

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



EVALUACION DE HONGOS COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO
DE ZACATE JOHNSON (*Sorghum halepense*).

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN MICROBIOLOGIA

PRESENTA

Q.B.P. MARIA MAGDALENA IRACHETA CARDENAS

MONTERREY, N.L.

MAYO DE 1992.

TM

Z53

FCB

199

I7



1020091472

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



EVALUACION DE HONGOS COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO
DE ZACATE JOHNSON (*Sorghum halepense*).

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN MICROBIOLOGIA

PRESENTA

Q.B.P. MARIA MAGDALENA IRACHETA CARDENAS

MONTERREY, N.L.

MAYO DE 1992.

TM
ZS320.
FCB
1992
I7



FONDO TESIS

166096

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVALUACION DE HONGOS COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO
DE ZACATE JOHNSON (*Sorghum halepense*).

T E S I S

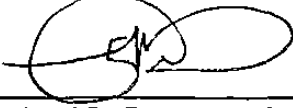
QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN MICROBIOLOGIA

PRESENTA

Q.B.P. MARIA MAGDALENA IRACHETA CARDENAS

COMISION DE TESIS


PRESIDENTE:


M. en C. LUIS J. GALAN WONG

SECRETARIO:


M. en C. NAOR GONZALEZ GARZA

VOCAL:


M. en C. LILIA H. MORALES RAMOS

INDICE

Resumen1
Introducción2
Objetivo3
Antecedentes4
Material y Método	
I.- Aislamiento de hongos	15
II.- Identificación y Conservación	15
III.- Evaluación de patogenicidad:	
1.- Sobre hojas	16
2.- Sobre plantas completas	
A.- De semilla	17
B.- De rizoma.	18
3.- Efecto de la temperatura sobre la germinación.	18
IV.- Prueba de rango de hospedero.	18
V.- Propagación y rendimiento de esporas.	19
Resultados	22
Discusiones.	40
Conclusiones	43
Literatura Citada.	44

RESUMEN

Las características que debe presentar un microorganismo, en este caso un hongo, para ser propuesto como un agente de biocontrol son: especificidad, estabilidad genética y facilidad de propagación en medios de cultivo definidos. Se evaluaron 37 hongos aislados de plantas enfermas de zacate Johnson, contra plantulas de 3 semanas de edad de ésta maleza; solamente una cepa (C-12), identificada como *Helminthosporium triseptatum* infecta zacate Johnson; reduce su desarrollo y la producción de estructuras importantes para la propagación, como son, los rizomas y estolones. Comparado con plantas no inoculadas, el peso seco de la planta disminuye de 0.91 a 0.12 (DMS = 0.1352), el número de nudos de 5.9 a 1.60 y el número de estolones de 2.0 a 0. Además, este hongo se evaluó contra 5 híbridos comerciales de sorgo (*Sorghum halepense*), maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), correhuela (*Ipomea* sp.), zacate de agua (*Echinochloa* sp.) y quelite (*Amaranthus* sp.) a los cuales resultó avirulento. Los más altos rendimientos de biomasa total se obtienen en caldo V-8 al 40% (2.99 mg/ml), en cambio el rendimiento específico de esporas mayor, se obtuvo en caldo V-8 al 20% (0.90 mg/ml).

INTRODUCCION:

Las malezas o malas hierbas se cuentan entre los principales factores que limitan la producción agrícola, causan grandes pérdidas económicas al disminuir el rendimiento de granos hasta en un 30%.

Esto, debido a competencia directa, producción de sustancias alelopáticas, además son reservorios o huéspedes intermediarios de algunos agentes causales de enfermedades que atacan a las plantas cultivadas.

El Estado de Nuevo León cuenta con 450,000 ha cultivables, lo que representa un 32% de su extensión territorial. Sus principales cultivos son cítricos, sorgo, trigo, maíz, alfalfa, papa y frijol; estos son invadidos por una amplia variedad de malezas, de entre las cuales el zacate Johnson se destaca por su facilidad de desarrollo en climas cálidos y tanto en cultivos anuales como perennes. Para su control se utilizan herbicidas químicos no selectivos y se requieren repetidas aplicaciones para un adecuado control.

A partir de 1970, el uso de microherbicidas surgió como una alternativa al control químico para reducir malezas, sin algunos de los efectos indeseables de los herbicidas químicos, tales como: toxicidad y resistencia en las plantas tratadas.

Un microherbicida es una formulación de esporas y micelio de un hongo patógeno que infecte específicamente a una maleza. Generalmente se aplica en cada temporada cuando la maleza tiende a emerger o mide menos de 30 cm de altura, en campo se ha logrado controlar de 62-100% diferentes malezas por este método. Algunos hongos que se han usado son: *Colletotrichum*, *Phytophthora*, *Fusarium*, etc.

Pocos estudios sobre control biológico de zacate Johnson surgen a partir de 1986, proponiéndose algunos hongos como agentes de biocontrol, sin embargo estos estudios no han resultado tan exitosos como los anteriormente mencionados.

Debido a esto se propone como objetivo principal del presente estudio; la evaluación de hongos fitopatógenos como potenciales agentes de control biológico de zacate Johnson (*Sorghum halepense*).

ANTECEDENTES:

Una especie vegetal constituye una mala hierba, cuando dificulta el crecimiento de las plantas cultivadas (Villarías Mordillo 1979). El concepto botánico de mala hierba no existe, pero se han enlistado algunas características propiamente distintivas (Cuadro 1). Para ello, se seleccionaron 17 malezas que en promedio infestan seriamente 33 diferentes cultivos en 54 países; éstas poseen un 85.6% de las propiedades distintivas de una maleza prototipo, es decir, 11 de 13. En contraste las plantas cultivadas poseen un 42 % de las características de maleza, solamente 5 de éstas (Keeler. 1989).

Las malezas disminuyen la producción de cultivos por su gran adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales, por lo que obstaculizan la utilización de la tierra y compiten por nutrientes, luz y espacio con las plantas cultivadas, interfieren en la irrigación y en la cosecha (Strobel 1991).

Sin embargo, no sólo pueden interferir por competencia directa, sino también a través de alelopatía, esto es, que ciertas especies de malezas o algunas de sus partes liberan a su medio ambiente, sustancias alelopáticas que incrementan su habilidad competitiva. Estudios con una gran variedad de malezas han mostrado que exudados de partes de plantas subterráneas, extractos de agua o productos de la descomposición de residuos en suelo contienen tales sustancias alelopáticas (Lolas & Coble 1982).

Abdul-Wahab y Rice en 1967 reportaron que rizomas de zacate Johnson (*Sorghum halepense*), vivos o decayendo en suelo inhiben la germinación y el subsecuente desarrollo de siete especies de malezas estudiadas, también encontraron que las raíces y rizomas vivos exudan una toxina (p-hydroxybenzaldehyde) o toxinas que son inhibitorias a la germinación y desarrollo de diferentes especies.

CUADRO 1. Características que distinguen a las malezas de otras plantas (Keeler 1989, Strobell1991).

- a. Germinación en diferentes condiciones ambientales
- b. Germinación discontinua controlada internamente
- c. Semillas con alta longevidad
- d. Rápido crecimiento y floreación
- e. Producción de semillas continua
- f. Autocompatible
- g. Diseminación por insectos o viento
- h. Alta producción de semilla
- i. Producción de semilla en diferentes condiciones ambientales
- j. Semillas adaptadas para distancia de dispersión
- k. Crecimiento vegetativo y/o regeneración de fragmentos
- l. Difícil de desenraizar
- m. Buen competidor
- n. Flores no son fuente de miel
- o. Alergenas para humanos
- p. Son tóxicas
- q. No son fuente de alimento

El zacate Johnson es una importante maleza en muchos agroecosistemas, principalmente en maíz, soya, algodón y sorgo (Mov-Yen 1989). Es considerado una de las 10 peores malezas mundiales (Holm 1969), causa grandes pérdidas económicas; en estudios de competencia en campo reduce el rendimiento de soya hasta en un 70% (Mc Whorter 1972).

En otros estudios, la inhibición del crecimiento de plántulas de la maleza *Hordeum distichum*, fué proporcional a la cantidad de rizomas incorporados en suelo y la inhibición fué mayor en suelos pobres (Horowitz & Friedman 1971).

El zacate Johnson es nativo de la región del Mediterráneo y fué intencionalmente sembrado E.U.A. en 1840 para su utilización como pastura; actualmente constituye un serio problema tanto en cultivos anuales y perennes en muchos países (Massion & Lindow 1986).

Su nombre se debe a uno de los más entusiastas fomentadores de su cultivo (William Johnson); en México se le conoce también como zacate Navaja en los estados de Chihuahua, Aguascalientes, Nayarit, Guanajuato y Querétaro. En España le llaman Sorgo de Alepo, Sorguillo; Canutillo y Maicillo en otros países (Villarias 1979). Se introdujo a los países sudamericanos a mediados del siglo pasado, Guatemala y El Salvador lo adquirieron de México (Flores Menéndez 1977).

El control del zacate Johnson en suelos agrícolas es difícil debido a sus hábitos de crecimiento y a la falta de herbicidas completamente selectivos. Aplicaciones postemergentes con glifosfato (N-phosphonementyl glicine) han controlado excelentemente esta maleza, sin embargo las características no selectivas de este herbicida requieren técnicas especiales de aplicación que en ocasiones no permiten su uso (Banks & Tripe 1983).

Otros herbicidas sistémicos no selectivos, comunmente usados para su control incluyen dinitroanilinas, fenilureas, arsonatos que tienen la desventaja de ser inaplicables a las plantas cultivadas (Dale 1981).

Recientemente, diferentes nuevos herbicidas se han desarrollado para controlar selectivamente zacate Johnson en soya, pero como en todos los herbicidas muchos factores pueden afectar su actividad y esta debe ser determinada. BAS-9052, PP-009 y CGA-82725 fueron evaluados en aplicaciones foliares en campo para determinar el tiempo y número de aplicaciones necesarias y la posibilidad de mezclarlos con otros herbicidas (Banks 1983).

También se ha recomendado la rotación de las aplicaciones de herbicidas químicos aplicados y de cultivos, alternando uno cada época de siembra (Dale & Chandler 1979).

Los herbicidas son generalmente efectivos y necesarios a la agricultura, pero hasta ahora, algunos causan serios problemas particularmente cuando se ha abusado en su uso; son dañinos al amenazar la salud pública y de animales acumulandose en plantas que sirven de alimento y en agua, también pueden dañar directamente a las personas que los aplican (Strobel 1991).

Debido a estos inconvenientes, el control biológico de malezas ofrece una atractiva alternativa al uso de pesticidas químicos, visualizado para integrarse en las técnicas de combate de plagas; para racionalizar y estabilizar a niveles estrictamente necesarios el uso de herbicidas químicos (Templeton 1979).

El control biológico de malezas ha sido usado desde hace años, en Australia se usó una palomilla para el control de *Opuntia* sp.; más tarde en California, un escarabajo para controlar *Hypericum perforatum*; y recientemente la introducción de diferentes insectos para el control de *Alternanthera pilloxeroides* en el sur de Estados

Unidos (Templeton 1982)

Teóricamente todas las clases de patógenos de plantas pueden ser considerados como potenciales agentes de control biológico, se incluyen: virus, hongos, bacterias y nemátodos. Hasta ahora el número de hongos excede considerablemente a los organismos patógenos, de 83 patógenos estudiados: 71 son hongos, 6 virus, 3 bacterias y 3 nemátodos (Templeton 1981).

El concepto de micoherbicida surge en 1969, con el descubrimiento de R. J. Smith de un hongo patógeno en *Aschinomene virginica* (Templeton 1986). A partir de entonces, hongos patógenos de plantas han sido ampliamente investigados y se han identificado dos estrategias para su utilización: clásica e inundativa:

En la estrategia clásica, un hongo es simplemente introducido o liberado en una población de maleza, para establecer en un tiempo determinado una epifitía, sin requerir manipulación adicional. Un ejemplo bien conocido, es la introducción de *Puccinia chondrillina* en Australia de Europa, para controlar *Chondrilla juncea*. También ha sido recientemente introducido en el oeste de Estados Unidos en un esfuerzo para controlar la misma maleza. La estrategia inundativa emplea un gran inóculo anual del hongo en campos o bosques infestados de una maleza específica, para infectar y eliminar plantas susceptibles. Estas aplicaciones pueden hacerse tan frecuentemente como sea necesario y el tiempo sea favorable para el subsecuente desarrollo de la enfermedad (Te Best & Templeton 1985).

Actualmente, la mayoría de los trabajos con micoherbicidas están concentrados en especies que escapan a los patrones de control químico de malezas. El control biológico de éstas en cultivos anuales, puede ser más efectiva con aplicaciones directas de patógenos de plantas; inoculaciones con esporas de hongos específicos que puedan controlar malezas tan efectivamente como los

herbicidas (Boyette et.al. 1979).

El zacate Johnson por ser una de las malezas más difíciles de controlar por los métodos tradicionales, es considerado una de las 10 peores malezas mundiales, y se propone como candidato para controlarse biológicamente. La estrategia bioherbívora emplea organismos patógenos que han sido propuestos para controlar malezas (Massion 1986).

De más de 30 especies de malezas que han sido evaluadas recientemente, solamente la avena silvestre (*Avena fatua* L.) y el zacate Johnson (*Sorghum halepense*) son gramíneas. No obstante, estos estudios son pocos, una razón de este limitado interés es que los hongos patógenos de zacates, también pueden dañar a cereales y a otros pastos forrajeros de interés económico (Chiang 1989).

El rango de hospedero de los hongos patógenos de gramíneas varía considerablemente, pero hongos específicos de género, especie y subespecie han sido reportados (Chiang 1989). Así puede ser posible encontrar hongos específicos para controlar pastos maleza. La mayoría de la información sobre patogenicidad, especialización fisiológica y rango de hospedero de hongos patógenos de gramíneas ha sido derivada principalmente de estudios de hongos aislados de plantas cultivadas (Templeton 1986).

Algunos ejemplos de hongos patógenos que han sido evaluados como agentes de control biológico son:

Protomyces macrospora fué evaluado contra diez especies de la familia Umbelliferae y se encontró que carece de efectividad contra estas especies. En cambio contra *Ambrosia trifida* y *Xanthium strumarium* es altamente patógeno (Cortwigh & Templeton 1981).

Cercospora rodmanii es un patógeno virulento a *Eichornia crassipes*; en condiciones de invernadero después de tres semanas,

las plantas inoculadas llegan a ser cloróticas y aparecen zonas necróticas en hojas y eventualmente mueren; presentándose los mismos síntomas en condiciones de campo (Inman 1970).

Puccinia chondrillina ataca *Chondrilla juncea*, posee un considerable potencial como microherbicida y es quizás el agente más eficaz de control biológico en Europa (Hasan 1974).

Uromyces scutellatus en parcelas cultivadas infecta del 50% al 100% de plantas inoculadas, además de ser altamente patógeno y específico para *Euphorbia cyparissias* (De Fago et.al. 1985).

Sphacelotheca holci infecta zacate Johnson (*Sorghum halepense*), reduce su crecimiento y altera sus características morfológicas. En estudios de invernadero el 55% de las plantas inoculadas sufren daños severos (Massion & Lindow 1986).

Varias especies de *Alternaria* también han sido evaluadas:

Alternaria macrospora: Contra plantas de la familia Malvaceae, Solanaceae, Leguminosae y Germinaeae; evidencias de la infección fué limitada a plantas de la familia Malvaceae con *Anoda cristata* que es la más susceptible de las especies probadas (Walker & Scimbato 1979).

Alternaria macrospora y *Fusarium lateritium* contra *Anoda cristata*, se encontró altos niveles de mortalidad al aplicar primero *Alternaria* y cinco días después *Fusarium*, ésta interacción es potencialmente útil para incrementar la efectividad de los hongos patógenos como microherbicidas (Crawley et.al. 1985).

Alternaria alternantherae es patógeno a siete especies de la familia Amaranthaceae, causa infecciones en hojas con moderada defoliación; en *Amaranthaceae cadatus* y *A. retroflexus*, estas lesiones aparecen dos días después de inocular y el hongo se ha

logrado reaislar de las lesiones de las plantas inoculadas (Holcomb -1978).

Alternaria cassiae causa el 100% de mortalidad de *Cassia obtusifolia* en pruebas de invernadero a solo dos días después de inocular y con 8 horas de rocío posterior (Walker & Boyette 1985).

En 1981, los laboratorios Abbot (USA), desarrollaron un nuevo producto comercial con el nombre De Vine a base del hongo *Phytophthora palmivora* para el control de *Morrenia odorata* en campos de cítricos, este producto es disponible como una suspensión líquida que contiene 6.7×10^6 clamidiosporas viables/ml, con este formulado se logra controlar hasta el 90% de la maleza en 10 semanas (Templeton 1982).

Desde 1963 hasta 1981, ha sido probado en condiciones de campo *Colletotrichum gloesporioides* que causa antracnosis en *Aschynomene virginica*. Se utilizaron 16 campos de arroz (184 ha) que fueron tratadas por aspersion aérea con una suspensión de 2×10^6 esporas/96 litros de agua/ ha. Se logró controlar la maleza hasta en un 92%. En campos de soya se obtuvo un 98% de mortalidad en 247 ha tratadas, distribuidas en 29 parcelas, después de 4 a 6 semanas (Te Beest & Templeton 1985).

En 1982 fue comercializado por Upjohn Co. (E.U.A.) con el nombre de Collego, el producto consiste de un formulado en polvo que contiene 85% de ingredientes inertes, y 15% de esporas viables de *Colletotrichum*. Además, puede ser mezclado en el mismo tanque de aspersion con algunos herbicidas químicos (Templeton 1986).

Los dos microherbicidas ahora disponibles han mostrado ser efectivos y seguros, sin embargo no se desarrollan como un sustituto de los químicos, porque los beneficios se extienden hasta fines económicos (Te Beest & Templeton 1985).

En China, también se utiliza el control biológico de malezas. Desde 1960, dos especies de hongos han sido evaluadas: *Colletotrichum gloesporioides* contra *Cuscuta* sp. y *Fusarium orobanches* contra *Orobanche* sp. en campos de soya y melón respectivamente, con buenos resultados (Wang 1986).

Investigaciones con otros patógenos de plantas como *Fusarium lateritium*, *Colletotrichum malvarum*, *Alternaria cassiae*, también se han realizado (Kirkpatrick et.al. 1982, Schroeder 1982, Walker et.al. 1985).

Las esporas son el más común propagulo usado en programas de biocontrol, deben ser producidas en grandes cantidades, rápida, fácil y eficientemente; estas son normalmente producidas en cultivos líquidos y sólidos. Pero existe una limitada información sobre los rendimientos específicos y la proporción del total de biomasa producida como esporas (Cascino 1990).

Daniel y col., reportaron en 1973 buen crecimiento y esporulación en lima plátano agar y en medio líquido con jugo V-8, sacarosa, nitrato y sales minerales.

C. gloesporioides se desarrolla bien en diferentes medios, pero necesita un balance de nitrógeno, carbono y suplementos minerales son requeridos para una esporulación óptima (Curchil 1982). *C. gloesporioides* f. sp. *aeschynomene* produce una mayor cantidad de conidias cuando la concentración de carbón fué incrementada; en contraste con *C. truncatum* que a estos niveles la esporulación fué inhibida sin la producción de la masa hifal. Estos resultados sugieren que la regulación de la esporulación en diferentes concentraciones de carbono no es universal en las especies del género *Colletotrichum* (Jackson 1990).

En otros experimentos se encontró que al aumentar las concentraciones de sacarosa se incrementa preferencialmente el

desarrollo de micelio (Lingappa 1969).

Slade en 1987, comparó 11 medios de cultivo comunes en forma sólida y líquida para la producción de esporas y encontró que el jugo V-8 sin suplementos y a una concentración de 6 mg/ml (15% de jugo V-8 sin filtrar) fué el más óptimo para obtener una alta esporulación y baja producción de micelio.

Altos rendimientos de esporas son favorecidos por conidiación microcíclica, que es definida como la esporulación ocurrida directamente después de la germinación de la espora, con reducción o inhibición total de la producción de micelio (Smith 1981). Esto puede ser inducido por altas temperaturas, nutrientes y otros factores que inhiben el desarrollo vegetativo.

Trabajos con *Glomerella cingulata* y *C. gloesporioides* demuestran que en medios sólidos con una alta densidad de inóculo resulta un crecimiento levaduriforme caracterizado por un desarrollo acelerado de conidioforos cortos que sostienen la producción masiva de esporas (conidiación microcíclica). Sin embargo para *C. gloesporioides* esta inducción microcíclica fué dependiente de la concentración del medio y la concentración del inóculo (2×10^6 esporas/ml) ya que al aumentar la concentración del jugo V-8 (mayor de 20% v/v) se incrementa extensivamente el crecimiento micelial.

Slade y col. en 1967, proponen que la conidiación microcíclica es inducida por la producción de un metabolito, limitación de nutrientes o ambas.

Trabajos con *C. cingulata* en cultivos líquidos indican que un inóculo suficiente para inducir conidiación microcíclica incrementa el rendimiento relativo de esporas y por ende la concentración final de estas (Lingappa 1969). Recientemente se mostró que cultivos en tanques de fermentación (condiciones experimentales no

especificadas) pueden producir el 100% del total de biomasa como
- esporas (Cascino 1990).

MATERIAL Y METODO:

I.- AISLAMIENTO DE HONGOS.

Se muestrearon campos cultivados con sorgo, invadidos con zacate Johnson (*Sorghum halepense*), en tres municipios del Estado de Nuevo León: Marín, Escobedo y Cadereyta Jiménez, se colectaron plantas de zacate Johnson (*S. hapelense*), que presentaran lesiones en hojas y tallo; y raíces de plántulas con signos de marchitez.

Las partes de las plantas con evidentes daños, como lesiones necróticas, pudrición, manchas, etc. fueron cortadas en piezas de aproximadamente 10 cm, depositadas en bolsas de polietileno y almacenadas a 4°C hasta su tratamiento.

Para el aislamiento de hongos, las lesiones fueron cortadas en piezas de 0.5 cm² y esterilizadas con una solución de hipoclorito de sodio al 1.0% por 3 minutos, lavadas con agua destilada y sembradas en agar V-8 (20 g/lit), después de 72 h de incubación a 28°C, se examinaron las colonias y se hicieron subsecuentes resiembras hasta obtener colonias puras.

II.- IDENTIFICACION Y CONSERVACION:

Los hongos aislados se identificaron (Barnet 1972, Alcorn 1988, Drechsler 1923) y se conservaron en agar V-8 por la técnica de inmersión en aceite mineral, almacenadas a 4°C y por liofilización de esporas en sacarosa al 5% como medio de soporte (Demain 1984).

III.- EVALUACION DE PATOGENICIDAD:

1.- Preparación de la suspensión de esporas:

Los hongos aislados se propagaron en agar V-8 y después de 10 días de incubación a 28°C, las conidias se colectaron por inundación del cultivo con agua estéril y raspado de todo el crecimiento, se filtro a través de gasa para eliminar fragmentos grandes de micelio (Holcomb 1978). Esta suspensión se ajustó a 1×10^5 esporas/ml con un hemocitómetro (Walker y Sciumbato 1979).

La suspensión de esporas obtenida se asperjó mediante un atomizador hasta humedecer por completo: trozos de hojas y plantas completas originadas de semillas y de rizoma, para evaluar la virulencia de los hongos aislados.

2.- Sobre trozos de hojas:

Hojas de zacate Johnson de una misma planta colectada en campo, se cortaron en piezas de 20 cm, éstas se asperjaron con una suspensión de esporas-micelio de los hongos a evaluar y se depositaron en cámara húmeda a 28°-30°C con 12 h luz (± 8000 U lux)/ 12 h oscuridad.

Los hongos que infectaron y colonizaron hojas, fueron además evaluadas en plantas completas de zacate Johnson, aplicando los postulados de Koch (Chiang & Dyke 1989).

3.- Sobre plantas originadas de semillas:

Para la obtención de plántulas: se colectó semilla de zacate Johnson, se eliminaron las glumas; y para uniformizar su germinación se trataron con agua a 70°C/ 5 seg, fueron lavadas con agua fría y puestas en cámara húmeda por 48 h. Las semillas que germinaron se depositaron en macetas de plástico de 1 litro con una

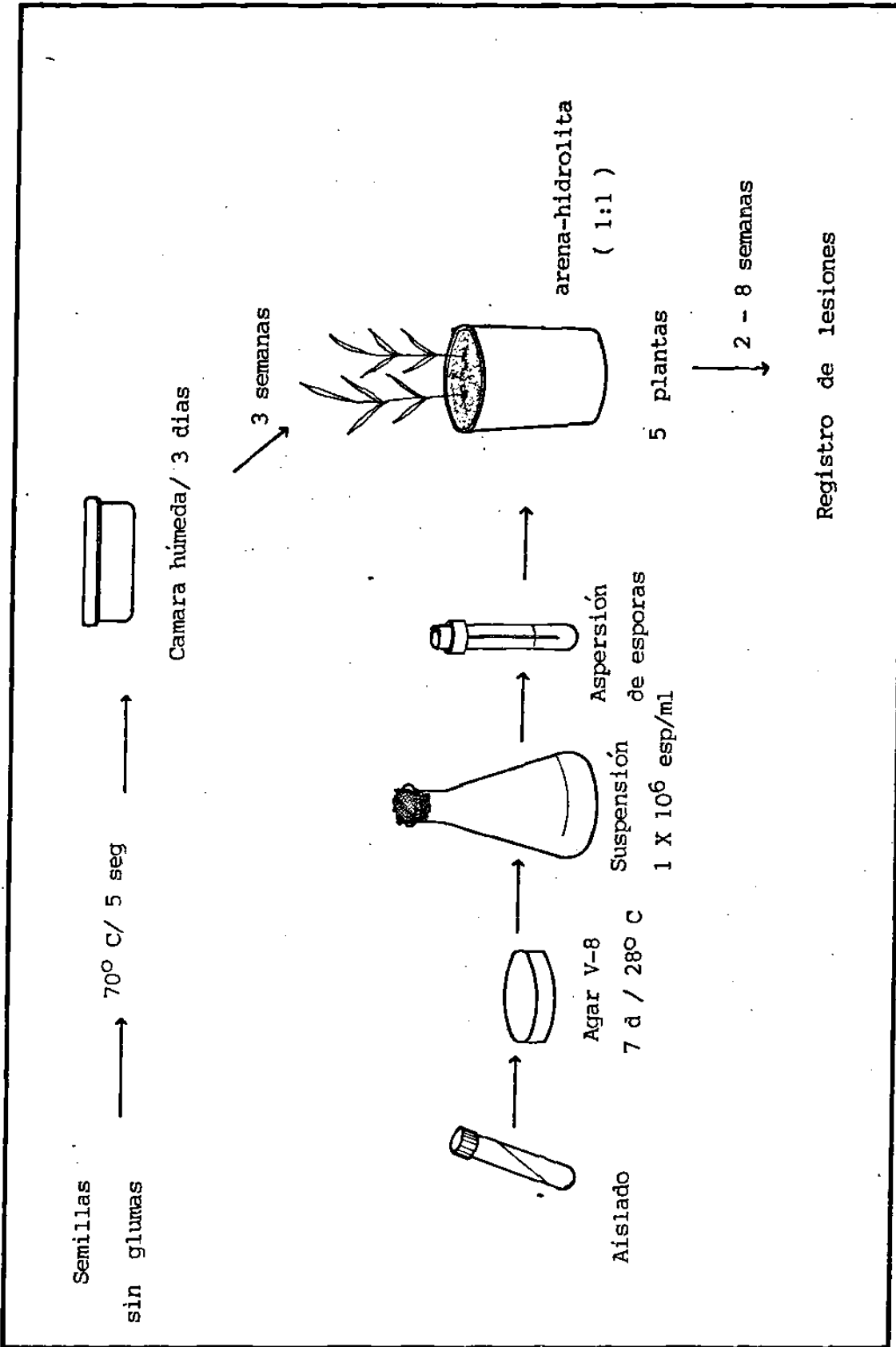


FIGURA 1.- Diagrama de evaluación de hongos contra plantas de zacate Johnson .

mezcla de arena-hidrolita (1:1) lavada y esterilizada (120°C/1 h). Las plántulas fueron regadas cuando fue necesario con solución de nutrientes.

Cuando las plantas alcanzaron 3 semanas de edad, macetas con 5 plantas de aproximadamente 20 cm de altura (3 repeticiones para cada hongo) fueron asperjadas con una suspensión de esporas-micelio, hasta quedar completamente húmedas (aproximadamente 3 ml) se taparon con bolsas de polietileno, colocándose en cámara bioclimática con 12 h luz/12 h oscuridad a 28°C-30°C con un 60-70% humedad relativa. Después de 2-4 semanas se registraron daños en hojas y tallo, altura de la planta y número de rizomas (Fig. 1).

4.- Efecto sobre plantas originadas de rizoma:

Rizomas de zacate Johnson fueron cortadas en piezas de 2 cm enjuagadas con agua y esterilizadas con hipoclorito de sodio al 5% por 5 min, se lavaron con agua estéril y se depositaron en recipientes de plástico de 1 litro con arena-perlita (1:1) y se regaron con solución de nutrientes.

5.- Efecto de la temperatura en la germinación de conidias:

Piezas de hojas de zacate Johnson de 1 cm² inoculadas con esporas fueron incubadas a diferentes temperaturas (15, 27, 30, 37 y 42°C) en cámara húmeda, después de 24 h se hizo un conteo microscópico; 5 campos por 3 repeticiones de cada tratamiento de temperatura, y se determinó el porcentaje de germinación.

IV.- PRUEBAS DE RANGO DE HOSPEDERO:

Plantas de tres semanas de edad de 5 híbridos comerciales de sorgo (*Sorghum vulgare*): Wac-694, Pioner-8226, NK-2670, Funks G-522 y Master-Gold, 1 variedad de trigo (*Triticum aestivum*) y 1 variedad de maíz (*Zea mays*), quelite (*Amaranthus sp*), correhuela (*Ipomea sp*)

y zacate del agua (*Echinochloa* sp) fueron tratadas e incubadas de la misma manera que el zacate Johnson.

V.- RENDIMIENTO DE ESPORAS EN CULTIVO LIQUIDO:

1.- Producción del inóculo:

En matraces con 100 ml de caldo V-8 (20%) se inocularon 0.5 ml de esporas y se incubaron a 25°C, después de 4 días se filtró a través de gasa estéril; esta suspensión se ajustó a 1×10^5 esporas/ml.

2.- Propagación masiva del hongo:

En matraces con 50 ml de caldo V-8 a diferentes concentraciones de 5, 10 y 20% se inocularon 0.5 ml de la suspensión anterior y se incubó a 27°C. Se colectaron (tres matraces por réplica) a 6, 12, 18, 24, 48, 60, 72, 84 h y diariamente durante 10 días.

Cada réplica se vació en canastas de aluminio de 6 cm de diámetro previamente taradas y se llevó a 65°C hasta peso constante.

3.- Análisis de datos:

De la cinética de fermentación para cada lote experimental, se calcularon los siguientes rendimientos:

A.- Rendimiento de esporas

$$Y_{sp} = \frac{(C_f \times V_{of}) - (C_i \times V_{oi})}{V_{of}}$$

Cf= cuenta de esporas final (mg/ml)

Volf= volumen final (ml)

Ci= cuenta de esporas inicial (mg/ml)

B.- Rendimiento específico de biomasa total

$$Y_{x/s} = \frac{(P_f \times V_{olf}) - (P_i \times V_{oli})}{\text{Sólidos V-8} \times V_{olf}}$$

P = peso final de las esporas (mg/ml)

Pi = peso inicial de las esporas (mg/ml)

Sol V-8 = peso de sólidos del caldo V-8 (mg/ml)

C.- Rendimiento específico esporas:

$$Y_{s/p} = \frac{(C_f \times V_{olf}) - (C_i \times V_{olf})}{C_{V-8} \times V_{olf}}$$

C V-8 = concentración de caldo V-8 (mg/ml)

D.- Rendimiento relativo de esporas:

$$RSY = \frac{Y_{sp/s}}{Y_{x/s}} \times 100$$

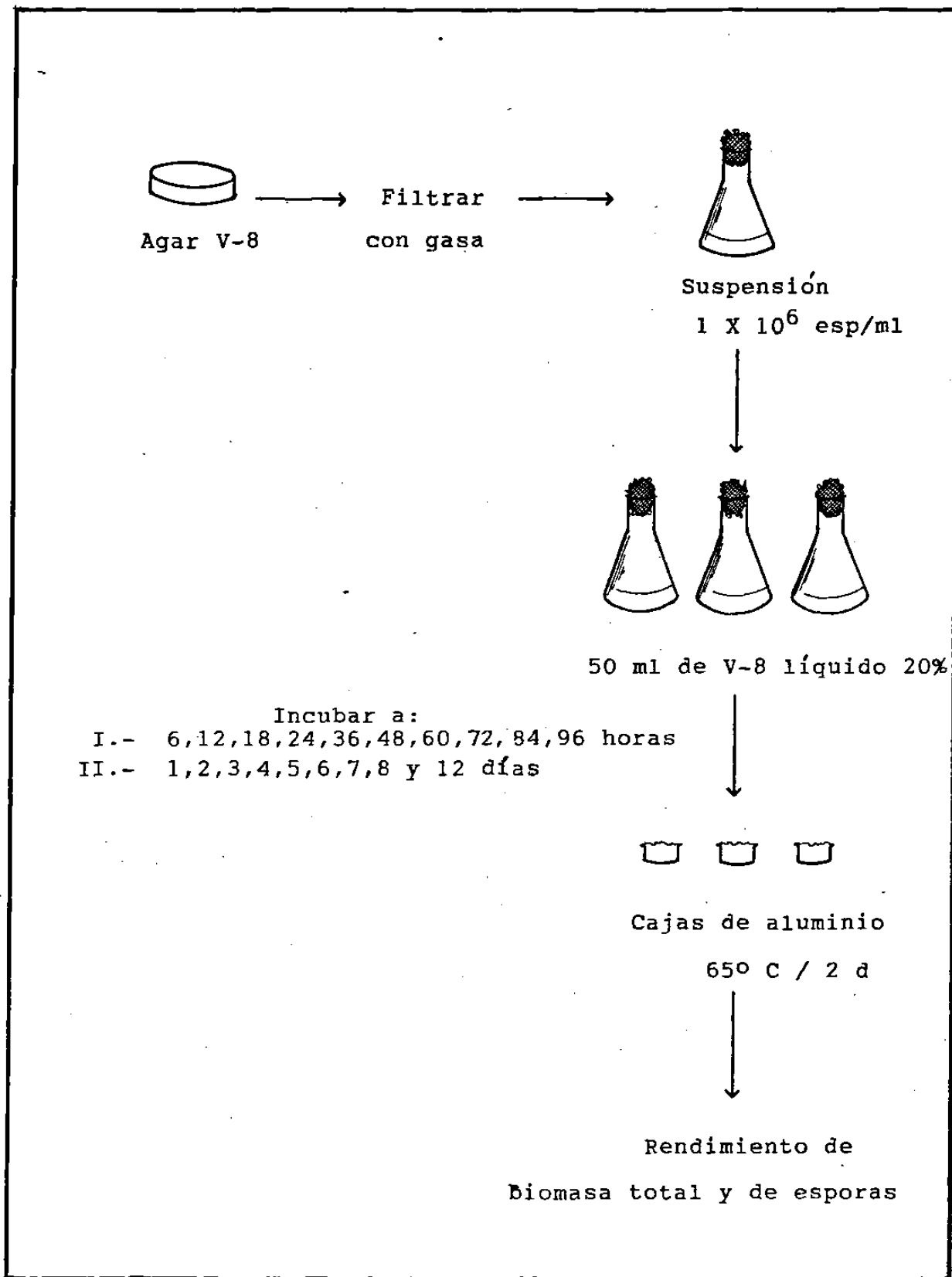


FIGURA 2. DIAGRAMA DE PRODUCCION DE BIOMASA TOTAL EN CALDO V-8 ESTATICO.

RESULTADOS

I. Aislamiento e Identificación.

Se obtuvieron 37 aislamientos de hongos en total, de diferentes partes (raíz, tallo, hojas y panoja) de plantas enfermas de zacate Johnson.

16 aislamientos corresponden a plantas colectadas en campos de siembra de la Facultad de Agronomía, UANL, en Marín, Nuevo León (Tabla 1). De plantas invadiendo cultivos de sorgo y maíz en La Hacienda del Canadá, se aislaron 12 cepas (Tabla 2). Y 9 cepas de los cultivos en Cadereyta Jiménez (Tabla 3).

Todas las cepas fueron evaluadas preliminarmente en piezas de hojas de plantas jóvenes de zacate Johnson, solamente 17 fueron capaces de infectar y colonizar éstas hojas, por lo que se identificaron y se seleccionaron para su evaluación patogénica contra plantas completas (Tabla 4).

Las cepas seleccionadas se identificaron como *Aspergillus* sp (1), *Alternaria* sp (4), *Curvularia* sp (3), *Fusarium* sp (4) y *Helminthosporium* sp (9).

II. Bioensayo.

a). En plantas originadas de semilla.

Después de la inoculación de plántulas de zacate Johnson, en hojas y tallo se desarrollaron pequeñas lesiones; aparecen como puntos café-oscuros, que se expanden hasta formar zonas necróticas de menos de 5 mm de diámetro.

Del total de hongos probados, solamente dos resultaron debilmente virulentos a zacate Johnson; cepas H-1 y C-12. La cepa H-1 causa pequeñas y aisladas lesiones en hojas y tallo, la cepa C-12 de aisladas a moderadas. Pero estas cepas pueden ser definidas como específicos de zacate Johnson, ya que resultaron avirulentas contra otras malezas. (*Ipomea* sp, *Amaranthus* sp, *Echinochloa* sp).

Las lesiones causadas por ambas cepas son muy similares: en hojas; pequeñas zonas necróticas (Fotografía I-A) y en tallo (Fotografía I-B), disminuyen el desarrollo de las plantas considerablemente (Fotografía I-C) y al cabo de 7 semanas después de la inoculación causan la muerte de las plantas inoculadas.

De las lesiones aparentemente visibles se logró reaislar el hongo asperjado, *H. triseptatum* (C-12), como único causante de éstas lesiones.

La infección resulta con severos cambios morfológicos en las plantas tratadas al cabo de 7 semanas después de inocular; ya que la formación de nudos y rizomas es disminuida considerablemente y no hay formación de estolones, lo que como consecuencia reduce la producción de biomasa comparada con las plantas no inoculadas (Tabla 5).

Los datos mostrados fueron analizados mediante una regresión múltiple entre los parámetros mencionados anteriormente: peso seco de la planta, número de nudos, número de rizomas y número de estolones (Apéndice A).

La matriz de correlación no mostró relación entre ellos, ni dependencia. Sin embargo, el análisis de varianza entre los tratamientos (inoculado y no inoculado) muestra un marcado efecto a nivel de $P = 0.01$ en la Prueba DMS.

b). En plantas originadas de rizoma.

Las lesiones son mucho menores, midieron alrededor de 2 mm de diametro, sin llegar a formar lesiones necróticas como las desarrolladas en plantas originadas de semilla, sin halos cloróticos; debido a la aparente ineffectividad, no se registraron las diferencias señaladas anteriormente, ya que en hojas el desarrollo de lesiones es apenas visible.

c). Efecto de la temperatura sobre la germinación de esporas de la cepa C-12.

Se determinó el porcentaje de germinación de esta cepa a diferentes temperaturas (15, 27, 30, 37, 42°C) y se estimó su capacidad de esporulación en las mismas condiciones, a 48 y 72 horas.

El porcentaje de germinación a 27 y 30°C fue del 100%, a 37°C disminuye a 92% y a 42°C se encontró solamente el 8% de germinación (Tabla 6).

III. Caracterización de la cepa C-12.

Fue identificada como *Helminthosporium triseptatum* (Dreschler, 1923), esta especie difiere de la mayoría de las especies de *Helminthosporium* descritas, sus esporas de color oscuro oliváceo, muestran quizá el mayor grado de constancia en su morfología, presentan tres septos, de ahí el nombre de la especie, germinan por la producción de uno o dos tubos germinativos del extremo basal (Fotografía II).

Los conidioforos son distinguibles no solo por su relativa longitud, sino también por la presencia de una capa delgada en la periferia inmediatamente abajo del punto de unión de las esporas sucesivas, la porción distal del esporoforo, puede así presentar un

contorno más o menos distintivamente moniliforme, dentro del cual el lumen mantiene un diámetro aproximadamente uniforme.

(Fotografía III-A, III-B, III-C).

Estas características morfológicas permanecen constantes al reaislar el hongo de las lesiones causadas en hojas y tallo, aunque la longitud del esporoforo es mucho más largo ($>80\mu$) en medio V-8 que los desarrollados en la planta. Las constricciones del extremo apical del esporoforo también son menores, de 3 a 4 septos, comparado con 9 a 12 en medio de cultivo (Fotografía IV).

IV. Pruebas de rango de hospedero.

la cepa C-12 resultó avirulenta contra todos los híbridos comerciales de Sorgo (*Sorghum vulgare*), trigo (*Triticum aestivum*) y maíz (*Zea mays*); así como a las otras malezas, quelite (*Amaranthus* sp), correhuela (*Ipomea* sp) y zacate del agua (*Echinochloa* sp). Tabla 7.

V.- Rendimiento de esporas.

La producción de biomasa total en V-8 líquido a diferentes concentraciones (5, 10, 20 y 40%) se ve incrementada proporcionalmente con la concentración de V-8 (mg/ml); ya que se obtuvieron hasta 2.9 mg/ml de peso seco del cultivo total en V-8 al 40% (19.42 mg de sólidos de jugo V-8/ml) Gráfica 1.

Sin embargo, la producción de esporas es mayor en caldo V-8 al 20%, se obtuvo 0.90 mg/ml en esta concentración, en contraste con 0.07 mg esporas/ml en V-8 al 40% donde la producción de biomasa total fué mayor.

La concentración de micelio durante el período de máxima densidad de esporas se incrementó desde 0.26 hasta 2.99 mg/ml en 5 y 40% de V-8 respectivamente.

En el análisis de los rendimientos específicos de biomasa y esporas mostradas en la Tabla 8, la producción de biomasa total Y_x/s fué relativamente constante (alrededor de 0.1 a 0.2 mg/mg de jugo V-8) sobre el rango de las concentraciones de V-8 probadas.

El incremento progresivo de la concentración de micelio con el incremento en la concentración de jugo V-8 nos da un rendimiento específico de esporas mayor a 10 y 20% (.083 y .078 respectivamente) al igual que en el rendimiento relativo de esporas 36 y 39 para 10 y 20% en contraste con 1.6 correspondiente al 40%.

En este medio de cultivo no se indujo la conidiación microcíclica en ninguna de las concentraciones probadas, sin embargo se observaron conidioforos aislados antes de que la esporulación fuera detectada por la determinación del peso seco de esporas.

Los datos anteriormente mencionados se procesaron mediante un análisis de regresión polinomial (Apéndice B).

Clave	Hongo Aislado	Lesión
M-1	<i>Aspergillus</i> sp	Tallo
M-2	<i>Helminthosporium</i> sp	Hoja
M-3	- - - - -	Hoja
M-4	<i>Helminthosporium</i> sp	Tallo
M-5	<i>Helminthosporium</i> sp	Tallo
M-6	- - - - -	Hoja
M-7	<i>Curvularia</i> sp	Hoja
M-8	- - - - -	Hoja
M-9	- - - - -	Tallo
M-10	- - - - -	Raíz
M-11	<i>Helminthosporium</i> sp	Hoja
M-12	<i>Alternaria</i> sp	Hoja
M-13	<i>Alternaria</i> sp	Hoja
M-14	- - - - -	Raíz
M-15	- - - - -	Panoja
M-16	- - - - -	Panoja

-- Aislamientos fungosos no identificados.

Tabla 1. Hongos aislados de lesiones en diferentes partes de la planta de zacaçe Johnson (*S. halepense*) colectadas en Marín, Nuevo León.

Clave	Hongo Aislado	Lesión
H-1	<i>Helminthosporium</i> sp	Hoja
H-2	<i>Helminthosporium</i> sp	Tallo
H-3	<i>Curvularia</i> sp	Hoja
H-4	<i>Alternaria</i> sp	Hoja
H-5	<i>Fusarium</i> sp	Tallo
H-6	<i>Fusarium</i> sp	Hoja
H-7	- - - - -	Hoja
H-8	- - - - -	Hoja
H-9	- - - - -	Tallo
H-10	<i>Helminthosporium</i> sp	Hoja
H-11	- - - - -	Panoja

-- Aislamientos fungosos no identificados.

Tabla 2. Hongos aislados de zacate Johnson colectado en la Hacienda del Canadá, Escobedo, N.L. en campos sembrados con sorgo.

Clave	Hongo Aislado	Lesión
C-11	<i>Fusarium</i> sp	Hoja
C-12	<i>Helminthosporium</i> sp	Hoja
C-25	- - - - -	Tallo
C-26	<i>Curvularia</i> sp	Tallo
C-27	<i>Helminthosporium</i> sp	Hoja
C-28	- - - - -	Hoja
C-29	<i>Alternaria</i> sp	Hoja
C-30	<i>Fusarium</i> sp	Hoja
C-31	- - - - -	Panoja

-- Aislamientos fungosos no identificados.

Tabla 3. Hongos aislados de zacate Johnson colectado en Cadereyta Jiménez, Nuevo León.

Clave	Hongo	Daño a Plantas	
		Semilla	Rizoma
M-1	<i>Aspergillus</i> sp	0	0
M-2	<i>Helminthosporium</i> sp	0	0
M-4	<i>Helminthosporium</i> sp	0	0
M-5	<i>Helminthosporium</i> sp	0	0
M-7	<i>Curvularia</i> sp	0	0
M-11	<i>Helminthosporium</i> sp	0	0
M-12	<i>Alternaria</i> sp	0	0
M-13	<i>Alternaria</i> sp	0	0
H-1	<i>Helminthosporium</i> sp	1	0
H-2	<i>Helminthosporium</i> sp	0	0
H-3	<i>Curvularia</i> sp	0	0
H-4	<i>Alternaria</i> sp	0	0
H-5	<i>Fusarium</i> sp	0	0
H-6	<i>Fusarium</i> sp	0	0
C-11	<i>Fusarium</i> sp	0	0
C-12	<i>Helminthosporium</i> sp	2	1
C-26	<i>Curvularia</i> sp	0	0
C-27	<i>Helminthosporium</i> sp	0	0
C-29	<i>Alternaria</i> sp	0	0
C-30	<i>Fusarium</i> sp	0	0

Tabla No. 4: Evaluación de la toxicidad de hongos a plantas de zacate Johnson (*S. halepense*) de 3 semanas de edad..

0 = ninguna lesión; 1 = pequeñas y aisladas lesiones necróticas;
2 = moderadas lesiones; 3 = abundantes lesiones

Tratamiento	Peso Seco		No. de		No. de	
	Planta (gr)	Nudos	Rizomas	Estolones		
No Inoculados	.910a	2.20	5.9	2.0		
Inoculados	.253b	.13	1.60	0		

C.V. = 23.78% P = 0.01 DMS = 0.1352

Tabla 5. Efecto de infección de la cepa C-12 sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de zacate Johnson (*S. halepense*) después de 7 semanas.

Temperatura °C	% Germinación	Esporulación
	48 h	72 h
18	81	+ esporulación
27	100	+++ esporulación
30	100	+++ esporulación
37	92	+ esporulación
42	8	-

+ Escasa; ++ Moderada; +++ Abundante

Tabla 6. Efecto de la temperatura sobre la germinación de esporas de la cepa C-12 a diferentes temperaturas y su capacidad de esporulación sobre hojas de zacate Johnson.

		Grado de infección				
		S. vulgare				
Clave	S. halepense	Wac-694	Pioner-8226	NK-2670	Funks G-522	Master Gold
H-1	2	0	0	0	0	0
C-12	1	0	0	0	0	0

Tabla 7. Grado de infección de Helminthosporium sp en zacate Johnson (Sorghum halepense) y a 5 variedades comerciales de sorgo (Sorghum vulgare).

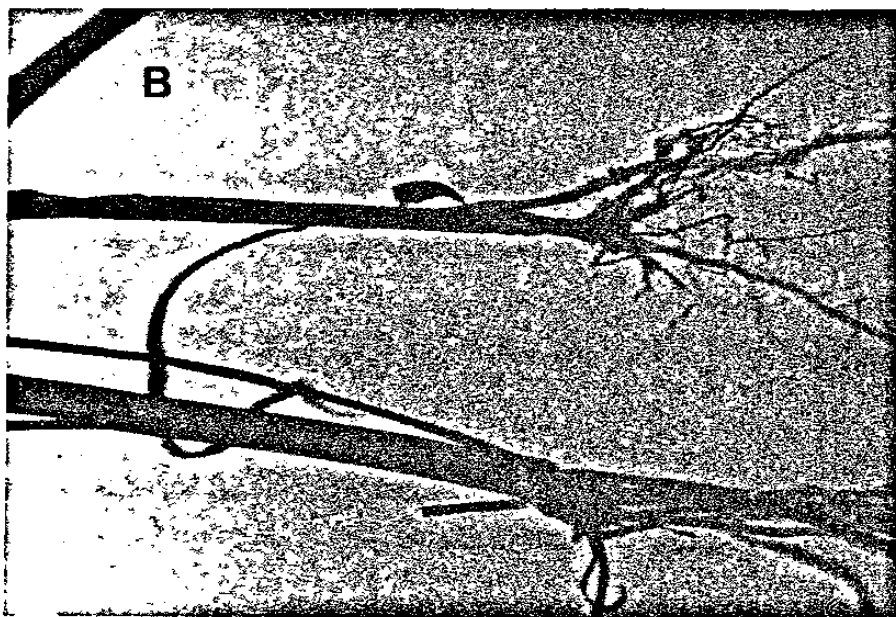
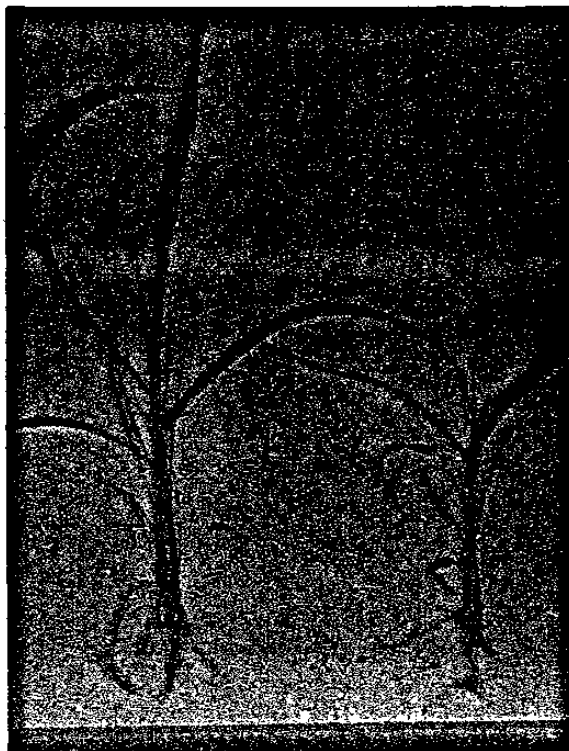
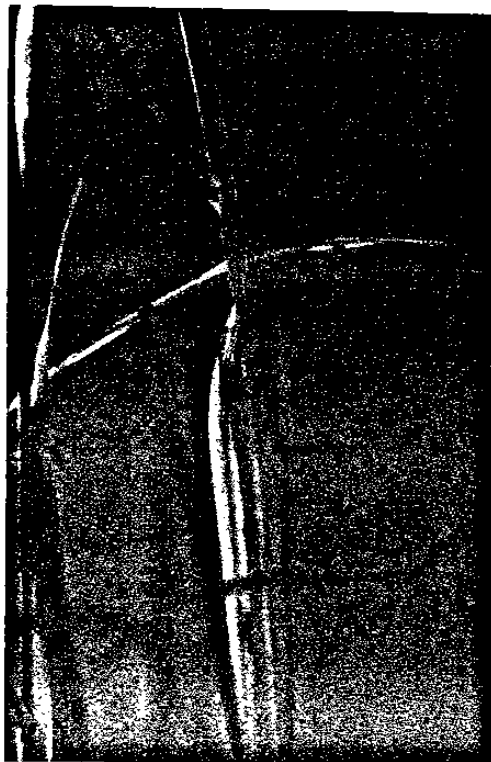
- 0.- ninguna lesión; 1.- pequeñas lesiones aisladas; 2.- moderadas;
- 3.- abundantes lesiones necróticas en todas las hojas

Concentración (de jugo V-8)	Sólidos (mg/ml)	Biomasa Total (mg/ml)	Esporas (mg/ml)	Ysp (mg/ml)	Yx/s (mg/mgV8)	Ysp/s (mg/mgV8)	RSY
5%	2.20	0.26	0.07	0.06	0.10	0.028	28
10%	4.31	1.10	0.39	0.38	0.23	0.083	36
20%	10.13	2.32	0.90	0.89	0.20	0.078	39
40%	19.42	2.99	0.07	0.06	0.12	0.002	1.6

$R^2 = 0.9$

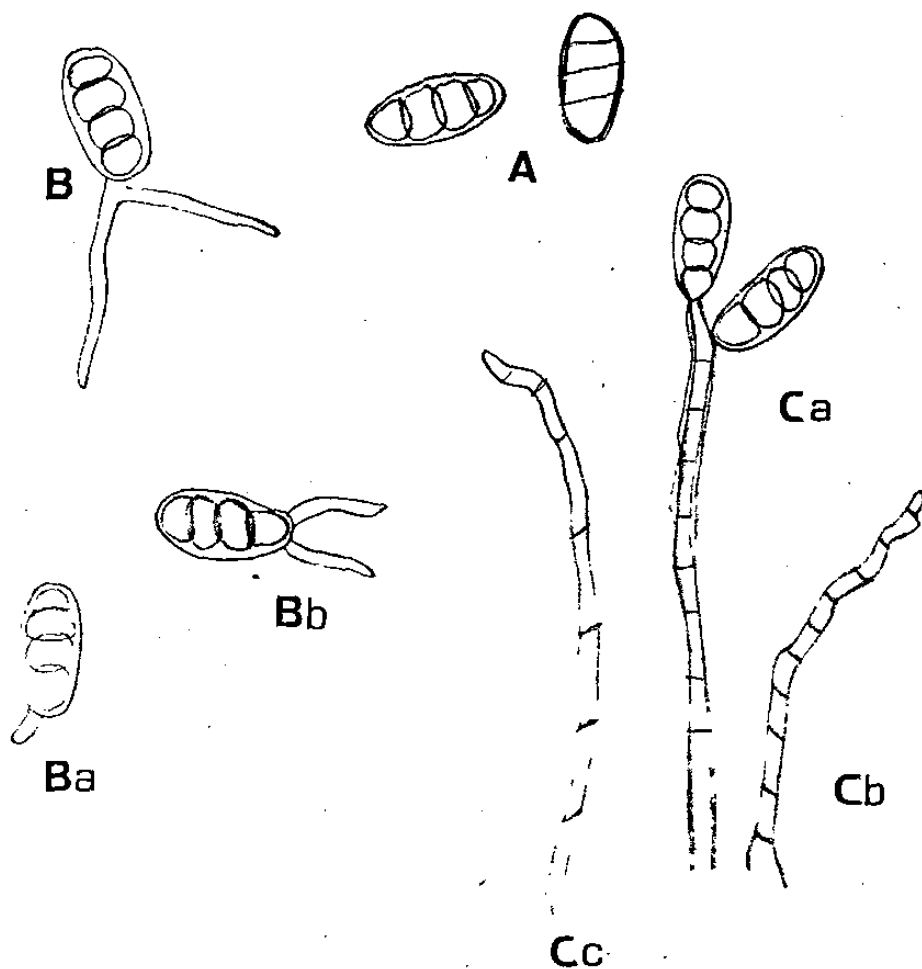
$P = 0.01$

Tabla 8. Producción de micelio y esporas en cultivos batch estáticos hasta 6 días de *H. triseptatum* (C-12).



FOTOGRAFIA I : APARIENCIA DE PLANTAS INOCULADAS CON LA CEPA C- 12.

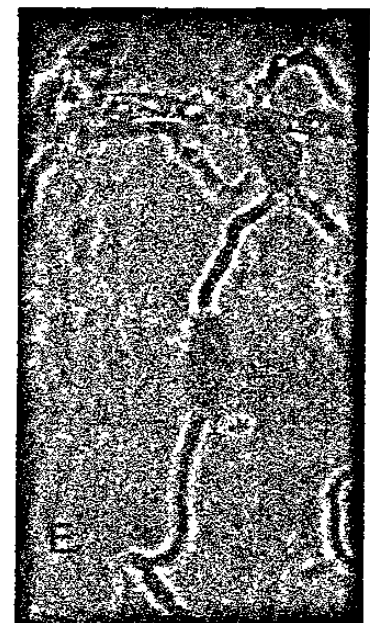
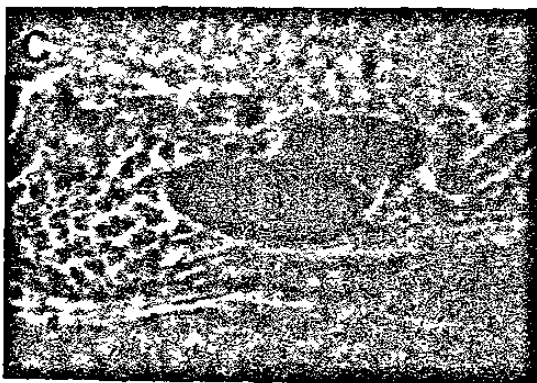
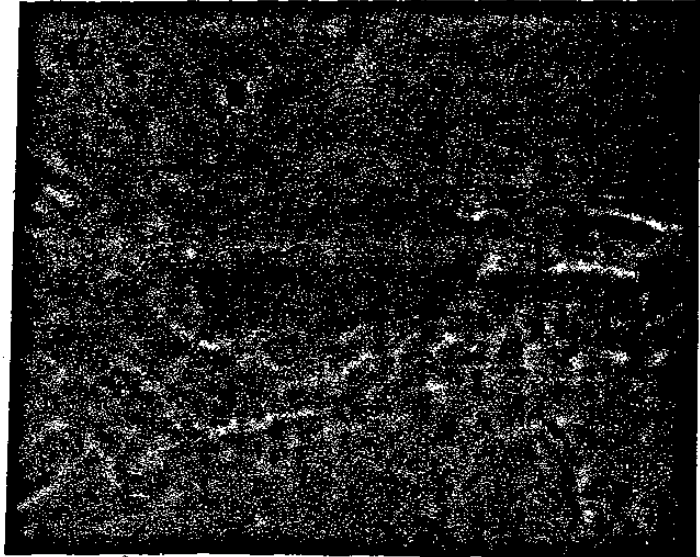
- A: Presencia de pequeñas lesiones circulares café-negras, de menos de 1 cm de diametro.
- B: Base del tallo completamente infectado, no hay formación de nudos y raices secundarias.
- C: Disminución del desarrollo de plántulas.



FOTOGRAFIA 2: DIAGNOSIS DE Helminthosporim triseptatum

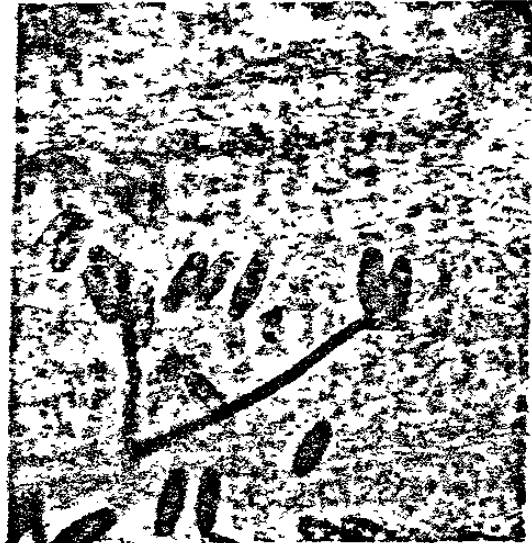
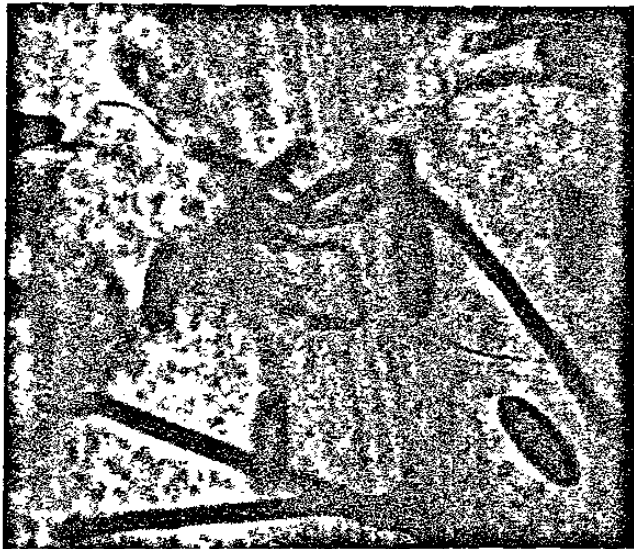
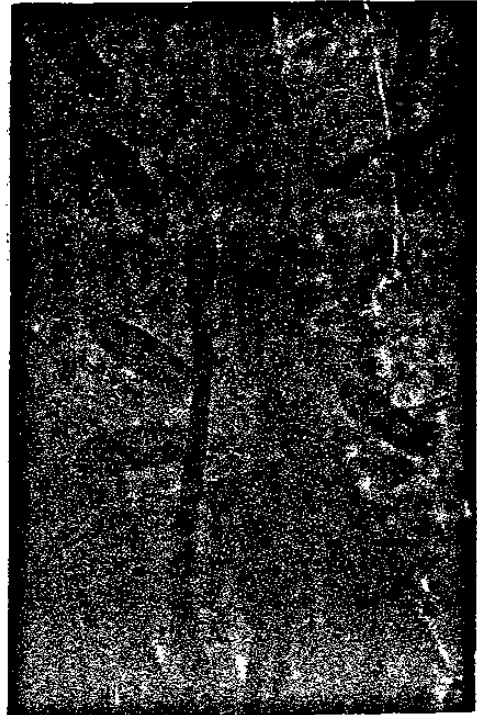
(C. Dreschler del)

- A: Esporas elipsoidales o cilíndricas, regularmente con tres septos, estos no asociados con las constricciones de la pared periférica, miden 15 a 21 X 35 a 50 μ .
- Ba-c: Germinación de las esporas por la producción de uno o dos tubos germinativos en posición adyacente o proxima al hilum.
- Ca-c: Esporoforos simples o en pares.



FOTOGRAFIA 3: DIAGNOSIS DE LA CEPA C- 12.

- A: Esporas y micelio desarrollados en Agar V-8.
 a; Esporoforos largos con el extremo apical desamente septado, con apariencia engrosada en serie.
 b: Esporas generalmente con tres septos.
- B: Germinacion del extremo distal por la formacion de un tubo germinativo.
- C :Formacion de varios tubos germinativos
- D: Formacion de dos tubos germinativos en el mismo extremo.
- E: Formación de un tubo germinativo en cada extremo de la espora.

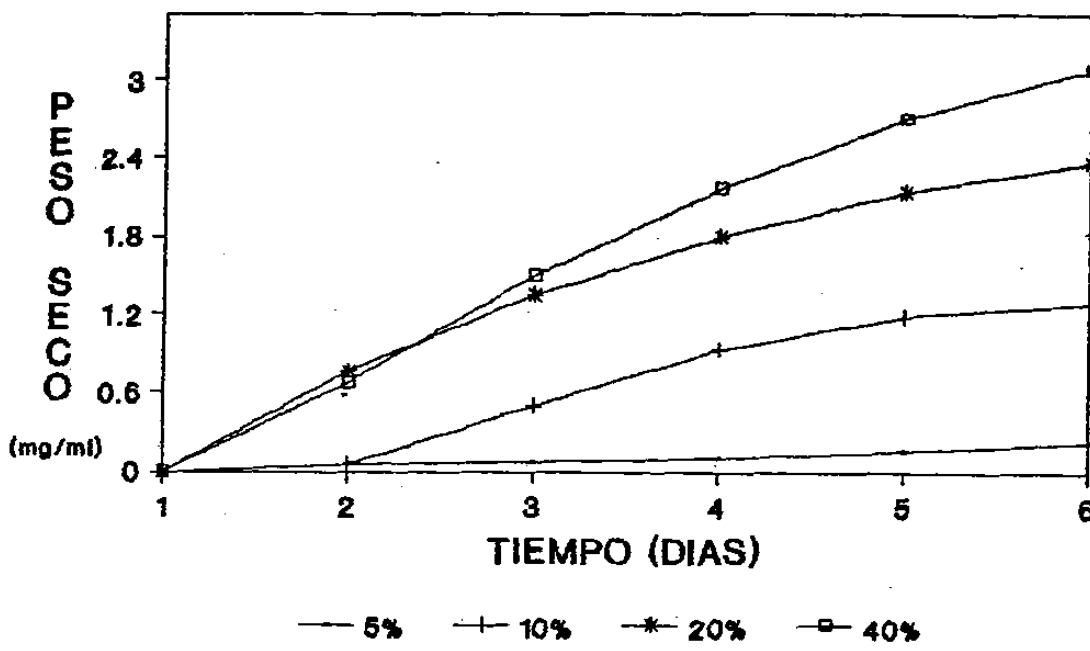


FOTOGRAFIA 4; CONIDIOFOROS DESARROLLADOS EN HOJAS DE ZACATE
JOHNSON.

A-B: Esporóforos con extremo apical característico, con varias esporas unidas.

C: Formación de conidioforos aislados y en conjunto.

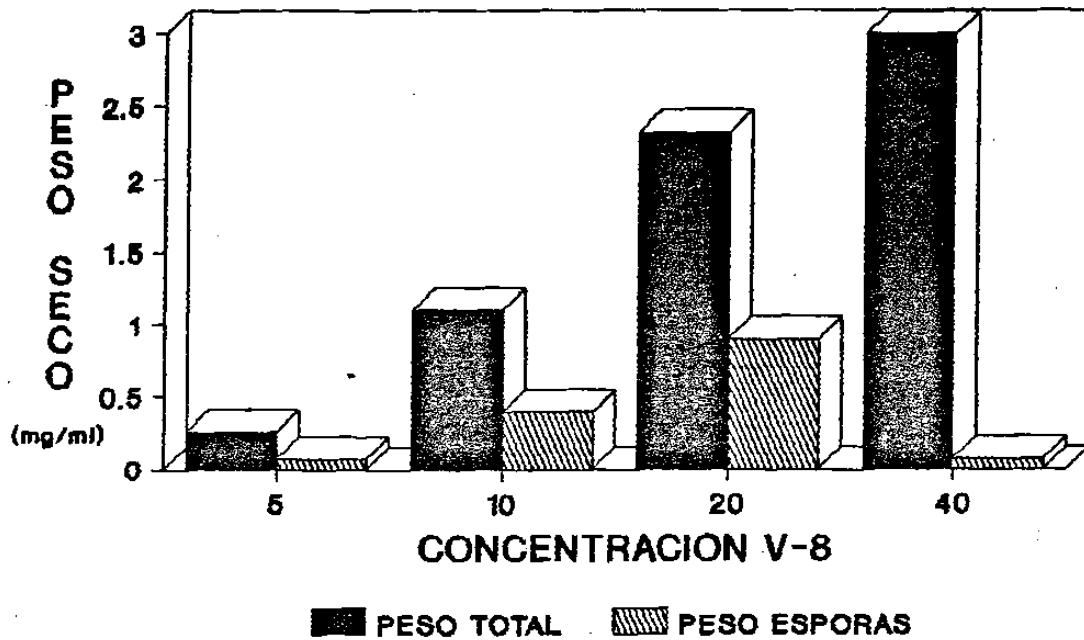
D: Unión de las esporas al esporoforo.



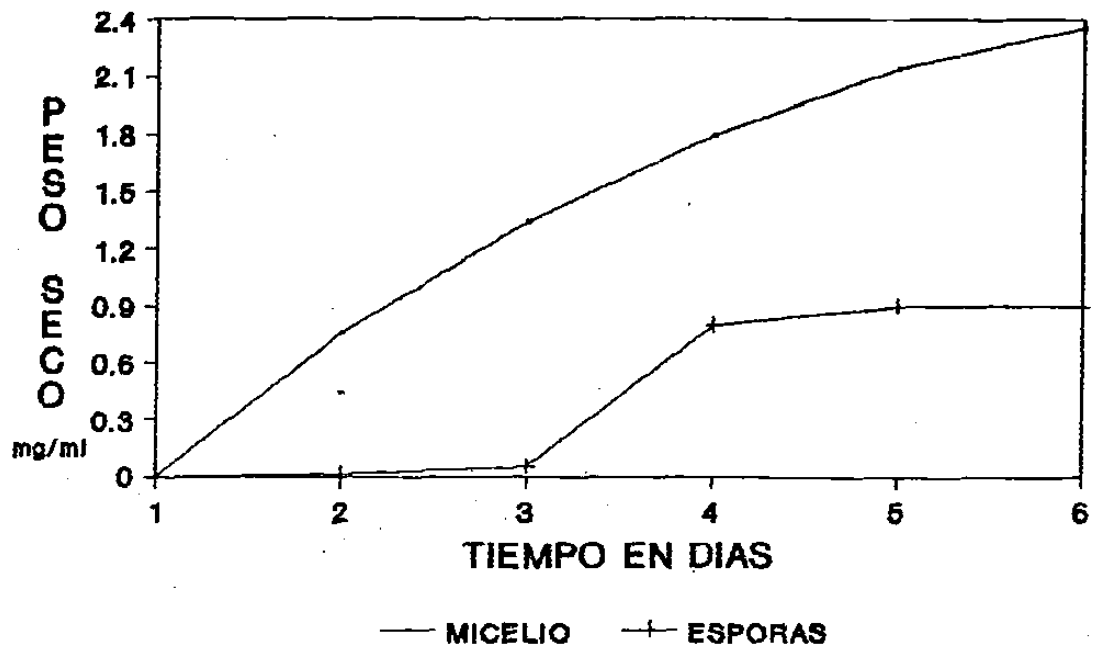
GRAFICA 1.- Producción de biomasa total (micelio y esporas) en varias concentraciones de caldo V-8.

mg de sólidos de jugo V-8/ ml:

5% (2.20), 10% (4.31), 20% (10.13), 40% (19.42)



GRAFICA 2.- Comparación de la producción de biomasa total y específicamente de esporas en caldo V-8 en condiciones estáticas de *H. triseptatum*, Cepa C -12.



GRAFICA 3.- Producción de biomasa total y específicamente de esporas de *Helminthosporium triseptatum*, Cepa C- 12, en caldo V-8 al 20%.

DISCUSION

El aislamiento e identificación de microorganismos con potencial es el primer paso en el desarrollo de un sistema de control biológico (Nelson 1988); especificidad de hospedero, virulencia, requerimientos ambientales para el desarrollo de la enfermedad, capacidad de esporulación en medios artificiales, son algunos de los criterios usados para evaluar el potencial de micoherbicidas (Templeton 1979).

La evaluación preliminar realizada en este estudio de diversos hongos patógenos sobre plantas de zacate Johnson (*S. halepense*), indica que estos hongos pueden ser manipulados para inducir moderadas y severas lesiones foliares en plantas de zacate Johnson.

Del total de hongos evaluados en este estudio, 9 correspondieron al género *Helminthosporium*, entre estas, la cepa C-12 difiere morfológica e infectivamente al resto. La cepa - - -C-12 fué caracterizada y se identificó como *Helminthosporium triseptatum* según Drechsler 1923. Aunque el género *Helminthosporium* se ha segregado en los géneros *Drechslera* (1930), *Bipolaris* (1958) y *Exserohilum* (1974), aún es ampliamente usado (Alcorn 1988).

La aparente especificidad de esta cepa a zacate Johnson, que fué avirulenta a sorgo, trigo, maíz y a otras malezas como correhuela (*Ipomea* sp.), quelite (*Amaranthus* sp.) y zacate de agua (*Echinochloa* sp.), concuerda con aislados específicos a zacate Johnson de *E. turanicum* que fueron designados como tipos "f. sp. sorghi" (Chiang 1989).

Se han descrito hongos patógenos de zacate Johnson que son avirulentos a maíz y sorgo; desde que Mitra reportó especialización en el hongo *Helminthosporium turanicum*, se han encontrado considerables diferencias en patogenicidad y afinidades raciales en este

género (Dreschler 1923).

El resto de los aislamientos evaluados resultó avirulento a zacate Johnson y a las otras plantas; esto sugiere que las plantas de zacate Johnson inoculadas en esta evaluación, fueron diferentes genéticamente de aquéllas plantas de las cuales se obtuvieron los aislamientos de hongos probados, esto implica una especialización fisiológica entre patógeno y hospedero.

Especialización fisiológica de *Colletotrichum graminicola* y *Gloeocercospora sorghi* también ha sido reportada, aislados de pastos fueron frecuentemente encontrados no patogénicos a otras especies (Bergquist 1974).

Muchos ecotipos de zacate Johnson ocurren en América, se han reportado diferencias en resistencia a enfermedades y rendimiento según el ecotipo; estos varían también en su respuesta a diferentes condiciones ambientales, germinación de semilla y rangos de crecimiento (McWhorter 1971). Hamilton y Trucker en 1964, demostraron que cepas de zacate Johnson varían en su respuesta a la aplicación de herbicidas foliares. Posiblemente la estructura del ecotipos es la respuesta a la dificultad y variación del control de zacate Johnson (McWhorter 1971).

El efecto de la infección de zacate Johnson con *Helminthosporium triseptatum* (C-12), resulta en la disminución considerable de biomasa, y reducción e inhibición de la formación de estructuras importantes en la propagación vegetativa de la planta. La morfología y características de crecimiento naturales, son alteradas notablemente sólo en plantas originadas de semilla; en plantas obtenidas a partir de rizoma los daños son apenas visibles, ya que las plantas de 3 semanas de edad midieron más de 46 cms, lo que sugiere inoculaciones en plantas a menor edad.

Resultados de pruebas de hospedero, indican que aislados de zacate Johnson difieren en virulencia y especificidad al ser evaluados contra el mismo; la mayoría de los aislados de *C. graminicola* induce lesiones en avena y la más virulenta cepa de *G. sorghi* fué menos específico que los otros aislados; esto demuestra que, puede no ser posible seleccionar aislados con la combinación óptima de virulencia y especificidad (Chiang 1989).

Recientes técnicas de aplicación y formulación se han desarrollado para facilitar la aspersión de hongos patógenos; alginato de sodio y vermiculita son algunos soportes que se han ensayado (Walker and William 1983). Debido a que altos niveles de inóculo, son usados en las estrategias que involucran el uso de microherbicidas, también se han probado diferentes medios de propagación, que induzcan la mayor cantidad de esporas posible.

La propagación de la cepa C-12 en caldo V-8, resulta favorable, ya que el incremento de la producción de biomasa, mostrado por la constante específica de rendimiento de biomasa (Y_x/s), indica que en todos los cultivos, el crecimiento fué inicialmente micelial y la inducción de la esporulación reduce o cesa este crecimiento; tanto como la disponibilidad del sustrato.

Los más altos rendimientos de esporas que han sido reportados pueden ser logrados en medios con sustrato limitado y alimentación posterior, se puede obtener hasta 3 mg/ml para *C. gloesporioides* y en cultivos batch se obtiene hasta 0.9 mg de esporas/ml (Cascino 1990).

En los experimentos realizados con la cepa C-12 el rendimiento de esporas máximo obtenido fué de 0.89 mg/ml, lo que concuerda con lo anteriormente mencionado para *C. gloesporioides* en medios agitados, sin embargo, para *H. triseptatum* (C-12) los rendimientos señalados fueron obtenidos bajo condiciones estáticas.

CONCLUSIONES

- 1.- Del total de hongos aislados, solamente una cepa (C-12) identificada como *Helminthosporium triseptatum* infecta zacate Johnson (*Sorghum halepense*).
- 2.- El grado de infección es notable en plantas de zacate Johnson originadas de semilla, en plantas originadas de rizoma el efecto es apenas aparente.
- 3.- *H. triseptatum* es aparentemente específico para zacate Johnson, ya que no infectó al resto de hospederos inoculados.
- 4.- En medio de cultivo líquido (V-8 - 20%), se obtienen los más altos rendimientos de esporas.

LITERATURA CITADA:

- Alcorn, J.L. 1988. The taxonomy of *Helminthosporium* species. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26:37-56.
- Allen, S.J., J.F. Brown and Kochman. 1982. Effects of temperature, dewe period, and light on the growth and development of *Alternaria helianthi*. *Phytopathology* 73:893-896.
- Azlin, W.R. and C.G. Mc Whorter. 1981. Johnsongrass (*Sorghum halepense*) control in soybeans (*Glicine max*) with metriflufen applied postemergence. *Weed Science* 19:139-143.
- Banks, P.A. and T.N. Trip. 1983. Control of Johsongrass (*Sorghum halepense*) in soybeans (*Glicine max*) with foliar applied herbicides. *Weed Science* 31:628-633.
- Bergquist, R.R. and O.R. Masias. 1974. Physiologic specialization in *Trichometasphaeria turcica* f. sp. *zea* and *T. turcica* f. sp. *sorghi* in Hawaii. *Phytopathology* 76:-1111.
- Boyette, C.D., G.E. Templeton, R.J. Smith. 1979. Control of winged waterprimrose (*Jessiaea decurrens*) and northern jointvetch (*Aeschynomene virginica*) with fungal pathogens. *Weed Science* 25:497-501.
- Boyette, C.D. and H.L. Walker. 1985. Factors influencing biocontrol of velvetleaf (*Abutilon theopasti*) and pickly sida (*Sida spinosa*) with *Fusarium lateritium*. *Weed Science* 33:209-211.
- Cartwright, R.D. and G.E. Templeton. 1988. Biological limitations of *Protomyces gravidus* as a mycoherbicide for gigant ragweed, *Ambrosia trifida*. *Plant Disease* 72:580-582.

- Cascino, J.J., R.F. Harris, C.S. Smith and J.H. Andrews. 1990. Spore yield and microcycle conidiation of *Colletotrichum gloeosporioides* in liquid culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2303-2310.
- Chiang, M., C.G. Van Dyke and K.J. Leonard. 1989. Evaluation of endemic foliar fungi for potential biological control of Johnsongrass (*S. halepense*): Screening and host range tests. *Plant Disease* 73:459-464.
- Crawley, D.K., H.L. Walker and J.A. Riley. 1985. Interaction of *Alternaria macrospora* and *Fusarium lateritium* on spurred anoda. *Plant Disease* 69:977-979.
- Dale, J.E. and J.M. Chandler. 1979. Herbicide-Crop rotation for Johnsongrass (*Sorghum halepense*) control. *Weed Science* 27:479-485.
- Dale, J.E. 1981. Control de Johnsongrass (*Sorghum halepense*) and volunteer corn (*Zea mays*) in soybean (*Glicine max*). *Weed Science* 29:708-711.
- Daniel, J.T., G.E. Templeton, R.J. Smith and W.T. Fox. 1973. Biological control of northern jointvetch rice with an endemic fungal disease. *Weed Sci.* 21:303-307.
- DéFago G., Kern H., L. Sedlor. 1985. Potential control of weedy spurge by the rust *Uromyces scutellatus*. *Weed Science* 33:857-860.
- Drechsler, Ch. 1923. Some graminicolous species of *Helminthosporium*. *Journal of Agricultural Research* 8:641-740.
- Flores M., J.A. 1977. *Bromatología animal*. Ed. Limusa, Mex. 200-203.

- Frederiksen, R.A. 1986. Compendium of Sorghum diseases. American Phytopathol. Society. St. Paul, MN.
- Hamid, A.H. and M. Aragaki. 1975. Inheritance of pathogenicity in *Setosphaeria turcica*. Phytopathology 65:280-283.
- Hasan, S. 1974. First introduction of a rust fungus in Australia for the biological control of skeleton weed. Phytopathology 64:253-254.
- Holcomb, G.E. 1978. *Alternaria alternantherae* from alligatorweed also is pathogenic on ornamental amaranthaceae species. Phytopatology 68:265-266.
- Holm, L. 1969. Weed problems in developing countries. Weed Science 17:20-37.
- Horsfall, J.G. & E.B. Cowling. 1978. Plant Disease. An advanced treatise. Vol. II. How disease develops in populations. Academic Press, N. York.
- Horowitz, M. and T. Friedman. 1971. Biological activity of subterranean residues of *Cynodon dactylon* L., *Sorghum halepense* L. and *Cyperus rotundus* L. Weed Res. 11:88-93.
- Inman, R.E. 1970. A preliminary evaluation of rumex rust as a biological control agent for curly dock. Phytopathology 61:102-108.
- Jackson, M.A. and R.J. Bothast. 1990. Carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio influence submerged-culture conidiation by the potential bioherbicide *Colletotrichum truncatum* NRRL 13737. App. Environ. Microbiol. 56:3435-3438.

- Keeler, K.H. 1989. Can genetically engineered crops become weeds? *Biotechnology*. 7:1134-1139.
- Kirkpatrick, T.L., G.E. Templeton, D.O. Te Beest, R.J. Smith. 1982. Potential of *Colletotrichum malvarum* for biological control of prickly sida. *Plant Disease* 66:323-325.
- Lingappa, B.T. and Y. Lingappa. 1969. Role of auto-inhibitors in mycelial growth of *Glomerella cingulata*. *J. Gen. Microbiology* 56:35-45.
- Lolas, P.C. and Coble, H.D. 1982. Noncompetitive effects of Johnsongrass (*Sorghum halepense*) on soybean (*Glicine max*). *Weed Science* 30:589-593.
- Massion, C.L. and S.E. Lindow. 1986. Effects of *Spacelotheca holci* infection on morphology and competitiveness of Johnsongrass (*Sorghum halepense*). *Weed Science* 34:883-888.
- McWhorter, C.G. 1971. Growth and development of Johnsongrass ecotypes. *Weed Science* 19:141-146.
- McWhorter, C.G. 1972. Competition of Johnsongrass and cocklebur with six soybeans varieties. *Weed Sci.* 20:56-59.
- Muenschler, W.C. 1955. *Weeds*. Mc. millan Company, N. York. 142-145.
- Nelson, M.E. and M.L. Powelson. 1988. Biological control of grey mold of snap beans by *Trichoderma hamatum*. *Plant Disease* 72:727-729.
- Pohl, R.W. 1954. *How to know the grasses*. W.C. Brown Company Publishers D. Iowa. 186-188.

- Robbins, W.W., A.S. Crafts, R.N. Raynor. 1962. Weed Control A textbook and manual. Mc Graw-Hill Book Company Inc. 3-8, 346-440.
- Schroeder, D. 1981. Biological control of weeds. Recent advances in weed research. 3:41-69.
- Slade, S.J., R.F. Harris, C.S. Smith and J.H. Andrews. 1987. Microcycle conidiation and spore-carrying capacity of *Colletotrichum gloesporioides* on solid media. App. Environ. Microbiol. 53:2106-2110.
- Strobel, G.A. 1991. Biological control of weeds. Scientific American 265:71-78.
- Te Beest, D.O. and G.E. Templeton. 1985. Mycoherbicides: progress in the biological. Plant Disease 69:6-10.
- Tedford, E.C., T.L. Miller, M.T. Nielsen. 1990. A detached technique for detecting resistance to *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* in tobacco. Plant Disease. 74:313-316.
- Templeton, G.E. 1982. Biological herbicides: Discovery, development, deployment. Weed Science 30:430-433.
- Templeton, G.E. 1986. Mycoherbicide research at the University of Arkansas, past, present, and future. Weed Science 34:35-37.
- Templeton, G.E., D.O. Te Beest and R.J. Smith Jr. 1979. Biological weed control with mycoherbicides. Ann Rev Phytopathology 17:301-310.
- U.S.D.A. 1971. Common weeds of the United States. Diver Publications, Inc. N. York. 86-90.

- Villarias M., J.L. 1979. Control de malas hierbas. Vol. I. Ed. Mundi-Prensa, Madrid-España. 15-19..
- Walker, H.L., G.L. Scimbato. 1979. Evaluation of *Alternaria macrospora* as a potential biocontrol agent for spurred anoda (*Anoda cristata*): host range studies. *Weed Science* 27:612-614.
- Walker, H.L. and W.J. Connick. 1983. Sodium alginate for production and formulation of mycoherbicides. *Weed Science* 31:333-338.
- Walker, H.D. and C.D. Boyette. 1985. Biocontrol of sicklepod (*Cassia obtusifolia*) in soybeans (*Glycine max*) with *Alternaria cassiae*. *Weed Science* 33:212-215.
- Walker, H.L., C.D. Boyette. 1986. Influence of sequential dew periods on biocontrol of sicklepod (*Cassia obtusifolia*) by *Alternaria cassiae*. *Plant Disease* 70:692-693.
- Wilkinson, R.E. and H.E. Jaques. 1976. The weeds. W.C. Brown Co. Publishers. 20-23.
- Wang, R. 1986. Current status and perspectives of biological weed control in China. *Chinese Journal of Biol Control* 2:173-177.

1020091472

A P E N D I C E A

REGRESSION ANALYSIS

HEADER DATA FOR: MAG-2.DAT LABEL:
 NUMBER OF CASES: 10 NUMBER OF VARIABLES: 7

REGRESSION SIMPLE

INDEX	NAME	MEAN	STD. DEV.
1	3S	21.200	2.331
2	7S	45.200	4.290
3	ES	2.000	.667
4	RI	5.900	.994
5	NU	2.200	.632
6		-999.000	.000
DEP. VAR.: Y		.910	.152

DEPENDENT VARIABLE: Y

VAR.	REGRESSION COEFFICIENT	STD. ERROR	T(DF= 4)	PROB >T
3S	8.0823E-03	3.5858E-02	.225	.83272
7S	1.7073E-02	1.9033E-02	.897	.42042
ES	7.5907E-03	1.3220E-01	.057	.95696
RI	3.2732E-02	7.0387E-02	.465	.66610
NU	1.2974E-01	1.3950E-01	.930	.40499
CONSTANT	-.5325			

STD. ERROR OF EST. = .197
 R SQUARED = .257
 MULTIPLE R = .507

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

SOURCE	SUM OF SQUARES	D.F.	MEAN SQUARE	F RATIO
MODEL	.054	5	.011	.276
RESIDUAL	.155	4	.039	
TOTAL	.209	9		

SOURCE	DF	SEQUENTIAL SUM OF SQUARES		F VALUE	PROB > F
		TYPE I	SS		
3S	1		.002	.05	.83305
7S	1		.007	.19	.68921
ES	1		.003	.08	.79386
RI	1		.008	.20	.67615
NU	1		.034	.86	.40499

SOURCE	DF	PARTIAL SUM OF SQUARES		F VALUE	PROB > F
		TYPE III	SS		
3S	1		.002	.05	.83272
7S	1		.031	.80	.42042
ES	1		.000	.00	.95696
RI	1		.008	.22	.66610
NU	1		.034	.86	.40499

DEPENDENT VARIABLE: Y

PAR.	REGRESSION COEFFICIENT	STD. ERROR	T(DF= 8)
CONSTANT	5.0000E-02	8.3333E-02	.600
	.8000		

STD.ERROR OF EST. = .158
 R SQUARED = .043
 r = .208

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

SOURCE	SUM OF SQUARES	D.F.	MEAN SQUARE	F RATIO
MODEL	.009	1	.009	.360
RESIDUAL	.200	8	.025	
TOTAL	.209	9		

SOURCE	DF	SEQUENTIAL SUM OF SQUARES		F VALUE	PROB > F
		TYPE I	SS		
NO	1		.009	.36	.56511

SOURCE	DF	PARTIAL SUM OF SQUARES		F VALUE	PROB > F
		TYPE III	SS		
NO	1		.009	.36	.56511

VARIABLE = Ps

TRATA.

1	0.6000	0.9000	0.9000	1.2000	1.1000	0.8000
	0.7000	0.9000	1.0000	0.8000		
2	0.3000	0.2000	0.4000	0.1000	0.2000	0.3000
	0.4000	0.2000	0.2000	0.3000	0.1000	0.3000
	0.4000	0.2000	0.2000			

ANALISIS DE VARIANZA

EV	GL	SC	CM	F	PDF
TRATAMIENTO	1	2.587268	2.587268	171.8209	0.000
ERROR	23	0.345332	0.015014		
TOTAL	24	2.932600			

C.V. = 23.761160%

TABLA DE MEDIAS

TRATA.	REP.	MEDIA
1	10	0.910000
2	15	0.253333

TABLA DE DATOS

DEPENDENT VARIABLE: Y

VARIABLE	REGRESSION COEFFICIENT	STD. ERROR	T-RATIO
E	7.9206E+01	9.4109E+00	8.418
CONSTANT	.8901		

STD. ERROR OF EST. = .598
R SQUARED = .845
r = .919

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

SOURCE	SUM OF SQUARES	D.F.	MEAN SQUARE	F-RATIO
MODEL	25.347	1	25.347	70.809
RESIDUAL	4.653	17	.274	
TOTAL	30.000	18		

SEQUENTIAL SUM OF SQUARES				
SOURCE	DF	TYPE I SS	F VALUE	PROB > F
E	1	25.347	70.81	.00001

PARTIAL SUM OF SQUARES				
SOURCE	DF	TYPE III SS	F VALUE	PROB > F
E	1	25.347	70.81	.00001

-----REGRESSION ANALYSIS-----

HEADER DATA FOR: CUARENTA.D LABEL: REGRESSION SIMPLE
 NUMBER OF CASES: 15 NUMBER OF VARIABLES: 3

ANALISIS AL CUARENTA PORCIENTO

INDEX	NAME	MEAN	STD.DEV.
1	P	2.020	.902
2	E	.038	.017
DEP. VAR.:	T	4.000	1.464

DEPENDENT VARIABLE: T

VAR.	REGRESSION COEFFICIENT	STD. ERROR	T(DF= 12)	PROB >T
P	1.3077E+00	2.0252E-01	6.457	.00003
E	1.6576E+01	1.0749E+01	1.542	.14901
CONSTANT	.7286			

STD. ERROR OF EST. = .294
 R SQUARED = .925
 MULTIPLE R = .959

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

SOURCE	SUM OF SQUARES	D.F.	MEAN SQUARE	F RATIO
MODEL	26.540	2	13.270	157.075
RESIDUAL	1.040	12	.087	
TOTAL	36.000	14		

SEQUENTIAL SUM OF SQUARES					
SOURCE	DF	TYPE III SS	F VALUE	PROB > F	
P	1	26.754	331.77	.00001	
E	1	.206	2.38	.14901	

PARTIAL SUM OF SQUARES					
SOURCE	DF	TYPE III SS	F VALUE	PROB > F	
P	1	2.613	41.65	.00002	
E	1	.206	2.75	.14901	

DEPENDENT VARIABLE: T

VAR.	REGRESSION COEFFICIENT	STD. ERROR	T (DF= 13)
P	1.5895E+00	9.1773E-02	17.320
CONSTANT	.7892		

STD.ERROR OF EST. = .310
R SQUARED = .958
r = .979

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

SOURCE	SUM OF SQUARES	D.F.	MEAN SQUARE	F RATIO
MODEL	26.754	1	26.754	299.576
RESIDUAL	1.246	13	.096	
TOTAL	30.000	14		

SOURCE	DF	SEQUENTIAL SUM OF SQUARES			
		TYPE I	SS	F VALUE	PRDF > F
F	1		26.754	299.95	.00001

SOURCE	DF	PARTIAL SUM OF SQUARES			
		TYPE III	SS	F VALUE	PRDF > F
F	1		26.754	299.95	.00001

A P E N D I C E B

REGRESION POLINOMIAL

GRADO DE LA ECUACION = 2

LISTA DE DATOS PROCESADOS				
OBS	X(OBS)	Y(OBS)	Y(PRED)	RESIDUAL
1	2.00	0.05	0.05	0.00
2	2.00	0.05	0.05	0.00
3	2.00	0.06	0.05	0.01
4	3.00	0.07	0.07	0.00
5	3.00	0.07	0.07	0.00
6	3.00	0.06	0.07	0.01
7	4.00	0.09	0.10	0.01
8	4.00	0.09	0.10	0.01
9	4.00	0.09	0.10	0.01
10	5.00	0.17	0.16	0.01
11	5.00	0.19	0.16	0.03
12	5.00	0.17	0.16	0.01
13	6.00	0.18	0.22	0.04
14	6.00	0.18	0.22	0.04
15	6.00	0.25	0.22	0.03

CONSTANTE = 6.0466172E-02

1 COEFICIENTE DE GRADO = -2.219524E-02

2 COEFICIENTE DE GRADO = 8.261902E-03

COEFICIENTE DE DETERMINACION (R²) = .8518181

COEFICIENTE DE CORRELACION = .92294

ERROR ESTANDAR DE LA ESTIMACION = 2.565975E-02

REGRESION POLINOMIAL

GRADO DE LA ECUACION = 2

LISTA DE DATOS PROCESADOS

OBS	X(OBS)	Y(OBS)	Y(PRED)	RESIDUAL
1	2.00	0.05	-0.10	0.15
2	2.00	0.05	-0.10	0.15
3	2.00	0.06	-0.10	0.16
4	3.00	0.09	0.49	0.40
5	3.00	0.09	0.49	0.40
6	3.00	0.15	0.49	0.34
7	4.00	1.02	0.92	0.10
8	4.00	1.21	0.92	0.29
9	4.00	1.18	0.92	0.26
10	5.00	1.49	1.18	0.31
11	5.00	1.35	1.18	0.14
12	5.00	1.00	1.18	0.18
13	6.00	1.40	1.28	0.12
14	6.00	1.20	1.28	0.08
15	6.00	1.00	1.28	0.28

CONSTANTE = -1.776323

1 COEFICIENTE DE GRADO = 1.001123

2 COEFICIENTE DE GRADO = -8.192722E-02

COEFICIENTE DE DETERMINACION (R²) = .807172

COEFICIENTE DE CORRELACION = .898099

ERROR ESTANDAR DE LA ESTIMACION = .2772833

REGRESION POLINOMIAL

GRADO DE LA ECUACION = 2

LISTA DE DATOS PROCESADOS				
OBS	X(OBS)	Y(OBS)	Y(PRED)	RESIDUAL
1	2.00	0.87	0.76	0.11
2	2.00	0.91	0.76	0.15
3	2.00	0.74	0.76	0.02
4	3.00	1.12	1.34	0.22
5	3.00	1.24	1.34	0.10
6	3.00	1.15	1.34	0.15
7	4.00	1.68	1.75	0.11
8	4.00	1.74	1.75	0.05
9	4.00	1.50	1.75	0.11
10	5.00	2.15	2.14	0.14
11	5.00	2.54	2.14	0.40
12	5.00	2.23	2.14	0.07
13	6.00	2.17	2.31	0.15
14	6.00	2.41	2.31	0.07
15	6.00	2.24	2.31	0.11

CONSTANTE = -.7473100

1 COEFICIENTE DE GRADO = .871720E

2 COEFICIENTE DE GRADO = -3.904875E-02

COEFICIENTE DE DETERMINACION (R²) = .9309257

COEFICIENTE DE CORRELACION = .9648781

ERROR ESTANDAR DE LA ESTIMACION = .174517

REGRESION POLINOMIAL

GRADO DE LA ECUACION = 2

LISTA DE DATOS PROCESADOS				
OBS	X(OBS)	Y(OBS)	Y(PRED)	RESIDUAL
1	2.00	0.79	0.67	0.12
2	2.00	0.68	0.67	0.01
3	2.00	0.74	0.67	0.07
4	3.00	1.32	1.49	0.17
5	3.00	1.40	1.49	0.09
6	3.00	1.37	1.49	0.12
7	4.00	2.20	2.16	0.04
8	4.00	2.00	2.16	0.16
9	4.00	2.17	2.16	0.01
10	5.00	2.85	2.70	0.15
11	5.00	2.78	2.70	0.08
12	5.00	2.89	2.70	0.29
13	6.00	3.81	3.05	0.16
14	6.00	3.61	3.05	0.06
15	6.00	3.81	3.05	0.16

CONSTANTE = -1.465305

1 COEFICIENTE DE GRADO = 1.160764

2 COEFICIENTE DE GRADO = -7.214101E-05

COEFICIENTE DE DETERMINACION (R²) = .9774953

COEFICIENTE DE CORRELACION = .9886821

ERROR ESTANDAR DE LA ESTIMACION = .1462667

REGRESION POLINOMIAL

GRADO DE LA ECUACION = 2

LISTA DE DATOS PROCESADOS

OBS	X(OBS)	Y(OBS)	Y(PRED)	RESIDUAL
1	5.00	0.18	0.26	0.08
2	5.00	0.15	0.26	0.11
3	5.00	0.25	0.26	0.03
4	10.00	1.40	1.10	0.30
5	10.00	1.20	1.10	0.10
6	10.00	1.00	1.10	0.10
7	20.00	2.17	2.32	0.15
8	20.00	2.40	2.32	0.08
9	20.00	2.24	2.32	0.08
10	40.00	2.90	2.95	0.05
11	40.00	3.00	2.95	0.05
12	40.00	3.10	2.95	0.15

CONSTANTE = -1.711025

1 COEFICIENTE DE GRADO = 0.2109857

2 COEFICIENTE DE GRADO = -2.95425E-02

COEFICIENTE DE DETERMINACION (R²) = .921571

COEFICIENTE DE CORRELACION = .959971

ERROR ESTANDAR DE LA ESTIMACION = .1448125

REGRESION POLINOMIAL

GRADO DE LA ECUACION = 2

LISTA DE DATOS PROCESADOS

OBS	X(OBS)	Y(OBS)	Y(PRED)	RESIDUAL
1	5.00	0.07	-0.11	0.18
2	5.00	0.05	-0.11	0.16
3	5.00	0.09	-0.11	0.20
4	10.00	0.07	0.39	0.32
5	10.00	0.06	0.37	0.31
6	10.00	0.07	0.39	0.32
7	20.00	0.92	0.90	0.02
8	20.00	1.12	0.90	0.22
9	20.00	1.06	0.90	0.16
10	40.00	0.30	0.07	0.23
11	40.00	0.05	0.07	0.22
12	40.00	0.04	0.07	0.22

CONSTANTE = -.7672200

1 COEFICIENTE DE GRADO = .1453969

2 COEFICIENTE DE GRADO = -0.114497E-02

COEFICIENTE DE DETERMINACION (R²) = .7672200

COEFICIENTE DE CORRELACION = .8863238

ERROR ESTANDAR DE LA ESTIMACION = .2291661

T A B L A D E D A T O S

