición el Damping-off por el fungicida

En cuanto a la evaluación del potencial del fungicida Moncerén M.R. (Bayer) para inhibir el Damping-off pre y postemergente en almácigos o macetas, se realizaron las siguientes actividades: El hongo *R. solani* se puso en crecimiento en 500 ml de medio de cultivo líquido específico para *Rhizoctonia* durante 15 días, al término de los cuales se vació directamente el medio líquido y se sustituyó por 500 ml de agua destilada estéril, homogeneizándolo por agitación. Posteriormente se prepararon 20 bolsas de plástico negro de 25 cm de ancho por 30 cm de largo agregándoles 2 kg de suelo de bosque esterilizado, en ellas se vertió una alícuota de 25 ml de la suspensión de micelio preparada previamente dispersando al mover la capa superficial del suelo (1 cm de profundidad aproximadamente), dejándose en incubación por espacio de cinco días a 20-25°C.

Dentro de cada una de las 20 bolsas de plástico se colocaron 20 semillas de *Pinus pseudostrobus* desinfectadas previamente, a una profundidad de 1 cm. De las 20 bolsas se separaron 10 y se les aplicaron dos dosis de 50 ml de fungicida a una concentración de 25 µg/ml (que resultó ser la más efectiva en el ensayo *in vitro*); una el día de la siembra y otra nueve días después. Todas las bolsas se dejaron a una temperatura de 20 a 25°C en condiciones de luz-oscuridad durante 7 semanas. Durante este tiempo se cuantificaron las semillas germinadas, no germinadas, vivas y muertas. Durante el tiempo que se

mantuvieron, a cada bolsa se le agregaron 200 ml de agua destilada estéril cada 7 días a manera de riego.

Para corroborar la presencia del hongo en el suelo después del tiempo del tratamiento, se tomó una muestra de 10 g del suelo y se suspendió en 90 ml de agua destilada estéril, correspondiendo por lo tanto a una dilución de 10^{-1} . Conjuntamente se preparó una serie de 7 tubos de ensayo que contenían cada uno 9 ml de agua destilada estéril, en el primero se agregó 1 ml de la suspensión quedando la dilución de 10^{-2} , de ella se tomó 1 ml y se agregó al siguiente tubo obteniendo la dilución de 10^{-3} y así sucesivamente para obtener las siguientes diluciones hasta llegar a 10^{-7} , de las tres últimas diluciones (10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7}) se tomó 1 ml y se mezcló con 20 ml de PDA, el cual se encontraba a una temperatura aproximada de 40°C (todavía líquido), con tres réplicas por dilución, se vació a cajas petri y se dejó solidificar, incubando las cajas posteriormente en oscuridad a 25°C . Después de la detección del hongo desarrollado sobre este medio se realizó el aislamiento en cultivo puro del patógeno sobre PDA. El método se aplicó para los cuatro tratamientos en suelo.

Por último, para comprobar que la muerte de las plántulas fue causada por *R. solani*, se realizaron aislamientos a partir del tejido muerto de plántulas elegidas al azar, colocando trozos de estas de 1 cm de largo sobre PDA.

RESULTADOS

-Aislamiento e identificación de micromicetos de las semillas de *P. pseudostrabus*

En la determinación de los micromicetos presentes en las semillas de *Pinus pseudostrabus*, se recurrió al aislamiento en cultivo puro a partir de las colonias de hongos crecidas sobre medio PDA, donde se colocaron semillas y embriones en dos tratamientos: con y sin desinfección. Los hongos se identificaron por morfología macro y microscópica.

Como se observa en el Cuadro 2, el 1% de las semillas desinfectadas contenía *Aspergillus sp* y el 9% *Penicillium sp*; en tanto que el 1% de las semillas no desinfectadas presentó *Alternaria sp*, el 8% *Mucor sp* y el 60% *Penicillium sp*. En el caso de los embriones, tanto asepticados como no asepticados, no hubo crecimiento fúngico alguno.

Cuadro 2 Géneros de hongos aislados de las semillas de *P. pseudostrabus*.

		GENERO	% DE INCIDENCIA
SEMILLAS	DESINFECTADAS	<i>Aspergillus sp</i>	1
		<i>Penicillium sp</i>	9
	S/DESINFECCIÓN	<i>Alternaria sp</i>	1
		<i>Mucor sp</i>	8
		<i>Penicillium</i>	60
EMBRIONES	DESINFECTADOS	NINGUNO	
	S/DESINFECCIÓN	NINGUNO	

Los hongos se aislaron de 200 semillas en ambos tratamientos.

-Patogenicidad de *R. solani*

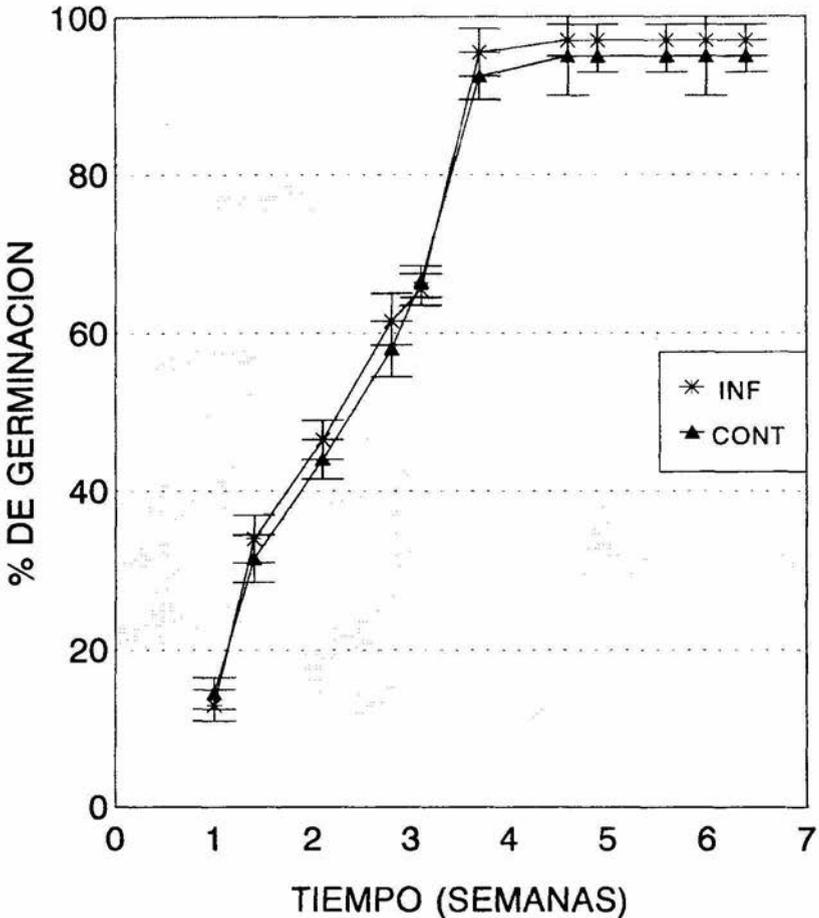
-Efecto de *R. solani* sobre la germinación

Con el propósito de averiguar si *R. solani* afecta la germinación en *P. pseudostrobis*, se infectaron 200 semillas de esta especie, colocándolas sobre PDA previamente inoculado con el patógeno. Se incluyó un control con un número igual de semillas en las mismas condiciones, excepto por la ausencia del hongo. En ambos lotes se cuantificó el número de semillas germinadas a diferentes tiempos. Como se aprecia en la Figura 1, el comportamiento de los dos lotes de semillas fue prácticamente idéntico: los porcentajes de germinación totales fueron 94% para el control y 96% para las semillas infectadas. Tampoco se observó retraso en los tiempos de germinación de las semillas infectadas respecto a las control, observándose en ambos casos un incremento notorio en el porcentaje de germinación entre las 3 y 3.5 semanas, el cual aumentó de 65.5% a 95.5% en las semillas infectadas y de 65% a 92% en las no infectadas.

-*R. solani* como causante del damping-off preemergente (*in vitro*)

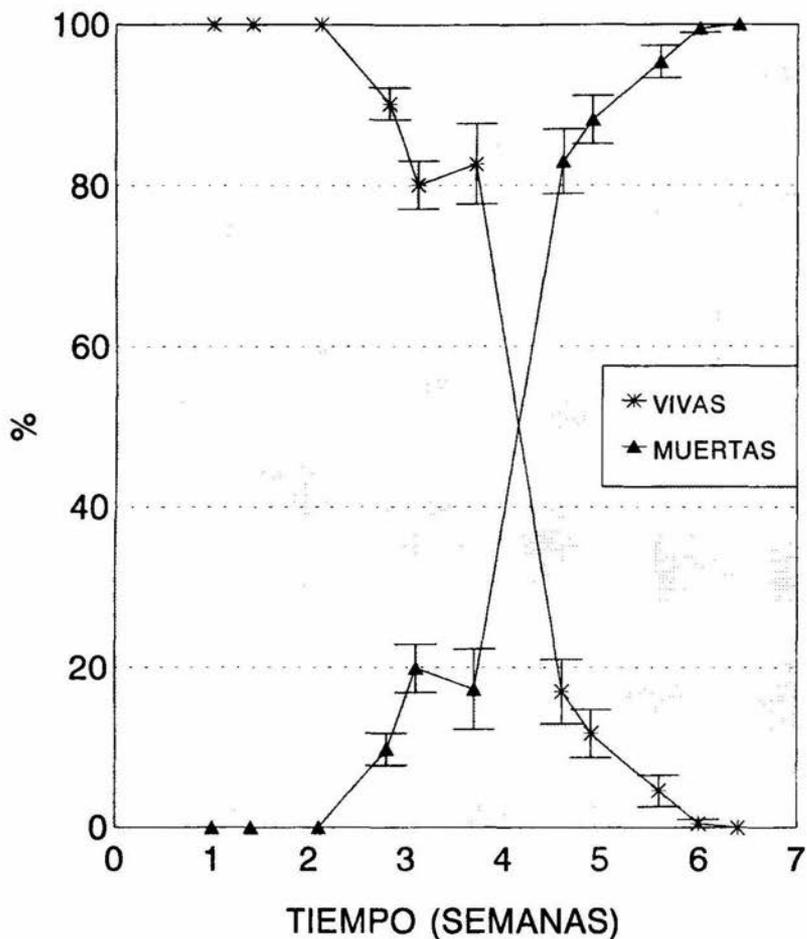
Para evaluar el efecto de *R. solani* en la sobrevivencia de plántulas de *P. pseudostrobis* se infectaron semillas con el patógeno y posteriormente se registró el número de plántulas vivas o muertas, reportándolo como porcentaje del número total de semillas germinadas a diferentes tiempos. Como se aprecia en la Figura 2, la mortalidad comenzó a manifestarse a las 2.7 semanas después de la germinación y se incrementó rápidamente hasta alcanzar un máximo de 100% a las 6.5 semanas.

FIGURA 1
EFECTO DE *R. solani* SOBRE LA GERMINACION
DE SEMILLAS DE *P. pseudostrobus* *in vitro*



Comparación del % de germinación en semillas infectadas vs. no infectadas.

FIGURA 2
EFECTO DE *R. solani* EN LA SOBREVIVENCIA DE
SEMILLAS GERMINADAS DE *P. pseudostrobus* *in vitro*



La infección se realizó a nivel de semillas y se registró la sobrevivencia de las plántulas a diferentes tiempos.

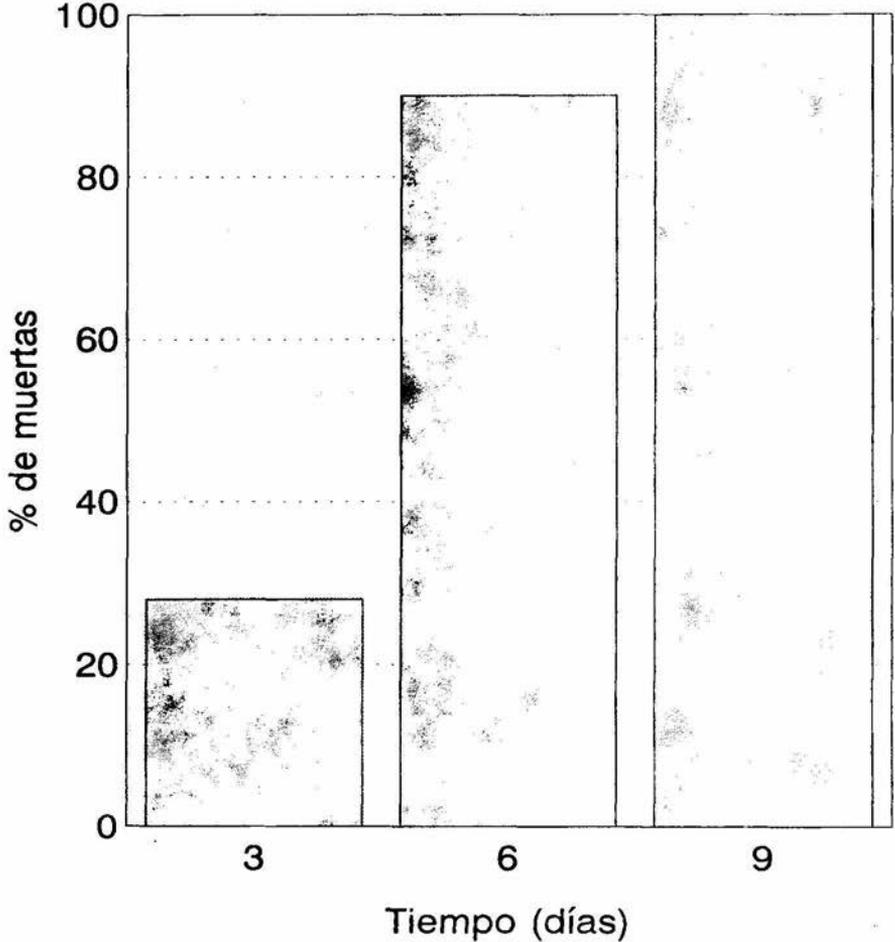
-*R. solani* como causante del damping-off postemergente (*in vitro*)

Se evaluó también la patogenicidad de *R. solani* sobre plántulas de *P. pseudostrobilus* como característica del Damping-off postemergente. Para ello, se infectaron 200 plántulas *in vitro* y posteriormente se registró el número de plántulas muertas en tres periodos de tiempo. La Figura 3 muestra que a los 3 días de la inoculación la mortalidad fue del 28% , aumentando a 62% a los 6 días y a los 9 días se observó la muerte del 10% restante de las plántulas.

-Prueba de sensibilidad

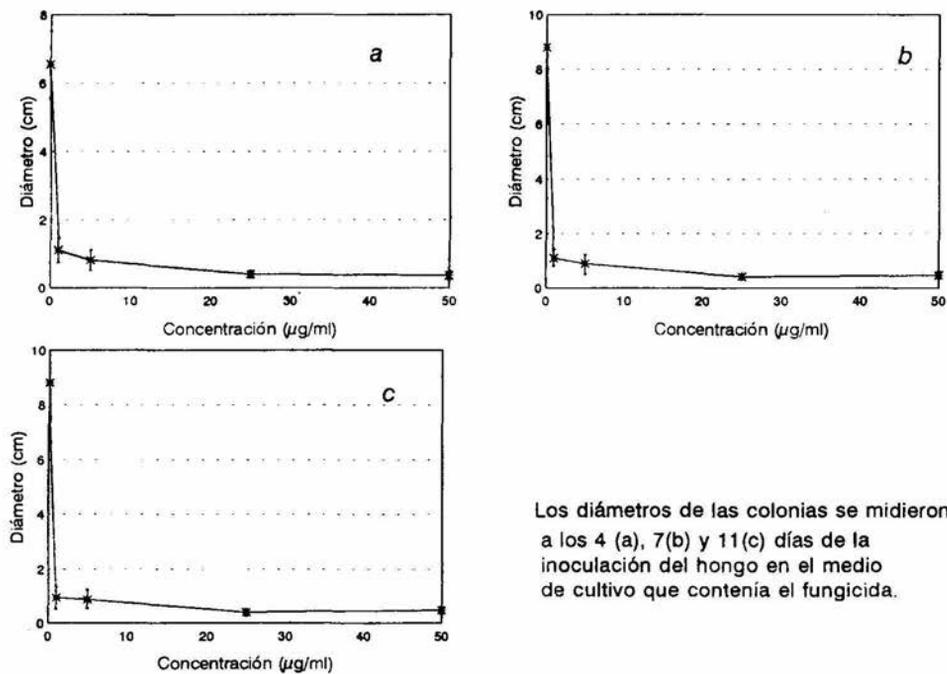
La sensibilidad de *R. solani* al fungicida Monceren M.R.(Bayer) se evaluó midiendo el crecimiento de las colonias del hongo en PDA que contenía el fungicida a diferentes concentraciones. Como se observa en la Figura 4a, el crecimiento micelial en ausencia de fungicida (grupo control) fue de 6.54 cm a los 4 días y de 8.8 cm (diámetro total de la caja de Petri) a los 7 y 11 días. El crecimiento de *R. solani* fue inhibido drásticamente por el fungicida incluso a la dosis más baja; así podemos observar que a los 4 días después de la inoculación el diámetro de las colonias en el medio con 1 µg/ml fue solo de 1.15 cm (17.4% respecto del control), disminuyendo a 0.82 cm (12.4% del control) a 5 µg/ml y a 0.4 cm (6% del control) y 0.37 cm (5.6% del control) a las dosis de 25 y 50 µg/ml de Monceren, respectivamente. La ausencia de crecimiento del hongo continuó prácticamente igual a los 7 y 11 días (Figura 4b y 4c). En cuanto al tratamiento a la concentración más alta del fungicida (980 µg/ml) no hubo crecimiento del hongo.

FIGURA 3
RESULTADOS DE LA PRUEBA DE PATOGENICIDAD
DE *R. solani* SOBRE PLÁNTULAS DE *P. pseudostrobilus*



Se infectaron 200 plántulas y se registró el número de muertas a los tiempos indicados.

FIGURA 4
SENSIBILIDAD DE *R. solani* AL FUNGICIDA
MONCEREN M.R. BAYER *in vitro*



Los diámetros de las colonias se midieron a los 4 (a), 7(b) y 11(c) días de la inoculación del hongo en el medio de cultivo que contenía el fungicida.

-Inhibición del damping-off por el fungicida

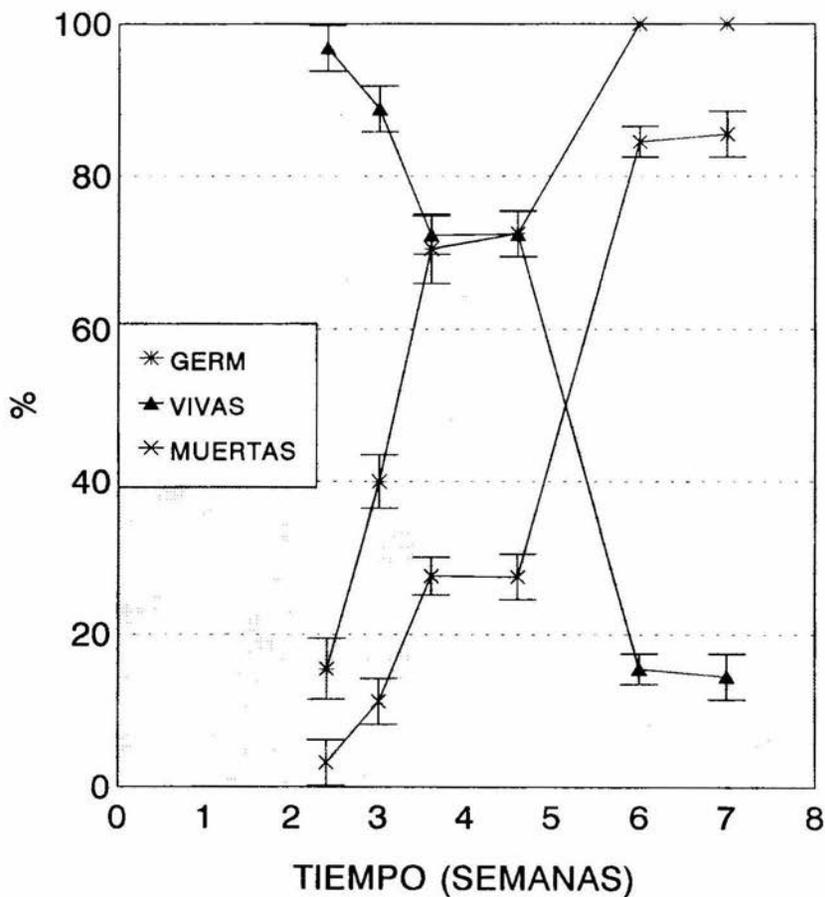
-Patogenicidad de *R. solani* in vivo.

Para determinar el efecto de *R. solani* en la sobrevivencia de semillas germinadas de *P. pseudostrobis* en un ensayo in vivo, se sembraron 200 semillas en suelo inoculado con el patógeno. Posteriormente se cuantificó el número de semillas germinadas, plántulas sobrevivientes y plántulas muertas a diferentes tiempos. Como se aprecia en la figura 5, es hasta las 2.4 semanas que se manifestó el efecto del patógeno ya que de 15.4% semillas que alcanzaron el estadio de plántulas, 3.2% fueron muertas. El porcentaje de germinación se mantuvo casi sin cambio entre las 3.6 y 4.6 semanas, alcanzando el 100% a la sexta semana; durante este lapso el número de plántulas muertas aumentó considerablemente hasta alcanzar un máximo de 85.5% a las 6 semanas.

-Inhibición del damping-off por el fungicida in vivo

El efecto del fungicida Monceren M.R. (Bayer) en la sobrevivencia de plántulas de *P. pseudostrobis* infectadas con *R. solani* se determinó sembrando 200 semillas en suelo previamente inoculado con el patógeno y haciendo dos

FIGURA 5
 EFECTO DE *R. solani* EN LA SOBREVIVENCIA DE
 SEMILLAS GERMINADAS DE *P. pseudostrobus* in vivo

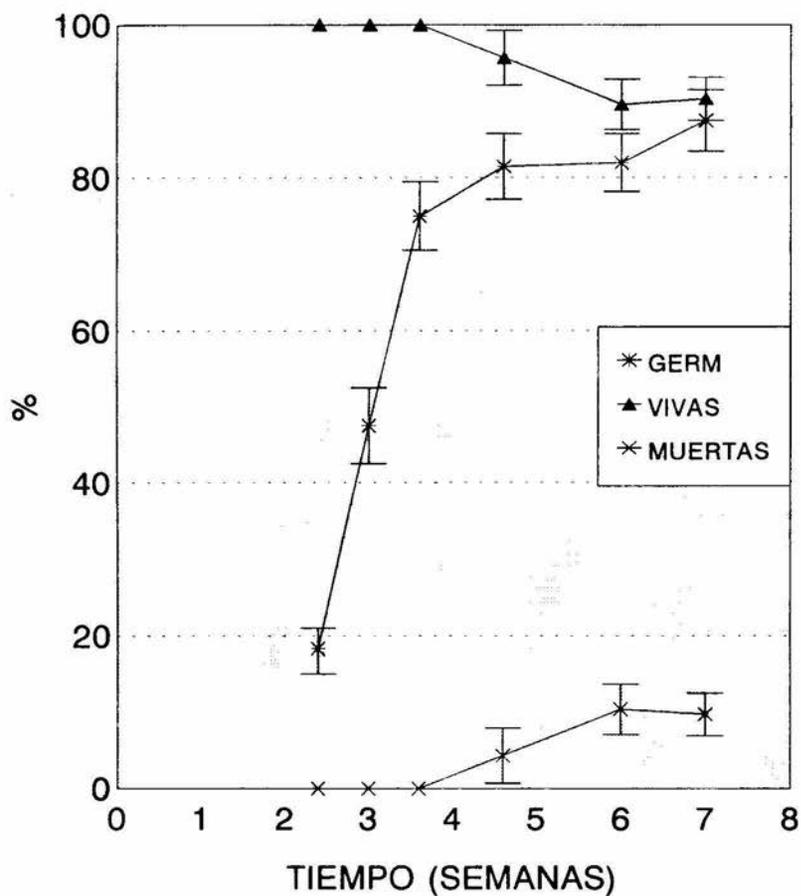


Las semillas se sembraron en suelo inoculado con el patógeno y se registró el núm. de semillas germinadas, el de plántulas vivas y el de muertas a diferentes tiempos

aplicaciones del fungicida, una al momento de la siembra y otra a los nueve días después de la primera aplicación; se registró el número de semillas que alcanzaron el estadio de plántulas (germinadas), el número de plántulas muertas y el número de plántulas vivas a diferentes tiempos. Como se observa en la figura 6, las plántulas comenzaron a emerger a las 2.4 semanas después de la siembra (18% de germinación), se incrementaron notoriamente a las 3.6 semanas (75% de germinación) y alcanzaron su máximo a las 7 semanas (84.5% de germinación). El efecto protector del fungicida contra la infección de las plántulas por el patógeno fue muy evidente, ya que ninguna de ellas murió durante las tres primeras observaciones (2.4, 3 y 3.6 semanas) y los porcentajes de sobrevivencia fueron mayores de 90% aún a las 7 semanas.

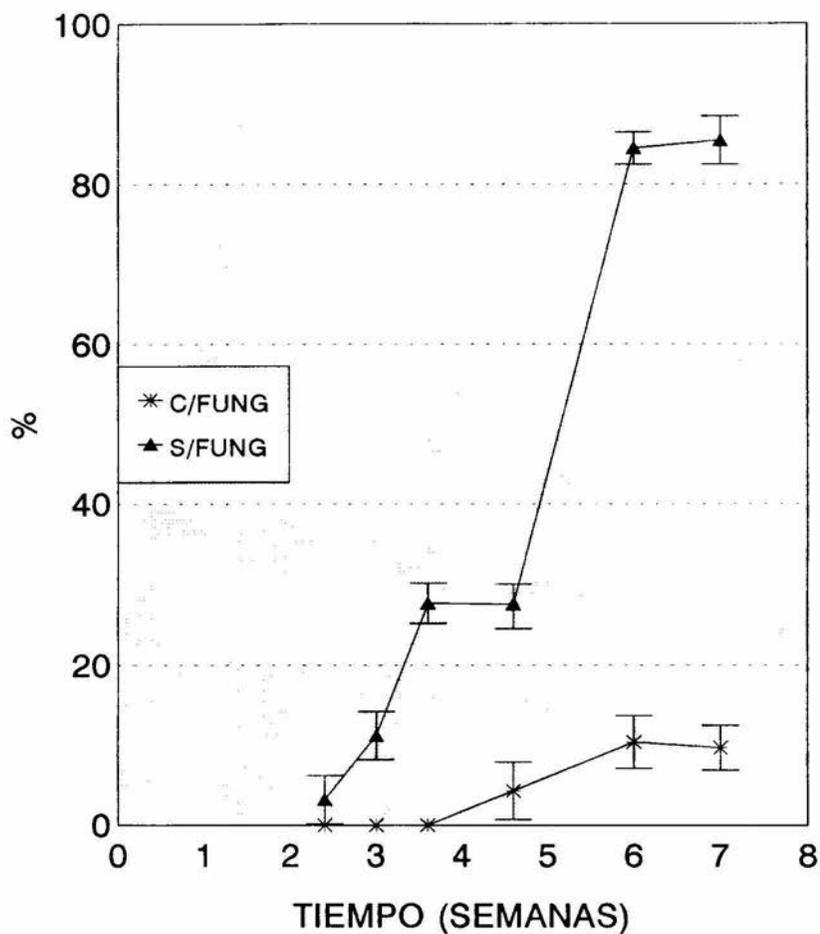
En la figura 7 se muestra la comparación de los porcentajes de mortalidad de dos lotes de plántulas de *P. pseudostrobis* infectadas con *R. solani* a nivel de semillas, en presencia y ausencia de fungicida. Se aprecia una gran diferencia en la mortalidad causada por el hongo entre ambos tratamientos. Todas las plántulas tratadas con el fungicida permanecieron vivas hasta las 3.5 semanas, registrándose solamente 9.7% de muertas a las 7 semanas. Por el contrario, las plántulas sin tratamiento con fungicida desde las 2.4 semanas mostraron una mortalidad de 3.2%, la cual llegó a ser notoriamente alta (85.5%) a las 6-7 semanas posteriores a la inoculación. Las plántulas muertas del lote que fue tratado con fungicida no manifestaron ninguno de los síntomas de la enfermedad y tampoco se aisló el patógeno cuando se incubaron cajas de PDA en las que se colocaron fragmentos de plántulas comprendidos de la raíz al hipocotilo; a diferencia del aislamiento positivo del hongo a partir de las plántulas muertas del lote no

FIGURA 6
SOBREVIVENCIA DE PLANTULAS DE *P. pseudostrobis* INFECTADAS
CON *R. solani* AL APLICAR EL FUNGICIDA MONCEREN MR. BAYER



Las semillas se sembraron en suelo inoculado con el patógeno y se aplicaron dos dosis del fungicida, registrando la sobrevivencia de de las plántulas a diferentes tiempos.

FIGURA 7
MORTALIDAD DE PLANTULAS DE *P. pseudostrobus* INFECTADAS
CON *R. solani* Y TRATADAS CON MONCEREN MR. BAYER



La infección se realizó al sembrar las semillas en suelo inoculado con el hongo y se registró la mortalidad de las plántulas a diferentes tiempos.

tratado con fungicida, las cuales mostraron los síntomas típicos de la enfermedad (Figura 8).

Figura 8

Aspecto de las plántulas de *Pinus pseudostrobus* enfermas y sanas.

a.



b.



a. Plántulas infectadas con *R. solani* sin tratamiento con fungicida.

b. Plántulas infectadas con *R. solani* tratadas con fungicida.

DISCUSIÓN

Los géneros de hongos encontrados en los aislamientos hechos a partir de las semillas de *Pinus pseudostrabus* concuerdan con lo encontrado por Baez (1986), quien reporta la presencia de los géneros *Mucor* sp, *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp y *Alternaria* sp (además de *Rhizopus* sp, *Hormodendrum* sp, *Monilia* sp, *Stemphiliium* sp y *Trichoderma* sp) sobre semillas de *Pinus ayacahuite* var. *veitchi* Shaw; sin embargo, Baez detectó su presencia tanto en semillas completas como en testas y embriones; en cambio, en este estudio solamente se detectó su presencia sobre las semillas completas, encontrándose completamente libres de hongos a los embriones. Esto nos indica un buen estado sanitario de las semillas, aunque los géneros *Mucor* sp, *Alternaria* sp y *Apergillus* sp están reportados como parásitos facultativos de muchas plantas (Finch, 1974), en este caso podemos decir que se encuentran como saprobios pues las semillas no presentaron penetración ni daños internos.

El Damping-off preemergente, caracterizado por la infección durante los primeros estadios de la germinación, sí fue producido por la cepa de *R. solani* utilizada en el estudio *in vitro*, ya que al someter las semillas de *P. pseudostrabus* al ataque del patógeno, a pesar de que se obtuvo un porcentaje de germinación del 96 % (figura 2), el 100% de las plántulas germinadas murieron en tiempos realmente cortos después de la infección, como se observa en la Figura 3, lo cual corresponde a la muerte en los primeros estadios de germinación, pues además ninguna plántula alcanzó un tamaño mayor de 1 cm. Aunque debido a la disparidad en los momentos de la germinación y por lo tanto en la muerte de las plántulas, la mortalidad total se registró a las 6.5

semanas. Cuando el tratamiento se hizo directamente sobre plántulas de tamaño mayor de 3 cm haciendo coincidir los tiempos de infección, la muerte osciló entre los 3 y 9 días, registrándose el mayor porcentaje de mortalidad a los 6 días después de la infección, como se observa en la figura 4. La virulencia de la cepa fue muy alta, pues infectó y causó la muerte del total de las plántulas en un tiempo relativamente corto (9 días). Resultados similares fueron reportados por Iacobelis (1986) con la cepa de *R. solani* 366, la cual causó la muerte del total de las plántulas de col (infectadas a nivel de semilla y a nivel de plántula) en un tiempo total de una semana.

Según se observa en la figura 4a, a los 4 días de expuesto el hongo a las diferentes concentraciones del fungicida, su crecimiento en todos los tratamientos fue mínimo, puesto que el tamaño promedio de las colonias fue menor de 1 cm, comparado con el control cuyo tamaño a este tiempo fue de 6.5 cm; lo cual demuestra el efecto inhibitorio del fungicida sobre *R. solani*, observándose también una relación directa entre el aumento en la concentración del fungicida y la disminución en el crecimiento de la colonia de *R. solani*, hasta la concentración de 25 µg/ml, donde se observa que aunque se registra cierto crecimiento (0.4 cm), lo mismo que a la siguiente concentración más alta de 50 µg/ml (0.35 cm), la diferencia entre ambas es mínima, incluso comparándolas con las demás concentraciones donde el crecimiento de las colonias fue mayor. Por lo tanto la concentración más adecuada para impedir el crecimiento del hongo y tratar la enfermedad fue la de 25 µg/ml.

Esta concentración se encuentra dentro de los estándares recomendados para la aplicación de plaguicidas por SEDESOL, y además es menor que la

dosis recomendada de hexaconazol, para el tratamiento de la misma enfermedad (100 µg/ml; Carling, 1990).

El efecto patogénico de *R. solani* sobre las plántulas de *P. pseudostrobis* en el ensayo *in vivo* queda perfectamente establecido en la figura 7, en la cual se observa claramente que bajo estas condiciones la cepa no causa el Damping-off en su fase preemergente, pues el 100 % de las semillas germinaron y emergieron del suelo. Sin embargo, después de que las primeras plántulas emergieron (15.5%), en el primer conteo a las 2.4 semanas comenzó a registrarse la muerte por ahogamiento en un 3.2 % de las plántulas emergidas. El avance de la enfermedad a partir de este tiempo fue muy notorio, ya que en todos los casos después de emergidas las plántulas comenzaban a mostrar los síntomas de la enfermedad (amarillamiento del tallo y caída de la planta, ver figura 10a); culminando a las 6 semanas con el 100 % de emergencia, manifestandose de la enfermedad en este momento en un 85.5 % y quedando libre solamente el 14.5 %.

Los datos anteriores no concuerdan con lo reportado por Huang (1990), quien encontró que la cepa AG4 de *R. solani* causó la muerte del 63% de las plántulas de *P. elliotii*, obtenidas por germinación de un mismo lote de semillas, debido al Damping-off preemergente y del restante 37% por Damping-off postemergente. Aunque la cepa de *R. solani* utilizada por nosotros no causó la enfermedad en su fase preemergente, sí causó la muerte de un alto porcentaje de plántulas como en el estudio citado anteriormente. Las diferencias entre nuestros resultados y los obtenidos por Huang podrían deberse a que la cepa utilizada por él pertenezca a un subgrupo de la especie con mayor virulencia, lo que le permite infectar las plántulas más rápidamente; sin

embargo ambas cepas causan la muerte de una elevada proporción de los organismos infectados.

Al tratar con el fungicida Monceren (25 µg/ml) el suelo inoculado con *R. solani* donde se sembraron las semillas de *P. pseudostrabus*, se observó un buen control de la enfermedad, puesto que del total de plántulas emergidas (84.5 %) sobrevivió el 90.3 % (Figura 8) sin mostrar ningún síntoma de la enfermedad (Figura 10b). La muerte del restante 9.7 % de las plántulas no se debió a la infección por *R. solani*, pues de los aislamientos hechos a partir de ellas no se obtuvo crecimiento del patógeno. Se han obtenido resultados similares con otros fungicidas, aunque aplicando concentraciones comparativamente más elevadas; por ejemplo, de Benomil se recomienda una concentración de 300 µg/ml, de Benodanil entre 150 a 300 µg/ml o Ipridione en 900 µg/ml (Frisina, 1988); si a esto agregamos la especificidad reportada del fungicida Monceren (CICOPLAFEST, ob. cit.), tenemos dos ventajas muy valiosas de este compuesto.

Por último, comparando los dos índices de mortalidad de los tratamientos de las plántulas infectadas en presencia y ausencia del fungicida, se observa el efecto claro de inhibición de la enfermedad, puesto que mientras la mortalidad de las plántulas no tratadas con fungicida fue del 85.5 %, de las que fueron tratadas solamente se registró el 9.7 % de mortalidad (Figura 9) la cual, como se mencionó antes, no se debió al ataque del patógeno, sino probablemente a que las semillas hayan quedado a poca profundidad y por ello las plántulas no arraigaron lo suficiente quedando expuestas al calor, escasés de agua, etc.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir lo siguiente:

El estado sanitario de las semillas de *Pinus pseudostrabus* utilizadas en este trabajo fue bueno, ya que no se conoce efecto patogénico de los géneros de hongos aislados de ellas, además no se detectó la presencia de hongos dentro de las semillas.

No se detectó ningún efecto sobre la germinación de las semillas de *Pinus pseudostrabus*, tanto en el ensayo *in vitro* como en el ensayo *in vivo*, por la presencia de *Rhizoctonia solani*.

R. solani causó la muerte de las plántulas de esta especie por Damping-off pre y postemergente en el ensayo *in vitro*, mientras que en el ensayo *in vivo* solamente se manifestó el postemergente.

Se demostró la sensibilidad se la cepa de *R. solani* al fungicida Monceren a dosis muy bajas (25 µg/ml de pencycuron) comparado con otros fungicidas ensayados *in vitro*, cuyas dosis efectivas reportadas son ostensiblemente mayores.

La enfermedad se controló efectivamente por medio del fungicida Monceren, ya que la protección fue al menos del 90 %. Si a esto le sumamos las características propias del fungicida como tiempo de permanencia en el suelo de 4-26 semanas, especificidad comprobada contra *Rhizoctonia* y toxicidad solamente reportada para peces, la cual puede sortearse siguiendo algunas reglas para su uso; entonces se le puede recomendar para el control del damping-off causado por *R. solani* en *P. pseudostrabus*.

El fungicida no mostró ser tóxico para esta especie de pino pues las semillas germinaron en un 84.5 % y las plántulas se desarrollaron sin manifestación de enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, N.G.** 1985. Fitopatología. Limusa. México. pp 162-164.
- Agrios, N.G.** 1969. Plant pathology. Academic Press. New York. pp 35-37.
- Baez, O.G.** 1986. Determinación de hongos en semillas de *Pinus ayacahuite* var *veitchii* Shaw. Tesis de Licenciatura. UNAM. México. pp 41-48.
- Baker, S.F.** 1950. Principles of silviculture. Ist edition. McGraw-Hill. New York. p 414.
- Boyce, S.J.** 1948. Forest pathology. 2nd. edition. McGraw Hill. New York.
- Carling, D.E., Helm, D.J. and Leiner, R.H.** 1990. *In vitro* sensitivity of *R. solani* and other multinucleate and binucleate *Rhizoctonia* to selected fungicides. Plant Disease. 74: 860-863.
- Chi-Chang, Chen y Sung-Chang, J.** 1964. Interaction of seed borne and soil-borne microorganisms in relation to Damping-off disease of conifers. Botanical Bulletin of Academia Sinica. 7(7): 1-13.
- Cid y Bergman, M.** 1960. Informe relativo a los intentos de investigación de variedades de Pinaceas y Pinos elaborados en el vivero de Coyoacán. Subsecretaría de Recursos Forestales y de Caza, Dirección General de Protección y repoblación forestales. Manuscrito Inédito. México. 18 cuartillas.
- Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de **Plaguicidas Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST)**. 1993. Catálogo oficial de plaguicidas. SARH. SEDESOL. Secretaría de Salud, Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. México. pp 22-24, 326.

English, J.T., Ploetz, R.C. and Barnard, E.L. 1986. Seedling blight of longleaf pine caused by a binucleate *Rhizoctonia solani*-like fungus. Plant Disease 70:148-150.

Finch, H.C. and Finch, A.N. 1974. Los hongos comunes que atacan cultivos en América Latina. Trillas. México. pp 13, 17.

Frisina, T.A. and Benson, D.M. 1988. Sensitivity of binucleate *Rhizoctonia* spp and *Rhizoctonia solani* to selected fungicides *in vitro* and on azalea under greenhouse conditions. Plant Disease 72:303-306.

Gibson, I.A. y Salinas, Q.R. 1985. Notas sobre enfermedades forestales y su manejo. Boletín Técnico Inst. Nac. Invest. For. (106). pp 196.

Gómez, N.S. 1976. Combate del Damping-off en semilleros forestales. Bol. Divulgativo No. 42. SARH. México. pp 16-20.

Gómez, N.S. y Yáñez, O.M. 1963. Damping-off en *Pinus montezumae* Lamb. y su combate. SARH. Boletín Técnico No. 7. México. pp 6-14.

Graham, J.H., and Linderman, R.G. 1983. Pathogenic seedborne *Fusarium oxisporum* from Douglas-fir. Plant Disease. 67:323-325.

Huang, J.W., and Kuhlman, E.G. 1990. Fungi associated with Damping-off of slash pine seedlings in Georgia. Plant Disease. 74:27-30.

Iacobelis, N.S. and DeVay, J.E. 1987. Studies on pathogenesis of *Rhizoctonia solani* in beans: an evaluation of the possible roles of phenylacetic acid on its hidroxy derivates as phytotoxins. Physiological and Molecular Plant Pathology. 30:421-432.

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. 1981. Segunda reunión de plantaciones forestales. (Memoria). Chiapas, México. pp 111-112.

Madrigal, S.X., Mas, P.J. y González, F.H. 1978. La importancia del conocimiento del ecosistema para el establecimiento de plantaciones forestales. Memoria de la primera reunión nacional de plantaciones forestales. Publicación Especial No. 13. INIF. México. pp 25-26.

Martínez, H.A. 1987. Las plantaciones forestales con especies de árboles de uso múltiple. Un curso sobre silvicultura de plantaciones de especies A.U.M. (Memoria). Sihuatepeque, Honduras. s.n. 32 p.

Mas, P.J. 1978. Características del crecimiento de seis especies de pino con gran futuro para reforestaciones artificiales. (Memoria) 1a. Reunión Nacional sobre Plantaciones Forestales. SARH. México. pp 27-30.

Ogoshi, A. 1987. Ecology and pathogenicity of Anastomosis and intra-specific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. Annual Review Phytopathology. USA. pp 125-128.

Ortiz, M.O. 1983. Curso intensivo: Administración y manejo de viveros forestales. Cartago, C.R. ITCR-FAO. Departamento de Ingeniería Forestal. s. p.

Padilla, M.S. 1983. Manual del viverista. Centro de Investigación y Capacitación Forestal (CICAFOR). Cajamarca, Perú. 149 p.

Plascencia, G.R. y Banda, J. 1952. Experimento sobre el control del Damping-off en semilleros forestales de la escuela. El Mensajero Forestal. México. 95:8-9.

Riker, A.J. 1954. La prevención del Damping-off de semilleros de coníferas. Forestry Research notes. No. 140. p 14.

Rodríguez, E. y Murillo, O. 1985. El elmácigo forestal como la opción ante el vivero tradicional. In Taller Nacional Semillas y Viveros Forestales. (1, 1995. San José C.R.) ed Freddy Rojas. Cartago, C.R., I.T.C.R.-C.A.T.I.E. 377-395.

Rosas, R.M. 1990. Incidence and pathogenicity of *Fusarium* species associated with temperate cereals in east Scotland. A thesis presented for the degree of doctor of Philosophy. University of Edimburg. pp 47-52.

Schonhar, S. 1959. Spraying test with various fungicides for the control of *D. populea* Allg. Forstzeitschr. 14 (47):824-825.

Teakle, D.S. 1956. Control of Damping-off in seedbeds. Qd. Agricultural Journal. 82(4):215-216.

Toole, E. R. 1964. Harwood nursery diseases. Proceedings Region & Forest Nurserymens' Conferences. pp 148-150.

APENDICE

Medio líquido específico para *Rhizoctonia*

Adicionar en 500 ml de agua destilada los siguientes productos:

REACTIVO	CANTIDAD EN GRAMOS
Cloruro de potasio	0.02
Fosfato de potasio monobásico	1.0
Extracto de malta	5.0
Asparagina	5.0
Peptona	5.0
Cloruro de sodio	0.02
Glucosa	5.0
Sulfato ferroso	0.02
Sulfato de magnesio	0.5