101
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

" MICROMICETOS ASOCIADOS A SEMILLAS DE PINUS CULMINICOLA ANDRESEN &BEAMAN "

FALLA DE ORIGEN

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:

ELDA LUCILA MENDOZA RODRIGUEZ

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

MEXICO, D. F. 1998

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

VNIVERSIDAD NACIONAL
AVTONOMA DE
MEXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron LA pasante(s) ELDA LUCILA MENDOZA RODRIGUEZ

con número de cuenta 7524032 - 3 con el Título:

"MICROMICETOS ASOCIADOS A SEMILLAS DE PINUS CULMINICOLA ANDRESEN &BEAMAN

Otorgamos nuestro Voto Aprobatorio y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de BIOLOGO

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
BIOLOGO	JOSE FRANCISCO	RESENDIZ MARTINEZ	
Director de Tesis M EN C	HERMELINDA MARGARITA	VILLEGAS RIOS	
M EN C	ROSAMARIA ESTHER	MERCADO DOMENECH	
BIOLOGO	ROSARIO	VAZQUEZ BRAVO	
Suplente BIOLOGO	MARIA CRISTINA JULIA	PEREZ REYES	
Suplente			

Es bueno dar cuando se nos pide, pero es mejor hacerlo
sin que se nos pida a través del entendimiento.
Y hay algunos que dan y al dar no sienten dolor ni tampoco
buscan ningún placer y al dar no buscan cubrirse de virtud.

Gibrán Jalil Gibrán.

A mis padres con cariño:

Nemesio

y

Maria de la Luz

A mis hermanos:

Celia

Ma. Elisa

José Luis

A mis amigos: Irene, Margarita G. , Fernando, Marco, Lupita, Luis, Leandro, Lety B., Chuy, Margarita B., Javier, Vicky con quien he compartido de alguna forma tristezas, alegrías y un gran cariño que siento por todos ellos y a Sergio por su apoyo moral y su confianza que me brindó para que llevara a cabo el término de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a las autoridades del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, por haberme permitido relizar el presente trabajo.

A todas las personas que en diferente forma hicieron posible la terminación de este trabajo.

Al Dr. Manuel Rosas Romero Director de Inspección Fitosanitaria deSanidad Vegetal por sus finísimas atenciones y su asesoría para la determinación de las especies.

Al Biól. FelipeNepomuceno, Biol. Irene Frutis, Prof. Hernán Cortés, y mi amiga Lupita Escamilla por su colaboración en el material fotográfico.

Al Biól. y gran amigo Leandro Ramos por su ayuda para la elaboración de los mapas y gráficas presentadas en este trabajo.

Al Sr. Enrique Vargas por la elaboración de los dibujos.

Al jurado por sus atinadas sugerencias, su apoyo y paciencia en la revisión del manuscrito.

Biol. José Francisco Reséndiz Martínez.

M. En C. Hermelinda Margarita Villegas Rios.

M. EN C. Rosamaria Esther Mercado Domenech.

BIOL. Rosario Vazquez Bravo.

BIOL. Maria Cristina Julia Pérez Reyes.

EL presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Patología Forestal del CENID-COMEF del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, bajo la dirección del Biól. José Franncisco Reséndiz Martínez.

INDICE

	Pag.
Lista de Figuras	**III**
Lista de Cuadros y Gráficas	**IV**
Resumen	**V**
1.Introducción	1
1.1 Importancia de los Bosques de Pino	1
1.2 Importancia de la semilla	2
1.3 Manejo del Pino enano en México	3
2. Objetivos	3
3. Antecedentes	4
3.1 Conocimiento del piñonero	4
3.2 Características biológicas de la especie	5
3.3 Trabajos relacionados con micromicetos asociados a semillas forestales	6
4. Materiales y Método	12
4.1 Descripción del Área de Procedencia de la semilla	12
4.2 Actividades de Laboratorio	15
4.3.1 Selección de muestras	15

4.3.2 Preparación de muestras 17

4.3.3 Siembra de muestras a intervalos de tiempo 18

4.3.4 Distribucíon de las muestras 21

4.3.5 Aislamiento de la micobiota 21

4.3.6 Identificación de hongos 21

5. Resultados y Discusión 24

5.1 Análisis de las Tablas en relación al número de colonias presentes con Tratamiento de Hipoclorito de Sodio (3 y 5 min.) 24

5.2 Análisis de las Tablas en relación al número de colonias presentes con Tratamiento de Agua Oxigenada (3 y 5 min.) 29

5.3 Análisis de la Tabla en relación al número de colonias totales presentes con el Tratamiento de Hipoclorito de Sodio (3 y 5 min.) 34

5.4 Análisis de la Tabla en relación al número de colonias totales presentes con el Tratamiento de Agua Oxigenada (3 y 5 min.) 36

5.5 Análisis Cualitativo de los desinfectantes utilizados 38

5.6 Análisis Micológico de las semillas de *Pinus culminicola* 40

5.7 Descripción microscópica de las especies encontradas en las semillas de *Pinus culminicola* 42

6. Conclusiones 50

7. Literatura citada 51

8. Glosario 58

LISTA DE CUADROS Y GRAFICAS

Cuadro 1. **Certificado de Procedencia de la semilla del piñon enano.**

Cuadro.2. **Esquema sobre la distribución de la siembra de muestras**

Tabla 1. **No. de Colonias por especie con tratamiento de Hipoclorito de sodio durante 3 min.**

Tabla 2. **No. de Colonias por especie con tratamiento de Hipoclorito de sodio durante 5 min.**

Tabla 3. No. de Colonias por especie **con tratamiento de Agua** oxigenada durante 3 min.

Tabla 4. No. de Colonias por especie **con tratamiento de Agua** oxigenada durante 5 min.

Tabla 5. Colonias totales con **tratamiento de Hipoclorito de Sodio.**

Tabla 6. Colonias totales con **tratamiento de Agua Oxigenada.**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Localización de *Pinus culminicola* en la República Mexicana.
Figura 2.	Distribución de *Pinus culminicola* en Nuevo León y Coahuila.
Figura 3.	Estructuras de la semilla del pino enano.
Fotografía 1.	Habítat de *Pinus culminicola*.
Fotografía 2.	Ejemplar de *Pinus culminicola*.
Fotografía 3.	Semillas de la especie en estudio.
Fotografía 4.	Semillas sin testa de pino enano en cultivo de PDA.
Fotografía 5.	Cultivos puros de algunos micromicetos de *P. culminicola*.
Fotografía 6.	Cultivo de *Aspergillus niger*.
Fotografía 7.	Cultivo de *Aspergillus parasiticus*.

Fotografía 8. Cultivo de ***Aspergillus restrictus***

Fotografía 9. Cultivo de ***Aspergillus terreus.***

Fotografía 10. Cepa a de ***Penicillium spp.***

Fotografía 11. Cepa b de ***Penicillium spp.***

Fotografía 12. Microfotografía de cabeza conidial de ***Aspergillus niger.***

Fotografía 13. Microfotografía de cabezuela conidial de ***A. parasiticus.***

Fotografía 14. Microfotografía de cabezas conidiales de ***A. terreus.***

Fotografía 15. Microfotografía de cabezuelas conodiales de ***A. terreus.***

Fotografía 16. Microfotografía de conidióforos y conidios de *Penicillium spp.*

RESUMEN

Los pinos piñoneros tienen un alto grado de endemismo en México, existen 10 taxa endémicos, algunos con distribución restringida, como es el caso del pino enano *Pinus culminicola* Andresen & Beaman.

Se considera a esta especie en peligro de extinción debido a que ocupa pequeñas áreas limitadas en la porción norte de la Sierra Madre Oriental.

El conocimiento de los factores que deterioran a este pino, efectos en sus semillas justifican la necesidad de realizar este trabajo de micromicetos como uno de los muchos factores que alteran la germinación de las semillas almacenadas y la propuesta de que sus áreas de distribución se consideren como reserva ecológica.

Se utilizaron 300 semillas de la especie *Pinus culminicola* procedentes del Cerro del Potosí, Galeana, estado de Nuevo León, las cuales fueron desinfectadas superficialmente con dos tratamientos Hipoclorito de Sodio y Agua Oxigenada a diferentes concentraciones y a intervalos de tiempo de 3 y 5 minutos, las siembras de las semillas se realizaron en cajas de Petri con el medio de cultivo PDA, colocando 5 semillas en cada caja, a una temperatura de 27°C, durante un período de incubación de aproximadamente de 7 días ó dependiendo del desarrollo del organismo, se hicieron resiembras de las colonias desarrolladas con objeto de purificar las cepas y proceder a su posterior determinación.

De los desinfectantes utilizados (Hipoclorito de sodio y Agua oxigenada), se determinó que el agua oxigenada fué ligeramente mejor para la desinfección de embriones

Para identifar los micromicetos asociados a estas semillas se contó con el apoyo de claves taxonómicas, de esta forma se encontró a: *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus restrictus* y *Aspergillus terreus*, por lo que toca a *Penicillium*, cabe mencionar que no se pudo realizar la determinación hasta especie, debido a que se carecio de algunos reactivos.

Para el género *Aspergillus* la especie que se presentó con mayor frecuencia fué *Aspergillus niger*.

Con base a lo anterior es importante señalar que algunas especies de estos géneros deterioran semillas de cultivos agrícolas ocasionando pérdidas económicas de consideración. Probablemente algunos de estos micromicetos están causando daños a las semillas de *Pinus culminicola*.

MICROMICETOS ASOCIADOS A SEMILLAS DE

Pinus culminicola Andresen & Beaman.

INTRODUCCIÓN

La gran diversidad de vegetación existente en México, es debida en gran parte a las diferentes condiciones ecológicas, topográficas, climatológicas etc. que presenta el país., los bosques de coníferas ocupan un 15% del territorio del país, encontrándose distribuídos en las zonas de clima templado y frío (Eguiluz, 1982).

Esta situación hace que México se considere un país rico en recursos forestales y más por la gran diversidad de especies de coníferas, entre las que destacan por su importancia económica los géneros *Abies* y *Pinus*, ya que son la fuente principal de materia prima. El grupo de las pináceas es uno de los mejores representados en México, existiendo 94 taxas 42 especies, 22 variedades y 9 formas que representan aproximadamente el 41% del total de especies estudiadas en el globo (Eguiluz, 1971), su distribución altitudinal generalmente varía desde los 1500 m a los 3000 m, aunque es factible observarlos en altitudes mayores o menores, como es el caso de *Pinus hartwegii* Lind que forma asociaciones o bosques a altitudes de 4000 m y *Pinus caribea* Morelet que es en ejemplo de adaptación del género *Pinus* a altitudes de 120 m (Chavelas,1981).

Dentro de esta gran variedad de especies destaca el grupo de los pinos piñoneros que tienen un grado alto de endemismo en México, conociéndose 10 taxas endémicas algunos con distribución restringida (Cerro del Potosí, N:L, Sierras La Marta y La Viga, Coah., in Sánchez et al. 1987), como es el caso de *Pinus culminicola*. Todos los piñoneros tienen un elevado porcentaje de mortalidad de conos y semillas provocada por plagas, ejemplo de ello lo representa *P. culminicola*, en donde es frecuente observar daños ocasionados por roedores y pájaros además, esta especie es especialmente vulnerable al fuego debido a: su carácter arbustivo, alta densidad de la comunidad pura, sus asociaciones con otros arbustos, las fuertes ráfagas de vientos típicos de zonas

montañosas, intensa actividad humana que existe en ese lugar y la implantación de fraccionamientos campestres, lo cual trae como consecuencia la muerte ó susceptibilidad del arbolado joven y maduro, todo lo anterior ha propiciado que a este pino se le considere en peligro de extinción.(Sánchez et al., 1987. Nepamuceno y Camacho, 1989).

Varios autores (Sánchez et al. 1987, Nepamuceno F. y F. Camacho 1989), han señalado que se requiere proteger esta zona del Cerro del Potosí mediante el establecimiento de recursos y conservación del germoplasma para asegurar la supervivencia de comunidades vegetales únicas a nivel mundial. El INIFAP realiza esfuerzos para la recolección y almacenamiento de germoplasma de este pino, para su posterior utilización en programas de reforestación, pero el hecho de que esta especie habite en zonas secas, ocasionan que los incendios sean su peor amenaza.

Las especies forestales tienen gran importancia, como un factor principal que dará soporte de garantía, confianza y seguridad a toda la plantación como medio de propagación de estas especies arbóreas útiles tanto para fines comerciales como de reforestación. Desde su origen, formación, recolección, almacenaje y siembra posterior de la semilla, este material es susceptible de sufrir daños causados por un mal manejo, favoreciendo el ataque de hongos patógenos, insectos y bacterias que van a afectar la calidad de la semilla durante su almacenamiento, disminuyendo su capacidad germinativa o atacando a la plántula en sus estados de preemergencia y postemergencia.

El almacenamiento de semillas forestales requiere de una serie de conocimientos sobre características de las mismas, así como los factores que las afectan durante el periodo que permanecen en la cámara fría, lo que va alterar en mayor o menor grado la capacidad germinativa del germoplasma.

Mediante condiciones apropiadas de almacenamiento se conserva mejor la viabilidad de las semillas por largo tiempo, ya qué en la mayoría de las especies forestales la producción no es anual y es necesario, cuando hay abundancia de ellas, recolectar más de lo necesario, a fin de mantener una reserva suficiente para satisfacer la demanda de los programas de reforestación en los años que no habrá producción.

Manejo del Pino enano en México

Los pinos piñoneros tienen gran importancia debido a que la recolección y comercialización de semillas constituyen ingresos económicos para las familias que se dedican a esas actividades.

Dentro de la jardinería en maceta el *P. culminicola* es adecuado para la tecnica denominada "Bonsai" (Bradley, 1976), la que requiere: hojas cortas, ramificaciones abundantes, tronco relativamente grueso y frutos proporcionados y llamativos, características que reune esta especie.

También se ha recomendado esta especie para reforestación urbana en el D. F., (Benavides, 1990), ya que presenta características tales como: (a) especies adaptadas a desarrollarse en climas áridos, con escasa precipitación y baja húmedad ambiental; (b) bajas tasas de transpiración; (c) mantenimiento de altos potenciales de agua; (d) especies de lento crecimiento; (e) troncos de pequeño grosor y bajo tamaño; (f) especies relativamente libres de plagas y enfermedades; (g) facilidad de producción en vivero. Por estas características, los pinos enanos serían de gran utilidad en la dasonomía urbana de las ciudades de la zona árida y semiárida de México.

OBJETIVOS

Vislumbrar la importancia que puede representar la presencia de hongos en este tipo de semillas.

Determinar en forma cuantitativa y cualitativa los micromicetos en semillas de *Pinus culminicola* Andresen & Beaman, de una misma procedencia (Cerro del Potosí, Galeana, N.L.).

Contribuir al conocimiento de la micobiota asociada a semillas de *Pinus culminicola*.

ANTECEDENTES

El conocimiento sobre el piñonero se ha ido conformando gracias a contribuciones de muchos investigadores, entre los que destacan Lanner (1981), en historia natural; Cristchfield y Little (1966) y Passini (1982), en fitogeografía; Little Jr. (1938), Lanner (1970, 1976) y Owens (1986), en anatomía y morfología; Robert (1978), Rebolledo (1983), en ecología; Martínez (1948), Robert (1978), Robert Passini (1981) y Bailey y Hawkarworth (1983), en taxonomía; Vander Wall y Balda (1983), Forcella (1978, 1980), Tomback (1982), Whitman y Mopper (1985) y Cibrian Tovar et al. (1986) en interacciones; Forcella (1981), en producción.

Lanner (1981), menciona que probablemente los piñoneros tuvieron su origen en un ancestro que vivió en la época del paleoceno; cuando el clima de América cambió gradualmente a seco y muy caliente. La condición de aridez provocó diversos cambios en la vegetación. Las plantas más débiles no superaron esas condiciones y dejaron de existir. Debido a su agresividad, por selección natural las especies resistentes quedaron como herederas de las zonas semiáridas. Probablemente una de esas especies fué la que dió origen a los piñoneros.

Los pinos piñoneros constituyen en nuestro país un grupo bien definido propio de regiones áridas y semiáridas, como las coníferas en general, son muy variables en su morfología, estas variaciones son muy importantes particularmente en la clasificación y en la genética forestal. Los 15 Taxa de piñoneros mexicanos que forman la subsección Cembroides Engelm. de la clasificación de Little y Critchfield (1969), se encuentran distribuídos en 19 estados de la zona centro y norte del país.

Pinus culminicola comúnmente llamado pino enano o piñonero enano, fué descrito en 1961 de ejemplares procedentes del Cerro del Potosí, N. L., Rzedowski (1978) lo menciona como "el único caso de verdadero matorral cespitoso de pinos que se conoce en México", se consideró que su área de distribución se hallaba restringida, pero posteriormente se colectaron y reportaron ejemplares de áreas circunvecinas como la Sierra La Marta, Coah.

(Capó-Arteaga, 1972), en el Cañon de las Alazanas, Coah. (Riskind y Patterson, 1975) y posteriormente se colectó en la Sierra La Viga, Coah. (Ramírez, 1979 in Sánchez, 1979) Por ello se considera que es endémico de la porción norte de la Sierra Madre Oriental, subsistiendo como una comunidad relicto del pleistoceno, la flora del Cerro del Potosí, en su conjunto, es probablemente, de este periodo.

De acuerdo con la clasificación de Little & Cristchfield (1969), la especies estudiada pertenece a:

DIVISIÓN: Espermatophyta
CLASE: Gymnospermae
ORDEN: Coniferales
FAMILIA: Pinaceae
GÉNERO: *Pinus* L:
1 SUBGÉNERO *Strobus* L.
1.2 SECCIÓN *Parrya* Lemm:
1.2.2 SUBSECCIÓN *Cembroides* Engelm.
Pinus culminicola Andresen & Beaman.

CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LA ESPECIE:

FUSTE: Este árbol se caracteriza por ser muy ramificado desde la base, con una altura de 1 a 2 m y diámetro en las ramas más gruesas de 15 a 20 cm. como máximo.

ACÍCULAS: Se presentan en número de 5 por fascículo, rara vez de 4 a 6 cm, miden de 3 a 5 cm de largo por 1.3 de grueso, ligeramente aserradas, curvadas y aglutinadas en la punta de las ramillas, ápices redondeados y muy cutinizados.

CONOS: Por lo regular son globulosos de 3 a 4.5 cm. de largo por 3 a 4.5 de ancho (abiertos): 50 a 60 escamas por cono.

SEMILLAS: Las dimensiones de estas estructuras fluctúan de 6 a 9 mm. de largo por 6 mm. de diámetro, desarrollándose de 1 a 2 semillas por escamas, además presentan una coloración café pardo y la almendra es de color blanco.

Cuando el cono se abre en Octubre deja expuesta las semillas zenitalmente, dispersándose en Noviembre con la ayuda del viento.(ver figura No. 3).

De los trabajos consultados con relación a micromicetos asociados a especies forestales, se cuenta con información proveniente de países como: Estados Unidos, Canadá, India, Inglaterra, entre otros, de estos trabajos se puede mencionar a:

Fisher (1941) quien al realizar algunas pruebas de inoculación de hongos para probar el efecto de germinación de algunas semillas de especies forestales, encontró que los hongos: *Botrytis cinerea, Fusarium sp., Pythium debaryanum, P. ultimum, Rhizoctonia sp.*y *Verticillium sp.* causaban algunas pudriciones en las radículas, al emerger de las testas comparativamente con *Aspergillus niger, Penicillium sp., Rhizopus oryzae, R. circinas, Pestalotia sp. Alternaria sp.,A. brassicae, Chaetomium globosum, Mucor sp.* y *Thielavia sp.*que causan pérdidas considerables en las radículas.

Gibson (1957), trabajó con semillas de *Pinus patula* dañadas de la testa, en donde observó el desarrollo de algunos hongos como: *Mucor sp., Rhizopus arrihizus, Chaetomium cochliodes, Cladosporium sp., Aspergillus tamarii* y *Trichoderma koeningii*, que bajo condiciones favorables pueden penetrar a la semilla y causar muerte al vástago.

Urosevic (1961), al realizar un estudio sobre la inoculación artificial de hongos en semillas y plántulas de *Picea excelsa* y *Pinus sylvestris*, determinó que los hongos desarrollados presentaban diferencias de agresividad o afección ya que las especies de *Fusarium sp.* aisladas de *Pinus sylvestris* fueron más severas en la reducción de la germinación mientras que los hongos identificados como: *Acremoniella atra, Alternaria brassicae, Alternaria tenuis, Botrytis alii, Chaetomium globosum, Curvularia inaequalis, Mucor plumbeus, Helminthosporium sativum*, presentaron el mismo efecto, pero en menor grado. Para *Picea excelsa* reportó la presencia de los hongos que penetraron profundamente en los cotiledones y redujeron la germinación los cuales fueron: *Alternaria tenius, Curvularia inaequalis. Chaetomium globosum, Mucor racemosus, Helminthosporium restratum, H. sativum, Penicillium arenarium, Stemphylium atrum, Trichoderma lignorum y Verticillium alboratum.*

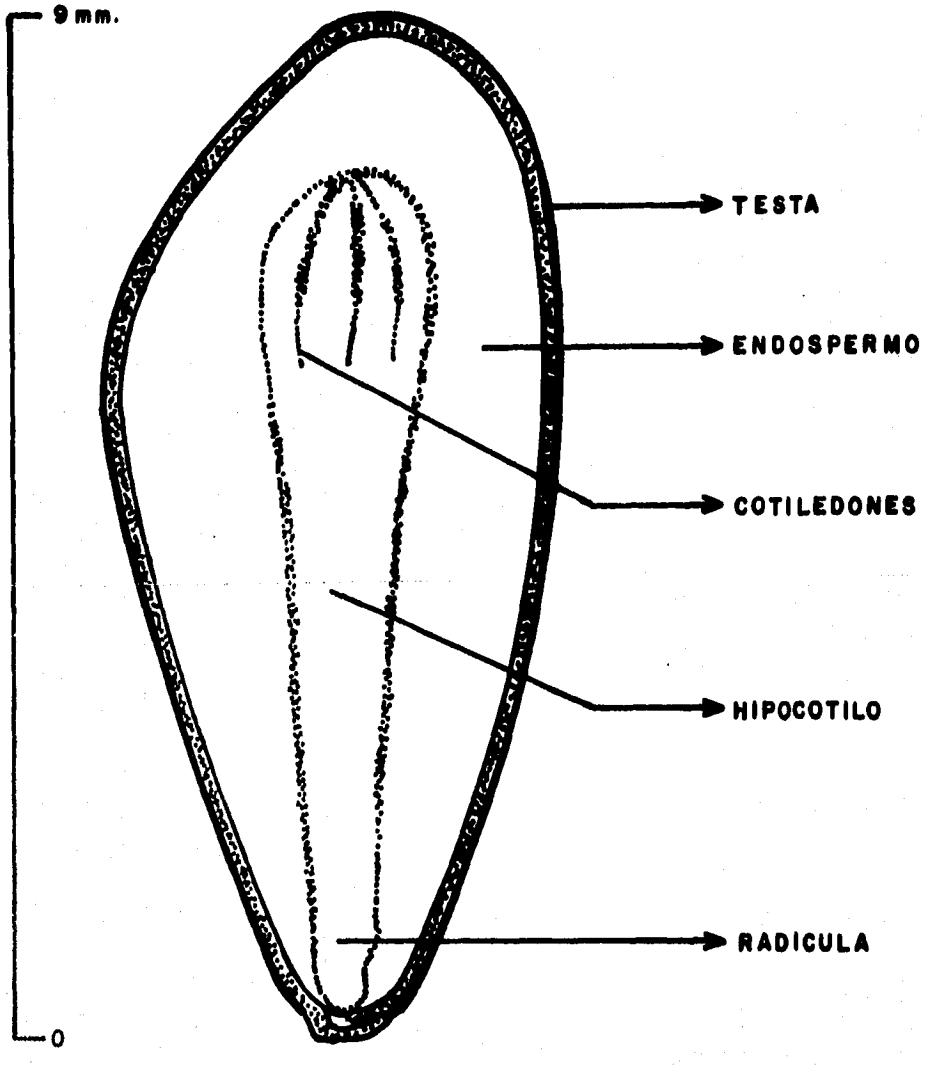


FIGURA No. 3 ESTRUCTURA DE LA SEMILLA DEL PINO ENANO

Peace (1962) menciona que los conos de pinos poseen una cubierta adherente de resina donde se posan esporas de hongos, las cuales llegan a tener cierta importancia ya que invaden el interior de los conos y subsecuentemente los tejidos, hasta alcanzar las semillas, pudiendo manifestarse los deterioros desde una reducción en la capacidad de la germinación hasta la completa reducción de las estructuras de las semillas

Chi -Chang et al. (1964) reportaron algunos datos experimentales sobre estudios de efectos del ambiente, concentración del ion hidrógeno, temperaturas y tratamientos químicos realizados en el aislamiento de microorganismos asociados con semillas de *Pinus elliottii, P. luchuensis y P. thunbergii*. Estos autores mencionan la presencia de algunos géneros de hongos como: *Aspergillus, Diplodia, Penicillium, Mucor, Curvularia, Rhizopus, Fusarium* y *Glomerella*, además comprobaron que para realizar aislamientos de los microorganismos presentes en las capas superficiales de la semilla (testa), se requiere que sean tratadas con hipoclorito de sodio al 4% y para los microorganismos desarrollados en la parte interna de la semilla se requiere del tratamiento con bicloruro de mercurio al 0.5%, para este estudio utilizaron el medio de Papa-dextrosa-agar (PDA) e incubaron a temperatura de 28°C. Estos mismos autores al realizar un estudio sobre la interacción de microorganismos del suelo y semillas de coníferas relacionados con la enfermedad del mal del semillero, determinaron un descenso en la germinación de las plántulas sembradas en suelos previamente esterilizados, esto se debío a que los microorganismos internos en la semilla se activaron al desaparecer la micobiota de las capas superficiales de la semilla y del suelo. Observaron que las pudriciones de los cotiledones fueron causadas por hongos internos de la semilla, *Diplodia* principalmente y *Cylindrocladium*; en el tallo se presentaron los hongos: *Aspergillus, Fusarium, Verticillium, Penicillium y Cylindrocladium*, siendo algunos de los microorganismos causantes del mal de semilleros en las plántulas.

Timonin (1964) reportó algunos efectos de la micobiota desarrollada en el estado de preemergencia y postemergencia de *Pinus banksiana, P. contorta* y *Picea glauca*, llevándose acabo pruebas sobre semillas desinfectadas y no desinfectadas, los resultados indicaron que *Pinus banksiana* y *Picea glauca*, fueron significativamente afectadas por microorganismos en la emergencia de las plántulas, en tanto que *P. contorta* mostró cierta selectividad.

Salisbury (1965) en un estudio de hongos patógenos de semillas obtenidos de *Pseudotsuga taxifolia*, encontró que de 108 semillas obtenidas de conos completamente cerrados, 93 estuvieron libres de hongos, las semillas restantes presentaron infección por *Penicillium* y *Pullularia*.

Bloomberg (1966) detectó que un 80% de las plántulas sanas de *Pseudotsuga menziesii* presentaron hongos, siendo los más frecuentes: *Fusarium sp.*, *Cylindrocarpon dimum* y *Mycelium radicis atrovirens*. En las plántulas enfermas determinó la presencia de los siguientes géneros de hongos: *Alternaria*, *Phoma*, *Monilia*, *Pullularia*, *Rhizoctonia*, *Trichoderma*, *Trichocladium* y *Stemphylium*. Se aislaron un mayor número de hongos de las partes del tallo de las plántulas que de la raíz, en los lotes de semilla con mayor capacidad de germinación se aisló *Trichoderma viride* y en los de menor grado de germinación a *Aspergillus* y *Rhizopus*.

Chi-Chang et al. (1966) determinaron la micobiota de 7 especies de coníferas en Taiwan, empleando dos desinfectantes, de las semillas sometidas al tratamiento con hipoclorito de sodio al 4% fueron aislados representantes de los siguientes17 géneros de hongos: *Aspergillus*,*Cephalosporium*, *Chaetomium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Diplodia*, *Helminthosporium*, *Graphium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Phoma*, *Pestolotia*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Verticillium*, *Chaetomella* y *Sphaeropsis*, este último género se ha reportado como causante del tizón de las yemas en *Pinus elliotii*. De las semillas sometidas al tratamiento con bicloruro de mercurio al 0.5% fueron aislados 11 géneros de hongos: *Aspergillus*, *Phoma*, *Chaetomium*, *Diplodia*, *Fusarium*, *Pestalotia*, *Verticillium*, de las partes internas de la semilla encontraron a: *Fusicoccum*, *Phomopsis*, *Gloesporium* y *Stemphylium*, influyendo algunos de ellos en la capacidad de germinación de las semillas.

Bloomberg (1969), determinó que las semillas de conos que habían sido cortados longitudinalmente no mostraron signos de enfermedad, pero después de ser extraídas para probar la capacidad de germinación fueron afectados por hongos como: *Trichoderma*, *Trichotecium*, *Cephalosporium* y *Pullularia*, variando la infección con el periodo de almacenamiento de semillas.Algunos de los hongos más frecuentemente aislados en conos fueron: *Gliocladium*, *Penicillium*, *Spicaria* y *Trichoderma*, se indicó que la baja capacidad de las semillas fué debida a los hongos facultativos aislados y también a la inmadurez de la semilla.

Munjal et al (1976) en un estudio de micoflora de semillas de *Pinus roxburghii*, *P. wallichiana* y *Cedrus deodara*, reportaron la presencia de 40 hongos de los cuales 21 fueron comunes en todas las especies de pinos y son los siguientes: *Alternaria tenuis*, *Aspergillus flavus*, *A. humicola*, *A. niger*, *Cephalosporium sp.*, *Chaetomium bostrychodes*, *Ch. globosum*, *Ch. spiali*, *Coprinus sp.*, *Curvularia sp.*, *Fusarium bostricoides*, *F. moniliforme*, *F. nivale*, *Penicillium sp.*, *Pestalotia sp.*, *Mucor globosus*, *M. hiemalis*, *Sordaria fimicola*, *Rhizopus arrhizus*, *Trichoderma viride*, *Stemphylium botryosum* y *Stigmella nanum*. En un 4% del endospermo de la semilla de *Pinus roxburghii*, se determinó la presencia de *Penicillium* y en algunas de las semillas malformadas, delgadas y pastosas se identificó a *Chaetomuim spiali*. Estos mismos autores realizaron pruebas sobre el marchitamiento de plántulas en el estado de preemergencia y postemergencia de *Pinus roxburghii* y *P wallichiana* ;determinaron que hongos identificados como: *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Curvularia sp.*, *Helminthosporium sp.*, *Phoma sp.*, *Stemphylium botryosum*, causaron grandes pérdidas en las plántulas en el estado de preemergencia y los hongos como: *Mucor sp.*, *Cephalosporium sp.*, *Fusarium sp.* y *Trichoderma viride*, fueron los que causaron pérdidas en el estado de postemergencia de las plántulas y solo *Aspergillus humicola* y *Stysanus medius*, fueron los hongos que tuvieron efecto en la germinación de las plántulas, ya que la redujeron en un 11% y 13%.

Whittle (1977) al realizar algunas pruebas sobre la presencia de hongos en las semillas y conos de *Pinus sylvestris*, observó que todos los conos maduros y los que permanecieron sobre los árboles fueron invadidos por *Scleraphoma pythiphila* y los hongos que caracterizaron la micobiota de almacenamiento fueron *Mucor* y *Penicillium*.

Garland. (1978) realizó 61 aislamientos de hongos a partir de conos y semillas y plántulas de *Pinus tedea* y algunos de los hongos aislados correspondieron a los géneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Trichothecium*.

Salinas (1978), menciona que una alta proporción de semillas forestales, particularmente las vanas portan gran cantidad de inóculo superficial o interno adquirido en la floración, en el desarrollo de los frutos o durante la manipulación de estos frutos y de sus semillas, siendo así transportado a locales o recipientes de almacenamiento, donde si las condiciones de humedad,

temperatura e iluminación resultan favorables, los hongos son capaces de desarrollarse y crear problemas de deterioro de las semillas.

Baez (1986), trabajó con semillas de *Pinus ayacahuite* var. *Veitchii* Shaw., en donde las testas y los embriones fueron sometidos al tratamiento con hipoclorito de sodio al 4%, identificándose los siguientes géneros de hongos: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Helminthosporium*, *Hormodendron*, *Monilia*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus* y *Stemphylium*; Así mismo fueron determinados algunos daños en embriones (adelgazamientos, malformaciones, reblandecimientos) asociados con la presencia de *Aspergillus* y *Penicillium*, micromicetos cuya incidencia probablemente fué decisiva en el hallazgo de embriones no desarrollados (semillas vanas).

Es importante mencionar que existen pocos estudios (Andresen & Beaman 1961, Beaman & Andresen 1966, Capó-Arteaga 1972, Riskind y Paterson 1975, Sánchez et al. 1987, Nepamuceno y Camacho 1989, Sánchez et al. 1990), que se pueden considerar como antecedentes sobre aspectos biológicos de *Pinus culminicola*, y ninguno sobre la micobiota asociada a sus semillas que pudieran alterar el desarrollo de la especie en el bosque o causar daños durante su almacenamiento. Aunque en México existe poca información sobre contaminantes de semillas forestales, se ha determinado que los micromicetos degradadores pueden destruir totalmente el cono y su contenido (Reséndiz y Rosales, 1990), de lo anterior se justifica la necesidad de realizar varios trabajos incluyendo los de micromicetos asociados.

En México el interés principal sobre micromicetos contaminantes de semillas, se ha enfocado a granos y semillas de plantas de cultivo (Christensen, C. y López L, 1962, Rangel, S.J., 1972, Christensen y Kufmann, 1976, Moreno, 1988), por lo que la mayoría del germoplasma forestal no ha recibido la debida atención. Los estudios realizados con semillas se concretan a: Determinación de pureza, húmedad, porciento de germinación, pruebas de viabilidad (Patiño y Garza 1983), lo anterior con la finalidad de determinar la calidad de la semilla, pero no se incluye el análisis fitosanitario que debiera considerarse prioritario, para conocer los daños causados y prevenir los posibles riesgos futuros, en planta reproducida en viveros y propagada en plantaciones, para ser utilizadas como recurso natural de gran importancia en la economía de México.

MATERIALES Y MÉTODO

A) Descripción del Área de Procedencia de las Semillas de *Pinus culminicola*

LOCALIZACIÓN. El Cerro del Potosí, está ubicado en el estado de Nuevo León en la porción de la Sierra Madre Oriental, entre los paralelos 25°52' de latitud norte y los meridianos 100°14' longitud oeste.(ver figura No. 1 y 2 Perry, 1991).

MUNICIPIO. Galeana.

TOPOGRAFÍA. Montañosa que va de 3200 a 3600 m.(ver Fotografía No.1).

SUELO. En estas condiciones los suelos son con escaso desarrollo, se les puede ubicar de acuerdo a la clasificación de los Orthents y en los Rendolls; Estos últimos más evolucionados que los primeros, en las fases iniciales de su desarrollo son delgados, con débil diferenciación de horizontes y presentan un alto contenido de materia orgánica en descomposición.

GEOLOGÍA. Geológicamente está formado por rocas sedimentarias del cretácico inferior aunque la Sierra Madre Oriental, en general es del plioceno (Chaplin, 1949; in Beaman & Andresen, 1966).

CLIMA. Según la clasificación de Köppen modificado por García (1980). Corresponde a un clima: BSohw"(e): Seco estepario, con una temperatura media anual superior a los 18°C (cálido) y una temperatura media mensual menor a los 18°C (frío), con lluvias en verano y una oscilación térmica extremosa entre 7 y 14°C.

VEGETACIÓN. Beaman & Andresen (1966) identifican 4 tipos de vegetación desde el punto de vista fisonómico que son los siguientes:

a) Pradera alpina: Con 38 especies, donde *Potentilla lesenina* es la más frecuente, también se encuentra a *Arenaria sp.* y *Bidens mucellari*. Las gramíneas

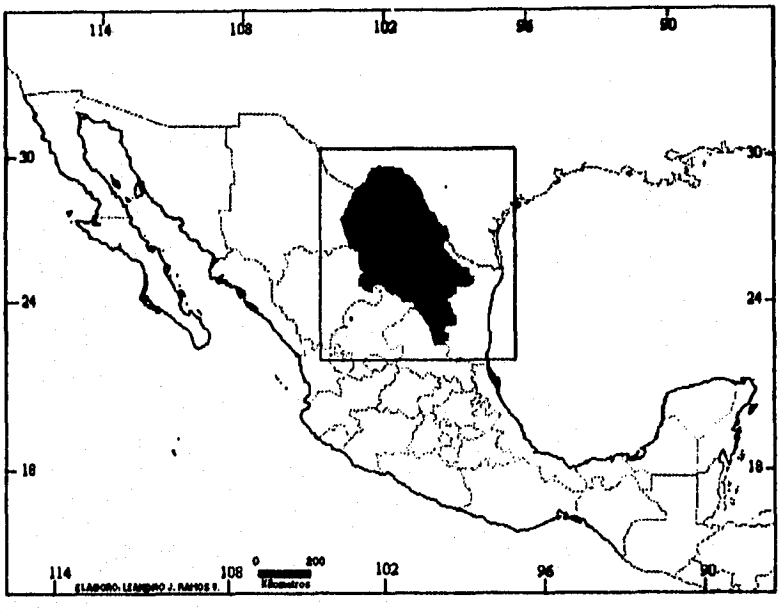


Figura 1. Localización de *Pinus culminicola* en la República Mexicana.

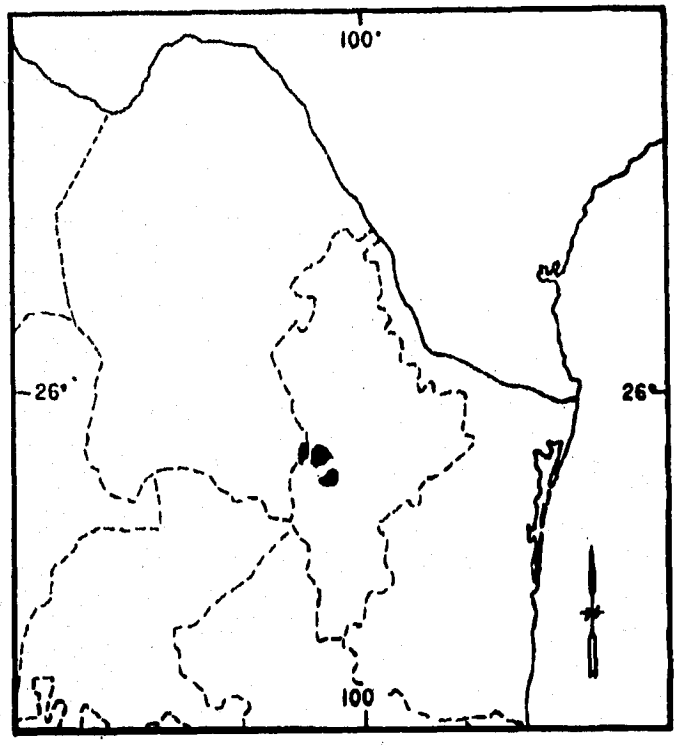
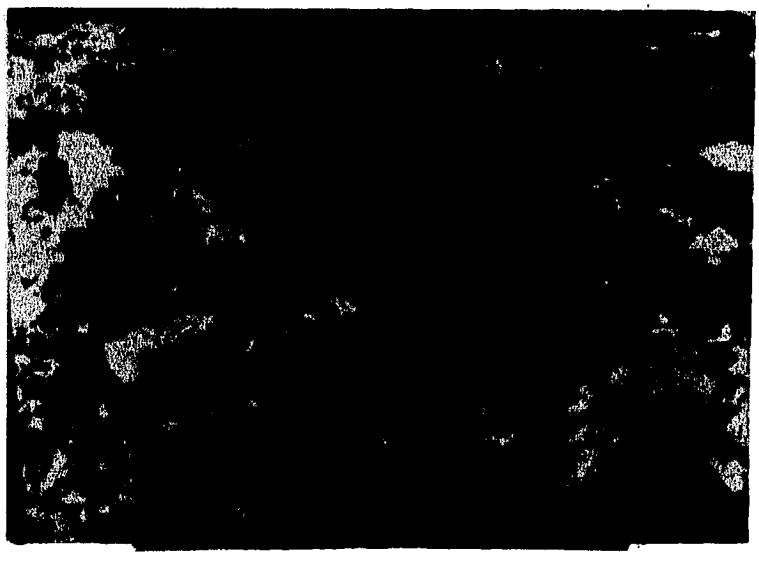


Figura 2. Distribución de *Pinus culminicola* en Nuevo León y Coahuila.

Fotografía 1 Habitat de *Pinus culminicola*.



Fotografía 2 Ejemplar de *Pinus culminicola*.

son de menor importancia entre ellas se mencionan: ***Festuca hephaestophila, Trisetum spicatum, Blepharoneuron trichalepis, Poa mulleri*** y ***Phleum alpinum.***

b) Pradera subalpina: Se presenta bajo el límite arbóreo, con especies de crecimiento mayor, destacando: ***Achillea lanulosa, Astranthium beamanii, Cirsium subcoriaceum, Delphinium valens, Helenium integrifolium, Hymenoxys insignis*** y ***Senecio carnerensis.***

c) Comunidad de *Pinus culminicola*: Constituye matorrales densos y practicamente impenetrables, formando un estrecho cinturón entre la pradera alpina y el bosque de ***Pinus hartwegii***, sin perder su caracter arbustivo.(ver fotografía No. 2).

d) Bosque de *Pinus hartwegii:* Se localiza inmediatamente abajo de la comunidad de ***Pinus culminicola*** a una altitud entre los 3000 y 3450 m., con orientación norte, y en ocasiones asciende hasta los 3700 m., con individuos que muestran deformaciones debidas a las condiciones ambientales extremas en que se desarrollan estos individuos.

B) Actividades de Laboratorio.

1.- Selección de muestras:

Para realizar el cumplimiento del objetivo trazado se procedió a realizar las siguientes actividades:

La semilla empleada en el presente estudio correspondío a la especie ***Pinus culminicola*** proporcionadas por el Centro de Germoplasma Forestal del CIFAP-D:F: Campo Experimental Coyoacán, procedentes de 2 lotes (04BA y 04BC) colectadas en el mes de Octubre de 1988, en el Cerro del Potosí, Municipio Galeana Nuevo León. (ver Cuadro No. 1. Certificado de Procedencia).

De los 2 lotes anteriores se tomaron al azar 300 semillas de cada uno, las cuales se sumergieron en un recipiente de vidrio perfectamente limpio conteniendo agua destilada durante 24 hrs. para reblandecer las testas y embriones con la finalidad de analizar estas estructuras. (ver.Fotografía No. 3).

CUADRO No. 1 Certificado de Procedencia del piñon enano.

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES Y PECUARIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES FORESTALES Y AGROPECUARIAS DEL DISTRITO FEDERAL.

PROYECTO DE GERMOPLASMA FORESTAL.

CERTIFICADO DE PROCEDENCIA.

Certificado No. 20

Especie: *Pinus culminicola* Andresen & Beaman.

No. de identificación del lote: 04BA y 04BC

Categoria: Rodal semillero identificado

Fecha de recolección: Octubre 1988

Procedencia: Cerro del Potosí, Galeana, N. L.

Altitud	Longitud	Latitud
3600 mts.	100°04'	24°49'

No. de semilla/kG.	No. de semilla viables /Kg.	Pureza (%)
4845		100

Germinación en Laboratorio (%) y Fecha de Análisis:

50%	Febrero de 1989.

Información Adicional: Alta presencia de hongos en semillas germinantes en Laboratorio. No se aplica ningún fungicida u otra sustancia.

Una vez eliminada el agua fueron abiertas las semillas utilizando el aparato triturador de semillas (marca Portlock, F. y Dought, T.,1979) con el objeto de separar las testas y de esta forma obtener embriones para sembrarlos posteriormente en el medio de cultivo PDA.

2.- Preparación de las muestras.

De esta forma tenemos que a los embriones obtenidos de el lote 04BA se les aplicaron a saber: Hipoclorito de sodio y agua oxigenada.

Para el primero se determinaron 5 concentraciones las cuales fueron: 2,4,7,10 y 15% (las primeras tres concentraciones se eligieron con base a otros estudios (Chen et al., 1965. Moreno, 1988) relacionados con este tema y las restantes se seleccionaron de acuerdo al criterio del autor de esta tesis) cada una de estas concentraciones se preparo colocando en un matraz Erlenmeyer el aseptizante y se aforó a 250 ml. con agua destilada, formándose así 5 tratamientos a intervalos de tiempo de 3 y 5 minutos, (las concentraciones y tiempos de exposición pueden variar de acuerdo a las experiencia del analista, pero hay que tomar en cuenta que se desea eliminar solamente los contaminantes, Moreno, 1988), después de desinfectar los embriones en cada una de estas concentraciones se enjuagaron mediante tres cambios con agua destilada esterilizada, posteriormente el material fué colocado en cajas de Petri provistas de papel filtro para secarlo, cabe señalar que este procedimiento es la explicación general para la utilización de hipoclorito de sodio el cual se explica más detalladamente en el rubro siembra de muestras.

Se utilizó el método directo en placa, ya que permite cuantificar los diversos hongos e identificar un gran número de especies.

Las semillas anteriormente desinfectadas fueron transferidas bajo condiciones de asepsia a cajas de Petri las cuales con anterioridad fueron esterilizadas a 200°C durante 120 min., posteriormente se vació en ellas el medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar y se incubaron durante 48 hrs. para su prueba de esterilidad, se utilizó este medio porque es uno de los más empleados para el aislamiento de hongos. La preparación de este medio consistío en esterilizarlo por calor húmedo utilizando la autoclave a una presión de 15 lb. y 120°C por espacio de 20 min., una vez esterilizado el medio se dejó enfriar y se vaciaron 30 ml., en cada caja de Petri cerca de la flama de un mechero.

3.-Siembra de las muestras a intervalos de tiempo.

Lote 04BA **Hipoclorito de sodio a intervalo de 3min.**

Se utilizaron las concentraciones al 2,4,7,10 y 15%, enseguida se prepararon 5 cajas con el medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar para cada una de estas concentraciones, sumando un total de 25 cajas, además se utilizaron otras 5 cajas con el mismo medio para el grupo testigo, al cual no se le aplicó ningún desinfectante, resultando un total de 30 cajas por tratamiento posteriormente mediante pinzas de punta roma esterilizadas se colocaron 5 embriones para cada una de las 25 cajas del grupo experimental y para las 5 cajas del grupo testigo.(ver Cuadro No. 2 y Fotografía No. 4).

Hipoclorito de sodio a intervalo de 5 min.

Por lo que respecta al intervalo de 5 min. se utilizaron las mismas concentraciones (2, 4, 7, 10 y 15%), se empleó el mismo procedimiento anteriormente descrito, en donde se utilizaron las cinco repeticiones (5 cajas de Petri) por concentración (grupo experimental) y 5 repeticiones (5 cajas de Petri) para el grupo testigo

Lote 04BA **Agua oxigenada a intervalos de 3 y 5 min.**

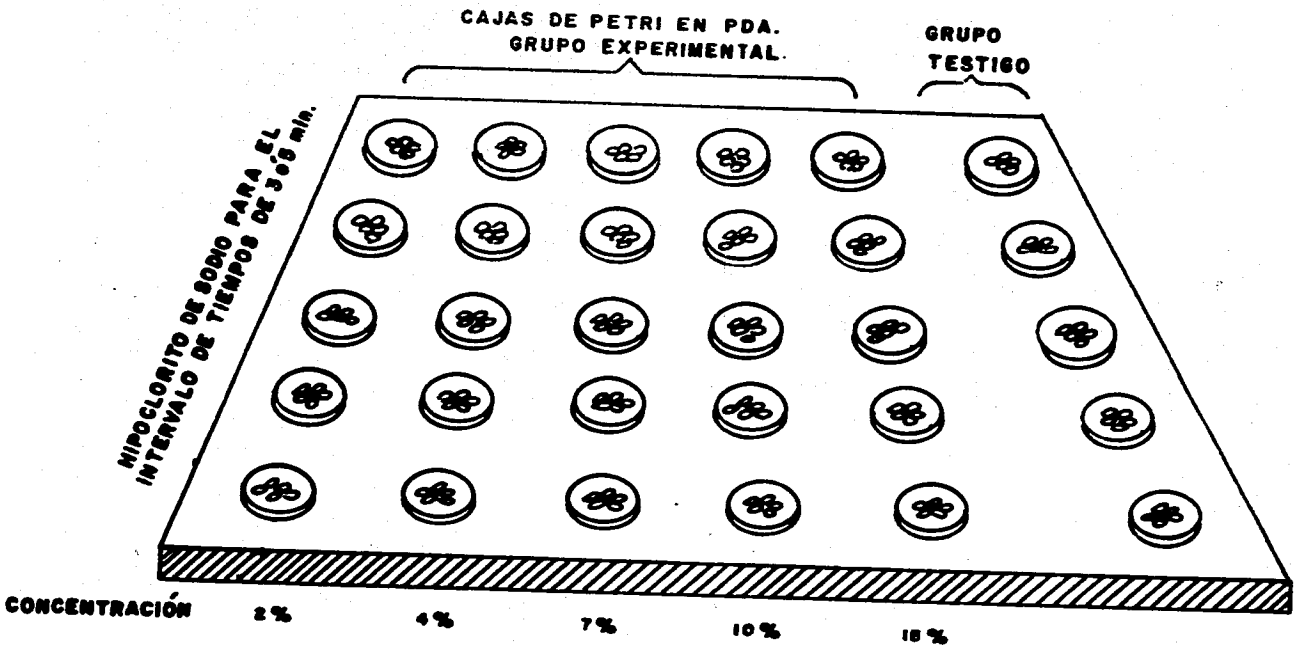
Por lo que respecta a este desinfectante se siguio el mismo procedimiento que para el hipoclorito de sodio, pero a diferencia de este aquí las concentraciones fueron de: 5,10,15,20 y 25% con los mismos intervalos de tiempo de 3 y 5 min. y las cinco repeticiones (5 cajas de Petri) por concentración (grupo experimental) y 5 repeticiones (5 cajas de Petri) para el grupo testigo.

Este lote de semillas se caracterizó por ser un lote de uso continuo que sirve para realizar ensayos como de: procedencia, viabilidad, germinación ó donación, para trabajos de investigación del CENID-COMEF y otras instituciones como la ENCB del IPN.

Lote 04BC

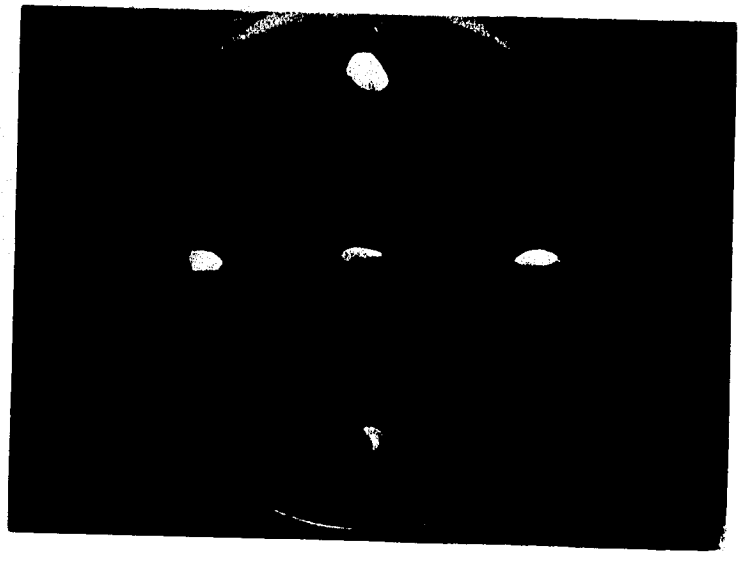
Para este lote se utilizaron los mismos desinfectantes (hipoclorito de sodio y agua oxigenada) e intervalos de tiempo de 3 y 5 minutos. Para cada una de las concentraciones también se aplicaron 5 repeticiones (5 cajas de Petri con

CUADRO 2. ESQUEMA SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE LA SIEMBRA DE MUESTRAS



NOTA: ESTE MISMO PROCEDIMIENTO SE SIGUIÓ PARA EL TRATAMIENTO DE AGUA OXIGENADA LO UNICO QUE CAMBIO, FUE EL TIPO DE CONCENTRACIONES

Fotografía 3 Semillas de la especie en estudio.



Fotografía 4. Semillas sin testa de pino enano en cultivo de PDA.

medio de cultivo Papa-dextrosa-agar) y 5 repeticiones (5 cajas de Petri) para el grupo testigo con 5 embriones cada una de las cajas, haciendo un total de 25 cajas del grupo experimental y 5 cajas del grupo testigo por cada aseptizante.

Este lote es de conservación y se encuentra de reserva al cual se le mantiene en condiciones de preservación.

4.- Distribución de las muestras.

De el número total de embriones empleados (600) se utilizaron 120 cajas, destinándose 100 cajas para el material experimental y 20 cajas para el grupo testigo.

5.- Aislamiento de la micobiota.

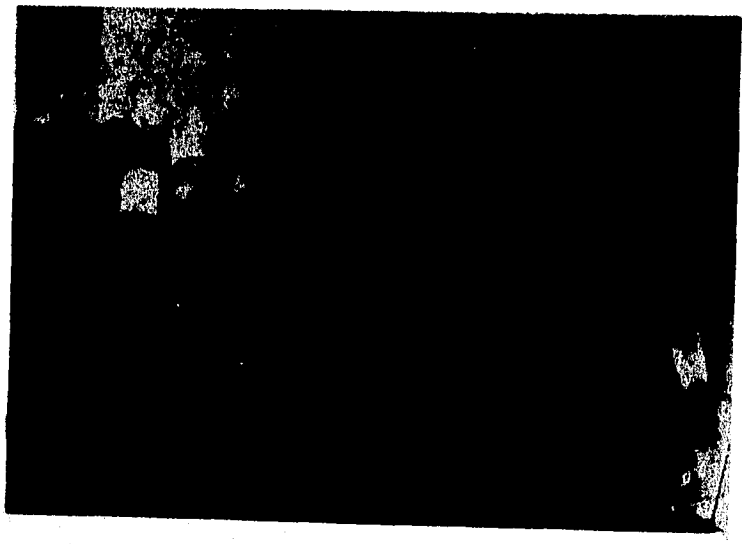
Una vez preparado este material fué llevado a incubación a una temperatura de 25 a 27°C (temperatura apropiada para el desarrollo de estos hongos), enseguida se realizaron observaciones cada tercer día, de acuerdo a (CENICCANDSA cit. en el Taller de Hongos en Semillas y Granos 1993), menciona que el rango de desarrollo óptimo para los hongos es de seis a siete días, ya que las placas deben ser leídas durante esos días para evitar que los hongos interfieran unos con otros por la abundante esporulación, esta incubación fué realizada en una estufa (Blue M).

De las cajas de siembra original se contabilizaron los embriones que mostraron crecimiento fúngoso, transferiendo cada una de las colonia a nuevas cajas de medio de cultivo con el objeto de obtener cultivos puros.

Cuando se consideró apropiado se fueron aislando en tubos inclinados por duplicado (medio de papa-dextrosa agar) los hongos, la inoculación fué en punto, mediante asa micológica e incubación de 25-27°C en estufa (Blue M) para cultivo durante un tiempo variable (5-7 días) según el requerimiento, para obtener cultivos puros. (ver Fotografía No. 5).

6.- Identificación de hongos.

La determinación de los hongos aislados se realizaron bajo los siguientes criterios:



Fotografía 5 Cultivos puros de algunos micromicetos de *Pinus culminicola*

A.- Caractísticas macroscópicas.

Las características macroscópicas, se estudiaron de el medio de cultivo ya mencionado considerándose: observación de el tipo de desarrollo y características de la colonia, (forma de crecimiento, aspecto y color de la colonia, coloración al reverso, difusión de pigmento en el medio), los cuales permitieron observar sus diferentes características morfológicas. (Verna y Herrero, 1952., Baez, 1986., Moreno, 1988., Guarneros, 1989.).

B.- Características microscópicas.

Se incluyeron técnicas de observación en microscopio compuesto para lo cual en condiciones de asepsia se realizaron:

a) Preparaciones directas con alcohol al 70%, tomando un poco de micelio y estructuras reproductoras de cada colonia.

b) Preparación con colorante azul de lactofenol-algodón.

c) Preparaciones semipermanentes con el medio de montaje de Tuite (Tomado de Moreno, 1988), utilizando alcohol al 70% para eliminar burbujas de aire para añadir posteriormente el lactofenol. Para limpiar de esporas, burbujas e impurezas a la preparación se le realizó un cambio de agua a lactofenol, para sellar las preparaciones se utilizó barniz o esmalte de uñas con la finalidad de guardarlas por varios meses.

d) La identificación de las estructuras observadas se realizaron mediante claves micológicas para llegar primeramente a nivel de grupo, género y en ciertos casos a especie (Ellis, 1971, Barnett, 1972, Raper y Fenell 1977, Domsch et al. 1980, Moreno, 1988, Romero, 1988), y con la valiosa asesoría del Dr. Manuel Rosas Romero (comunicación personal). (Director de Inspección Fitosanitaria de Sanidad Vegetal).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de las Tablas en relación al número de colonias presentes con los Tratamientos de Hipoclorito de Sodio y Agua Oxigenada a intervalos de Tiempo de 3 y 5 min.

Tabla 1. Número de colonias por especie con tratamiento de Hipoclorito de Sodio durante 3 minutos.

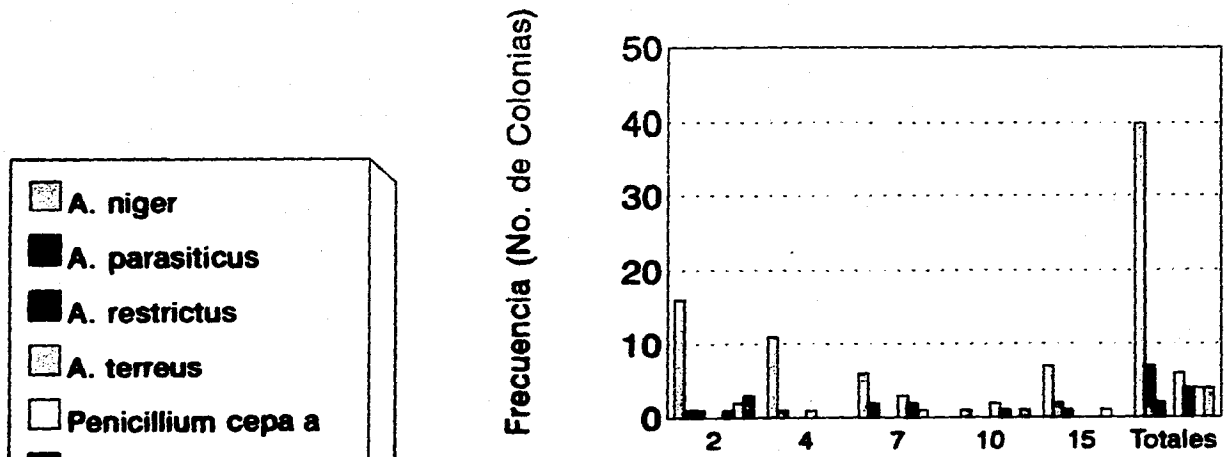
En el análisis de los resultados de la tabla 1, en donde se relaciona la frecuencia de colonias presentes con el tiempo de exposición de las semillas en hipoclorito de sodio a las concentraciones: 2%, 4%, 7%, 10% y 15%, se tiene que la especie *Aspergillus niger* se presentó con una mayor incidencia en los embriones de las semillas de *P. culminicola* , observándose el desarrollo de más colonias a las concentraciones de 2% y 4% con 16 y 11 colonias, mientras que en las concentraciones de 7% y 15%, se presentó un número menor de colonias con 6 y 7, y en donde no hubo crecimiento de este hongo fué en la concentración al 10%, por lo que el número total de colonias de esta especie en las concentraciones empleadas fué de 40.

Aspergillus parasiticus se presentó en las concentraciones 2%, 4%, y 10% con solo una colonia y en las concentraciones 7% y 15% se determinaron dos colonias, obteniéndose así para esta especie un total de 7 colonias.

De la especie *A. restrictus* la frecuencia del número de colonias fué solamente una en las concentraciones del 2% y 15%, y en las otras concentraciones no se observó desarrollo de esta especie.

A. terreus no presentó crecimiento en ninguna de las concentraciones probadas.

Tabla 1. Número de Colonias por especie con tratamiento de **Hipoclorito de Sodio** durante 3 Minutos



A. niger	16	11	6	0	7	40
A. parasiticus	1	1	2	1	2	7
A. restrictus	1	0	0	0	1	2
A. terreus	0	0	0	0	0	0
Penicillium cepa a	0	1	3	2	0	6
Penicillium cepa b	1	0	2	1	0	4
Penicillium cepa c	2	0	1	0	1	4
Penicillium cepa d	3	0	0	1	0	4

Concentraciones por tratamiento(%)

Tabla 2. Número de colonias por especie con tratamiento de Hipoclorito de Sodio durante 5 minutos.

Por lo que respecta a la tabla 2 tenemos que la especie *A: niger* también se presentó con mayor frecuencia en los embriones de las semillas de *P. culminicola*, desinfectadas con hipoclorito de sodio durante 5 minutos encontrándose esta especie en todas las concentraciones empleadas, observándose el desarrollo de más colonias al 2% y 7% con un número de 12 y 19, en cambio en las concentraciones de 10% y 15% se presentó un número menor de colonias 5 y 6 respectivamente; obteniéndose un total de colonias para todas las concentraciones de 49.

Por lo que respecta a la especie *A. parasiticus* se presentaron solamente 2 colonias en la concentración al 2%, mientras que en las restantes concentraciones no se observó crecimiento de este hongo.

En relación a las especies *A. restrictus* y *A. terreus*, cabe mencionar que no se observó crecimiento micelial de estas especies.

Para el género *Penicillium*, se encontró un mayor número de colonias (12) de esta forma para la cepa a, se registraron 5 colonias a la concentración del 10%, en la concentración del 2% 3 colonias en las concentraciónes del 4% y 7% con 2 colonias, y ningún crecimiento en la concentración del 15%.

La cepa b tuvo un registro de 4 colonias al 7%, 3 colonias al 15% 2 colonias en las concentraciones 7% y 10% y ninguna al 2%, con un total de 11 colonias.

En la cepa c se registró la presencia de 7 colonias a la concentración del 10%, 2 colonias al 2%, una colonia en las concentraciones del 7% y 15%y ningún crecimiento en la concentración del 4%, para hacer un total de 11 colonias.

En cuanto a la cepa d fué la que presentó un menor registro de colonias (4), 3 colonias en la concentración de l2%, una al 15% y ningún registro en las concentraciones del 4%,7% y 10%.

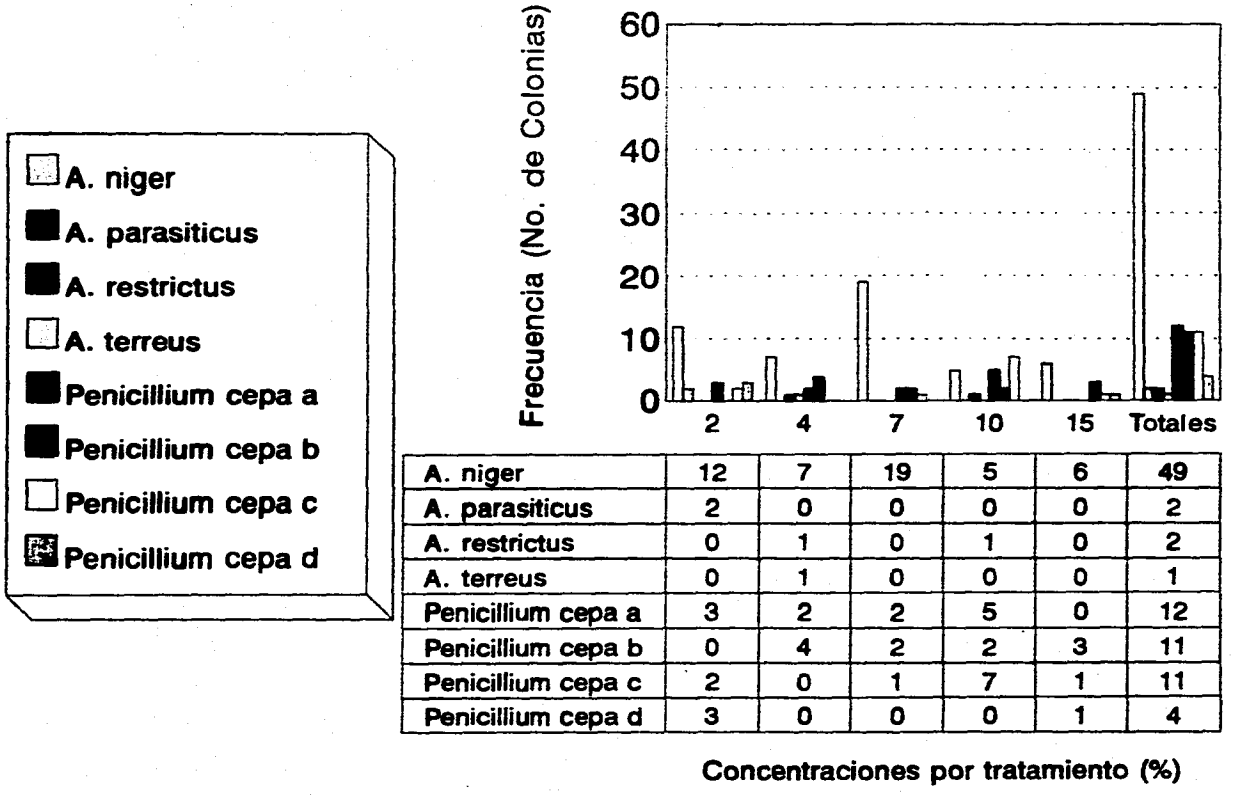
Con respecto al género *Penicillium* cabe mencionar que no se llegó a la determinación hasta especie, debido a que nó se contó con los reactivos necesarios para la preparación de los medios de cultivo, pero se realizó una descripción morfológica de estos micromicetos y de esa forma se llegó a la descripción de 4 tipos de cepas diferentes de este género, de las cuales se tiene que: En la cepa a de la concentración del 7% se presentó una frecuencia de 3 colonias, en la concentración 10% se obtuvo 2 colonias, mientras que al 4% solo se registró una colonia y en las concentraciónes del 2% y 15% no presentaron ningún crecimiento, por lo que el número total de colonias de este cepa fué de 6 colonias.

En la cepa b se presentaron 2 colonias a la concentración del 7%, una colonia al 2% y 10% respectivamente y ningún crecimiento en las concentraciones del 4% y 15% haciendo un total de 4 colonias

Por lo que respecta a la cepa c se determinó el crecimiento de 2 colonias en la concentración del 2%,una colonia se registró en la concentración del 7% y 15% y ninguna en la concentración del 4% y 10%.

Cepa d, en esta cepa se registró 3 colonias en la concentración del 2%,una colonia a la concentración del 10% y ninguna en las concentraciones del 4%, 7% y 15%, haciendo un total también de 4 colonias.

Tabla 2. Número de Colonias por especie de Micromicetos con tratamiento de Hipoclorito de Sodio durante 5 Minutos



A. niger	12	7	19	5	6	49
A. parasiticus	2	0	0	0	0	2
A. restrictus	0	1	0	1	0	2
A. terreus	0	1	0	0	0	1
Penicillium cepa a	3	2	2	5	0	12
Penicillium cepa b	0	4	2	2	3	11
Penicillium cepa c	2	0	1	7	1	11
Penicillium cepa d	3	0	0	0	1	4

Tabla 3. Número de colonias por especie con tratamiento de Agua oxigenada durante 3 minutos.

En la tabla 3 se presenta la frecuencia de colonias de hongos desarrolladas en semillas tratadas con agua oxigenada durante 3 min. a las concentraciones de: 5%, 10%, 15%, 20% y 25%, de esta forma tenemos que la especie de *A. niger* se presentó con mayor número de colonias en las concentraciones anteriormente señaladas, determinando así: 21, 15, 18, 16, 8 colonias respectivamente, sumando en total 78 colonias.

A. parasiticus se presentó en las concentraciones de 10%, 15% y 25% con una colonia y 4 colonias en la concentración al 20%, sumando un total de 7 colonias.

En cuanto a *A. restrictus* no se presentó desarrollo micelial en ninguna concentración.

A. terreus registró solo una colonia a la concentración del 10%.

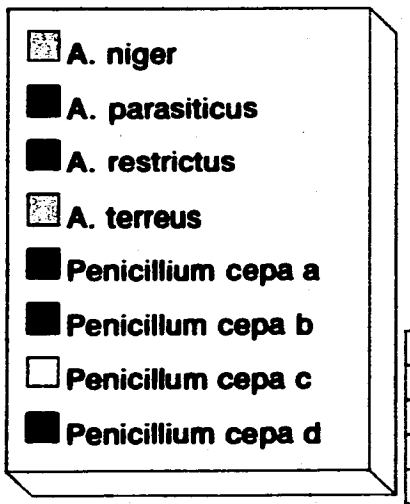
Para el género *Penicillium* se estimó una incidencia de 26 colonias correspondiendole a la cepa a, 8 colonias en las concentraciones del 5% y 20%, 5 colonias en la concentración del 10%; 3 colonias al 25% y 2 colonias al 15%.

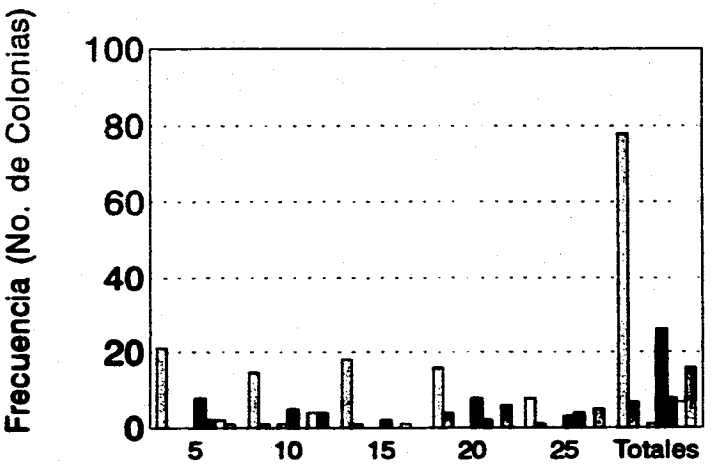
Para la cepa b se obtuvieron 4 colonias en la concentración del 4%, 2 colonias al 5% y 20%, ningún crecimiento micelial al 10% y 15%, sumando un total de 8 colonias.

En la cepa c se registró 4 colonias al 10%, 2 colonias al 5%,una colonia al 15% y ninguna presencia de este hongo en las concentraciones del 20% y 25%.

La cepa d presentó 6 colonias al 20%, 5 colonias al 25%,4 colonias en la concentración del 10%y ningún crecimiento al 15%,sumando untotal de colonias en esta cepa de 16.

Tabla 3. Número de Colonias por especie de Micromicetos con tratamiento de Agua oxigenada durante 3 Minutos





A. niger	21	15	18	16	8	78
A. parasiticus	0	1	1	4	1	7
A. restrictus	0	0	0	0	0	0
A. terreus	0	1	0	0	0	1
Penicillium cepa a	8	5	2	8	3	26
Penicillum cepa b	2	0	0	2	4	8
Penicillum cepa c	2	4	1	0	0	7
Penicillium cepa d	1	4	0	6	5	16

Concentraciones por tratamiento (%)

Tabla 4. Número de colonias por especie con tratamiento de Agua oxigenada durante 5 minutos.

Del análisis de resultados para el tiempo de exposición de las semillas en agua oxigenada durante 5 min. se determinaron las siguientes 3 especies.

A. niger se manifestó en todas las concentraciones (5%, 10%, 15%, 20% y 25%) con una frecuencia de 2, 12, 11, 7, 4 colonias respectivamente, sumando así un total de 36 colonias, comparando esta tabla con la anterior (3 minutos), tenemos que el número de colonias fué menor aquí, en casi un 50% (36 colonias) mientras que en la anterior (3 minutos) se presentaron 78 colonias.

Para *A. parasiticus* se tiene que en la concentración al 25% se presentó un crecimiento de 13 colonias; al 15% se presentó 2; Al 20% se contabilizó una, para las restantes concentraciones no se observó crecimiento alguno, de esta forma hubo un total de 16 colonias.

Comparando el tiempo de exposición anterior de 3 minutos y el de esta tabla, se tiene una mayor frecuencia de colonias en este tiempo de exposición (16) mientras que en la anterior (3 minutos) hubo 7 colonias.

Por lo que toca al desarrollo de colonias para las especies *A. restrictus* y *A. terreus* cabe mencionar que no se observó crecimiento micelial de estas especies.

Del género *Penicillium* se obtuvo el siguiente número de colonias, en la cepa a 6 colonias a la concentración de 25%, 4 al 20%, 3 al 10%, 2 al 15%, y ningún crecimiento al 2% haciendo un total de 15 colonias.

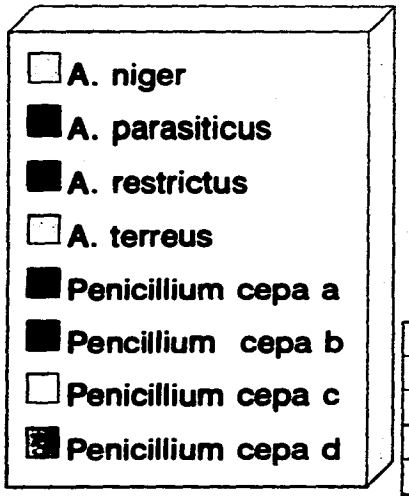
En cuanto a la cepa b solo se registró 4 colonias en la concentración del 15%.

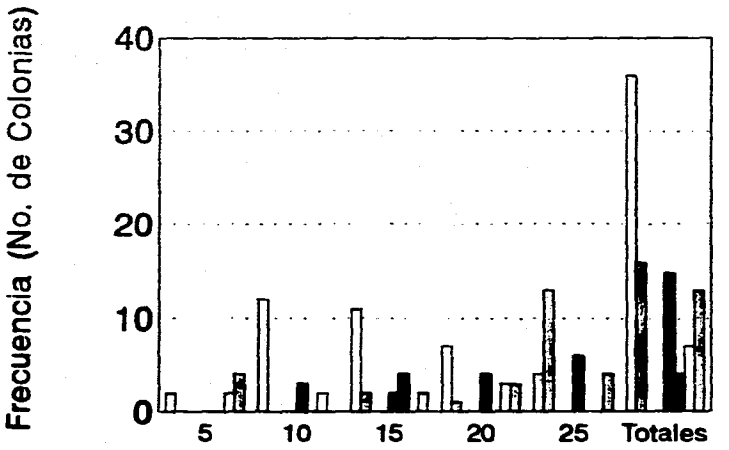
En la cepa c aparecieron 3 colonias al 20%, 2 colonias al 5% y 10% y ninguna en las concentraciones del 15% y 25% sumando un total de 7 colonias.

Por último en la cepa d se obtuvo el siguiente número de colonias, 4 al 5% y 25%, 3 al 20% ,2 al 15%y ningún crecimiento al 10%,teniendo un total de 13 colonias.

Relacionando ambos tiempos de exposición (3' y 5') tenemos que para el primer tiempo se contabilizó 57 colonias, en tanto que para el segundo tiempo disminuyeron las colonias con un total de 39.

Tabla 4. Número de Colonias por especie de Micromicetos con tratamiento de Agua oxigenada durante 5 Minutos





	5	10	15	20	25	Totales
A. niger	2	12	11	7	4	36
A. parasiticus	0	0	2	1	13	16
A. restrictus	0	0	0	0	0	0
A. terreus	0	0	0	0	0	0
Penicillium cepa a	0	3	2	4	6	15
Pencillium cepa b	0	0	4	0	0	4
Penicillium cepa c	2	2	0	3	0	7
Penicillium cepa d	4	0	2	3	4	13

Concentraciones por tratamiento (%)

Tabla 5. Colonias totales en el tratamiento con hipoclorito de sodio

En cuanto a esta tabla cabe aclarar que la columna horizontal representa el número de cajas que se empleó para cada concentración, así se tiene como ejemplo que para la primera concentración (2%) se utilizaron 5 cajas de Petri con PDA, conteniendo cada una 5 embriones, por lo que cada caja representa una repetición. La columna vertical indica las cinco concentraciones ensayadas y el grupo testigo.

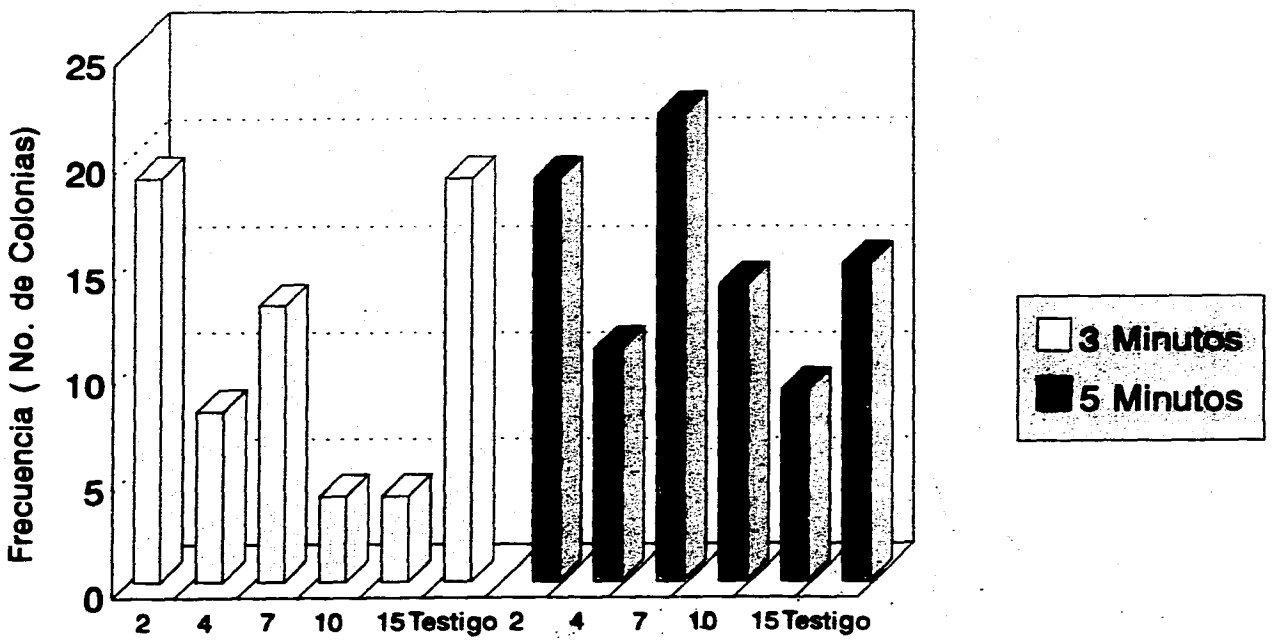
Del análisis de los resultados de esta tabla en el tiempo de exposición de 3 min., se pone de manifiesto que en la concentración del 2% se desarrolló mayor número de colonias (19), mientras que en las concentraciones que presentaron menor número de colonias fueron al 10% y 15% con 4 colonias, y en las concentraciones 4% y 7% se obtuvieron 8 y 13 colonias respectivamente.

Del grupo testigo se puede citar que se observó un comportamiento similar al de la concentración al 2%.

En cuanto a los resultados en la exposición de tiempo de 5 min. se observa mayor crecimiento de colonias (22) en la concentración del 7%, en donde se presentó un menor número de colonias (9) fué a la concentración del 15% y en las concentraciones del 2%, 4% y 10% se registraron 19, 11 y 14 colonias respectivamente.

Del grupo testigo se puede mencionar que se observó un desarrollo micelial de 15 colonias.

Tabla 5. Colonias totales con tratamiento de Hipoclorito de Sodio



3 Minutos	19	8	13	4	4	19						
5 Minutos							19	11	22	14	9	15

Concentraciones por tratamiento (%)

Tabla 6. Colonias Totales en el tratamiento de Agua oxigenada

Del análisis de resultados y representados en la gráfica 6 cabe mencionar que las variables en el eje cartesiano son iguales a las concentraciones descritas, para el tratamiento con hipoclorito de sodio en los tiempos de exposición de 3 y 5 minutos.

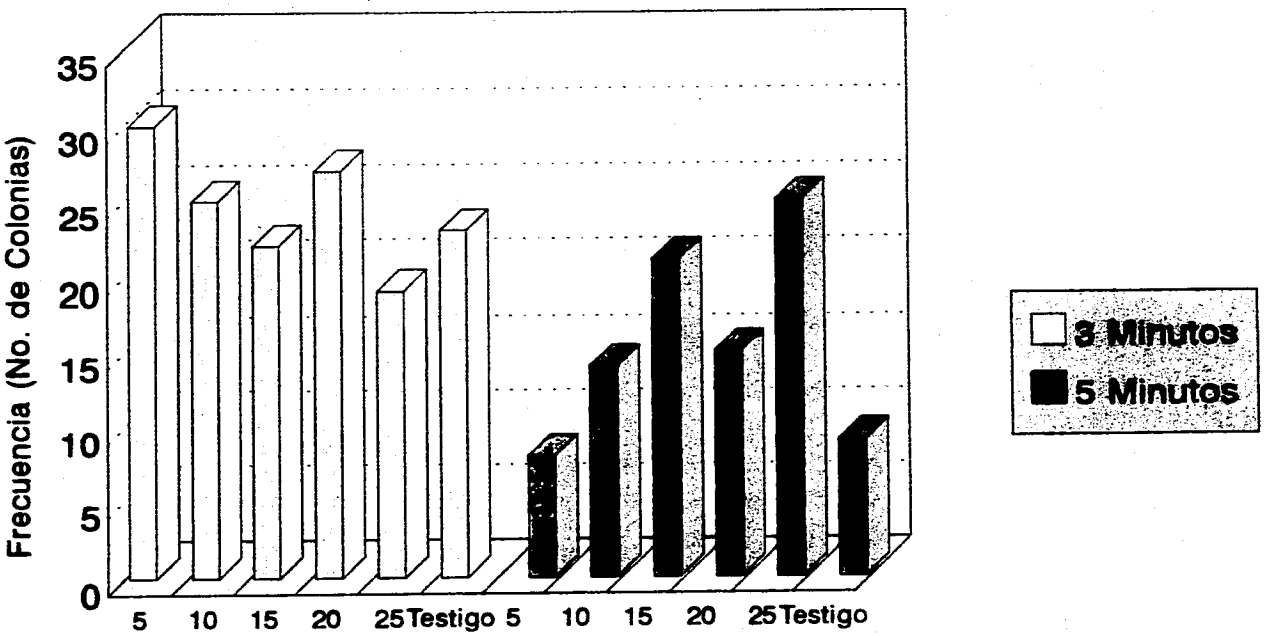
Así se tiene que para el tiempo de 3 minutos, la frecuencia de colonias de micromicetos presentes en todas las concentraciones es alta, se pone de manifiesto que en la concentración al 5% se desarrolló mayor número de colonias (30), mientras que para las concentraciones 10%, 15%, 20% se obtuvieron 25, 22 y 27 colonias respectivamente, y en donde se desarrolló menor número de colonias, fué en la concentración del 25% con un registro de 19 colonias.

Del grupo testigo se puede mencionar que se observó un crecimiento micelial de 23 colonias.

En cuanto a los resultados en la exposición de tiempo de 5 min. se observó una disminución en el número de colonias en relación con el tiempo de 3 min. de un 40% aproximadamente, la concentración en donde se desarrolló mayor número de colonias (25) fué al 25%, el menor número de colonias fué la concentración del 5% con 8 colonias, en cuanto a las concentraciones 10%, 15%, 20% se obtuvieron 14, 21 y 15 colonias respectivamente.

Del grupo testigo se observó un desarrollo micelial de 9 colonias.

Tabla 6. Colonias totales con tratamiento de Agua oxigenada



3 Minutos	30	25	22	27	19	23						
5 Minutos							8	14	21	15	25	9

Concentraciones por tratamiento (%)

Análisis Cualitativo de los desinfectantes utilizados.

Durante la realización de este trabajo se recabó información tanto bibliográfica como de datos originales obtenidos por observaciones y pruebas de laboratorio, con base a lo anterior se tiene que:

Se cumplieron nuestros objetivos sobre el conocimiento de la micobiota asociada a semillas de *P. culminicola*, nuestros resultados fueron satisfactorios en lo concerniente a la comparación de los resultados con hipoclorito de sodio y agua oxigenada bajo un enfoque cualitativo y cuantitativo.

Se determinó que los 2 desinfectantes empleados no influyeron por igual en los diferentes tiempos de exposición.

Del tratamiento con el desinfectante de hipoclorito de sodio a los tiempos de exposición de 3 y 5 min. se observó mayor frecuencia de colonias en el último periodo de tiempo, mientras que al tiempo de 3 min. se detectó menor frecuencia de colonias en los embriones (aproximadamente 30% de inhibición de desarrollo de hongos) (ver Tabla 5).

En relación con el otro desinfectante empleado que fué agua oxigenada, se observó una mayor frecuencia de colonias al tiempo de exposición de 3 min. y al tiempo de exposición de 5 min. hubo menor número de contaminantes en embriones de casi un 40% (ver Tabla 6).

Comparando los resultados de este estudio con los encontrados por Chen y Chung (1965). Se tiene que estos autores mencionan que el agua oxigenada es más efectiva para desinfectar embriones que el hipoclorito de sodio, esta opinión coincide con los resultados de este estudio ya que se detectó mayor efectividad del agua oxigenada, por lo que se propone utilizar mejor este desinfectante que el hipoclorito de sodio para desinfectar embriones, opinión reforzada con estudios relacionados sobre micobiota presente en semillas de especies agrícolas y forestales realizados por Neal et al. (1967) y Edgren y Trappe (1970).

En otros estudios realizados (Salinas 1978), sobre otras especies de *Aspergillus* observaron una disminución en su crecimiento ante la aplicación de hipoclorito de sodio al 10%. En nuestro estudio se determinó que este mismo desinfectante también disminuyó la presencia de esta especie a mayor tiempo de exposición (5 min.).

Los exámenes micológicos de las semillas de *P. culminicola* empleadas arrojan los siguientes datos:

Por lo que toca a la identificación se determinó a la Clase Deuteromycetes con el grupo "*Aspergillus*" obteniéndose desarrollo micelial de 3 a 4 colonias por caja y al grupo "*Penicillium*" con un desarrollo micelial de 2 a 3 colonias por caja en los tratamientos anteriormente mencionados.

En cuanto a los hongos determinados destacan 4 especies del género *Aspergillus* presentándose con una mayor frecuencia e incidencia en las cajas de cultivo a: *Aspergillus niger* la cual representó 90%del total de contaminantes en embriones; la presencia de este hongo fué en los 2 tratamientos y a todas las concentraciones empleadas, excepto en el tratamiento con hipoclorito de sodio al 10% a 3 min. (ver Tabla 1).

Por referencias bibliográficas (Moreno, 1988), este hongo en las semillas hace pensar en la posibilidad de un deterioro de estas estructuras, ya que coloniza productos en estado avanzado de deterioro. En granos agrícolas estos hongos son comunes durante su almacenamiento por lo que es probable que también deterioren a semillas forestales ya que también se encuentran almacenadas y sus condiciones ambientales de almacenamiento en la mayoría de los bancos de germoplasma son precarios

Aspergillus parasiticus: Este micromiceto se presentó con un mayor número de colonias en el tratamiento con agua oxigenada mientras que con hipoclorito de sodio se observó una reducción de colonias.

La presencia del grupo *A. flavus* en donde está incluído *A. parasiticus* indica una mala conservación de granos, pero no es determinante para decir que las aflatoxinas estén presentes en el producto del cual fué aislado, ya que para poder asegurar que las aflatoxinas estén presentes en una muestra determinada es necesario confirmarla con un bioensayo. En semillas forestales no se ha determinado.

Aspergillus restrictus: Se presentó solamente en el tratamiento de hipoclorito de sodio con 4 colonias a los 2 tiempos de exposición (3 y 5 min.) (ver Tabla 1 y 2). Su crecimiento de esta especie es lenta y se ha reportado en cereales, cacahuate y copra, no se ha reportado en semillas forestales.

Aspergillus terreus: Su frecuencia fué de 2 colonias, una en el aseptizante de hipoclorito de sodio al 4% en 5 min. y la otra en agua oxigenada al 10% en 3 min., no se ha reportado en especies forestales.

Del género ***Penicillium*** se han registrado más de 60 especies aisladas en granos y sus derivados (Wallace, 1973). También se ha reportado que ***Penicillium spp.*** aislado en embriones reduce el poder germinativo y se asocia también con deterioro de semillas almacenadas y especies productoras de micotoxinas (Christensen y Kaufman, 1969, cit. Moreno, 1988); (Baez, 1986).

La presencia de ***Rhizopus sp.*** fué solo en 5 cajas, el crecimiento de su micelio es rápido y se dispersa por toda la caja, enmascarando el desarrollo de otros hongos de crecimiento más lento, se ha aislado en granos de maíz en estado avanzado de deterioro, caba señalar que a este hongo se le considera como saprobio.

Se observaron también la presencia de algunas bacterias de color crema brillante en el medio, pero no se llegó a su determinación, ya que se les consideró como contaminantes.

De la experiencia adquirida se ha motivado el planteamiento de algunas ideas acerca de la forma en que se podría continuar con la investigación sobre este trabajo, de esta forma se tiene que: Los pinos piñoneros han sido recomendados como especies para reforestación urbana en el D. F. (Benavides, 1990), por sus características este árbol se puede utilizar en la jardineria en maceta en la técnica denominada "Bonsai" (Bradley, 1976),como se le considera a este pino en peligro de extinción se necesita realizar más estudios para que no desaparesca de esa zona como: La conservación de los recursos genéticos de los pinos piñoneros para proteger las especies y poblaciones amenazadas por incendios y también incluyendo los de micromicetos, por otro lado se recomienda realizar estudios con los tratamientos y las concentraciones empleadas en el mismo día para aplicarles análisis estadísticos que sean significativos.

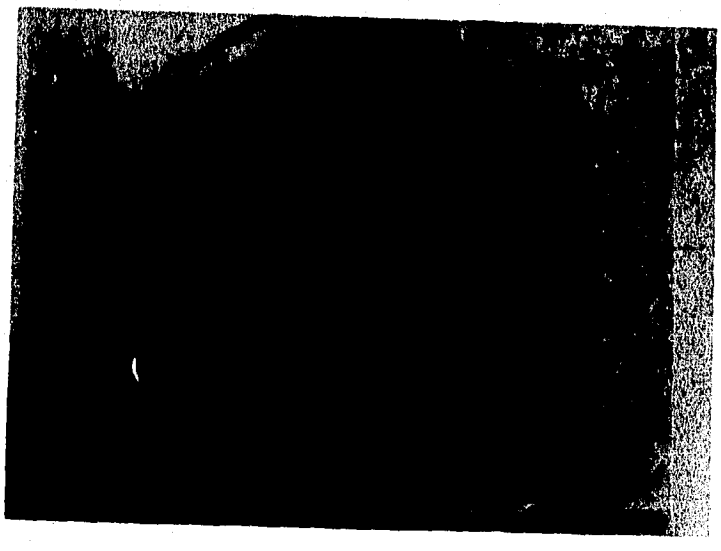
Descripción microscópica de los hongos que se encontraron en las semillas de *Pinus culminicola*.

***Aspergillus niger* van Tieghem.**

Colonias: En cultivos de PDA, el crecimiento fué abundante con anillós concéntricos de color café obscuro, el reverso incoloro.

Conidios: Formándose cadenas usualmente globosos ó equinulados de color café obscuro, cabezuela grande y globosa en tono también de café obscuro.

Conidióforos: Lisos, incoloros, de diámetro variable.



Fotografía 6 Cultivo de *Aspergillus niger*.

Aspergillus parasiticus Speare

Colonias: Se realizaron aislamientos en PDA y algunos en agar de Czapek y su crecimiento de las colonias fueron en los dos medios de cultivo de color verde amarillentas

Conidios: Equinulados, cabezuelas radiadas a globosas, esclerocios ausentes.

Conidióforos: Lisos, rugosos, fiálides en una serie color verde-amarrillo brillante.

Fotografía 7 Cultivo de *Aspergillus parasiticus*.

Aspergillus restrictus G. Sm.

Colonias: Se realizaron aislamientos en PDA y algunos en MSA, se observó que su crecimiento es muy lento, en los dos medios de cultivo, las colonias son muy pequeñas de color verde obscuro a verde olivo, en la parte externa presenta un anillo de color blanco, este hongo a simple vista se pueden confundir con **Penicillium**.

Conidios: Son en cadenas, elipsoidales ó equinulados, las cabezas conidiales son largas ó delgadas con columnas sueltas o compactas, sin cleistotecios.

Conidióforos: De pared lisa, hialinos con una vesícula semiesférica.

Fotografía 8 Cultivo de *Aspergillus restrictus*.

***Aspergillus terreus* Thom**

Colonias: Con un crecimiento aterciopelado, de color canela ó carne de forma fragmentada de diferentes tamaños, el reverso presenta un tono pálido.

Conidios: En cadenas elípticas a globosas, color canela ó carne, sin cleistotecios.

Conidióforos: Lisos, hialinos, simples ó septados, vesícula semiesférica fiálides biseriados.

Fotografía 9 Cultivo de *Aspergillus terreus*.

Penicillium spp.

En las observaciones microscópicas se observaron los conidios en forma de cadena y globosos, los conidióforos son largos que se ramifican en forma de escoba ó cepillo.

De las 4 cepas que se obtuvieron se describen las características macroscópicas siguientes:

Cepa a :
Presenta un micelio de color verde-agua claro con un anillo alrededor blanco, su crecimiento es rápido sobre las semillas, en forma de manchones de tamaño similar, no difunde pigmento en la coloración del medio.

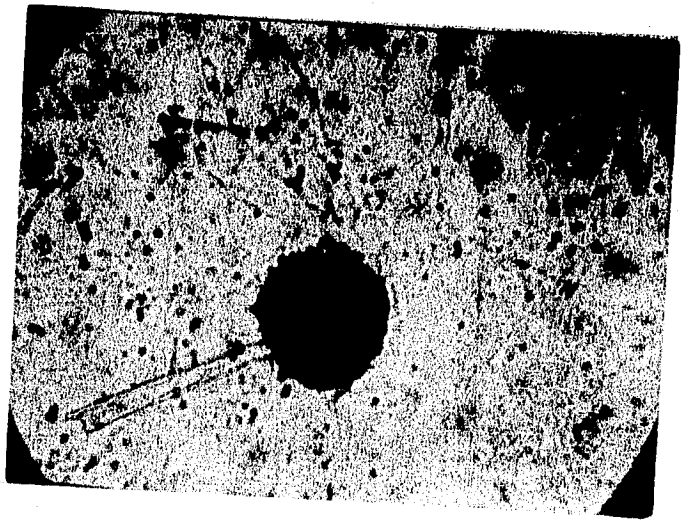
Cepa b :
El micelio es de color verde-agua de aspecto polvoso que con el tiempo el medio cambia a verde más obscuro, de crecimiento lento y uniforme, para resembrar o realizar preparaciones cuesta trabajo sacarlo de la caja, no difunde una coloración en el medio.

Cepa c :
El micelio es de color verde-grisáceo en forma de manchones no presenta un crecimiento rápido, no difunde coloración en el medio.

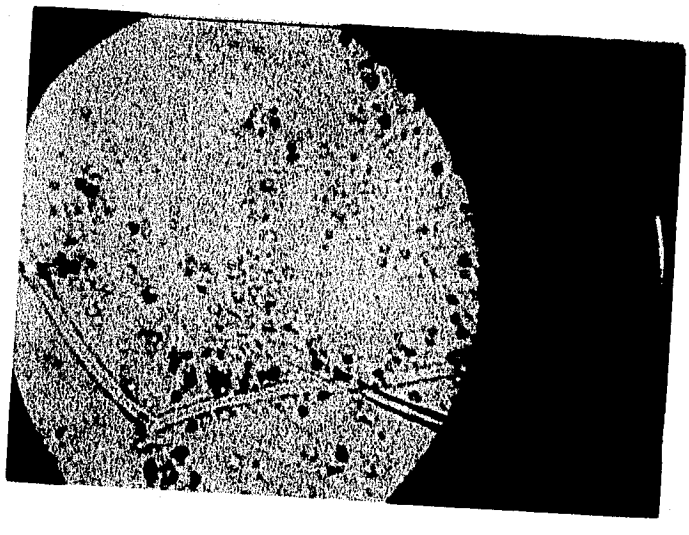
Cepa d :
El micelio se dispersa por toda la caja presentando un color verde-agua, después de 4 ó 5 días se observó una coloración verde-limón

Fotografía 10 Cepa a de *Penicillium spp.*

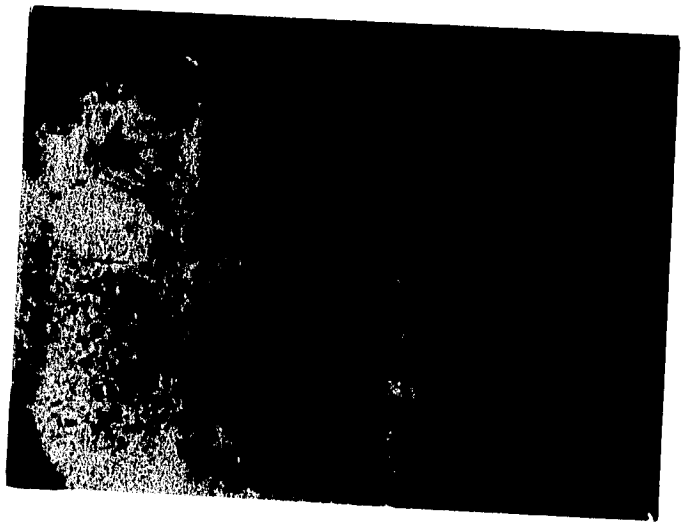
Fotografía 11 Cepa b de *Penicillium spp.*



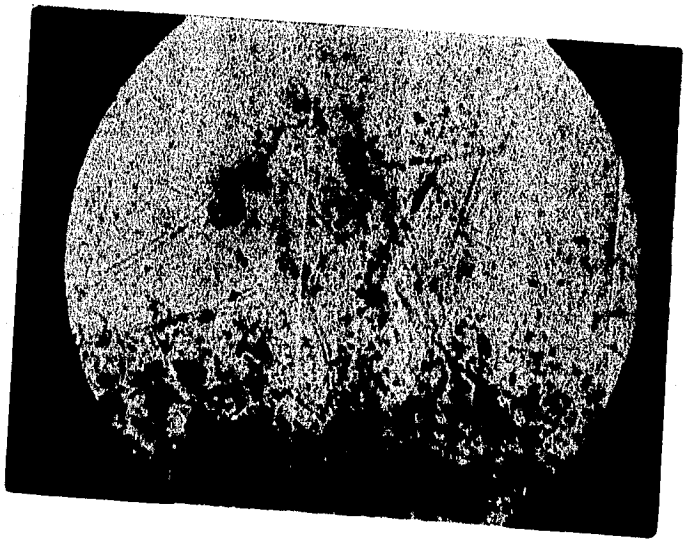
Fotografía 12 Microfotografía de cabeza conidial de *Aspergillus niger*.



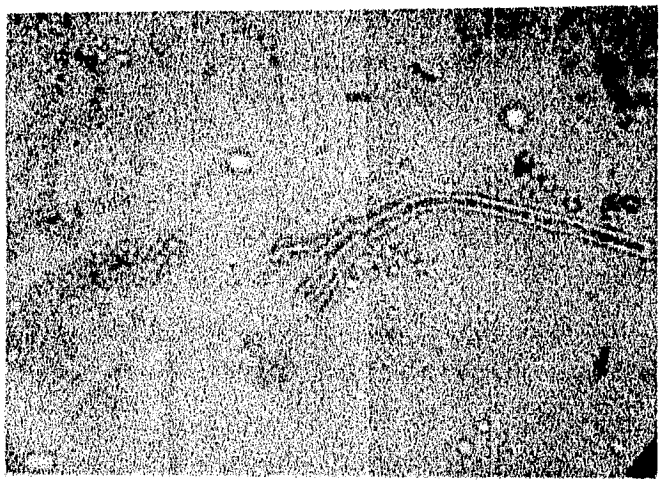
Fotografía 13 Microfotografía de cabezuela conidial de *Aspergillus parasiticus*.



Fotografia 14. Microfotografia de cabezas conidiales de *Aspergillus terreus*.



Fotografia 15 Microfotografia de cabezuelas conidiales de *Aspergillus terreus*.



Fotografía 16 Microfotografía de conidióforos y conidios de *Penicillium spp.*

CONCLUSIONES

Se determinó que los desinfectantes empleados no tuvieron el mismo efecto en los diferentes intervalos de tiempo utilizados para desinfectar superficialmente las semillas.

En el tratamiento con hipoclorito de sodio se presentó una mayor frecuencia de colonias de hongos en el tiempo de exposición de 5 min. y una menor frecuencia de colonias en el tiempo de exposición de 3 min.

Con el tratamiento de agua oxigenada se obtuvo una mayor frecuencia de colonias a los 3 min. y una menor frecuencia de colonias al tiempo de exposición de 5 min..

Comparando los resultados con los encontrados por Chen y Chung (1965), la desinfección del embrión con agua oxigenada fué ligeramente mejor que con hipoclorito de sodio.

Con respecto al aislamiento, identificación y determinación de los micromicetos obtenidos, se identificaron los géneros ***Aspergillus*** y ***Penicillium*** incluídos en la Clase Deuteromycetes.

Del género *Aspergillus* se determinaron las especies:

a) *A. niger*
b) *A. parasiticus*
c) *A. restrictus*
d) *A. terreus*

En cuanto a otros microorganismos encontrados cabe citar al hongo *Rhizopus sp.*y un solo tipo de bacterias , los cuales se les considera como saprobios.

Las características anotadas para los hongos aquí determinados servirán de base para otros estudios similares a este.

LITERATURA CITADA

Andresen, J. W. y J. H. Beaman 1961. A new species of *Pinus* from México. J. Arnold Arbor 62 (4): 437-441.

Baez, O. G. 1986. Determinación de hongos en semillas de *Pinus ayacahuite* var *veitchii* Shaw. Tesis Profesional ENEP Iztacala U.N.A.M., México. 60 p.

Bailey and Hawksworth 1983. Pinaceae of the Chihuahuan Desert Region. Phytologia 53(3):226-234.

Barnet, H. L. y Hunter, B. B. 1972. Ilustred Genera of Imperfect Fungi Pub. Co. Minneapolis U.S.A. 225 p.

Beaman J. H. & Andresen J. W. 1966. The vegetation, floristic and phytogeography of the summit of Cerro Potosí, Mexico. The American Midland Naturalist 75: 1-33.

Benavides, M. H. 1990. La utilidad de los pinos piñoneros en la dasonomía urbana de México. IV Simposio Nacional sobre Piñones Piñoneros, Resúmenes, Instituto de Ecología y Alimentos, Universidad Autónoma de Tamaulipas, México p. 33.

Bloomberg, J. W. 1966. The ocurrence of endophytic fungi in Douglas-fir seedling and seed. Canadian Journal of Botany 44 (10): 413-420.

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

Bradley, B. 1976. Bonsai; culture and care of minature trees. Sunset Book. Lane, USA., 33 p.

Capó-Arteaga, M. A. 1972. Observaciones sobre la taxonomía y distribución de coníferas en Nuevo León, México, Tesis de Licenciatura, Fac. de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N. L., México.

Cibrián-Tovar, D.; B. H. Ebel; H. O. Yates II y J. T. Méndez Montiel 1986. Insectos de conos y semillas de las coníferas de México (Cone and seed insects of the Mexican conifers). Universidad Autónoma Chapingo, S.A.R.H., México, 110 p.

Chavelas P. J. 1981. El *Pinus caribea* Morelet.en la estación de Quintana Roo, México. Bol. Div. Inst. Nal. Invest. For. México. No. 10 8p.

Chen, Chi-Chang y H. C. Chung 1965. Factors affecting the isolation of microorganisms associated with coniferous seeds Botanical Bulletin of Academia Sinica 6:106-_115.

Christensen C. M. y Kufmann H. H. 1969. Grain Storage. The role of fungi in quality loss. Univ. Minn. Press, Minneapolis.

_____ 1976. Contaminación por granos almacenados Pax. México.

Christensen C. M. y L. C. López 1962 Daños que causan en México los hongos de granos almacenados, INIA SAG, Boletín Técnico No. 44, México 30 p.

Chi-Chang, Chen y Shung-Chang, J. 1964. Interaction of seed borne and soil-borne microorganisms in relation to Damping off disease of conifers. Bot. Bull. of Academia Sinica 7 (7): 1-13.

_____ 1966. Micoflora of coniferous seed in Taiwan. Bot. Bull. of Academia Sinica 7 (2): 75-81.

Critchfield W.B. y E. L. Little Jr. 1966. Geographic Distribition of Pines of theWorld.USDA.Forests Service. Miscellaneus Pu. No. 991.

Domsch, K. H., W. Gams y T. H. Andersen 1980. Compendium of Soil Fungi Academic Press, New York; Vol. 1, 859 p.

Edgren, J. W. y J. M. Trappe 1970. Growth of ponderosa pine, douglas-fir and western larch seedling following see treatment with 30 porcent hydrogen peroxide. U.S.D.A., Forest Service. Research Note N° PNW-130 6p.

Eguiluz P. T. 1971. Tomado de Mondragón A. El Manejo del Pino Piñonero en México, 1985. Resumen de la Ponencia del Simposium Subsecretaria Forestal, SARH 241 pp.

_____ 1977. Los Pinos del Mundo. Publicaciones especiales ENA, Chapingo, México. 74 pp.

_____ 1982. Clima y Distribución del Género *Pinus* en México, Ciencia Forestal 38 (7) 64 pp.

Ellis, M. B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. CMI, Kew, Surrey. 608 pp.

Fisher, P. L. 1941. Germination, reduction and radicle decay of conifer caused by certain fungi. J. Agc. Research 52 (2): 87-95.

Forcella, F.1978. Irregularity of pinyon cone production and its relationspinyon cone moth predation. Madroño 25: 170-172.

_____ 1980. Cone predation by pinyon cone beetle (*Conophthorus edulis*: Scolytidae): dependence on frecuency and magnitude of cone production. An. Nat. 116:594-598.

_____.1981. Estmating cone productions in New Mexico and Western Oklahoma. J. Wildl. Manage 45 (2):553-557.

_____ 1981. Ovulatecone productions in pinyon: negative exponential relationship whit late summer temperature. Ecology 62(2): 488-491.

Garcia, E. 1980. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen 3a. Edición, Inst. de Geografía, U:N:A:M:, México. 252 p.

Garland, N. M. 1978. Fungi asociated with *Pinus tadea* seed development, Plant Disease Reporter 62 (10): p. 864-867.

Gibson, I. A. 1957. Saprophytic fingi as destroyer of germinating pine seeds, East African Agc. J. 22 (4): 203-206.

Guarneros, C. R. E. 1989. Comprobación de la patogenicidad de una cepa de *Alternaria* Nees, y un de *Fusarium oxysporum* (Schl) em. Snyd & Hans, como causante del mal de semilleros en *Pinus oyacahuite* var. *veitchii* Shaw., Tesis Profesional, E.N.E.P. Iztacala, U.N.A.M., México. 56 p.

Lanner, M. R. 1970. Origen of summer shoot of pinyon pines Canadian Journal of Botany 48:1759-1765.

_____1976. Patterns of shoot development in *Pinus* and their relationship to growth potential. pp. 223-243. In: M.G.R. Cannell and F. T. Last (eds.). Tree physiology and yield improvement. Academic, Nueva York

_____1981. The Pinyon Pine. A natural and cultural history. University of Nevada Press; Reno, Nevada, 108 p.

Little, Jr. E. L.1938 Stages of growth of piñons in 1938. Research Notes. Southwestern Forest and Range Experiment Station. Note No. 50 4 p.

Little E. L. and Critchfield W. B. 1969. Subdivisions of Genus *Pinus* (pines) U.S.D.A. Forest Service. Misc. Publit. No. 1144.

Martinez M. 1948. Los Pinos Mexicanos, Botas, México. 368 p.

Moreno, M. E. 1988. Manual para la identificación de Hongos en granos y sus derivados, 1a. Edición U.N.A.M., México. 109 p.

Munjal, L. y Sharma, D. A. 1976. Mycoflora of conifer seeds. Indian Journal and Plant Pathology 5 (2): 145-148.

Neal, J. L., J. M. Trappe and W. B. Bollen 1967. Sterilization of red alder seecoats with hydrogen peroxide Forest Sciencie 13 (1):104-105.

Nepamuceno F. y F. Camacho 1989. Conservacion "Ex situ" de *Pinus culminicola* Andresen y Beaman, III Symposium Nacional sobre Pinos Piñoneros, Saltillo, Coah., México. 30 pp.

Olaye, M. A. y Mendragón A. M. 1985. El Manejo del Pino Piñonero en México, Memorias del 1er. Symposium Nacional sobre Pinos Piñoneros, Universidad Autónoma de Nuevo León, México. p. 211-214

Owens, J. N. 1986. Cone and seed biology. In: Shearer R. C. (comp.), Proceedings of the conifer tree in the Inland Mountain West Symposium (1985), 14-31 USDA, For. Ser. Intermountain Research Station. Gen. Tech. Rep. Int. 203; 282 p.

Passini, M. F. 1982 Les forets de *Pinus cembroides* au Mexique. Mission Archéologique et Etnologique Francaise au Mexique. Etudes Mésoaméricaines. II-5. Cahier No.9 Editions Recherche sur les civilisations. Paris 373 p.

Patiño V., De la Garza L. P., Villagomez A. Y., Talavera A. I. y Camacho M. F. 1983. Guía para la Recolección y Manejo de Semillas de Especies Forestales. S.A.R.H. INST. NAL. INVEST. FTALES. Bol. Div. No. 63.

Peace, T. R. 1962. Pathology of trees and shrubs (with special reference to britain) Oxford University Press. G. Bretain 753 pp.

Perry J. R. 1991. The Pines of México & Central América Timber Prees,Oregon.

Rangel, S. J. 1972. Efecto de los hongos y condiciones de almacenamiento sobre la viabilidad de la semilla híbrida del maíz Tesis Profesional Facultad de Ciencias U.N.A.M. 46 p.

Rangel, J. y J. Ambriz 1973. Determinación de microorganismos en semillas de *Pinus montezumae* Seminario de Investigación Temas Selectos de Botánica (Patología Forestal) Facultad de Ciencias U.N.A.M.

Raper, K. B. y D. I. Fenell 1977. The Genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins Baltimore 686 pp.

Rebolledo V. A. 1983. Estudio preliminar sobre la ecología de piñonares en el Altiplano Potosino-Zacatecano. Tesis de M. en C. Colegio de Potgraduados Chapingo, México 123 p.

Reséndiz, J. F. y J. A. Rosales 1990. Micoflora contaminante de conos y semillas de *Pinus gregii*, 2a. Reunión Científica Forestal y Agropecuaria, CIFAP., D.F., Coyoacan, México. 56 p.

Riskind, D. H. and T. H. Patterson 1975. Distributional and ecological notes on *Pinus culminicola*. Madroño 23 (3): 159-161.

Robert, M. F. 1978. Un nouveau pin pignon Mexicain: *Pinus johannis*, Adansonia, ser. 2, 18: 365-373.

Robert-Passini, M F. 1981. Deux nouveaux pins pignons du Mexique. Bull. Mus. Natn. Hist. Nat., Paris, Adansonia. No.1: 61-73.

Romero, C. S. 1988. Hongos Fitopatógenos. 1a. Edición, Universidad Autónoma Chapingo, México. 347 p.

Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Limusa, México. 432 p.

Salinas, Q. R. 1978. Problemas de enfermedades de especies forestales en viveros y plantaciones. Plantaciones Forestales, 1a. Reunión Nac. Direcc. Gral. de Invest. Fortales. Memorias. S.A.R.H. p. 181-185.

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

Sánchez-Silva, R., J. López-García y J. M. Espinoza Rdz. 1987. Cambios en la comunidad de *Pinus culminicola* Andresen and Beaman en el Cerro del Potosí, Nuevo León, Boletín del Inst. de Geografía Núm. 17, U.N.A.M., México p. 65-73.

_____. 1990. *Pinus culminicola* Andresen y Beaman y sus asociaciones en la Ladera Sur del Cerro La Viga, Coahuila., Investigaciones Geográficas, Núm 21, U.N.A.M., México. p. 21-43.

Taller de Hongos en Semillas y Granos 1993. Curso Teórico-Práctico Lab. de Biología, Facultad de Química U.N.A.M. PUAL.

Tinsmin, M. 1964. Interaction of seed-coat micoflora and soil microorganisms and its effects on pre-and-post emergence of some conifer seedling. Canadian Journal of Microbiology 10 (1): p. 17-22.

Tomback, D. F. 1982. Dispersal of whitebark pine seeds by Clark's nutcracker: a mutualism hypothesis. Journal of Animal Ecology 51:451-467

Ulloa, M. 1991. Diccionario ilustrado de Micología, 1a. Edición, Inst. de Biología, U.N.A.M., México. 309 p.

Urosevic, B. C. 1961. The influence of saprophytic and semi-parasitic fungi on the germination of Norway spruce and Scots Pine seeds. Proced. Inter. Seed Testing Asso. 26 (3): 537-556.

Vander Wall, S. and P. R. Balda 1983. Remembrance of seeds stashed. Natural History 9:60-65.

Verna, L. C. y F. J. Herrero 1952. Micología. Ateneo, Argentina. 740 p.

Whitman, T. G. and S. Mopper 1985. Chronic herbivory: impacts on architecture and sex expression of pinyon pine. Science 228:1089-1091.

Whittle, M. A. 1977. Mycoflora of cones and seeds of *Pinus sylvestris*. Transaction Britsh Mycology Society. 69 (1): 47-57.

GLOSARIO

Almacenamiento. Es la conservación de semillas viables desde el momento de la recolección hasta que se necesitan para la siembra.

Desinfección de la semilla. Implica la erradicación de un patógeno que se encuentra en el interior de la semilla.

Desinfestación de la semilla. Implica la eliminación de hongos que se encuentran superficialmente en la semilla.

Endémico. En botánica se dice de la planta que se considera oriunda del país en que vive, propio exclusivamente de determinado país, de una coordillera, de una isla.

Micobiota (del gr.mýkes, mýketos, hongo y bios, vida): vida fúngica, conjunto de hongos indígenas de un lugar o hábitat.(Ulloa, 1991).

Micoflora. Habitante de la semilla que indica la asociación de bacterias, hongos y nemátodos que pueden o no tener potencial de causar deterioro a la semilla ó planta.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Micromicetes (del lat. *micromycetes*, y éste del gr. *mikrós*, pequeño y *mýketos*, hongos): hongos de tamaño muy pequeños, con estructuras esporíferas microscópicas o casi microscópicas.(Ulloa, 1991).

Pinus culminicola. Llamado piñonero enano, pino enano, piñon amarillo especie endémica del norte de la Sierra Madre Oriental.

Procedencia. Es la zona ó lugar donde crecen los árboles originarios de la semilla

Semilla. En términos agronómicos y comerciales se conoce como semilla a toda clase de granos, frutos y estructuras más complejas que se emplean en las siembras agrícolas.

Viabilidad. Se refiere a que individualmente una semilla esté viva, en un sentido amplio es la porción de individuos en la población de semillas (Patiño et al, 1983).