

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES**



**MICORRIZACIÓN DE *Pinus greggii* Engelm. COMO UNA MEDIDA DE  
PREVENCIÓN DEL ESTABLECIMIENTO DE TRES CEPAS DE *Fusarium*  
*oxysporum* Schlecht. CAUSANTES DE "DAMPING-OFF"**

**POR**

**BIÓL. BLANCA IMELDA ARGUELLO SOSA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS FORESTALES**

**LINARES, N.L.**

**SEPTIEMBRE DE 1999**

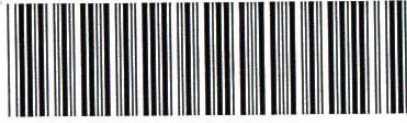
TM

Z5991

FCF

1999

A7



1020145624

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES**



**MICORRIZACIÓN DE *Pinus greggii* Engelm. COMO UNA MEDIDA DE  
PREVENCIÓN DEL ESTABLECIMIENTO DE TRES CEPAS DE *Fusarium*  
*oxysporum* Schlecht. CAUSANTES DE "DAMPING-OFF"**

**POR**

**BIÓL. BLANCA IMELDA ARGUELLO SOSA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS FORESTALES**

**LINARES, N.L.**

**SEPTIEMBRE DE 1999**

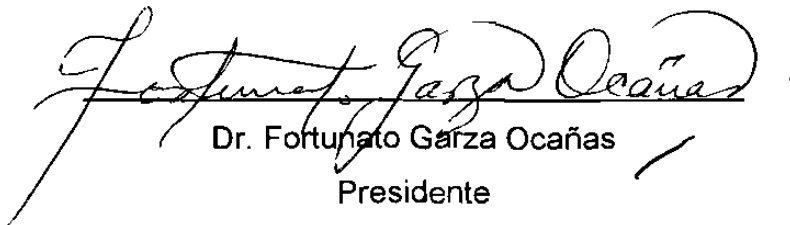
*m*

TM  
2599  
FLF  
1997  
A7



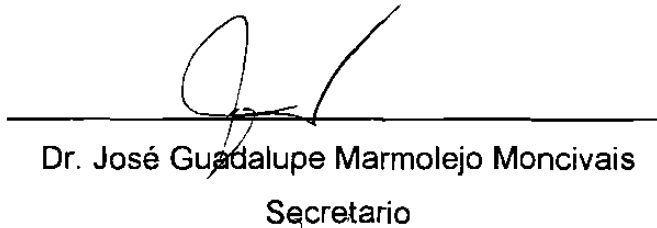
**MICORRIZACIÓN DE *Pinus greggii* Engelm. COMO UNA MEDIDA DE  
PREVENCIÓN DEL ESTABLECIMIENTO DE TRES CEPAS DE *Fusarium  
oxysporum* Schlecht. CAUSANTES DE "DAMPING-OFF"**

Aprobación de Tesis:



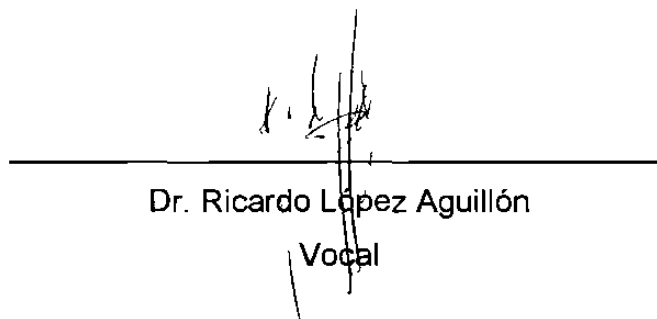
---

Dr. Fortunato Garza Ocañas  
Presidente



---

Dr. José Guadalupe Marmolejo Moncivais  
Secretario



---

Dr. Ricardo López Aguillón  
Vocal

## ***DEDICATORIA***

*Con profundo amor*

*A mi esposo Noé y a nuestro hijo(a)*

*A mis padres, hermanos y sobrinos*

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme otorgado una beca para la realización de mis estudios de posgrado.

A los miembros del comité de tesis:

Dr. Fortunato Garza Ocañas (presidente), por la dirección de este trabajo, así como por los comentarios y recomendaciones al escrito.

Dr. José Guadalupe Marmolejo Monsiváis (secretario), por la revisión del escrito y sugerencias al mismo.

Dr. Ricardo López Aguillón (vocal), por su apoyo con el material de semillas y por la revisión al escrito.

M.Sc. Chris Best (asesor externo), por su interés en formar parte de esta comisión.

Al Dr. Efrén Cázares González, por sus atinadas observaciones al inicio de este trabajo.

A la T.L. Cecilia Casas López, por su apoyo constante en el Laboratorio de Protección Forestal.

Al personal docente, técnico y administrativo de la Facultad de Ciencias Forestales, por su disposición de servicio.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas: Biol. Edna L. Sánchez C.; Biol. Eréndira Zamudio C., Lic. Rosalinda Barrientos, M.C. Mario A. García A., T.C. Roberto C. Montezco, M.C. Florentino Caldera H., Lic. Efraín Rodríguez T., Ing. Alfonso Maldonado, Ing. Manuel Baca y familia, Lic. Daniel Muñoz y familia, Dr. César Cantú A. y familia; Biol. Jesús García J., Lic. Francisca M. López C., Sra. Elsa Garza de Marmolejo, Srita. Vera Volodina, Lic. Laura I. Rentería, Sra. Manuela Perales y a la M.C. Emma Gema García Glz., gracias por su estímulo y apoyo constante.



## CONTENIDO

	pág.
Contenido	I
Lista de figuras	IV
Lista de gráficas	V
Lista de tablas	VI
Resumen	VII
Abstract	VIII
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>Introducción</b>	1
1.1 Justificación	7
1.2 Hipótesis	8
1.3 Objetivos	8
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Materiales y Métodos</b>	9
2.1 Material fúngico	9
2.1.1 Hongos ectomicorrícicos seleccionados	9
2.1.2 Hongo patógeno seleccionado	10
2.1.3 Medios de cultivo y buffer	11
2.1.3.1 Aislamiento y mantenimiento de cepas de los hongos ectomicorrícicos	11
2.1.3.2 Aislamiento y mantenimiento de cepas del hongo patógeno	11
2.2 Material vegetal	12
2.2.1 Selección	12
2.2.2 Obtención de semillas	12
2.2.3 Germinación de semillas	12
2.2.4 Síntesis de ectomicorrizas	13
2.3 Interacciones hongo ectomicorrícico - patógeno	13
2.4 Interacciones hospedero – hongo ectomicorrícico - patógeno	14
2.5 Cristalería	15
2.6 Esterilización	15
2.7 Descripción de hongos en cultivo	15
2.8 Estudio de competencia	16
2.8.1 Pareados de cultivos (hongos ectomicorrícicos vs cepas del hongo patógeno)	16
2.8.2 Producción de compuestos antibióticos difusibles <i>in vitro</i>	17
2.8.2.1 Medio sólido (Membranas de Diálisis)	17

	pág.
2.8.2.2 Medio líquido	18
2.9 Ensayo de patogenicidad	19
2.10 Plántulas preinoculadas con hongos ectomicorrícicos vs cepas de <i>F. oxysporum</i>	19
2.10.1 Material fúngico	19
2.10.2 Plántulas con inóculo ectomicorrícico vs cepas de <i>F. oxysporum</i>	19
 <b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>Resultados</b>	21
3.1 Descripción de cultivos puros de hongos ectomicorrícicos	21
3.1.1 <i>Scleroderma verrucosum</i> Pers.	21
3.1.2 <i>Lepista nuda</i> (Bull. ex Fr.) Cooke	21
3.1.3 <i>Cantharellus cibarius</i> Fr.	22
3.1.4 Velocidad de crecimiento de hongos ectomicorrícicos	23
3.2 Hongo patógeno	24
3.2.1 <i>F. oxysporum</i> cepa A	25
3.2.2 <i>F. oxysporum</i> cepa B	25
3.2.3 <i>F. oxysporum</i> cepa C	25
3.2.4 Velocidad de crecimiento	26
3.3 Pareados de cultivos (hongos ECM vs cepas del patógeno <i>in vitro</i> )	29
3.3.1 <i>Lepista nuda</i> vs cepas del patógeno	29
3.3.2 <i>Scleroderma verrucosum</i> vs cepas del patógeno	29
3.3.3 <i>Cantharellus cibarius</i> vs cepas del patógeno	30
3.4 Efecto de metabolitos producidos por los hongos ectomicorrícicos en el control del crecimiento del patógeno	32
3.4.1 Metabolitos difusibles en medio sólido a través de membranas de diálisis	32
3.4.1.1 <i>Lepista nuda</i> vs cepas patógenas	33
3.4.1.2 <i>Scleroderma verrucosum</i> vs cepas patógenas	33
3.4.1.3 <i>Cantharellus cibarius</i> vs cepas patógenas	34
3.4.2 Producción de metabolitos de los hongos ectomicorrícicos difusibles en medio líquido	37
3.4.2.1 Filtrados de cultivos de <i>Lepista nuda</i> vs cepas patógenas	37
3.4.2.2 Filtrados de cultivos de <i>Scleroderma verrucosum</i> vs cepas patógenas	38
3.4.2.3 Filtrados de cultivos de <i>Cantharellus cibarius</i> vs cepas patógenas	38

	pág.
3.5 Patogenicidad de las cepas de <i>Fusarium oxysporum</i>	41
3.6 Plántulas preinoculadas con hongos ECM vs cepa A de <i>Fusarium oxysporum</i>	42
<b>CAPÍTULO 4</b>	
<b>Discusión</b>	49
<b>CAPÍTULO 5</b>	
<b>Conclusiones</b>	61
Bibliografía	63
Apéndices	73

## LISTA DE FIGURAS

Figura		pág.
3.1	Cultivo puro de <i>Scleroderma verrucosum</i> en MMN	22
3.2	Cultivo puro de <i>Lepista nuda</i> en MMN	23
3.3	Cultivo puro de <i>Cantharellus cibarius</i> en MMN	23
3.4	Principales características de <i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht.	27
3.5	Características macroscópicas de las cepas A, B y C de <i>Fusarium oxysporum</i> en medio de cultivo de Extracto de Malta Agar (EMA) y Melin-Norkrans Modificado (MMN)	28
3.6	Pareados de cultivos en medio MMN	31
3.7	Metabolitos difusibles a través de membranas de diálisis. <i>L. nuda</i> vs cepa A, B y C de <i>Fusarium oxysporum</i>	33
3.8	Metabolitos difusibles a través de membranas de diálisis <i>Scleroderma verrucosum</i> vs cepa A, B y C de <i>Fusarium oxysporum</i>	34
3.9	Metabolitos difusibles a través de membranas de diálisis <i>Cantharellus cibarius</i> vs cepa A, B y C de <i>Fusarium oxysporum</i>	35
3.10	Comportamiento patogénico de <i>S. verrucosum</i> en plántulas de <i>P. greggii</i>	43
3.11	Plántulas de <i>P. greggii</i> .	46
3.12	Cortes transversales de raíces de plántulas de <i>P. greggii</i>	47

## LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica	pág.
3.1 Crecimiento de hongos ectomicorrícicos en MMN	24
3.2 Crecimiento de las cepas A, B y C de <i>F. oxysporum</i> en MMN	26
3.3 Efecto de los metabolitos producidos por los hongos ectomicorrícicos en el crecimiento de <i>F. oxysporum in vitro</i>	35
3.4 Efecto de los metabolitos producidos por los hongos ectomicorrícicos en el crecimiento de <i>F. oxysporum in vitro</i> . a) <i>Lepista nuda</i> vs cepas patógenas, b) <i>Scleroderma verrucosum</i> vs cepas patógenas, c) <i>Cantharellus cibarius</i> vs cepas patógenas	36
3.5 Biomasa de <i>F. oxysporum</i> (cepas A, B y C) en filtrados de cultivos de <i>C. cibarius</i> (Cc), <i>S. verrucosum</i> (Sv), <i>L. nuda</i> (Ln) y Testigo (T)	40
3.6 pH del medio de cultivo después del crecimiento de <i>F.oxysporum</i> (cepas A,B y C) en filtrados de cultivos de <i>C. cibarius</i> (Cc), <i>S. verrucosum</i> (Sv), <i>L. nuda</i> (Ln) y Testigo (T)	40
3.7 Sobrevivencia de plántulas de <i>P.greggii</i> con 3 cepas de <i>Fusarium oxysporum</i>	41
3.8 Mortalidad de plántulas de <i>P.greggii</i> por diferente concentración de inóculo de <i>F.oxysporum</i>	44
3.9 Mortalidad de plántulas de <i>P.greggii</i> con <i>C.cibarius</i> (Cc) y sin inóculo micorrícico (NM)	44
3.10 Mortalidad acumulada de plántulas de <i>P.greggii</i> por <i>F.oxysporum</i> cepa A	48

## LISTA DE TABLAS

Tabla		pág.
2.1	Tratamientos de hongos ectomicorrícicos y cepas del hongo patógeno	17
2.2	Tratamientos de diferente cantidad de inóculo de cepa A de <i>F. oxysporum</i> en plántulas inoculadas con <i>C. cibarius</i> y <i>S. verrucosum</i>	20
3.1	Tipos de interacciones en cultivo <i>in vitro</i>	30
3.2	Porcentaje de disminución de crecimiento en las combinaciones fúngicas	32
3.3	Medias de crecimiento en las combinaciones fúngicas establecidas	32
3.4	Biomasa de <i>F. oxysporum</i> (cepas A, B y C) creciendo en filtrados de cultivos de los hongos ectomicorrícicos	39
3.5	Cambios de pH del medio al final del crecimiento de <i>F.oxysporum</i> (cepas A, B y C)	39
3.6	Mortalidad de <i>P.greggii</i> con tres cepas de <i>F.oxysporum in vitro</i>	42
3.7	Porcentaje de mortalidad en plántulas de <i>P.greggii</i> con/sin <i>C.cibarius</i> (Cc y NM) y diferente cantidad de inóculo de <i>F.oxysporum</i>	43
3.8	Longitud de raíz y altura de plántulas de <i>P.greggii</i> con/sin <i>C.cibarius</i> (Cc y NM) y diferente cantidad de inóculo de <i>F.oxysporum</i>	45

## RESUMEN

### **Micorrización de *Pinus greggii* Engelm. como una medida de prevención del establecimiento de tres cepas de *Fusarium oxysporum* Schlecht. causantes de “damping-off”.**

Se estudiaron las relaciones de competencia entre tres especies de hongos ectomicorrícicos (*Cantharellus cibarius* Fr., *Scleroderma verrucosum* Pers. y *Lepista nuda* Bull. ex Fr. Cooke) y tres cepas de *Fusarium oxysporum* Schlecht causantes de “damping-off” en coníferas. Se implementaron varios ensayos experimentales *in vitro* para observar la eficiencia de los hongos ectomicorrícicos en el control del crecimiento y acción del patógeno. Estos son: 1) pareados de cultivos de hongo ectomicorrícico vs cepas patógenas, donde solamente *Cantharellus cibarius* mostró la inhibición del crecimiento de las tres cepas de *F. oxysporum*; 2) Producción de metabolitos antibióticos producidos por los hongos ectomicorrícicos difusibles a través de membranas de diálisis, donde los resultados muestran que todos los hongos micorrícicos influyeron en forma negativa en el crecimiento de los patógenos. *Cantharellus cibarius* mostró una reducción mayor formando también una evidente zona de inhibición; 3) Efecto de filtrados de cultivos de los hongos ectomicorrícicos en el crecimiento de las cepas patógenas, en el cual se registró un aumento en la biomasa de las cepas del patógeno, así como variaciones significativas en el pH del medio donde se cultivó originalmente a *L. nuda*; 4) Ensayo de patogenicidad, los resultados de este estudio muestran que hubo un diferente grado de patogenicidad entre las cepas de *F. oxysporum*; y 5) Pareado de plántulas preinoculadas con hongos ectomicorrícicos contra cepas de *F. oxysporum*, los resultados muestran que *S. verrucosum* mostró un comportamiento patogénico con *P. greggii*, en tanto que *C. cibarius* disminuyó la mortalidad de las plántulas en todos los casos con respecto del control. Se discuten los posibles mecanismos de resistencia involucrados.

## ABSTRACT

Mycorrhizal inoculation of *Pinus greggii* Engelm., a strategy to prevent the establishment of three strains of the damping-off fungus *Fusarium oxysporum* Schlecht.

The patterns of competition between three ectomycorrhizal fungi (*Cantharellus cibarius* Fr., *Scleroderma verrucosum* Pers. y *Lepista nuda* Bull. ex Fr. Cooke) and three strains of the damping-off fungus *Fusarium oxysporum* Schlecht in conifers were studied. *Fusarium oxysporum* Schlecht strains were isolated from conifer roots. Bioassay of the ectomycorrhizal fungi *in vitro* was used for showing potential control of ectomycorrhizal fungus on pathogen growth and function: 1) Pairing of ectomycorrhizal fungus and pathogen fungus in culture, results showed that *Cantharellus cibarius* was the only fungus that inhibited growth of the three strains of *Fusarium oxysporum*; 2) Production of diffusable extracellular antibiotic metabolites in culture, pathogen growth was diminished by all ectomycorrhizal fungus. *Cantharellus cibarius* showed a greater growth reduction and a circle of growth inhibition surrounding the colony; 3) Culture filtrates effect, was pathogens dry weight increased by all ectomycorrhizal fungi ( $P < .0001$ ), at the same time pH changes occurred only for treatment *L.nuda*; 4) Pathogenicity assay, a different pathogenicity degree for all strains of *F. oxysporum* was found, and 5) Seedlings of *Pinus greggii* Engelm. were inoculated with ectomycorrhizal fungus and confronted with different concentration of *F.oxysporum* (spores/ml), *S.verrucosum* showed a pathogenic influence in *P. greggii* seedlings, while *C. cibarius* was deterrent against the strain A of *F. oxysporum* in all treatments. Possible resistance mechanisms are discussed.



## CAPÍTULO 1

### Introducción.

La infección de partes aéreas y subterráneas de plantas por hongos se puede considerar ubicua, y es la regla en biología vegetal más que la excepción. La definición de enfermedad se ilustra por el desarrollo de síntomas obvios, por esta razón y por cuestiones económicas, los estudios en microbiología vegetal en los últimos dos siglos y medio han sido realizados en tópicos fitopatológicos; sin embargo, la mayoría de las infecciones que se observan en las plantas son de naturaleza micorrícica, las cuales no evidencian síntomas aéreos y resultan benéficas para las plantas, a menudo incluso determinando su distribución ecológica (Pegg & Ayres, 1987).

Casi todas las especies de árboles han coevolucionado con hongos micorrícicos en una fuerte interdependencia simbiótica (Harley & Smith, 1983). En un hospedero solamente, *Pseudotsuga menziesii*, Trappe, (1977) estimó que cerca de 2000 especies de hongos pueden formar ectomicorrizas.

Generalmente se acepta que los hongos ectomicorrícicos benefician a sus hospederos, en primer lugar por mejorar la nutrición mineral, a la vez que aumentan la resistencia a la sequía y a patógenos (Duchesne *et al.*, 1988; Nouaim & Chaussod, 1997).

Los hongos micorrícicos son considerados como una extensión del sistema radicular de las plantas a las cuales se asocian, ya que exploran un volumen mayor de suelo para la obtención de nutrientes, que el explorado por las raíces mismas.

Las raíces de coníferas se asocian a los hongos micorrícicos formando ectomicorrizas, las cuales están caracterizadas por la formación de una capa fúngica alrededor de las raíces denominada manto, en este tipo de micorriza el micelio penetra intercelularmente en la corteza del hospedero, además de inducir cambios en la morfología de la raíz de la planta hospedera debidos principalmente a la producción de hormonas por el hongo (e.g. auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, terpenos) (Thimann, 1969; Slankis, 1973; Gogala, 1971; Krupa & Fries, 1971).

Esta relación cobra importancia al tomar en cuenta a los hongos patógenos que atacan el sistema radicular de gran cantidad de plantas de importancia forestal, a nivel de producción de plantas en los viveros, principalmente en la fase de almácigos, (e.g. hongos del complejo damping-off: *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Cylindrocarpon*, *Fusarium*); ya que es bien conocido que la micorrización representa una marcada ventaja en la competencia por el establecimiento y un buen crecimiento en plántulas y plantas maduras de especies forestales; dada ésta por un aumento en la superficie de absorción de agua y nutrientes (e.g. nitrógeno, fósforo, potasio y calcio), además de un aumento en la protección contra organismos patógenos del suelo (Marx, 1969).

Las relaciones de competencia que se presentan en la naturaleza entre plantas y animales tales como antagonismo, neutralismo y mutualismo, también pueden observarse en relaciones fúngicas inter e intraespecíficas. Las asociaciones neutrales y mutualistas pueden ser estudiadas en el laboratorio; pero no se sabe que tanto de estos resultados pueda aplicarse a condiciones naturales; en contraste con las antagónicas, de las cuales se conoce a un amplio espectro de hongos involucrados en este tipo de simbiosis (Cooke, 1977).

Los hongos que colonizan las raíces incluyen los muy conocidos patógenos y los mutualistas o micorrízicos, y la comparación de sus características biológicas (e.g. velocidad de crecimiento, producción de metabolitos secundarios) evidencian tanto similitudes como diferencias entre el parasitismo y simbiosis (Marx, 1973).

En simbiosis con las raíces de las plantas, los hongos ectomicorrízicos forman una barrera física para evitar la penetración de patógenos, y cambian las condiciones en la rizósfera, lo que permite el establecimiento de otros organismos, además de estimular a las células de la raíz para la producción de sustancias inhibitorias de los patógenos (Zak, 1964).

Particularmente las relaciones de competencia que se establecen entre hongos ectomicorrízicos y hongos patógenos se llevan a cabo por circunstancias, como el uso de carbohidratos y otras sustancias químicas que pudieran ser utilizadas por los patógenos, así como por la secreción de compuestos antibióticos que inhiben o matan a éstos (Marx & Davey, 1969; Marx, 1971).

Algunos investigadores han encontrado que algunas especies de hongos ectomicorrícicos (ECM) producen compuestos antibióticos de bajo peso molecular, que pueden reducir o controlar el desarrollo de la infección de algunas especies agresivas de patógenos radiculares en el suelo (Marx, 1969 y 1972, Kope & Fortin, 1989; Stack & Sinclair, 1975; Sinclair *et al.*, 1982; Sylvia & Sinclair, 1983b; Bianco, 1988; Duchesne *et al.*, 1987)

De esta manera, la protección de las plantas como consecuencia de la asociación simbiótica tipo micorriza, esta representada por mecanismos de defensa inducidos, los cuales pueden ser vistos desde varios niveles: defensa física dada por el manto que proporciona una barrera para la entrada de organismos patógenos; defensa bioquímica por la producción de compuestos fenólicos y antibióticos (Sylvia & Sinclair, 1983b) y defensa estructural, ya que existen también cambios morfológicos en la raíz como la formación de papilas y estructuras phi (Marx, 1969; Marx & Davey, 1969; Bonello, 1991).

Existe gran cantidad de evidencias que indican el antagonismo existente entre patógenos radiculares (*e.g. Fusarium oxysporum, Phytophthora cinnamomi, Rhizoctonia solani*) y hongos ectomicorrícicos (*e.g. Paxillus involutus, Laccaria laccata, Cantharellus cibarius, Suillus granulatus, Cenococcum graniforme, Pisolithus tinctorius*) en coníferas, y el papel que desempeñan los hongos ectomicorrícicos en la protección de plántulas en vivero, al reducir drásticamente la severidad del ataque de estos patógenos y la mortalidad en las plantas, aún antes de que se forme la micorriza (Stack & Sinclair, 1975; Sylvia & Sinclair, 1983a; Tang *et al.*, 1988; Duchesne *et*

*al.*,1988,1989a,b; Chakravarty & Unestam,1987; Chakravarty *et al.*,1989; Natarajan & Gorindasamy,1990; Sampangiarmaiah & Perrin, 1990; Farquhard & Peterson,1990,1991; Chakravarty & Huang, 1991; Garza,1991; Bonello,1991; Cellerino, 1996; Hwang *et al.*, 1996; Yakimenko & Grodnitskaya, 1997).

Las asociaciones micorrícicas y las patogénicas tienen una importante semejanza, esta es, que ambas son tipos de parasitismo relacionado íntimamente con las finas raicillas de sus hospederos. Los hongos ECM son estimulados por las raíces de sus hospederos, infectan simbióticamente y eventualmente transforman las raicillas en órganos duales en los cuales las células corticales están encerradas en la red de Hartig, aisladas del contacto con el suelo por el manto fúngico; durante la síntesis de la ectomicorriza, el hospedero responde fisiológicamente a la infección y al simbiote con ciertas transformaciones. De manera parecida, los patógenos de raíz son estimulados por las raicillas, infectan patogénicamente el tejido meristemático y el córtex primario inmaduro, ramificándose a todos los tejidos y causando posteriormente necrosis limitada o extensiva, alcanzando los tejidos vasculares solamente en los estados de necrosis avanzada. Al parecer la endodermis altamente suberizada de las raíces limita la dispersión de simbiontes y patógenos en tejido vascular (Marx, 1973).

Las micorrizas incrementan la longevidad de las raicillas debido a la prevención del establecimiento de patógenos del suelo en éstas, mediante varios mecanismos: a) la utilización de los exudados de raíces, reduciendo con esto la cantidad de atrayentes para los patógenos; b) formación de un

manto y la red de Hartig, que puede ser una barrera física para la penetración; c) producción de diatretinonitrilo, antibióticos y químicos como las quinonas y los terpenos, que son difundidos o traslocados y que inhiben la germinación o el crecimiento de esporas de hongos patógenos; d) alteración de la composición de la rizósfera, ya que los exudados micorrícicos pueden diversificar la población microbiana y e) resistencia inducida en células del hospedero, a través de la formación *de novo* de sustancias protectoras, o la alteración estructural de las paredes celulares (Marx, 1973; Barea, 1986; Duchesne *et al.*, 1987).

Los estudios realizados sobre las ectomicorrizas y su efecto en la resistencia proporcionada contra patógenos del suelo muestran diferentes hongos ECM, diferentes porcentajes de micorrización, variaciones en las condiciones físicas en las cuales crecen las plántulas (e.g. pH, temperaturas diferente) (Cline *et al.*, 1987; Schisler & Linderman, 1989; Strobel & Sinclair, 1991); y al parecer la ectomicorrización disminuye la infectividad del suelo; sin embargo, la eficiencia de la inoculación con hongos ectomicorrícicos pudiera variar al ser confrontados con diferente cantidad de inóculo de patógenos.

Del mismo modo, trabajos anteriores han demostrado que los mecanismos que confieren la resistencia a las plántulas pueden ser muy distintos, siendo difícil determinar cual es el más importante (Marx, 1973).

El "damping-off", es una enfermedad común ocasionada por un complejo de hongos, que afecta semillas y plántulas de muchas especies de plantas, no siendo la excepción las plantas leñosas. Tradicionalmente se

reconocen dos tipos principales: el pre-emergente, que afecta a semillas y semillas recién germinadas antes de emerger de la línea del suelo; y el post-emergente, que afecta plántulas jóvenes hasta que éstas empiezan a desarrollar tejidos leñosos. Ambas formas aparecen en viveros y son causadas por el mismo grupo de hongos. (Landis, 1989).

El "damping off post-emergente", "caída", "mal de los almácigos", "ahogamiento de las plántulas" o "secadera" se presenta en primer lugar con una coloración café amarillenta de la parte basal del tallo (hipocótilo), casi inmediatamente después la planta cae, debido a que en la zona del cuello de la raíz se produce un anillo necrótico compuesto de células parenquimáticas totalmente colapsadas. Tal efecto se presenta por las toxinas características de los hongos patógenos y por la degradación de la celulosa (Butin & Peredo, 1986).

### **1.1 Justificación.**

Se considera que el "damping-off" se presenta frecuentemente en los viveros y es una de las principales causas de mortalidad en plántulas de ciertas especies; esta enfermedad ocupa el segundo lugar entre las enfermedades fúngicas de viveros forestales en contenedores en los Estados Unidos y Canadá (Landis, 1989). En España ha sido reportada como causante de considerables pérdidas tanto en vivero como en invernaderos (Soldevilla, 1996); por lo cual resulta conveniente estudiar y evaluar aspectos de competencia entre los hongos ECM y algunos de los patógenos que la ocasionan. Lo anterior, con el fin de considerar (previa selección), a los

primeros como posibles elementos de control biológico de esta enfermedad, representando una interesante alternativa biológica que puede reemplazar al tratamiento químico, utilizado frecuentemente en sustratos de viveros que reproducen especies forestales.

## **1.2 Hipótesis.**

Algunos hongos ectomicorrícicos tienen la capacidad de prevenir el crecimiento y establecimiento de hongos causantes de “damping-off” en viveros.

## **1.3 Objetivos.**

Realizar experimentos *in vitro* con el propósito de observar diferentes aspectos de competencia entre hongos ectomicorrícicos y hongos patógenos de coníferas.

Caracterizar el crecimiento en cultivo de los hongos ectomicorrícicos y patógenos, además de evidenciar la posible producción de compuestos metabólicos antibióticos por los hongos ectomicorrícicos y su acción en el control del crecimiento de los hongos patógenos.

Evaluar el efecto de la inoculación de hongos ectomicorrícicos en la prevención o supresión del “damping-off” en *Pinus greggii* ocasionado por *Fusarium oxysporum* en diferentes concentraciones de inóculo, así como tratar de establecer el o los posibles mecanismos de control que podrían estar participando.



## CAPÍTULO 2

### Materiales y Métodos.

#### 2.1. Material fúngico.

##### 2.1.1 Hongos ectomicorrícicos seleccionados.

La selección de los hongos ectomicorrícicos se hizo en base a la amplitud de su rango de hospederos reportada en literatura, a la rapidez de su crecimiento en medio de cultivo y a los registros existentes sobre posible actividad antibiótica.

Se emplearon tres especies de hongos ectomicorrícicos, que se asocian con coníferas y encinos en los bosques del Estado de Nuevo León (Garza *et al.*, 1985; Garza, 1986). Las especies seleccionadas son: *Cantharellus cibarius* Fr., *Lepista nuda* (Bull. ex Fr.) Cooke y *Scleroderma verrucosum* Pers.

*C. cibarius* es una especie secundaria que tiene un alto nivel de especificidad, además se asocia con árboles maduros y ha sido reportada con propiedades antibióticas (Garza, 1991); Moore *et al.* (1989) lo registran como simbionte de *Pinus sylvestris* y *Picea abies*.

*Lepista nuda* es un hongo común en los bosques de pino y encino de Nuevo León (Garza, 1985, 1986), además presenta un amplio rango de hospederos con los cuales forma ectomicorriza, Trappe (1962) lo registra como simbionte de *Pinus* spp., *Corylus avellana* L. y *Populus deltoides* Bartr.

*Scleroderma verrucosum* es una especie pionera que se asocia frecuentemente con árboles jóvenes y posee un amplio rango de hospederos (Garza, 1991).

El material fúngico fue colectado en las localidades “cerro El Potosí” del municipio de Galeana y “El Encinal” del municipio de Iturbide, en el estado de Nuevo León. El material de referencia se encuentra depositado en el herbario micológico de la Facultad de Ciencias Forestales (FCF) de la UANL.

*Cantharellus cibarius* y *Scleroderma verrucosum* se obtuvieron del cepario de la UANL.

### **2.1.2 Hongo patógeno seleccionado.**

Se emplearon tres cepas de *Fusarium oxysporum* Schlecht. Que fueron aisladas de raíces de plántulas de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, *Pinus pseudostrobus* Lindl. y *Pinus culminicola* Andresen & Breaman afectados por “damping-off” en el vivero del Bosque Escuela de la FCF, UANL.

La identificación de la especie de este patógeno se realizó utilizando las claves especializadas de Booth, (1971); Barnett y Hunter, (1972); y Von Arx, (1987).

Las cepas fueron seleccionadas por su rapidez de crecimiento en condiciones de cultivo y por ser más abundantes (núm. de colonias por caja Petri), además de presentarse en las tres especies de coníferas muestreadas para su aislamiento.

### **2.1.3 Medios de cultivo y buffer.**

Se utilizaron los siguientes medios: Extracto de Malta Agar (EMA), Melin-Norkrans Modificado (MMN), Agar-Agua 1% con estreptomicina (AA); empleándose para su preparación agua desionizada y purificada. Para la síntesis de ectomicorrizas *in vitro* se utilizó el sustrato de "Peat Moss"– perlita 1:4 humedecido con MMN sin extracto de levadura, ni dextrosa. Se empleó una solución buffer de ácido cítrico y fosfato para ajustar el ph a 7 (Garza, 1991).

#### **2.1.3.1 Aislamiento y mantenimiento de cepas de los hongos ectomicorrícicos.**

Los cultivos puros fueron obtenidos a partir de porciones del contexto de los cuerpos fructíferos inoculadas en cajas Petri plásticas estériles (9 cm diám.) con medio modificado Melin-Norkrans (MMN) como el descrito por Marx, (1969). Éstos se mantuvieron a 25 °C, realizándose transferencias sucesivas para eliminar contaminantes (Straatsma *et al.*,1985). Los cultivos se mantuvieron como "stock" en el mismo medio almacenados a 5 °C y se efectuaron resiembras cada 4-6 meses para reducir los cambios fisiológicos que pudieran resultar de resiembras continuas (Marx, 1969).

#### **2.1.3.2 Aislamiento y mantenimiento de cepas del hongo patógeno.**

Las raicillas de las plántulas infectadas fueron tratadas con hipoclorito de sodio \* y alcohol \* para su desinfección superficial (Agrios, 1986). Cada

raicilla se seccionó en 10 partes, las cuales posteriormente fueron colocadas en cajas Petri de plástico estériles (9 cm diám.) con medio de Extracto de Malta Agar (EMA) al 2% y MMN. Cada cepa se obtuvo en cultivo puro en medios de EMA y MMN, y se incubó a 25°C antes de ser utilizadas en los experimentos.

## **2.2 Material vegetal.**

### **2.2.1 Selección.**

Se seleccionó a *Pinus greggii* debido a que es una de las especies que más se producen en los viveros de la región Noreste de México, además de que en el vivero de la FCF de la UANL se tienen registros de bajos porcentajes de germinación y problemas muy frecuentes de "damping-off". Esta especie de pino se encuentra asociado con los bosques de *P. cembroides* del estado de Nuevo León, junto con enebros (*Juniperus* spp.) y madroño (*Arbutus xalapensis*), principalmente (Rzedowski, 1978).

### **2.2.2 Obtención de semillas.**

Se emplearon semillas de *Pinus greggii* Engelm., lote registrado en el Banco de Germoplasma de la FCF de la UANL, con fuente geográfica "Las Placetas", 18 de Marzo, Galeana, N.L." con fecha de colecta de 1997.

### **2.2.3 Germinación de las semillas.**

Las semillas se estratificaron durante dos días en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1 % a bajas temperaturas (4-6 °C), enseguida se realizó la desinfección superficial con

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % por 45 min. y finalmente se lavaron agitándose en dos ocasiones con agua destilada estéril. Posteriormente se transfirieron a cajas Petri con agar-agua 1 % con estreptomicina (80 ppm) y se mantuvieron en la obscuridad a 25 °C hasta su germinación (Bonello, 1991).

Se emplearon las plántulas recién germinadas que presentaban una raíz primaria no mayor de 2 cm de longitud.

#### **2.2.4 Síntesis de ectomicorrizas.**

Se emplearon frascos de vidrio de 200 ml conteniendo sustrato compuesto por "Peat Moss" – perlita 1:4 humedecido con MMN sin agar, ni carbohidratos en una proporción de 0.25, los cuales fueron inoculados e incubados por 1 semana a 25°C en la obscuridad antes de introducir las plántulas (Garza, 1991).

En los frascos anteriormente descritos se introdujeron las semillas germinadas asépticamente, posteriormente se sellaron con parafilm y se mantuvieron por una semana en la obscuridad a 25 °C. Los frascos se colocaron en una cámara con un fotoperiodo de 16 hrs luz – 8 hrs obscuridad, a una temperatura promedio de 28 °C. La iluminación fue provista por una lámpara Gro-Lux de 20W ubicada a ca. 30 cm de los frascos.

### **2.3 Interacciones hongos ectomicorrícicos-patógeno.**

Las fuentes de inóculo de los hongos consistieron en discos de micelio con crecimiento activo en agar MMN de 0.5 cm o 1 cm de diámetro, los

cuales se obtuvieron con sacabocados estériles de los bordes de las colonias (Garza, 1991).

#### **2.4 Interacciones hospedero-hongo ectomicorrícico-patógeno.**

Se emplearon 4 discos de micelio de los hongos micorrícicos y 1 ml de una suspensión de conidios del patógeno seleccionado ( $10^5$ ,  $10^4$  y  $10^3$  conidios por ml. de agua destilada estéril) para la inoculación de plántulas (Graham & Linderman, 1983; Duchesne *et al.*, 1988).

La suspensión se obtuvo añadiendo 10 ml de agua destilada estéril en 1 caja Petri con el micelio activo del patógeno. Con ayuda de un asa se frotó la superficie de la caja y posteriormente los 10 ml de agua se recuperaron con una pipeta estéril y se conservó en frasquitos viales de 20 ml con tapón de rosca (solución 1). De la solución 1 se obtuvo 1 ml y se diluyó en 9 ml de agua destilada estéril (solución 2), de ésta se tomó una alícuota con una pipeta Pasteur y se colocó en un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos procediéndose a realizar un conteo directo en 20 campos con el objetivo de 40 X, en los cuales se registró el número de conidios y se obtuvo así un total para los 0.04 ml que representó el volumen examinado. Posteriormente se multiplicó para obtenerlo para un volumen de 1 ml de la solución 2 y después de igual forma para la solución 1. Finalmente se obtuvo la dilución requerida ( $10^5$ ,  $10^4$  y  $10^3$  conidios / ml) mediante dilución de la solución 1 (Farquhar & Peterson, 1990).

## 2.5 Cristalería.

El material de vidrio utilizado en la preparación de los medios de cultivo (e.g. matraces Erlenmeyer, tubos de ensaye, frascos de vidrio, pipetas volumétricas, agitadores), así como en el experimentos con medio líquido, se lavó con detergente y se enjuagó por dos veces para eliminar rastros del detergente que pudieran alterar el pH de los medios.

## 2.6 Esterilización.

Los medios de cultivo y cristalería fueron esterilizados en autoclave a 121°C por 15 min. (Blanchard & Tattar, 1981), en el caso del sustrato de "Peat Moss" - perlita se prolongó el tiempo de esterilización a 1 hora (Molina & Palmer, 1982). Existen reportes de que sustratos artificiales, como el "Peat Moss", perlita y la vermiculita, a menudo se encuentran infestados con especies de *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Fusarium*, así como por otros hongos y bacterias no patógenas (Landis, 1989).

## 2.7 Descripción de hongos en cultivo.

Se realizaron descripciones de los cultivos de hongos ECM y de las cepas patógenas tomando características de color de la colonia, forma de crecimiento, coloración del medio de cultivo, así como las características del micelio (e.g. hifas, color en KOH 5%) (ver sección 3.1).

La velocidad de crecimiento de los hongos se midió en EMA y MMN, inoculando centralmente cajas Petri de MMN y EMA con cilindros de micelio

de 0.5 cm de diámetro, registrándose el crecimiento diariamente, hasta que se llenó completamente la caja de Petri o hasta que se detuvo el crecimiento (Garza, 1991).

## **2.8 Estudio de competencia.**

### **2.8.1 Pareados de cultivos (hongos ectomicorrícicos vs cepas del hongo patógeno).**

Se establecieron pareados en medio de cultivo entre los hongos ectomicorrícicos y las cepas del patógeno, el inóculo de cada hongo se colocó en lados opuestos ca. 4 cm de distancia entre sí, en una caja Petri con medio sólido MMN. Se incubaron a 25°C en la obscuridad por 2 semanas o hasta que su crecimiento se estabilizó. En las combinaciones establecidas en la tabla 2.1 y como testigos se tuvieron cultivos individuales de las especies. Se registró el ancho de la zona de inhibición en cada combinación establecida (Park, 1970).

Asimismo se registraron características sobre el crecimiento del micelio de ambos hongos y particularmente en las zonas de contacto, si lo hubo o en las zonas inhibición de crecimiento. Las determinaciones visuales se hicieron cuando los hongos habían estabilizado su crecimiento (Garza, 1991).



Tabla 2.1

Tratamientos de hongos ectomicorrícicos y cepas del hongo patógeno.

HONGO ECTOMICORRÍCICO	HONGO PATÓGENO <i>Fusarium oxysporum</i>			Testigo Micorrícico
	Cepa A	Cepa B	Cepa C	
1 <i>C. cibarius</i>	1 / A	1 / B	1 / C	1 / 0
2 <i>L. nuda</i>	2 / A	2 / B	2 / C	2 / 0
3 <i>S. Verrucosum</i>	3 / A	3 / B	3 / C	3 / 0
Testigo Patógeno	0 / A	0 / B	0 / C	0 / 0

## 2.8.2 Producción de compuestos antibióticos difusibles *in vitro*.

### 2.8.2.1 Medio sólido (Membranas de Diálisis).

En cajas Petri se emplearon membranas de diálisis sobre el medio sólido (20 ml MMN), las cuales se incubaron 48 hrs antes y después de introducir la membrana; en éstas, se inoculó centralmente un disco de 5 mm de diámetro del hongo ectomicorrícico en cuestión, el cual se incubó a 25 °C en la obscuridad por 14 días.

Posteriormente se retiraron las membranas con micelio y se inocularon centralmente con el patógeno correspondiente a las combinaciones ya establecidas.

Como testigos se utilizaron cajas inoculadas con cilindros de agar estéril sobre las membranas de diálisis, las cuales fueron retiradas de la misma manera que los demás tratamientos y se inocularon con los patógenos probados (ver tabla 2.1).

En cada caja se marcaron líneas ortogonales sobre las que se midió el crecimiento radial a intervalos de 24 hrs por 7 días (Garza, 1991). Como valor comparativo se consideró el 100 % de crecimiento del patógeno una colonia de 4.25 cm de radio (promedio del testigo).

#### **2.8.2.2 Medio líquido.**

Para estos experimentos se cultivaron los hongos ECM en tubos de ensaye con 50 ml de MMN estéril ajustado a pH 7, inoculando discos de ca. 1 cm de diámetro de inóculo. Los tubos estuvieron sellados con torundas de algodón y gasa y cubiertos con papel aluminio para su incubación a 25 °C en la obscuridad por un mes.

El medio se colectó bajo condiciones de presión reducida con bomba de extracción en tubos de ensaye de las mismas características a través de 2 capas de papel filtro Whatman no. 1 estériles. El micelio recuperado se pesó en fresco y en seco en una balanza analítica para obtener la biomasa por diferencia de peso.

Posteriormente, de acuerdo a las combinaciones de los tratamientos (ver tabla 2.1) se inoculó un disco de 5 mm de diámetro ca. de cultivo puro del hongo patógeno correspondiente; se incubaron por 8 días a 25 °C en la obscuridad. El micelio se recuperó de la misma manera y se cuantificó la biomasa de cada combinación.

En ambos experimentos se tuvieron 7 unidades de muestreo para cada tratamiento (Bonello, 1991).

## **2.9 Ensayo de patogenicidad.**

En frascos de vidrio con sustrato de "Peat Moss" - perlita 1:4 se colocaron a crecer plántulas obtenidas asépticamente como se describe en la sección 2.2.4, pero sin inóculo del hongo ECM. Posteriormente se inocularon con 1 ml de una suspensión de conidios de las cepas patógenas ( $10^4$  conidios / ml) (sección 2.4) y se mantuvieron en una cámara de crecimiento. Se registró la sobrevivencia diariamente (tomándose como muertas, aquellas plántulas que presentaban micelio sobre su radícula y oscurecimiento de tejido) (Farquhar & Peterson, 1990). Se emplearon 15 plántulas por cada cepa y el testigo.

## **2.10 Plántulas preinoculadas con hongos ectomicorrícicos vs cepas de *F. oxysporum*.**

### **2.10.1 Material fúngico.**

Se utilizaron las cepas de *Cantharellus cibarius* y *Scleroderma verrucosum*, que mostraron cierto grado de control del crecimiento de las cepas patógenas (ver sección 3.3 y 3.4) y la cepa A de *Fusarium oxysporum*, que resultó ser la más agresiva en el ensayo 2.9 (ver sección 3.5).

### **2.10.2 Plántulas con inóculo ectomicorrícico vs cepas de *F. oxysporum*.**

Se mantuvieron, 10 ó más plántulas por tratamiento (ver tabla 2.2) en frascos (ver sección 2.4). Primeramente las plántulas obtenidas de la germinación aséptica fueron inoculadas con hongos ECM por 7 días.

Posteriormente las plántulas fueron inoculadas con conidios en suspensión a diferentes concentraciones (ver tabla 2.2), posteriormente se mantuvieron en una cámara de crecimiento y se registró la sobrevivencia diariamente, por 10 días (Stack & Sinclair, 1975). Al décimo día de la inoculación, se registró la longitud radicular y de la parte aérea de las plántulas sobrevivientes, de éstas, así como de las plántulas muertas, se obtuvieron las raíces para realizar preparaciones temporales en KOH 5 %, reactivo de Melzer y Azul de tripano en lactofenol.

**Tabla 2.2**

**Tratamientos de diferente cantidad de inóculo de cepa A de *F. oxysporum* en plántulas inoculadas con *C. cibarius* y *S. verrucosum*.**

HONGO ECTOMICORRÍCICO	<i>Fusarium oxysporum</i> (conidios/ ml )			Testigo 0
	$10^5$	$10^4$	$10^3$	
1 <i>C.cibarius</i>	1 / $10^5$	1 / $10^4$	1 / $10^3$	1 / 0
3 <i>S. verrucosum</i>	3 / $10^5$	3 / $10^4$	3 / $10^3$	3 / 0
0 Testigo	0 / $10^5$	0 / $10^4$	0 / $10^3$	0 / 0

## CAPITULO 3

### Resultados.

#### 3.1 Descripción de cultivos puros de hongos ectomicorrícicos.

##### 3.1.1 *Scleroderma verrucosum* Pers.

Creciendo en medio MMN modificado se observa una colonia de 8.8 a 9 cm de diámetro en 9 días, color blanco opaco, margen muy irregular al inicio del crecimiento, que después se uniformiza, con cordones miceliares, los cuales en algunas partes de la colonia se aglomeran y dan el aspecto de granulado, no presenta exudados conspicuos, crece superficialmente sin levantarse mucho del medio, llenando rápidamente la caja en pocas semanas, invadiendo incluso las paredes de la caja, el revés de la colonia presenta tonos amarillo claro, no se evidencian cambios de color en el medio de cultivo (ver figura 3.1).

Micelio con abundantes fíbulas, con hifas delgadas de color hialino en KOH 5 %.

##### 3.1.2 *Lepista nuda* (Bull. ex Fr.) Cooke.

En cultivo desarrolla colonias de 6.8 a 8.3 cm de diámetro en 9 días, zonada, de color blanco con tintes violetas, margen ondulado con abundantes cordones miceliares de color lila, presenta gotas de agua

condensadas entre el micelio, de consistencia algodonosa creciendo de una manera moderada, llenando la caja en pocas semanas, el revés de la colonia es zonado, con tintes amarillentos, no se evidencian cambios de color en el medio de cultivo (ver figura 3.2).

Micelio con abundantes fibulas, con hifas gruesas de color hialino en KOH 5 %.

### 3.1.3 *Cantharellus cibarius* Fr.

En cultivo, *C. cibarius* exhibe diferentes coloraciones de tono blanco amarillo-naranja, la cepa empleada desarrolla colonias de 1.4 a 3 cm de diámetro en 30 días, zonadas, de color amarillo-naranja a café rojizo, margen ondulado, creciendo por debajo de la superficie del medio, el revés de la colonia es del mismo color, el medio de cultivo cambia a un color más oscuro y se licúa en algunas partes (ver figura 3.3).

Micelio con abundantes fíbulas, hifas delgadas, color amarillo claro en KOH 5 %.

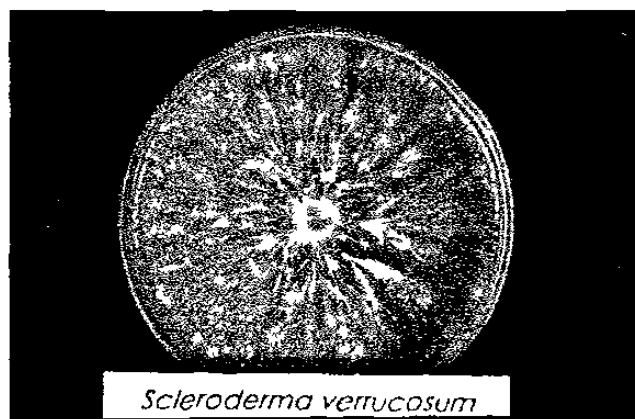


Figura 3.1 Cultivo puro de *Scleroderma verrucosum* en MMN.

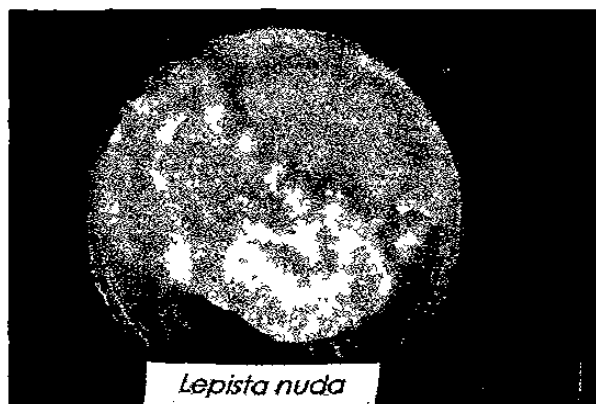


Figura 3.2 Cultivo puro de *Lepista nuda* en MMN.

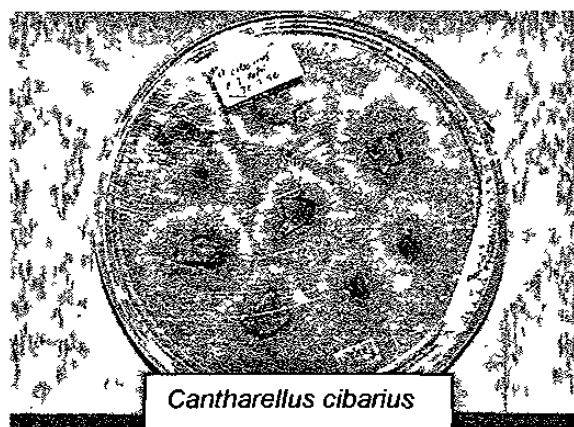
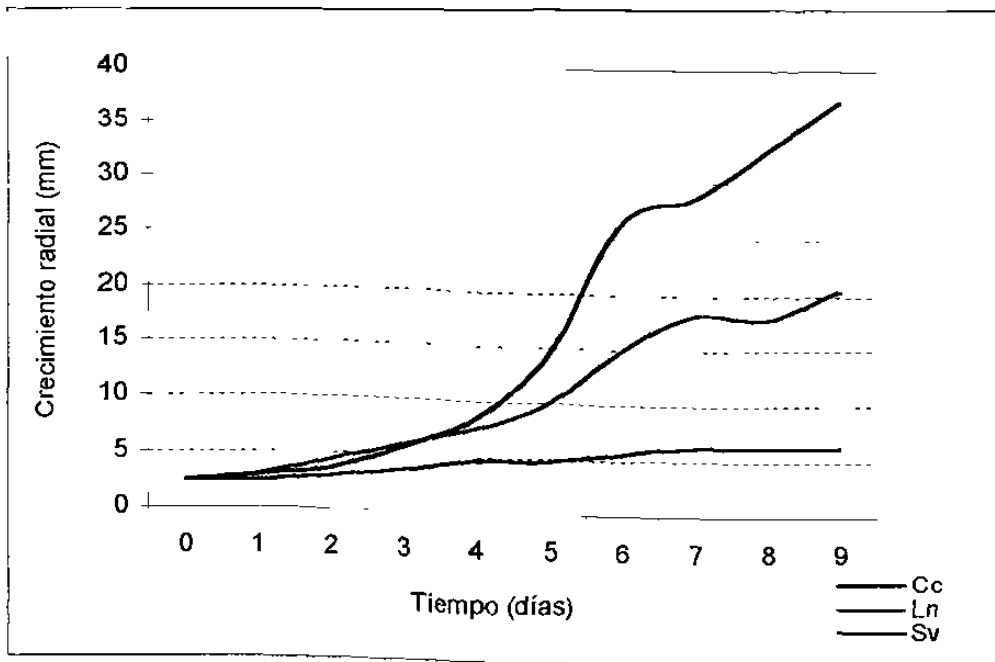


Figura 3.3 Cultivo puro de *Cantharellus cibarius* en MMN.

### 3.1.4 Velocidad de crecimiento de hongos ectomicorrícicos.

La velocidad de crecimiento de los tres hongos ectomicorrícicos seleccionados es diferente, ya que *L. nuda* y *S. verrucosum* registraron un crecimiento rápido con un promedio de 0.840 mm y 0.990 mm por día, respectivamente, en tanto que *C. cibarius* presentó un crecimiento lento registrando un promedio diario de 0.073 mm. (ver gráfica 3.1). Las medias de crecimiento de los hongos ectomicorrícicos seleccionados son diferentes significativamente ( $P \leq 0.05$ ) (ver apéndice 1.1).



**Gráfica 3.1 Crecimiento de hongos ectomicorrícicos en MMN.**

Cc = *Cantharellus cibarius*, Ln= *Lepista nuda* y Sv = *Scleroderma verrucosum*.

### 3.2 Hongo patógeno.

Las tres cepas seleccionadas de *Fusarium oxysporum* Schlecht. Emend. Snyder & Hansen tienen como principal característica la formación de macroconidios lunados o falcados, incoloros y multicelulares (3-5 septos) de 27-60 x 3,5  $\mu\text{m}$  que se originan en esporodocios de color rosado; los microconidios son uni- o bicelulares en medio de cultivo y miden de 5-12 x 2,2-3,5  $\mu\text{m}$ ; presentan clamidosporas esféricas con paredes gruesas aisladas o en pares en forma intercalar (ver figura 3.4).



### **3.2.1 *F. oxysporum* cepa A.**

La colonia alcanzó 6.44 cm de diámetro en 7 días en MMN, de color rosa, con crecimiento superficial. Micelio extensivo y algodonoso en cultivo, con tintes de color violeta, rosa y rojizo, septado, hifas delgadas, hialinas en KOH 5 %, con clamidosporas intercalares, macronidios en forma de canoa y microconidios globosos. Crecimiento promedio diario de 4.6 mm (ver figura 3.5a)

### **3.2.2 *F. oxysporum* cepa B.**

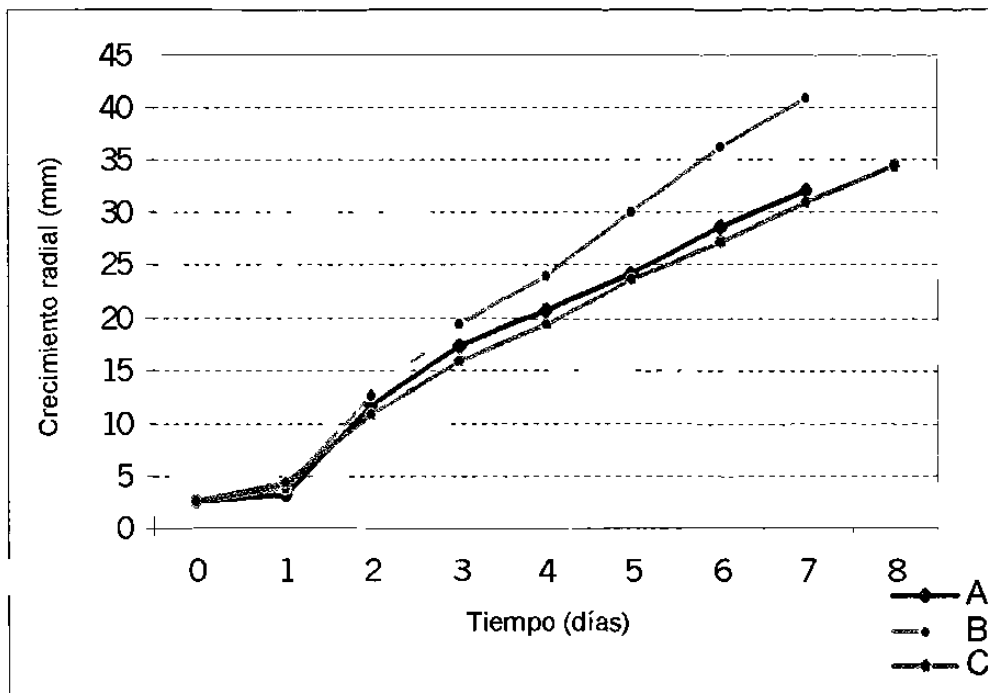
La colonia alcanzó 7.84 cm de diámetro en 7 días en medio de MMN, color blanco crema, crece adherida al medio de cultivo, sin formar prolongaciones aéreas, el micelio es septado, con hifas delgadas, septadas hialinas en KOH 5 %, conidióforos cortos con microconidios globosos y macroconidios lunados con septos transversales. Crecimiento promedio diario de 5.6 mm (ver figura 3.5b).

### **3.2.3 *F. oxysporum* cepa C.**

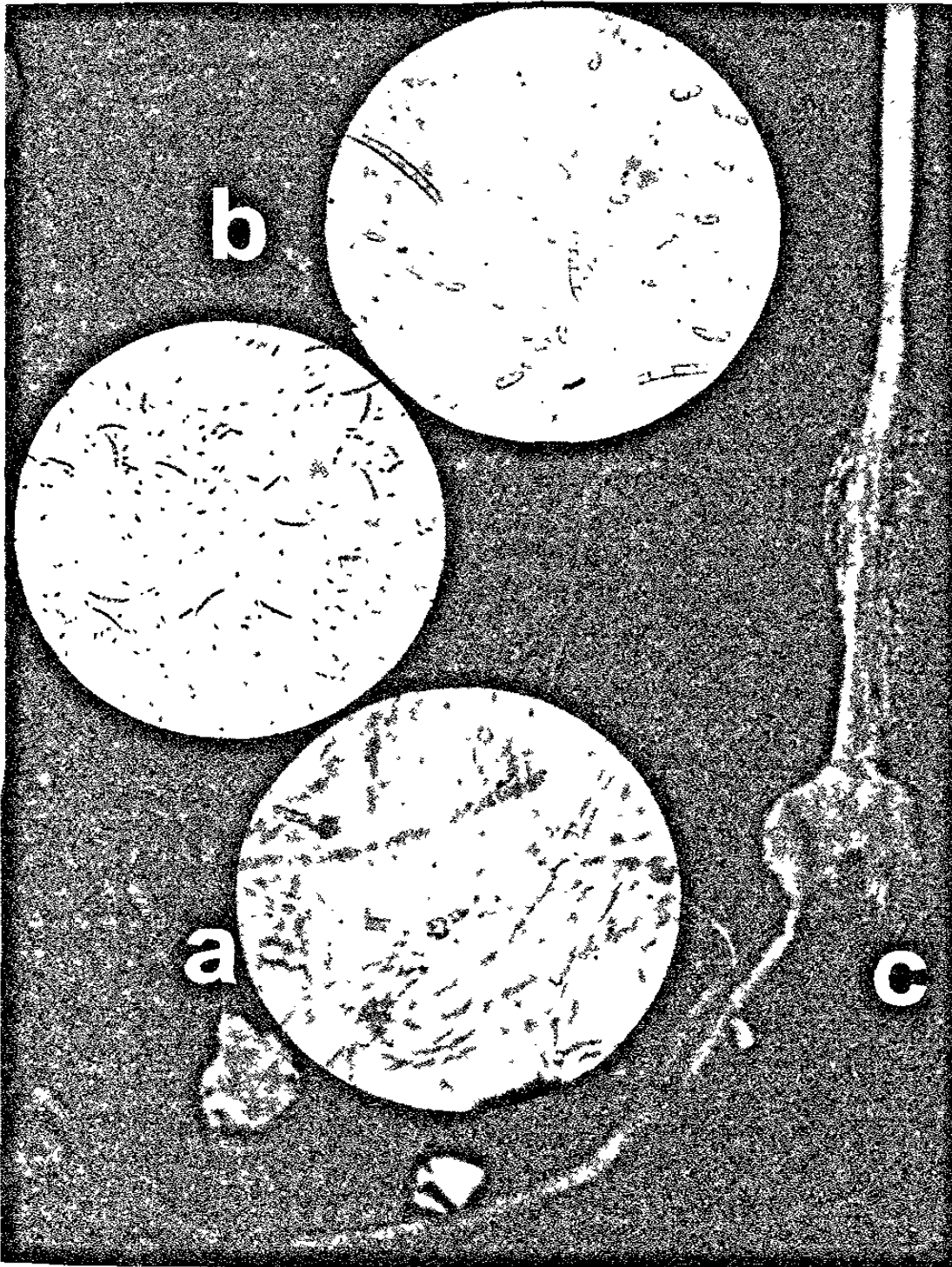
La colonia alcanzó 6.86 cm de diámetro en 7 días en MMN, color rojiza, creciendo adherida al medio de cultivo, al madurar con algunas hifas elevándose formando pequeños montículos, tiene micelio septado, delgado, hifas hialinas en KOH 5 %, macronidios en forma de canoa y microconidios globosos. Crecimiento promedio diario de 4.9 mm (ver fig. 3.5c).

### 3.2.4 Velocidad de crecimiento.

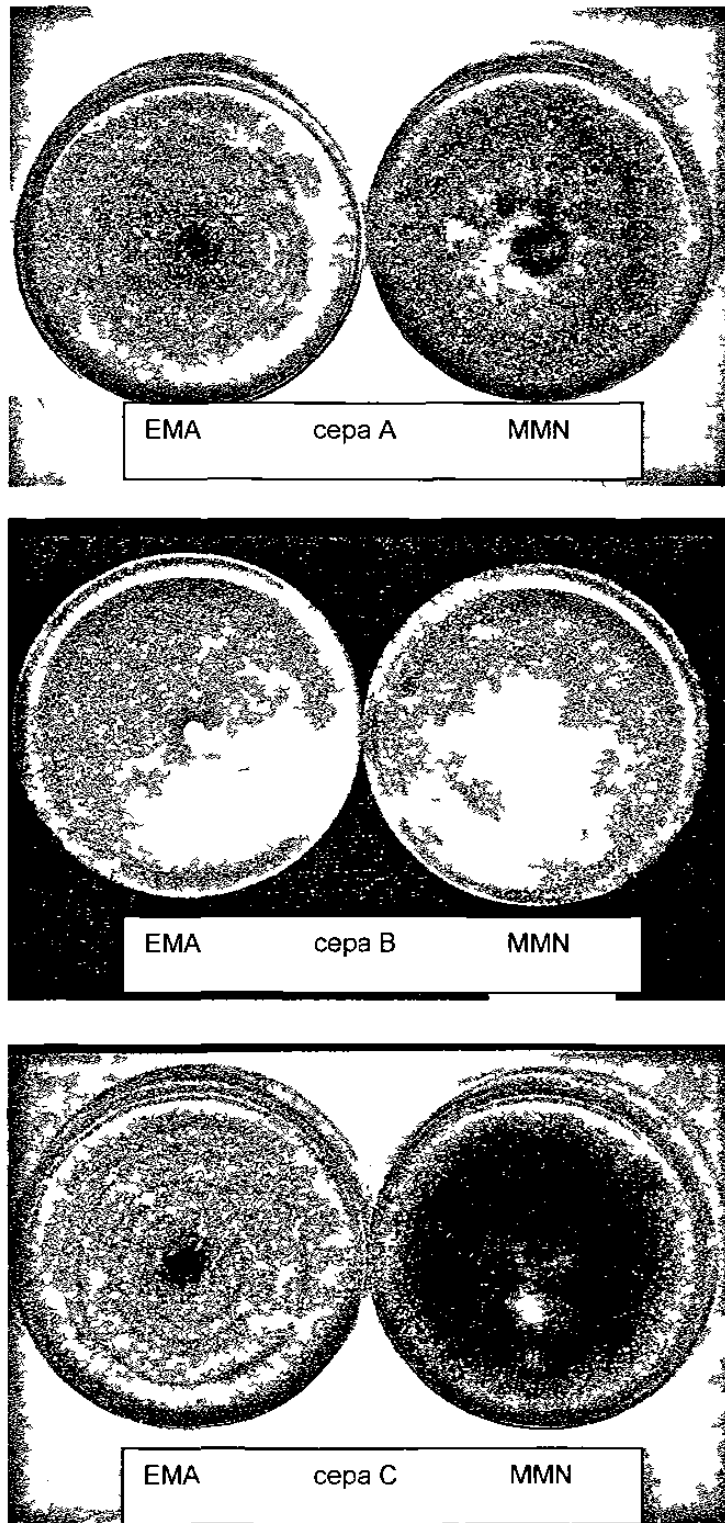
La velocidad de crecimiento de las cepas A, B y C de *Fusarium oxysporum* resultó ser de 4.6, 5.6 y 4.9 mm/día, respectivamente. Sin embargo, demostraron ser iguales estadísticamente al 95 % de confianza (ver gráfica 3.2, y apéndice 1.2).



Gráfica 3.2 Crecimiento de las cepas A, B y C de *F. oxysporum* en MMN.



**Figura 3.4** Principales características de *Fusarium oxysporum* Schlecht.  
a) clamidosporas intercalares, b) macroconidios lunados con septos transversales y microconidios globosos, c) *Pinus greggii* mostrando síntomas de "damping-off" en el laboratorio.



**Figura 3.5** Características macroscópicas de las cepas A, B y C de *Fusarium oxysporum* en medio de cultivo de Extracto de Malta Agar (EMA) y Melin Norkrans Modificado (MMN).

### **3.3 Pareados de cultivos (hongos ECM vs cepas del patógeno *in vitro*).**

El experimento se efectuó como se describe en la sección 2.8.1, observándose tres tipos de interacciones (sin sobrecrecimiento, con sobrecrecimiento e inhibición de crecimiento). Solamente *C. cibarius* mostró tener un efecto de disminución del crecimiento de las tres cepas de *F. oxysporum* estudiadas.

#### **3.3.1 *Lepista nuda* vs cepas del patógeno.**

*L. nuda* no disminuyó el crecimiento de las tres cepas probadas. En todos los casos se registró contacto entre las colonias, solamente se registró sobrecrecimiento en el pareado *L.n.* vs cepa C. No se formó zona de inhibición. El medio de cultivo mostró ligeros cambios de coloración solamente en la confrontación con la cepa C (ver figura 3.6 a, tabla 3.1).

#### **3.3.2 *Scleroderma verrucosum* vs cepas del patógeno.**

*S. verrucosum* no disminuyó el crecimiento de los patógenos. En todos los casos se registró contacto entre las colonias, sin sobrecrecimiento. En el área de contacto se observó lisis de hifas acompañada de un oscurecimiento del medio de cultivo. No se formó zona de inhibición (ver figura 3.6 b, tabla 3.1).

### 3.3.3 *Cantharellus cibarius* vs cepas del patógeno.

*C. cibarius* disminuyó el crecimiento de los tres patógenos probados. No se registró contacto entre las colonias, ya que *C. cibarius* produjo sustancias que se difundieron en el medio de cultivo, dichas sustancias inhibieron el crecimiento de los hongos patógenos, teniendo la zona de inhibición un promedio de 4.8, 5.6 y 6.7 mm de ancho para el patógeno A, B y C, respectivamente. En el área de contacto se observó lisis de hifas y algunas se observaron retorcidas. El medio de cultivo mostró cambios de coloración, de un amarillo claro a un color amarillo café (ver figura 3.6 c, tabla 3.1).

**Tabla 3.1**

**Tipos de interacciones en cultivo *in vitro*.**

TRATAMIENTOS	TIPO DE INTERACCIÓN	ÁREAS DE INTERACCIÓN
<b><i>L. nuda</i> vs</b>		
Cepa A	Sin sobrecrecimiento de A sobre Ln	Hifas en contacto, sin características distintivas
Cepa B	Sin sobrecrecimiento de B sobre Ln	Hifas en contacto, sin características distintivas
Cepa C	Con sobrecrecimiento de C sobre Ln	Hifas en contacto, sin características distintivas
<b><i>S. verrucosum</i> vs</b>		
Cepa A	Sin sobrecrecimiento de A sobre Sv	Hifas de contacto con lisis, área oscurecida.
Cepa B	Sin sobrecrecimiento de A sobre Sv	Hifas de contacto con lisis, área oscurecida
Cepa C	Sin sobrecrecimiento de C sobre Sv	Hifas de contacto con lisis, área oscurecida
<b><i>C. cibarius</i> vs</b>		
Cepa A	Inhibición de crecimiento de A por Cc	No hubo contacto entre hifas, se observó lisis de hifas y algunas retorcidas. área de inhibición
Cepa B	Inhibición de crecimiento de B por Cc	No hubo contacto entre hifas, se observó lisis de hifas y algunas retorcidas. área de inhibición
Cepa C	Inhibición de crecimiento de C por Cc	No hubo contacto entre hifas, se observó lisis de hifas y algunas retorcidas. Área de inhibición

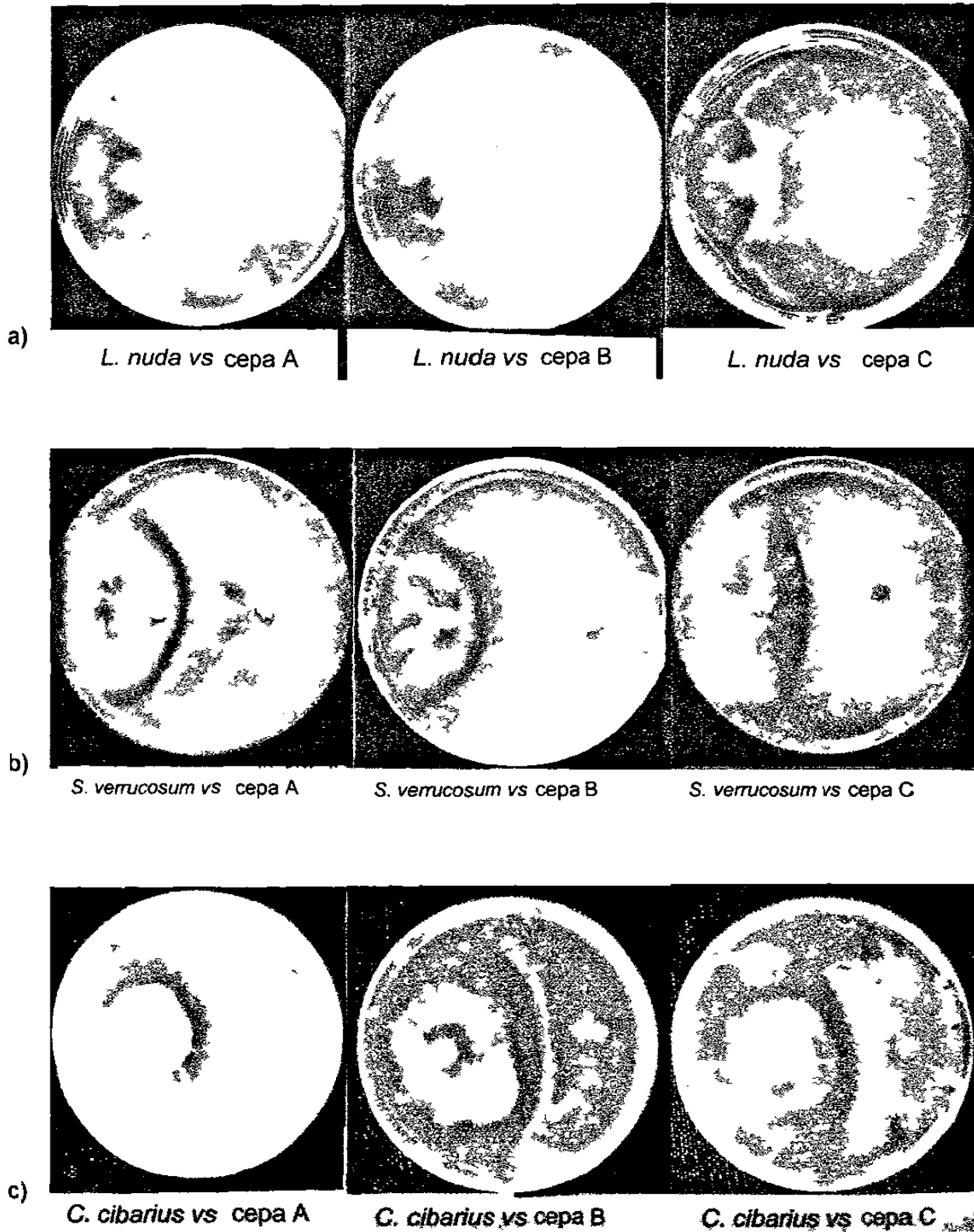


Figura 3.6 Pareados de cultivos en medio MMN. a) *Lepista nuda* vs cepas A, B y C de *F. oxysporum*, b) *Scleroderma verrucosum* vs cepas A, B y C de *F. oxysporum*, c) *Cantharellus cibarius* vs cepas A, B y C de *F. oxysporum*.

### 3.4 Efecto de metabolitos producidos por los hongos ectomicorrícicos en el control del crecimiento del patógeno.

#### 3.4.1 Metabolitos difusibles en medio sólido a través de membranas de diálisis.

El experimento se realizó como se indica en la sección 2.8.2.1, encontrándose que dependiendo de las combinaciones fúngicas, se obtuvo una disminución en mayor o menor grado del crecimiento de las cepas del patógeno probado (ver tablas 3.2 y 3.3; y gráfica 3.3).

**Tabla 3.2**

**Porcentaje de disminución de crecimiento en las combinaciones fúngicas.**

Tratamientos	Reducción de Crecimiento (%)		
	<i>Fusarium oxysporum</i>		
	<sup>2</sup> cepa A	<sup>2</sup> cepa B	<sup>2</sup> cepa C
<i>L. nuda</i> <sup>1</sup>	3.6	4.6	4.4
<i>S verrucosum</i> <sup>1</sup>	46.9	5.3	31.5
<i>C. cibarius</i> <sup>1</sup>	34.4	39.1	65.3
Testigo	0	0	0

<sup>1</sup>.- Hongo cultivado sobre la membrana de diálisis.

<sup>2</sup>.- Hongo cultivado sobre el agar después de la eliminación de la membrana de diálisis

**Tabla 3.3**

**Medias de crecimiento en las combinaciones fúngicas establecidas.**

Tratamientos	Crecimiento radial (mm)		
	<i>Fusarium oxysporum</i>		
	<sup>2</sup> cepa A	<sup>2</sup> cepa B	<sup>2</sup> cepa C
<i>L. nuda</i> <sup>1</sup>	30.4a	39.09 a	29.46 a
<i>S verrucosum</i> <sup>1</sup>	17.3 b	23.89 b	21.13 b
<i>C. cibarius</i> <sup>1</sup>	4.94 b	23.98 b	10.71b
Testigo	32.2 a	40.04 a	30.83 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>.- Hongo cultivado sobre la membrana de diálisis.

<sup>2</sup>.- Hongo cultivado sobre el agar después de la eliminación de la membrana de diálisis

Las medias acotadas con letras comunes no son significativamente diferentes (  $P \leq 0.5$  ).



### 3.4.1.1 *Lepista nuda* vs cepas patógenas.

*L. nuda* mostró una pequeña disminución del crecimiento en los cepas patógenas confrontadas (A, B y C), un 3.6, 4.6 y 4.4 %, respectivamente (figura 3.7; gráfica 3.4a).

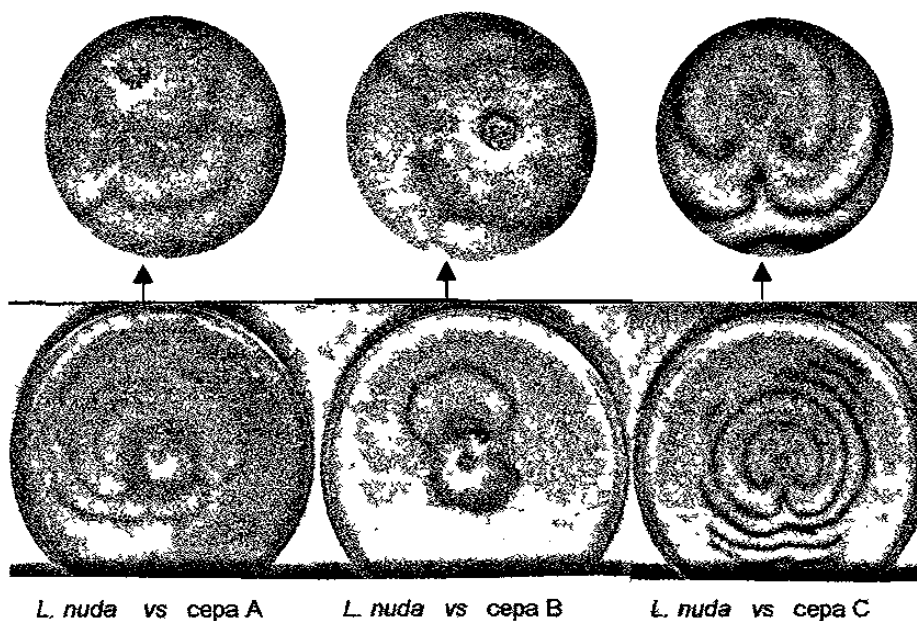
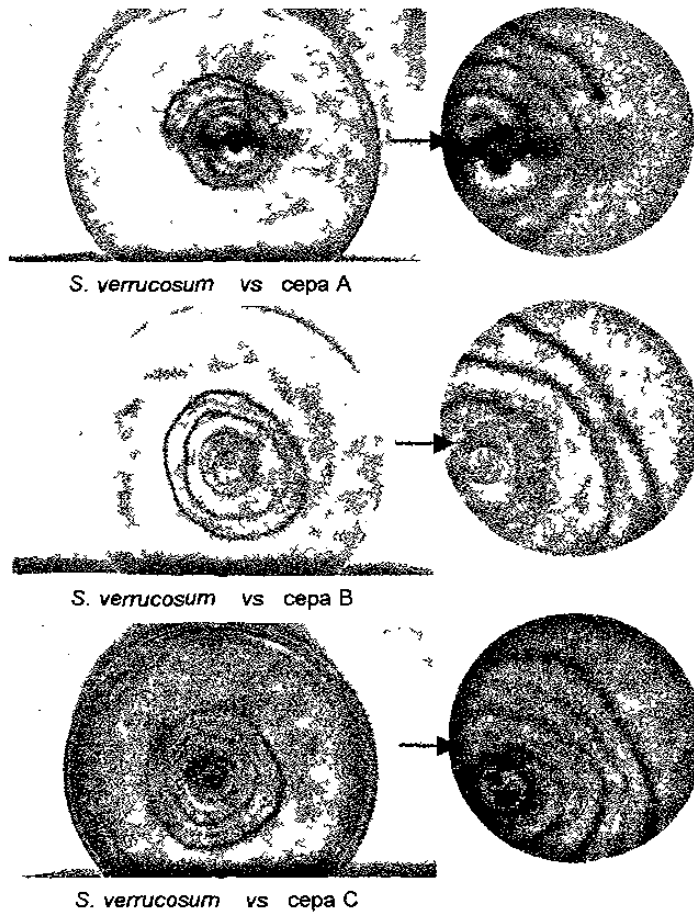


Figura 3.7 Metabolitos difusibles a través de membrana de diálisis *Lepista nuda* vs cepa A, B y C de *Fusarium oxysporum*.

### 3.4.1.2 *Scleroderma verrucosum* vs cepas patógenas.

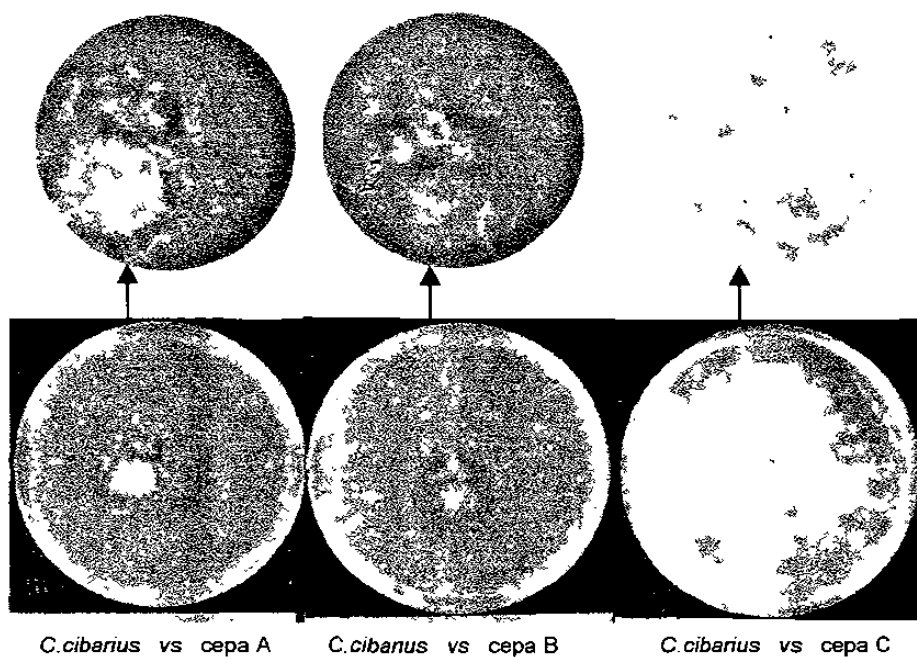
*S. verrucosum* mostró una pequeña disminución del crecimiento de la cepa B en un 5.3 %; en tanto que las cepas A y C fueron reducidos en un 46.9 y un 31.5 %, respectivamente. (figura 3.8; gráfica 3.4b).



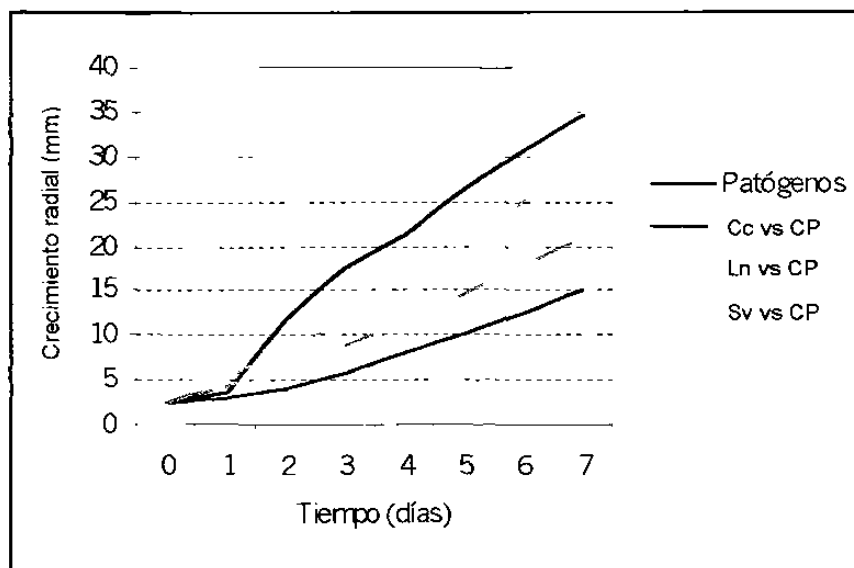
**Figura 3.8** Metabolitos difusibles a través de membrana de diálisis *S. verrucosum* vs cepa A, B y C de *Fusarium oxysporum*.

### 3.4.1.3 *Cantharellus cibarius* vs cepas patógenas.

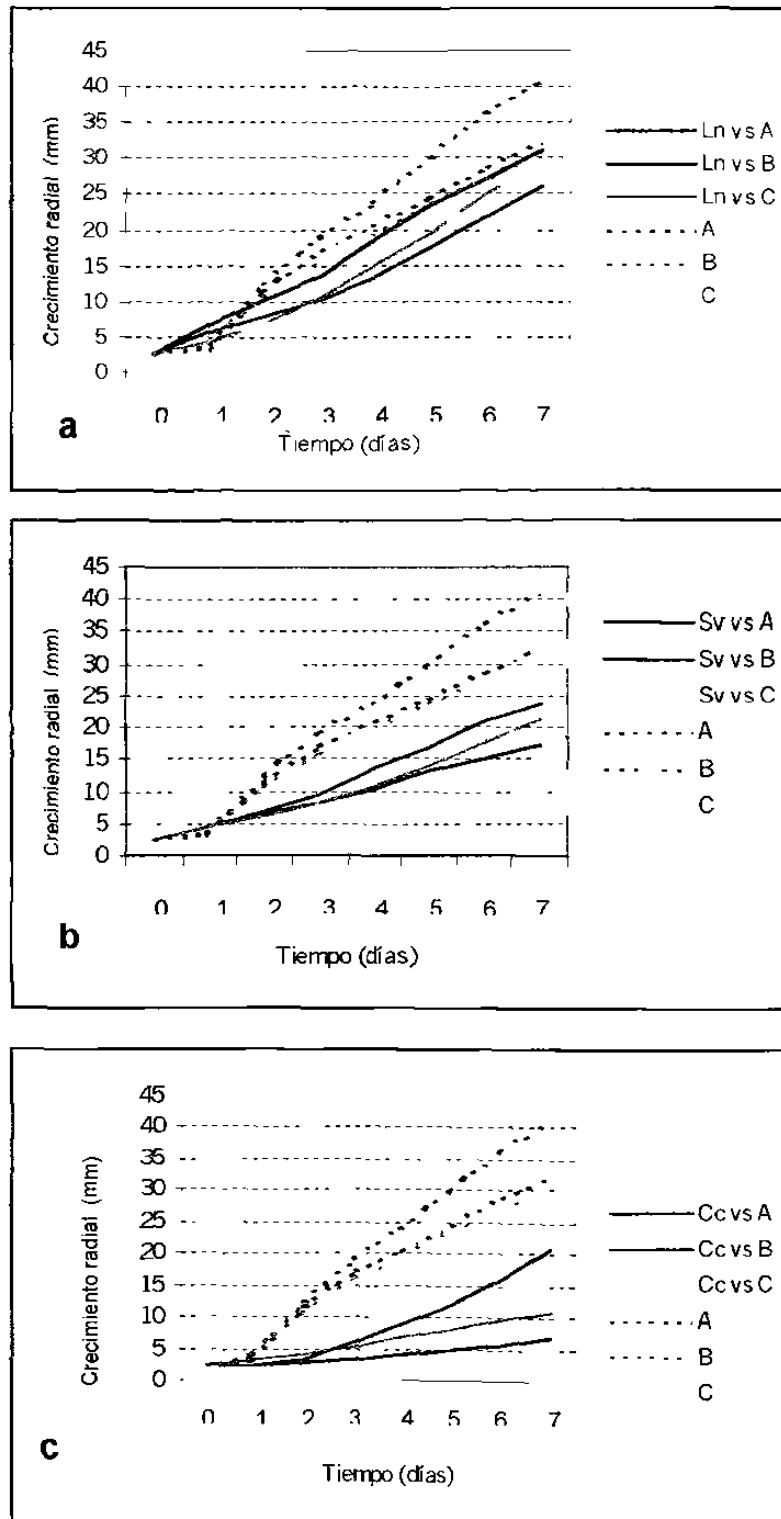
*C. cibarius* mostró una marcada disminución del crecimiento de todos los patógenos, aun cuando estos últimos muestran un crecimiento muy rápido. La cepa A redujo su crecimiento en un 34.4 %, la cepa B presentó una disminución de 39.1 %; en tanto que la cepa C, fue reducido en un 65.3 %. (figura 3.9; gráfica 3.4c).



**Figura 3.9** Metabolitos difusibles a través de membrana de diálisis *C. cibarius* vs cepa A, B y C de *Fusarium oxysporum*.



**Gráfica 3.3** Efecto de los metabolitos producidos por los hongos ectomicorrícicos en el crecimiento de *Fusarium oxysporum* *in vitro*. Cc= *Cantharellus cibarius*; Ln=*Lepista nuda*; Sv=*Scleroderma verrucosum*; y CP= cepas patógenas (promedios)



**Gráfica 3.4** Efecto de los metabolitos producidos por los hongos ectomicorrícicos en el crecimiento de *Fusarium oxysporum in vitro*.  
 a) *Lepista nuda* vs cepas patógenas, b) *Sclerotium verrucosum* vs cepas patógenas, c) *Cantharellus cibarius* vs cepas patógenas.

### **3.4.2 Producción de metabolitos de los hongos ectomicorrícicos difusibles en medio líquido.**

El experimento se llevó a cabo como se especifica en la sección 2.8.2.2, observándose que los hongos patógenos al ser cultivados en filtrados de cultivos de hongos ectomicorrícicos aumentaron en diferente proporción su crecimiento (biomasa), resultando diferentes del testigo, aunque no entre sí (ver tabla 3.4, gráfica 3.5); se registraron también ligeras variaciones del pH del medio de cultivo al final del experimento en algunas combinaciones fúngicas, los filtrados de *L. nuda* mostraron ser diferentes del resto (ver tabla 3.5, gráfica 3.6).

#### **3.4.2.1 Filtrados de cultivo de *Lepista nuda* vs cepas del patógeno**

*L. nuda* mostró tener un efecto positivo (*i.e.* sinérgico) en el control del crecimiento de las cepas del patógeno probado (ver tabla 3.4).

La cepa A registró un peso seco promedio de 0.2414 gr; la cepa B registró un peso seco promedio de 0.2369 gr; en tanto que la cepa C registró un peso seco promedio de 0.2421 gr, comparados con el testigo que reportó un promedio de 0.0462 gr, esto representa un 523.46, 512.21 y 521.95 % de aumento del crecimiento, respectivamente (ver tabla 3.4).

Respecto de los cambios de pH en el medio, se pudo observar que fue en estas combinaciones donde se mostró una reducción mayor respecto del resto de las confrontaciones, siendo el valor de 6.33 el registrado para la combinación *Ln vs C*, seguido por 6.36 de *Ln vs A*, y finalmente, 6.38 en *Ln vs B* (ver tabla 3.5).

### **3.4.2.2 Filtrados de cultivo de *Scleroderma verrucosum* vs cepas del patógeno**

*S. verrucosum* registró un efecto positivo (*i.e.* sinérgico) en el control del crecimiento de las cepas patógenas probadas (ver tabla 3.4).

La cepa A registró un peso seco promedio de .2331 gr; la cepa B registró un peso seco promedio de 0.2349 gr; en tanto que la cepa C registró un peso seco promedio de 0.2463 gr, comparados con el testigo que reportó un promedio de 0.0322 gr, esto representa un 722.79, 728.37 y 763.72 % de aumento del crecimiento, respectivamente (ver tabla 3.4)

En relación a los cambios de pH del medio se registró un valor promedio de 6.40 para Sv vs A , este mismo valor se registró para Sv vs B, y un valor muy cercano de 6.44 para Sv vs C (ver tabla 3.5).

### **3.4.2.3 Filtrados de cultivo de *Cantharellus cibarius* vs cepas del patógeno**

*C. cibarius* también resultó en un efecto positivo (*i.e.* sinérgico) sobre el crecimiento de algunos de los patógenos probados (ver tabla 3.4).

La cepa A registró un peso seco promedio de 0.2873 gr; la cepa B registró un peso seco promedio de 0.2869 gr; en tanto que la cepa C registró un peso seco promedio de 0.2069 gr, comparados con el testigo que reportó un promedio de 0.0365 gr, esto representa un 787.12, 786.02 y 566.85 % de aumento del crecimiento, respectivamente (ver tabla 3.4).

Los cambios de pH del medio observados registraron valores promedio que variaron en unas centésimas, para Cc vs A fue de 6.50, en tanto que para Cc vs B y Cc vs C fue de 6.46 y 6.43, respectivamente (ver tabla 3.5).

Tabla 3.4

**Biomasa de *Fusarium oxysporum* (cepas A, B y C) creciendo en filtrados de cultivos de los hongos ectomicorrícicos**

Tratamientos	Biomasa					
	<i>Fusarium oxysporum</i>					
	<sup>2</sup> cepa A		<sup>2</sup> cepa B		<sup>2</sup> cepa C	
	(gr)	%	(gr)	%	(gr)	%
<i>L. nuda</i> <sup>1</sup>	.2414 a	523.46	.2369 a	512.21	.2421 a	521.9
<i>S verrucosum</i> <sup>1</sup>	.2331 a	722.79	.2349 a	728.37	.2463 a	763.7
<i>C. cibarius</i> <sup>1</sup>	.2873 a	787.12	.2869 a	786.02	.2069 a	566.8
Testigo	.0365 b	100.00	.0322 b	100.00	.0462 b	100.0

<sup>1</sup>.- Hongo cultivado en primer lugar por 30 días

<sup>2</sup>.- Hongo cultivado después en el filtrado del cultivo del HEM

Las medias acotadas con letras comunes no son significativamente diferentes ( $P \leq .05$ ).

Tabla 3.5

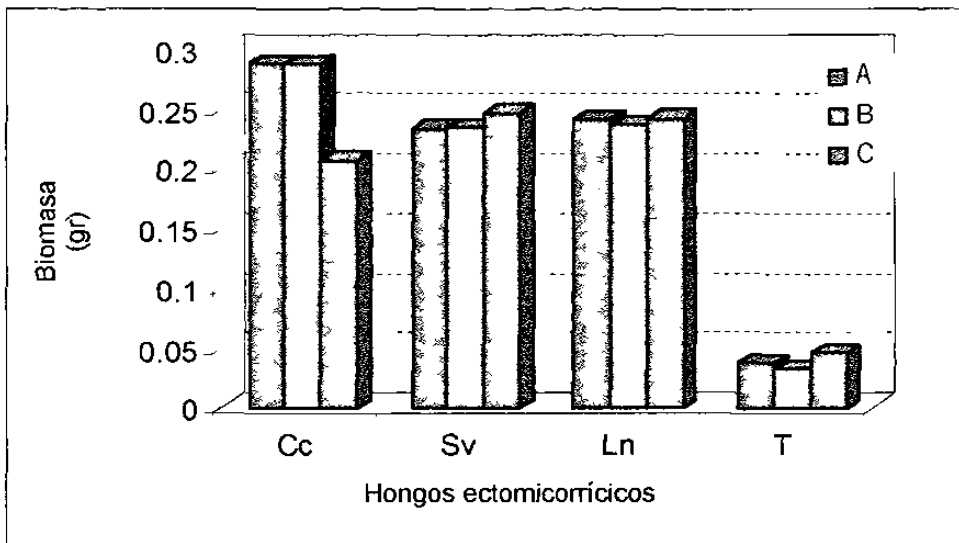
**Cambios de pH del medio al final del crecimiento de *F.oxysporum* (cepas A, B y C)**

Tratamientos	pH					
	<i>Fusarium oxysporum</i>					
	<sup>2</sup> cepa A		<sup>2</sup> cepa B		<sup>2</sup> cepa C	
	valor	% cambio	valor	% cambio	Valor	% cambio
<i>L. nuda</i> <sup>1</sup>	6.36 a	9.14	6.38 a	8.86	6.33 a	9.57
<i>S verrucosum</i> <sup>1</sup>	6.40 b	8.57	6.40 b	8.57	6.44 b	8.00
<i>C. cibarius</i> <sup>1</sup>	6.50 b	7.14	6.46 b	7.71	6.43 b	8.14
Testigo	6.65 b	4.96	6.45 b	8.36	6.512 b	6.96

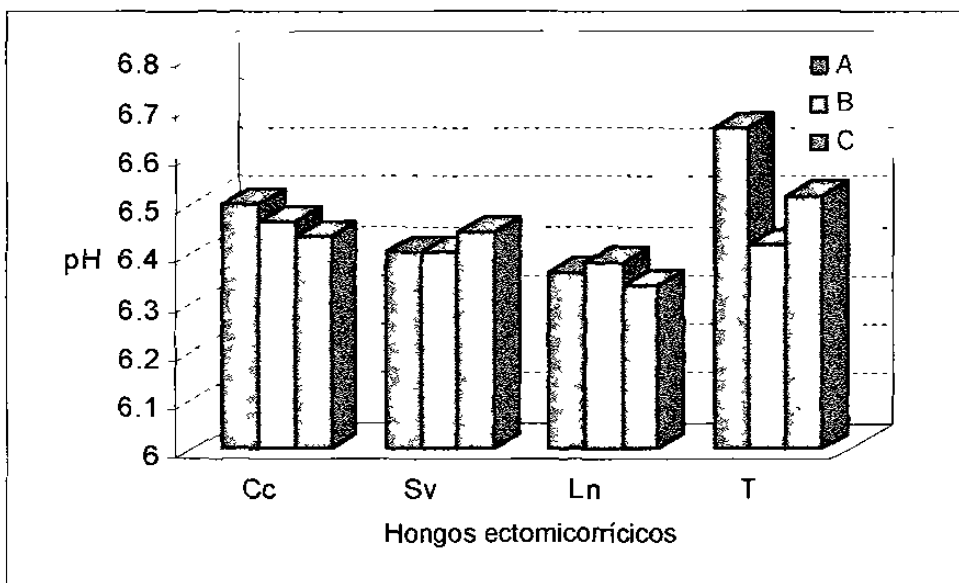
<sup>1</sup>.- Hongo cultivado en primer lugar por 30 días

<sup>2</sup>.- Hongo cultivado después en el filtrado del cultivo del HEM

Las medias acotadas con letras comunes no son significativamente diferentes ( $P \leq .05$ ).



Gráfica 3.5 Biomasa de *F. oxysporum* (cepas A, B y C) en filtrados de cultivos de *C. cibarius* (Cc), *S. verrucosum* (Sv), *L. nuda* (Ln) y Testigo (T)

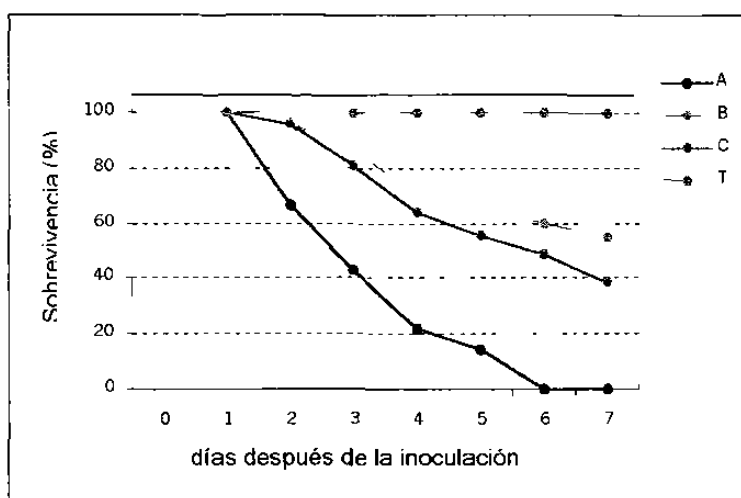


Gráfica 3.6 pH del medio de cultivo después del crecimiento de *F. oxysporum* (cepas A, B y C) en filtrados de cultivos de *C. cibarius* (Cc), *S. verrucosum* (Sv), *L. nuda* (Ln) y Testigo (T)



### 3.5 Patogenicidad de las cepas de *Fusarium oxysporum*.

La cepa A de *F. oxysporum* resultó ser la más patogénica, seguida por la C y finalmente por la B. Teniendo porcentajes de mortalidad a la semana de 100, 61.1 y 45.8 %, respectivamente, en comparación al 0 % del testigo. (ver gráfica 3.7). Las tres cepas resultaron ser estadísticamente diferentes del testigo y entre sí (ver tabla 3.6; apéndice 1.7).



Gráfica 3.7 Sobrevivencia de plántulas de *Pinus greggii* con 3 cepas de *Fusarium oxysporum*. Las letras A, B y C corresponden a las diferentes cepas probadas, T es el testigo sin inóculo fúngico.

Tabla 3.6

Mortalidad de *Pinus greggii* con tres cepas de *Fusarium oxysporum* *in vitro*

repetición	Cepas de <i>Fusarium oxysporum</i>			Testigo
	A	B	C	
1	100	45.8	62.5	0
2	100	41.7	53.7	0
3	100	50.0	66.7	0
<b>Promedio</b>	<b>100 a</b>	<b>45.8 b</b>	<b>61.1 c</b>	<b>0 d</b>

Las medias acotadas con letras comunes no son significativamente diferentes ( $P < 0.01$ )

### 3.6 Plántulas preinoculadas con hongos ECM vs cepa A de *Fusarium oxysporum*.

La síntesis de ectomicorrizas *in vitro* solamente se obtuvo con *Cantharellus cibarius*, ya que *Scleroderma verrucosum* mostró un comportamiento patogénico en la primer semana de desarrollo (ver figura 3.10), por lo cual el experimento con *F. oxysporum* cepa A se aplicó solamente a plántulas inoculadas con *C. cibarius*.

El experimento se realizó como se describe en la sección 2.10, observándose diferencias significativas tanto entre los tratamientos con diferentes concentraciones de inóculo de *F.oxysporum* ( $P= 0.0116$ ) como entre los tratamientos con/sin *C.cibarius* ( $P=0.0045$ ) (apéndice 1.8).

Los porcentajes de mortalidad registrados fueron menores en todos los tratamientos con *C. cibarius* (Cc) comparados a sus respectivos sin inóculo ectomicorrícico (0), respecto de la concentración de inóculo de *F. oxysporum* cepa A, se observó que los porcentajes de mortalidad registrados en ambos bloques, la concentración  $10^3$  resultó diferente del testigo y de las concentraciones  $10^5$  y  $10^4$  (ver tabla 3.7; gráfica 3.8).

Al comparar la mortalidad registrada en el bloque tratado con Cc con el no inoculado, se observó una disminución incluso en las concentraciones menores de *F. oxysporum* (e.g.  $0/10^3= 42.9 \%$ ,  $0/10^4= 50 \%$ ), con las concentraciones mayores combinadas con *C.cibarius* (e.g.  $Cc/10^5= 33.3 \%$ ,  $Cc/10^4=35.3 \%$ ) (ver tabla 3.7; gráfica 3.9).

Los síntomas de la enfermedad se presentaron en el tercer y cuarto día después de la inoculación, siendo más agresiva en el bloque no

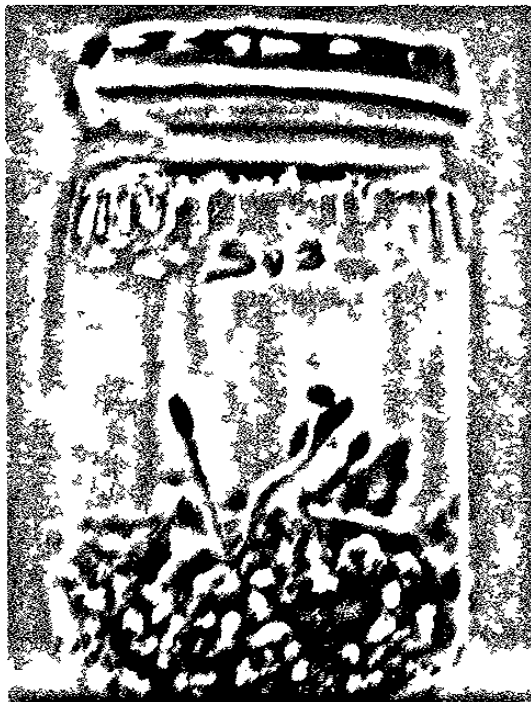
inoculado con *C. cibarius* (ver gráfica 3.10 b y c); esto se observa más claramente en las concentraciones  $10^4$ ,  $10^3$  y 0; en la concentración  $10^5$  se observó un comportamiento similar pero hasta el sexto día y séptimo día (ver gráfica 3.10 d y e).

**Tabla 3.7**

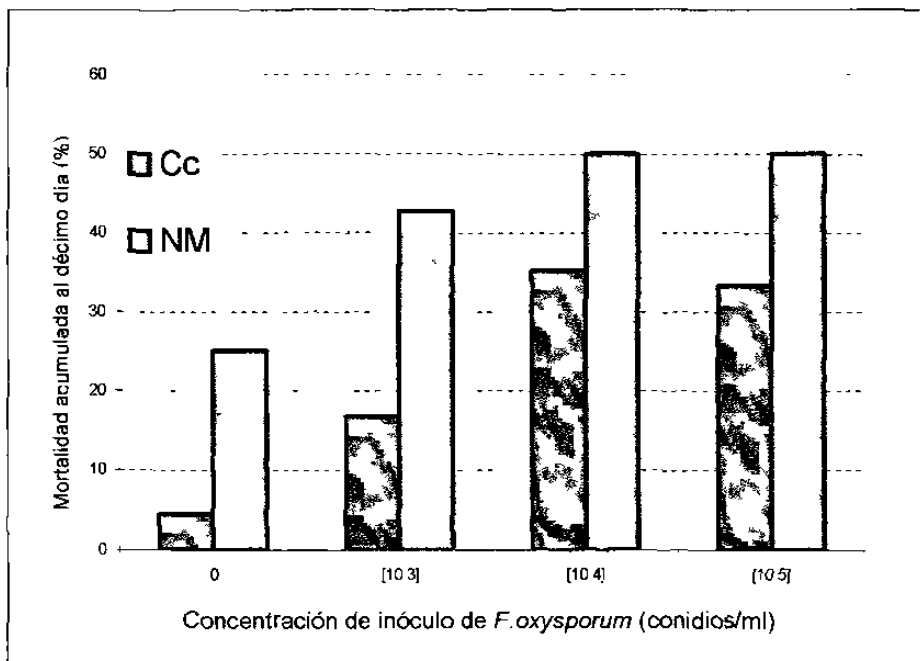
**Porcentaje de mortalidad en plántulas con y sin *C.cibarius* (Cc y NM) y diferente cantidad de inóculo de *F.oxysporum***

Bloque	Inóculo de <i>F.oxysporum</i> (conidios/ml)			
	$10^5$	$10^4$	$10^3$	0
Cc	33.33 <sub>a</sub>	35.29 <sub>a</sub>	16.70 <sub>b</sub>	4.44 <sub>c</sub>
NM	50.00 <sub>a1</sub>	50.00 <sub>a1</sub>	42.90 <sub>b1</sub>	25.00 <sub>c1</sub>

Las medias acotadas con letras comunes no son significativamente diferentes ( $P < .01$ )

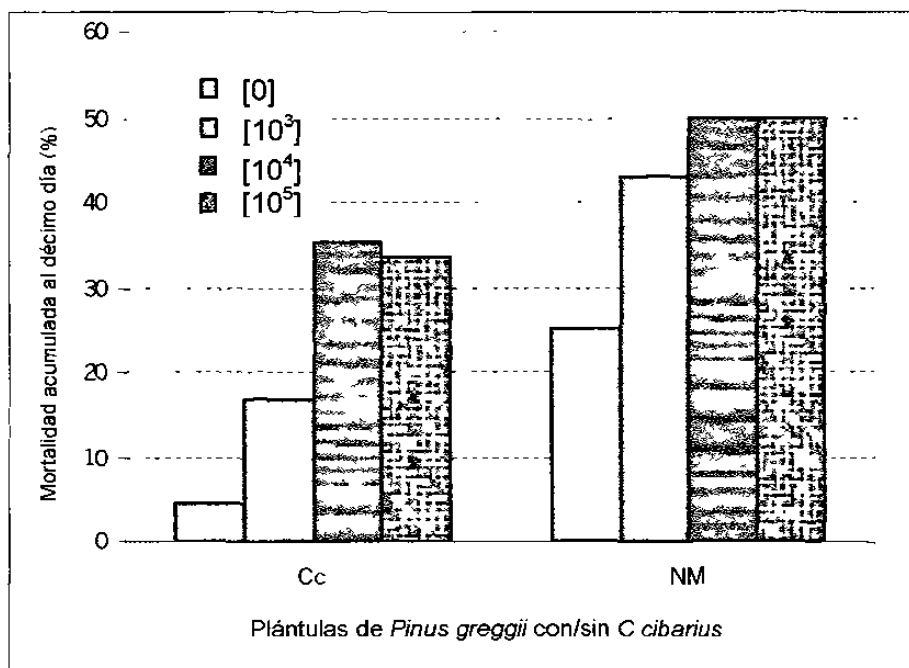


**Figura 3.10 Comportamiento patogénico de *S. verrucosum* en plántulas de *P. greggii*.**



Gráfica 3.8 Mortalidad de plántulas de *P. greggii* por diferentes concentraciones de inóculo de *F. oxysporum*.

Cc= Inoculadas con *C. cibarius*, NM= No inoculadas con Cc.



Gráfica 3.9 Mortalidad de plántulas de *P. greggii* con *C. cibarius* (Cc) y sin inóculo ectomicorrícico (NM).

$[10^x]$ = Diferentes concentraciones de *F. oxysporum*.

Al medir las plántulas sobrevivientes, se pudo observar que en la altura, se registraron valores desde 78.1 mm en Cc/[10<sup>3</sup>] hasta 63.5 mm en NM/[10<sup>4</sup>], y en la longitud de la raíz, los valores fueron desde 29.25 mm en NM/0 hasta 16.5 mm en Cc/[10<sup>5</sup>]; aunque en ningún caso se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos (ver tabla 3.8; apéndice 1.9 y 1.10). El crecimiento radicular se mostró muy bajo en todos los tratamientos (ver figura 3.11).

**Tabla 3.8**

**Longitud de raíz y altura de plántulas de *P. greggii* con y sin inóculo de *C. cibarius* (Cc y NM) y diferente cantidad de inóculo de *F. oxysporum***

Tratamiento	raíz (mm)				Altura (mm)				
	Conidios/ml	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	0	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	0
Cc		16.5	18.36	24.4	22.44	70.9	78	78.1	76.27
NM		15.3	28.38	26.25	29.25	67.83	63.5	75.75	73.19

\* Medias diferentes estadísticamente con P<.01

Los cortes de raíces de las plántulas inoculadas con *Cantharellus cibarius* mostraron en la mayoría de los casos solamente el crecimiento de hifas de *C. cibarius* en la superficie, sin que hubiera penetración, incluso algunas no mostraron crecimiento superficial (ver figura 3.12 c); por otro lado, las no inoculadas con *C. cibarius*, presentaron una digestión parcial o completa de los tejidos vasculares característica del “damping-off” por *F. oxysporum* (ver figura 3.12 a y b).

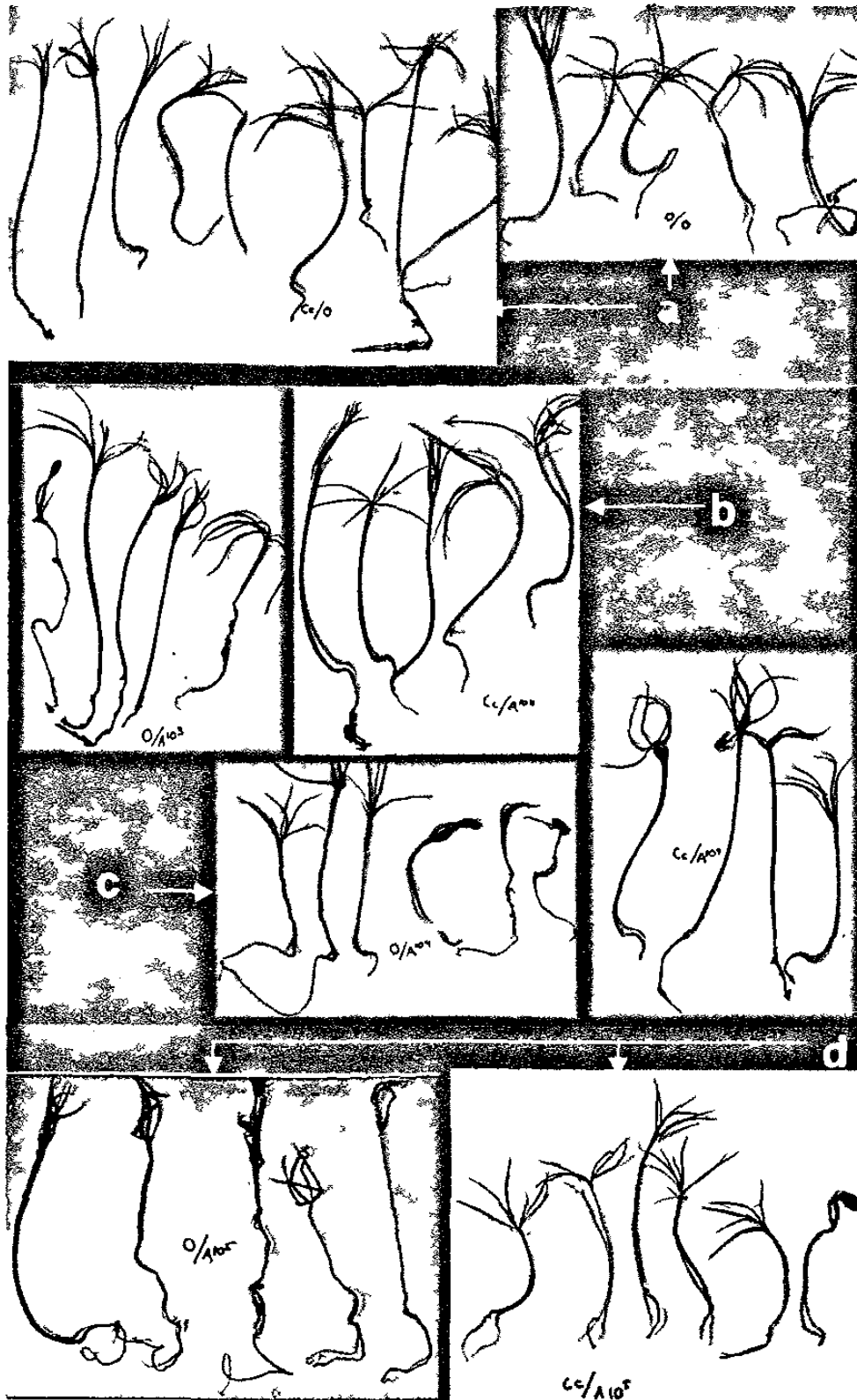
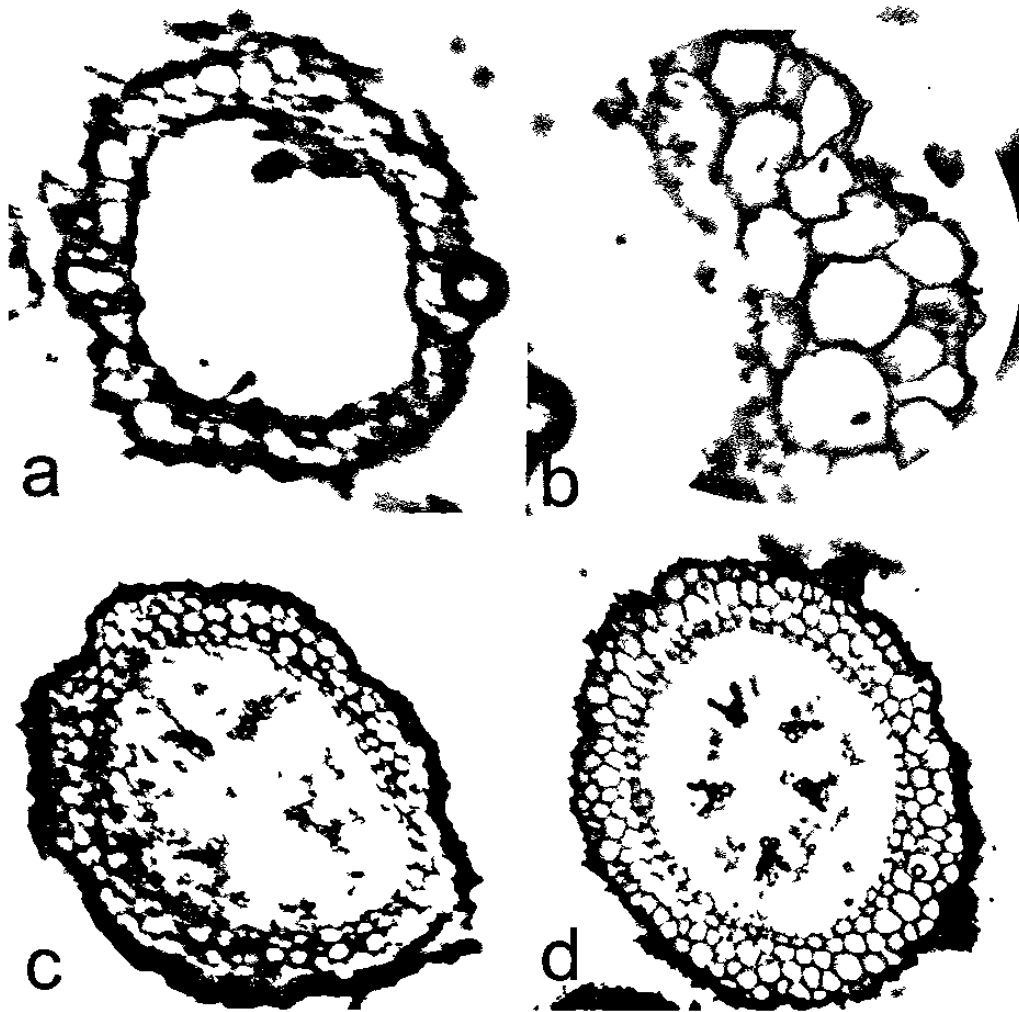
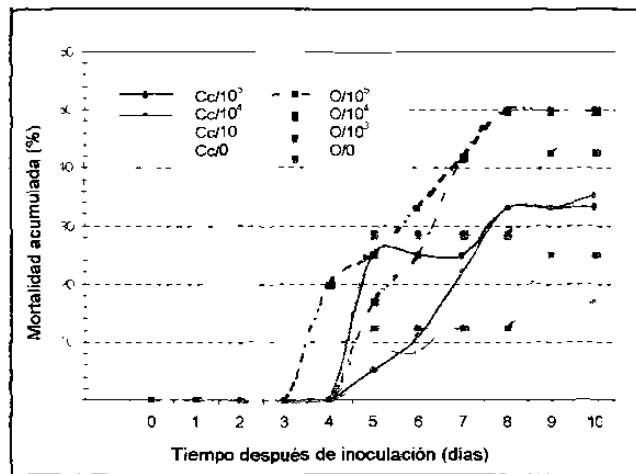


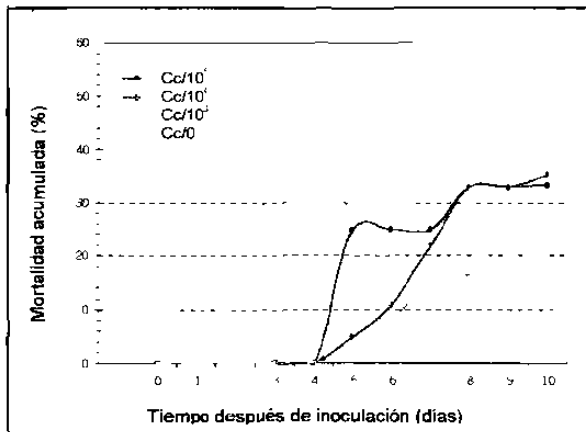
Figura 3.11 Plántulas de *P. greggii*. Cc = Inoculación de *C. cibarius*;  $A^{10^x}$  = Cantidad de inóculo de *F. oxysporum* (conidias/ml). a) [0]; b) [ $10^3$ ]; c) [ $10^4$ ] y d) [ $10^5$ ]



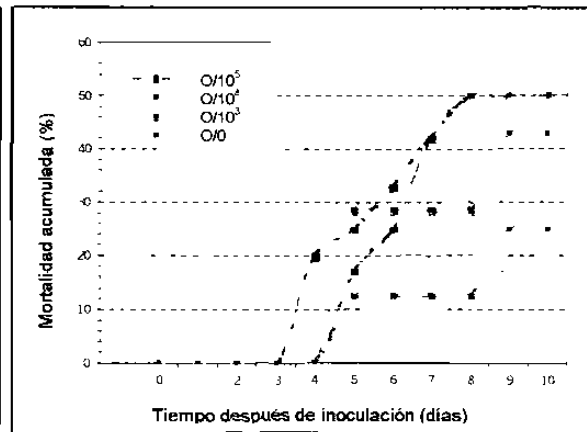
**Figura 3.12** Cortes transversales de raíces de plántulas de *P. greggii* a y b) con cepa A de *F. oxysporum* y sin *C. cibarius*, c) con cepa A de *F. oxysporum* y con *C. cibarius* y d) testigo.



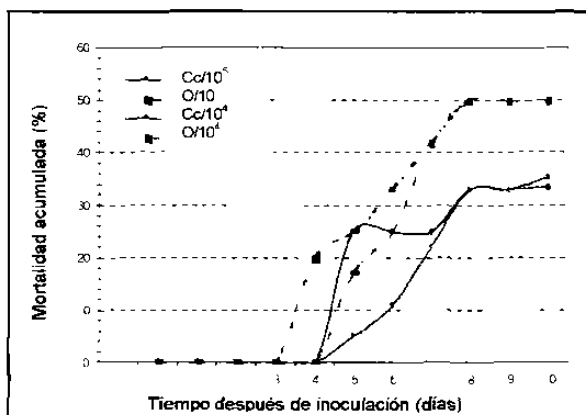
a) Todos los tratamientos



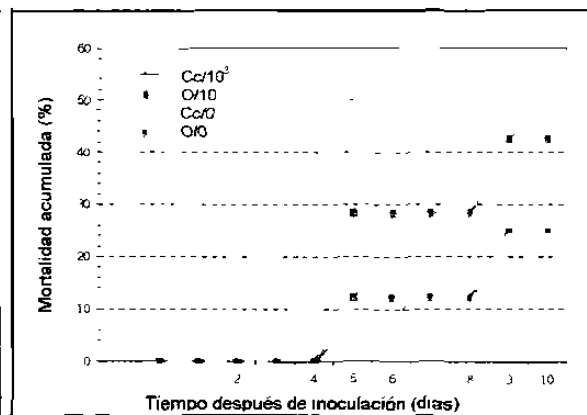
b) *C. cibarius* con diferentes concentraciones de *F. oxysporum*



c) Control de diferentes concentraciones de *F. oxysporum*



d) *C. cibarius* y control. [10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>] de *F. oxysporum*



e) *C. cibarius* y control. [10<sup>3</sup>, 0] de *F. oxysporum*

Gráfica 3.10 Mortalidad acumulada de plántulas de *Pinus greggii* por *Fusarium oxysporum* cepa A. Cc = *C. cibarius*; 0 = Sin inóculo micorrízico; 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup> y 0 = Concentraciones de conidios de *F. oxysporum*



## CAPÍTULO 4

### Discusión.

Se debe señalar que los hongos ectomicorrícicos difieren marcadamente en sus efectos sobre sus hospederos; su diversidad fisiológica influye la cantidad de desarrollo micorrícico y la respuesta de crecimiento de los hospederos (Trappe, 1962; Harley & Smith, 1983). Del mismo modo varían en la magnitud y naturaleza de su influencia protectora y en su efectividad contra diversos patógenos (Sarjala, 1990). Por lo que las diferencias respecto a la adaptabilidad de un hongo micorrícico a su hospedero y a un sitio en particular (Trappe, 1977), su capacidad de control de patógenos (Sarjala, 1990), así como la facilidad de aislamiento, crecimiento en cultivo puro, efectividad como inóculo micelial, rango de hospederos (Molina & Trappe, 1984), su sobrevivencia y competitividad en campo (McAfee & Fortin, 1986) deben de considerarse durante la selección de hongos micorrícicos para inoculaciones artificiales de semillas o plántulas.

Los hongos micorrícicos crecen lentamente, en comparación a los que presentan un hábito de crecimiento distinto; sin embargo, el crecimiento entre ellos mismos es diferente, como lo pudimos observar en la velocidad de crecimiento de los hongos seleccionados; Melin (1930) señala la intensidad de crecimiento de los hongos ectomicorrícicos en una escala de tres grados: débil, moderada y buena. Así, los hongos utilizados en este trabajo: *Cantharellus cibarius* se ubica en la categoría débil, *Lepista nuda* como moderada y *Scleroderma verrucosum* como buena (gráfica 3.1).

Por otro lado, han sido reportados con actividad antibiótica: *C. cibarius*, antibacterial (Marx, 1973) y antifúngica (Garza, 1991); *L. nuda*, antibacterial y antifúngica y *Scleroderma* spp, antifúngica (Marx, 1973); sin embargo en este estudio, solamente *C. cibarius* corroboró tal información.

Las tres cepas patógenas aisladas correspondieron a la especie *Fusarium oxysporum*. Las especies del género *Fusarium* son registradas por Landis, (1989) como las causantes de "damping-off" en viveros productores de coníferas en contenedores en Estados Unidos y Canadá; y por Fookhon, (1996) junto con *Pythium* spp. en Sarawak. Por otro lado, *F. oxysporum* es reportada como la especie más abundante en viveros de *Pinus radiata* con problemas de "damping-off" en Chile (Butin & Peredo, 1986), causando pudrición de raíz, achaparramiento y muerte de *Pseudotsuga menziesii* en viveros forestales (Stack & Sinclair, 1975; Graham & Linderman, 1983); en *Pinus* spp. ( Duchesne *et al.*, 1989b); además fue registrada como la más patogénica de 6 especies de *Fusarium* en plántulas de *Pseudotsuga menziesii* (Axelrood *et al.*, 1995).

Los síntomas de necrosis observados en las raíces y base del tallo de las plántulas muertas en el laboratorio, son al parecer el resultado de la producción de etileno (Swart & Kamerbeek, 1976), la secreción de toxinas características de las especies de *Fusarium* y de su capacidad para descomponer celulosa (Butin & Peredo, 1986).

La interacción de microorganismos es una consecuencia de su crecimiento y desarrollo en el ambiente. Estas interacciones pueden ser benéficas o perjudiciales; en el primer caso, el aumento del inóculo potencial

o biomasa para ayudar a un microorganismo a dominar un sustrato en particular, por otro lado, en el segundo caso, el microorganismo fracasará en su establecimiento y podría ser eliminado o no del sitio. El término antagonismo abarca un número de mecanismos cuyo resultado es la disminución o supresión de algunas especies en el suelo, en la rizósfera o en procesos de infección (Malajczuk, 1983), tal parece ser el caso que nos compete al hablar de las relaciones que se establecieron en los experimentos del laboratorio con los cultivos en medio sólido de los hongos ectomicorrícicos seleccionados y las cepas de *F. oxysporum.*; sin embargo, en el medio líquido se podría considerar como sinérgica para las cepas del patógeno.

Las relaciones que se establecen entre hongos ectomicorrícicos y patógenos de raíz generalmente se consideran como antagónicas, los estudios que reportan tal hecho sugieren diferentes mecanismos de resistencia, en donde el manto fúngico que forman los hongos ECM es una barrera mecánica a la penetración; pero aún en la ausencia de éste, también se observa resistencia, lo que indica una función química; a este respecto, la producción de antibióticos parece ser el mejor candidato (Marx, 1973).

La producción de sustancias antibióticas por hongos ECM, ya sea antibacteriales (Marx, 1972; Bianco, 1988) como antifúngicas (Marx, 1973; Peña & Valdéz, 1973; Sylvia & Sinclair, 1983 a, b; Kope & Fortin, 1989; Kope & Fortin, 1990) ha sido reportada ampliamente; sin embargo, es importante distinguir entre antibióticos producidos por el hongo simbiote en cultivo puro

o en basidiocarpos y los que se producen en la asociación micorrícica (Rudawska, 1990).

La mayor parte de las confrontaciones realizadas en este estudio mostraron el control del crecimiento de los patógenos, aunque solamente *Cantharellus cibarius*, resultó significativo. Las observaciones directas en cultivo, en general, no registraron sobrecrecimiento, excepto en el caso de *Lepista nuda* con la cepa C, la formación de una zona de interacción en el caso de *Scleroderma verrucosum* vs A, B y C, además de la notoria zona de inhibición en los pareados con *Cantharellus cibarius*, estas observaciones también fueron realizadas por Garza, (1991) quien registró la formación de una zona de inhibición al parear *C. cibarius* con *Pythium oligandrum*, otros pareados con *Cylindrocarpon destructans* registraron disminución del crecimiento y sobrecrecimiento de *C. cibarius*, este fenómeno lo registra para *Suillus tomentosus* con ambos patógenos radiculares. también otros hongos micorrícicos, como *Laccaria laccata* (Sylvia & Sinclair, 1983b), *Leucopaxillus cerealis* var. *piceina* (Marx, 1969), *Lactarius deliciosus*, *Suillus luteus* (Marx, 1969; Pratt, 1971) producen sustancias difusibles que inhiben el crecimiento micelial y/o la germinación de esporas de patógenos en cultivo.

La naturaleza de la antibiosis observada se trató de evidenciar en los experimentos con membranas de diálisis y filtrados de cultivos, en el caso de los metabolitos difusibles a través de membranas, los resultados obtenidos corroboraron los resultados obtenidos en las interacciones directas en cultivo.

En el caso de los filtrados se registraron datos inversos, esto es, un aumento del crecimiento de las cepas patógenas, menor en los filtrados de *L. nuda* y mayor en los filtrados de *C. cibarius*; Bianco (1988) registró la actividad antibiótica de basidiomicetos, sin embargo, algunos de ellos (e.g. *Clitocybe infundibuliformis*, *Scleroderma aurantium*, *Mycena polygramma*) registraron este fenómeno solamente en los pareados, no así en sus filtrados; lo mismo ocurrió en los experimentos realizados por Peña & Valdéz (1973) con aislamientos de hongos micorrícicos. Sylvia & Sinclair (1983) encontraron que las concentraciones de filtrados de cultivos de una variedad micorrícica de *Laccaria laccata* suprimía la germinación de *F. oxysporum* en una relación inversa, a mayor concentración se presentó una menor germinación. Kope & Fortin (1990) registraron actividad antibiótica de filtrados de cultivos de *Pisolithus tinctorius*, acompañada de lisis celular e inhibición de germinación de conidias. En 1985, Sampangi & Perrin, registraron también el antagonismo de *L. laccata*; pero no el de *P. tinctorius*.

Estas observaciones nos muestran que son los compuestos producidos por los hongos ectomicorrícicos los responsables de la disminución del crecimiento de los patógenos.

En relación al aumento del crecimiento en los filtrados de cultivos, podemos apreciar que tal vez las condiciones de crecimiento no fueron las adecuadas para el desarrollo eficiente de los hongos micorrícicos o para la conservación de sus subproductos. Esta evidencia de sinergismo también podría ser explicada por el desdoblamiento de los carbohidratos presentes a azúcares más simples en el medio por la acción de los hongos ECM que

fueron cultivados antes; se ha reportado que el cambio de las condiciones físicas y químicas del suelo (e.g. pH, relación C/N) altera la disponibilidad de nutrientes para los microorganismos, incluyendo hongos ECM y patógenos; los hongos ECM son fuertemente afectados por gradientes ambientales, con lo que al haber un cambio en tales condiciones se da lugar a la sucesión fúngica, esto es, hongos que requieren compuestos complejos son sustituidos por hongos que se desarrollan mejor en presencia de compuestos simples (Bledsoe, 1992).

Los resultados obtenidos en este trabajo al compararlos con los ya realizados, nos llevan a afirmar la variación inter- e intraespecífica que ocurre en los hongos ectomicorrícicos, en el particular de la magnitud y naturaleza de su influencia protectora en las plántulas de pino.

La diferencia observada en la velocidad de crecimiento entre los hongos ectomicorrícicos señala una relación inversa con su capacidad de controlar el crecimiento de patógenos radiculares *in vitro*.

Y al parecer, la lentitud de crecimiento de *C. cibarius*, se ve compensada por la producción de sustancias inhibitoras, así como la rapidez en *L. nuda* sin producir compuestos antifúngicos, podrían ser estrategias de adaptación que les permiten competir por los recursos (e.g. espacio, nutrientes, hospederos) contra hongos patógenos y otros hongos ECM.

Los cambios celulares y la lisis de hifas observados en las interacciones directas con los hongos ECM no son nuevos, ya que Kope & Fortin (1988) registraron la gemación, ramificación y aumento de la septación, así como la lisis, con lo que se indica la naturaleza fungitóxicas de

los compuestos producidos. Estos resultados fueron obtenidos también en medios de cultivos libres de micelio del hongo ectomicorrízico, pero con sus metabolitos; y aunque no se ha establecido que estos cambios tengan influencia sobre la patogenicidad; se puede asumir que el fenómeno lítico resulta fatal, ya que afecta el desarrollo del hongo (Kope y Fortin, 1989).

La reducción o inhibición del crecimiento del patógeno por los hongos ectomicorrízicos acompañada de lisis celular, como la observada en los experimentos de interacciones directas en cultivo y de metabolitos ectomicorrízicos en medio sólido fue documentada por Malajczuk (1983) y Hwang *et al.* (1996), quienes atribuyen este comportamiento a la producción de compuestos antibióticos u otros metabolitos tóxicos.

Es indiscutible que los hongos patógenos siempre han representado serios problemas en los viveros forestales, y la prevención de su establecimiento requiere un manejo cuidadoso de las condiciones de crecimiento de las plántulas en el mismo (e.g. control químico) (Huang & Kuhlman, 1990; Enebak, *et al.*, 1990; Wardlaw & Phillips, 1990).

Frecuentemente las formas de producción de plantas destruyen la flora natural de la rizósfera, incluyendo los hongos micorrízicos naturales (Molina, 1982). Estos disturbios pueden predisponer a las plántulas al ataque de patógenos oportunistas, con lo cual la selección de hongos ectomicorrízicos para la inoculación en vivero, no solamente debe basarse en el beneficio del crecimiento proporcionado al hospedero, sino también en su capacidad protectora (Chakravarty & Unestam, 1987).

Los hongos micorrícicos exhiben variación inter- e intraespecífica, del mismo modo, las cepas de *F. oxysporum* estudiadas en este trabajo mostraron diferencias, no en la sintomatología que ocasionaron, sino en su virulencia, estos resultados confirman los estudios realizados por Pawuk, (1978) quien encontró que no todas las especies de *Fusarium* aisladas por él, tuvieron la capacidad de causar "damping-off" pre- y/o postemergente en especies de pino; Graham & Linderman, (1983) obtuvieron resultados similares al probar 8 aislados de *F. oxysporum*, de los cuales solamente uno no ocasionó "damping-off" preemergente. James *et al.*, (1989) también encontraron variaciones en la patogenicidad de diferentes aislados de la misma especie.

En relación a la patogenicidad de *S. verrucosum* en plántulas de *P. greggii*, Marx (1973) establece similitudes entre las asociaciones simbióticas con las parasíticas, donde el hospedero controla el grado de desarrollo de los hongos a través de la secreción de compuestos. Este efecto ha sido asociado con una sustancia activa denominada factor M, y su identidad y actividad está relacionada con fosfátidos (Melin & Ramma Das, 1954), citocininas y auxinas (Barea, 1986), etileno y otros metabolitos intermediarios, los cuales son sintetizados también por los hongos ectomicorrícicos (Kruppa & Fries, 1971; Kruppa *et al.*, 1973; Harley & Smith, 1983).

La reacción patogénica mostrada por *Scleroderma verrucosum* al intentar la síntesis micorrícica *in vitro* con *Pinus greggii*, puede explicarse con las evidencias de incompatibilidad entre hongos micorrícicos y hospederos



que se ha observado en otros estudios, las cuales van desde diferencias en porcentajes de micorrización, como las registradas por Duchesne *et al.* (1987) y Lundeberg (1968) en diferentes procedencias de las mismas especies de coníferas, inoculadas con las mismas especies de hongos ectomicorrícicos, hasta la acumulación de taninos en los tejidos hospederos que induce la muerte de células corticales (Molina, 1982; Molina y Trappe, 1982; Garza, 1990).

La interface hospedero-hongo micorrícico en la ectomicorriza no es una estructura estática, ya que implica etapas de desarrollo, maduración y senescencia; asimismo, su formación puede ser alterada por la compatibilidad y el estado fisiológico de ambos simbioses y también por las condiciones ambientales (Duddridge, 1985). Björkman, (1970) registró que plántulas de pino jóvenes murieron al ser inoculadas con un hongo micorrícico y que la misma inoculación en plántulas de 1 a 2 meses de edad resultó en un crecimiento muy saludable. Este parece ser el caso que se presentó con *S. verrucosum* y *P. greggii*, ya que en otros estudios realizados por Arias, (1997) la inoculación de plántulas de pino de varios meses de edad con la cepa de *S. verrucosum* utilizada en este estudio resultó en una micorrización exitosa.

En relación a la protección proporcionada por *C. cibarius* en plántulas de *P. greggii* premicorrizadas contra *F. oxysporum*, es importante considerar el tiempo en el que ocurren las infecciones patogénicas, el cual se da en un periodo de 6 semanas después de la germinación (Bloomberg, 1973), y en virtud de que en este estudio el porcentaje máximo de mortalidad por la cepa

A del patógeno *F. oxysporum* en el ensayo de patogenicidad fue registrado al sexto día; el estudio examinó el efecto protector de *C. cibarius* contra la cepa A de *F. oxysporum* en un periodo de incubación de 10 días, previa micorrización por 7 días.

Muchos investigadores en las últimas décadas han mostrado que los hongos ectomicorrícicos son esenciales para el establecimiento y crecimiento de muchas especies de árboles (Marx, 1971). Además su posible uso en el control biológico de hongos fitopatógenos ha sido sugerido por Marx (1972), Duchesne *et al.* (1988), Chakravarty *et al.* (1989), Kope & Fortin (1989,1990), Bhat *et al.* (1998), entre otros.

La mortalidad de plántulas en las diferentes concentraciones de inóculo del patógeno se comportó de la misma manera en ambos tratamientos (inoculados con Cc y no inoculados), aunque fue menor en la concentración baja ( $[10^3]$ ) y mayor en las altas ( $[10^4$  y  $10^5]$ ), siendo estas dos últimas iguales estadísticamente, a pesar de que la última es 10 veces más concentrada que la primera, tales resultados permiten concluir que las enfermedades epidémicas como el "damping-off", quizá dependan solamente en su inicio de la concentración del inóculo.

Los resultados obtenidos sugieren el control de *F. oxysporum* por *C. cibarius*, al mostrar la disminución de la enfermedad en plántulas de *P. greggii*. Sin embargo, la forma en que se proporciona esta resistencia puede ser discutida al comparar los diferentes mecanismos propuestos por Zak, (1964):

1º.- La ectomicorrización entendida como la penetración intercelular en los tejidos del hospedero (red de Hartig) y la formación de un manto que proporcionara una barrera física, no fue importante en este caso ya que en la mayoría de las raíces examinadas la micorriza aún no se había establecido o era incipiente, esto tal vez al tiempo con el que fueron preinoculadas, que fue de 7 días, y por el lento crecimiento de *C. cibarius*, ya registrado en los experimentos anteriores.

2º.- La hipótesis de competencia por carbohidratos tampoco puede ser considerada debido al rápido crecimiento del *F. oxysporum* (4.6 mm/día) al compararlo con *C. cibarius* (0.5 mm/día), esto es 9.2 veces más rápido el patógeno que el micorrícico; el crecimiento más acelerado en los patógenos a pesar de parecer ventajoso, en este estudio fue disminuído en su actividad.

3º.- La competencia con otros organismos de la rizósfera se puede descartar debido al tipo de sistema usado.

4º.- El antagonismo mostrado por el micelio de *C. cibarius* pudo haber influído en la disminución del ataque, aunque no siempre se encontraba en simbiosis, sin embargo, quizá pudo haber desencadenado mecanismos de defensa previos a la infección radicular.

5º.- La protección observada debió ser el resultado de la resistencia inducida en las plantas por las interacciones micorrícicas o premicorrícicas que debilitaron el ataque del patógeno, como lo registran también otros estudios (Sylvia, 1982; Sylvia & Sinclair, 1983 a, b; Chakravarty & Unestam, 1987; Duchesne *et al.*, 1987).

La notable reducción del crecimiento radicular en todos los tratamientos, podría atribuirse al papel que desempeñan algunos compuestos volátiles como el etileno, que inducen la producción de raíces laterales (Graham & Linderman, 1979; 1981) y/o inhiben dicho crecimiento, tal actividad está estrechamente vinculada a la presencia de auxinas (Abeles, 1973). Ya se ha anotado que entre los productos secundarios de los hongos ectomicorrícicos se encuentran las auxinas, por tal situación, es posible que exista alguna relación entre los datos observados y las cantidades de estos compuestos en el sistema empleado aunque aquí no se estudiaron. De la misma manera, *F. oxysporum* y otros patógenos tienen la capacidad de producir este gas relacionado con la aparición de síntomas de necrosis (Linderman & Gilbert, 1975; Graham & Linderman, 1979).

El etileno también ha sido reportado como estimulante de la resistencia de las plantas a infecciones fúngicas (Pegg, 1976), sin afectar el desarrollo de la ectomicorriza (Graham & Linderman, 1981); incluso se han registrado niveles de producción de este gas 40 ó 30 veces mayor en plantas micorrizadas al ser comparadas con no micorrizadas (Krupa *et al.*, 1973).

La diferencia entre la relación patogénica con *F. oxysporum* y la simbiótica, es fundamental en los niveles de etileno producidos por la interacción hongo-hospedero y en la función de éste en el desarrollo de la enfermedad contra el establecimiento y mantenimiento de la micorriza (Abeles, 1973).

## CAPITULO 5

### Conclusiones.

Los hongos ectomicorrícicos seleccionados tienen la capacidad de controlar el crecimiento de las diferentes cepas de *Fusarium oxysporum* probadas.

Los hongos ECM probados mostraron diferente velocidad de crecimiento, así como diferente capacidad de control del crecimiento de las cepas patógenas en las confrontaciones directas y en medio sólido.

Los metabolitos producidos por los hongos ECM en medio líquido demostraron un efecto sinérgico en el crecimiento de las cepas patógenas.

Las cepas de *Fusarium oxysporum* mostraron igual comportamiento en relación a su crecimiento en medio de cultivo, y un grado diferente de patogenicidad sobre las plántulas de *Pinus greggii*.

Algunos hongos ectomicorrícicos como la cepa de *Cantharellus cibarius* empleada tienen el potencial de producir sustancias antibióticas contra *Fusarium oxysporum*, sin embargo, la existencia de variación interespecífica de hongos ectomicorrícicos en la disminución del crecimiento de las cepas de *Fusarium oxysporum* probadas y en la mortalidad ocasionada por el "damping-off" que éstas ocasionan, que se observó en este trabajo, evidencia lo difícil de extrapolar estos resultados a otros hongos que muestran el hábito micorrícico; sin embargo también alerta sobre la necesidad de que las investigaciones realizadas sobre los métodos

biológicos de control de plagas deben incorporar la inoculación de plántulas con hongos ectomicorrícicos que tengan potencial de protección (e.g. produzcan antibióticos), además de la conveniente selección de aquellos que tengan altos niveles de rendimiento en cuanto a la estimulación del crecimiento de las plántulas; esto debido a que no siempre, esta última característica o la frecuencia de micorriza está correlacionada con el nivel de protección.

Los resultados aquí obtenidos apoyan en parte el mecanismo de resistencia propuesto por otros investigadores contra el desarrollo de patógenos, el cual se ha definido como resistencia inducida por la acumulación de sustancias antibióticas alrededor de las células corticales de la raíz, tales sustancias han sido descritas como compuestos fenólicos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abeles, F.B. (1973). **Ethylene in plant biology**. Academic Press Inc., New York, N.Y. 103-152 pp.]
- Agrios, G.N. (1986). **Fitopatología**. Limusa. 475-477 pp.
- Arias, R.M. (1997). **Interacciones entre 4 especies de hongos ectomicorrícicos y dos especies de coníferas del Cerro El Potosí, Galeana, N.L. México**. Tesis de Maestría. FCF, UANL. 110 pp.
- Axelrod, P.E., Neumann, M., Trotter, D., Radley, R., Shrimpton, G., and J., Dennis. (1995). Seedborne *Fusarium* on Douglas-fir: pathogenicity and seed stratification method to decrease *Fusarium* contamination. **Forestry Abstracts 56(5): 642.**
- Barea, T. M. (1986). Importance of hormones and root exudates in mycorrhizal phenomena. **In Mycorrhizae: physiology and genetics –Les mycorrhizes: 1<sup>st</sup> ESM, INRA, Dijon, París. 177-187 pp.**
- Barnett, H.L., and B.B., Hunter. (1972). **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. Burgess Publishing C. USA. 241 pp.
- Bhat, M.N., Jerayan, R., and B., Ramaraj. (1998). Biocontrol of damping-off of *Eucalyptus tereticornis* Sm. using ectomycorrhizae. **Forestry Abstracts 59(4): 470.**
- Bianco C., M.A. (1988). Antibiotic activity in Basidiomycetes III. Antibacterial activity of mycelia and culture filtrates. **Allionia 28: 165-169.**
- Björkman, E. (1970). Forest tree mycorrhiza – the conditions for iys formation and the significance for tree growth and afforestation. **Plant and Soil 32: 589-610.**
- Blanchard, R.O., and T.A., Tattar. (1981). **Field and Laboratory Guide to Tree Pathology**. Academic Press, Inc. New York. 285 pp.

- Bledsoe, C.S. (1992). Physiological Ecology of ectomycorrhizae: Implications for Field Application. In **Mycorrhizal Functioning. An Integrative Plant-Fungal Process**. M.F. Allen (ed.). Chapman & Hall, Inc. New York. pp. 424-467.
- Bloomberg, W.J. (1973). Fusarium root rot of Douglas-fir seedlings. **Phytopathology** **63**: 337-341.
- Bonello, P.E. (1991). **Defense Responses of Non-Mycorrhizal and Mycorrhizal Seedlings of *Pinus sylvestris* L. to Fungal Pathogens**. Tesis Doctoral. Green College. University of Oxford. 221 pp.
- Booth, C. (1971). **The genus *Fusarium***. C.A.B. Commonwealth Mycological Institute. Kew, England. 237 pp.
- Butin, H., y H.L., Peredo. (1986). **Hongos parásitos en coníferas de América del Sur con especial referencia a Chile**. 1ª. Edición. J. Cramer. Berlin-Stuttgart, Alemania. 74-76 pp.
- Cellerino, C.P. (1996). Present situation and prospects in the biological and integrated control of fungal diseases of forest plants. **Forestry Abstracts** **57(10)**: 1118.
- Cooke, R. (1977). **The Biology of Symbiotic Fungi**. John Wiley & Sons, Inc. 271 pp.
- Chakravarty, P., and L., Chatarpaul. (1988). Protective influence of Ectomycorrhizae against *Fusarium* root rot of certain conifer seedlings. In **Abstracts of 2<sup>nd</sup> European Symposium on Mycorrhizae**. Prague, Czechoslovakia. pág. 20.
- Chakravarty, P., R.L., Peterson and B.E., Ellis. (1989). Interaction between the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*, damping-off fungi and *Pinus resinosa* seedlings. **Journal of Phytopathology** **132(3)**: 207-218.
- Chakravarty, P., and S.F., Huang. (1991). Effect of an ectomycorrhizal fungus, *Laccaria laccata*, on *Fusarium* damping-off in *Pinus banksiana* seedlings. **European Journal of Forest Pathology** **21(2)**: 97-106.



- Chakravarty, P., and T., Unestam. (1987). Differential Influence of Ectomycorrhizae on Plant Growth and Disease Resistance in *Pinus sylvestris* Seedlings. **J. Phytopathology** **120**: 104-120.
- Cline, M.L., France, R.C., and C.P.P., Reid. (1987). Intraspecific and interspecific growth variation of ectomycorrhizal fungi at different temperatures. **Can. J. Bot.** **65**: 869-875.
- Duchesne, L.C., Peterson, R.L., and B.E., Ellis. (1987). The accumulation of plant-produced antimicrobial compounds in response to ectomycorrhizal fungi: a review. **Phytoprotection** **68**: 17-27.
- Duchesne, L.C., Peterson, R.L., and B.E., Ellis. (1988). Interaction between the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* and *Pinus resinosa* induces resistance to *Fusarium oxysporum*. **Can. J. Bot.** **66**: 558-562.
- Duchesne, L.C., Ellis, B.E., and R.L., Peterson. (1989a). Disease suppression by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*: Contribution of oxalic acid. **Can. J. Bot.** **67(9)**: 2726-2730.
- Duchesne, L.C., Campbell, S.E., Koehler, H., and R.L., Peterson. (1989b). Pine species influence suppression of *Fusarium* root rot by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. **Symbiosis** **7(2)**: 139-149.
- Duddridge, I.A. (1985). A comparative ultrastructural analysis of the host-fungus interface in mycorrhizal and parasitic associations. **In Developmental Biology of Higher Fungi**. D. Moore, L.A. Casselton, D.A. Wood and J.C. Frankland (eds.). **Brit. Mycol. Soc. Symposium** **10**: 141-173.
- Enebak, S.A., Palmer, M.A., and R.A., Blanchette. (1990). Managing soilborne pathogens of white pine in a forest nursery. **Plant Disease** **74(3)**: 195-198.
- Farquhar, M.L., and R.L., Peterson. (1990). Early effects of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* on the root rot organism *Fusarium* associated with *Pinus resinosa*. **Can. J. Bot.** **68(7)**: 1589-1596.
- Farquhar, M.L., and R.L., Peterson. (1991). Later events in suppression of *Fusarium* root rot of red pine seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. **Can. J. Bot.** **69(6)**: 1372-1383.

- Fookhon, C. (1996). Damping-off in some forest nurseries in Sarawak. **Forestry Abstracts 57(4):** 427.
- Garza O., F. (1986). Hongos Ectomicorrícicos en el Estado de Nuevo León. **Rev. Mex. Mic. 2:** 197-205.
- Garza O., F., García, J., y J., Castillo. (1985). Macromicetos asociados al bosque de *Quercus rysophilla* en algunas localidades del centro del Estado de Nuevo León. **Rev. Mex. Mic. 1:** 423-437.
- Garza, F. (1991). **Competencia entre Hongos Ectomicorrícicos durante su Establecimiento en las Raíces de Pinos Tropicales.** Tesis Doctoral. (versión español). Colegio Linacre. Universidad de Oxford. 13-36, 76-90, 239-286 pp.
- Gogala, N. (1971). Growth substances in mycorrhiza of the fungus *Boletus pinicola* Vitt. and the pine-tree *Pinus sylvestris* L. **Dissertation Akad. Sci. Art. Slovenica. C1. IV, (XIV/5).**
- Graham, J.H., and R.G., Linderman. (1979). Ethylene production by ectomycorrhizal fungi and *Fusarium oxysporum* f. sp. *pini in vitro* and by aseptically synthesized ectomycorrhizae and *Fusarium* infected root of Douglas-fir. **In Proceedings of 4<sup>th</sup> North American Conference on Mycorrhizae,** Forth Collins, Colorado.
- Graham, J.H., and R.G., Linderman. (1981). Effect of ethylene on root growth, ectomycorrhiza formation, and *Fusarium* infection on Douglas-fir. **Can. J. Bot. 59:** 149-155.
- Graham, J.H., and R.G., Linderman. (1983). Pathogenic seedborne *Fusarium oxysporum* from Douglas-fir. **Plant Disease 67(3):** 323-325.
- Harley, J.L., and S.E., Smith. (1983). **Mycorrhizal Symbiosis.** Academic Press Inc. London. 170-200 pp.
- Huang, J.W., and E.G., Kuhlman. (1990). Fungi associated with damping-off slash-pine seedlings in Georgia. **Plant Disease 74(1):** 27-30.

- Hwang, S., Chakravarty, P., and C., Kanfa. (1996). The effect of two ectomycorrhizal fungi, *Paxillus involutus* and *Suillus tomentosus*, and of *Bacillus subtilis* on *Fusarium* damping-off in jack pine seedlings. **Forestry Abstracts 57(7):** 781.
- James, R.L., Dumroese, R.K., Gilligan, C.J., and D.L., Wenny. (1989). Pathogenicity of *Fusarium* isolates from Douglas-fir seed and container-grown seedlings. **Idaho Forest, Wildlife and Range Exp. St. Bull. 52:** 10 pp.
- Kope, H.H., and J. A., Fortin. (1988). Evidence of antifungal compounds secreted in vitro by ectomycorrhizal fungi. **In Canadian Workshop on Mycorrhizae in Forestry.** Université Laval, Quebec. M. Lalonde y Y. Piché (eds.). pp. 125-129.
- Kope, H.H., and J. A., Fortin. (1989). Inhibition of pathogenic fungi *in vitro* by cell free culture media of ectomycorrhizal fungi. **New. Phytol. 113:** 57-63.
- Kope, H.H., and J. A., Fortin. (1990). Antifungal activity in culture filtrates of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Can. J. Bot. 68:** 1254-1259.
- Krupa, S., Andersson, J., and D.H., Marx. (1973). Studies on ectomycorrhizae of pine IV. Volatile organic compounds in mycorrhizal and nonmycorrhizal root systems of *Pinus echinata* Mill. **Sonderdruck aus European Journal of Forest Pathology 3:** 194-200.
- Krupa, S., and N., Fries. (1971). Studies on ectomycorrhizae of pine. I. Production of volatile organic compounds. **Can. J. Bot. 49:** 1425-1431.
- Landis, T. (1989). Disease and Pest Management. **In The Biological Component: Nursery Pest and Mycorrhizae.** R.G. Nisley (ed.). **USDA Forest Service.** pp. 4-94.
- Linderman, R.G., and R.G., Gilbert. (1975). Influence of volatiles of plant origin on soil-borne plant pathogens. **In Biology and control of soil-borne plant pathogens.** G.W. Bruehl (ed.). **The American Phytopathological Society.** 90-99 pp.

- Lundeberg, G. (1968). The formation of mycorrhizae in different provenances of pine (*Pinus silvestris* L.). **Svensk Botanisk Tidskrift** **62(1)**: 249-255.
- Malajczuk, N. (1983). Microbial Antagonism to *Phytophthora*. In ***Phytophthora its biology, taxonomy, ecology and pathology***. D.C. Erwin, S. Bartnicki-García y P.H. Tsao (eds.). APS Press. 197-218 pp.
- Marx, D.H. (1969). The Influence of Ectotrophic Mycorrhizal Fungi on the Resistance of Pine Roots to Pathogenic Infections II. Production, Identification, and Biological Activity of Antibiotics Produced by *Leucopaxillus cerealis* var. *piceina*. **Phytopathology** **59**: 411-417.
- Marx, D.H. (1971). Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections. In **Proceedings of 1<sup>st</sup> North American Conference on Mycorrhizae**. US Department of Agriculture-Forest Service. Misc. Publication 1189: 81-96 pp.
- Marx, D.H. (1972). Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections. **Ann. Rev. Phytopathol.** **10**: 429-454.
- Marx, D.H. (1973). Mycorrhizae and feeder root diseases. In **Ectomycorrhizae: their ecology and physiology**. G.C. Marks y T.T. Kozlowski (eds.). 351-381 pp.
- Marx, D.H., and C.B., Davey. (1969). The Influence of Ectotrophic Mycorrhizal Fungi on the Resistance of Pine Roots to Pathogenic Infections III. Resistance of Aseptically Formed Mycorrhizae to Infection by *Phytophthora cinnamomi*. **Phytopathology** **59**: 549-558.
- McAfee, B.J., and J.A., Fortin. (1986). Competitive interactions of ectomycorrhizal mycobionts under field conditions. **Can. J. Bot.** **64**: 848-852.
- Melin, E. (1930). **Investigations of the significance of tree mycorrhiza. An Ecological-Physiologica Study**. Translated by Paul W. Stickel. Department of Agriculture, USA Forest Service. Edwards Brothers. Ann Arbor, Mich.
- Melin, E., and V.S., Ramma Das. (1954). Influence of root metabolites on the growth of tree mycorrhizal fungi. **Physiologia Plantarum** **7**: 851-858.

- Molina, R. (1982). Use of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* in forestry. I. Consistency between isolates in effective colonization of containerized conifer seedlings. **Can. J. For. Res.** **12**: 469-473.
- Molina, R., and J.M., Trappe. (1982). Lack of mycorrhizal specificity by the ericaceous host *Arbutus menziesii* y *Arctostaphylos uva-ursi*. **New. Phytol.** **90**: 495-509.
- Molina, R., and J.M., Trappe. (1984). Mycorrhiza management in bareroot nurseries. In **Forest Nursery Manual: production of bare root seedlings**. M.L. Duryea and T.D. Landis (eds.). Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk by Publishers, The Hague, The Netherlands. 211-223 pp.
- Moore, L.M., Jansen, A.E., and L.J.L.D., Van Griensven. (1989). Pure culture synthesis of ectomycorrhizas with *Cantharellus cibarius*. **Acta Bot. Neerl.** **38(3)**: 273-278.
- Natajara, K., and V., Gorindasamy. (1990). Antagonism of ectomycorrhizal fungi to some common root pathogens: In **Trends in mycorrhizal research. Proceedings of the National Conference on Mycorrhiza**. Haryana Agricultural University, India. pp. 98-99.
- Nouaim, R., and R., Chaussod. (1997). Role of mycorrhizas in plant nutrition and water relations: particularly woody plants of arid zones. **Forestry Abstracts** **58(7)**: 779.
- Park, J.Y. (1970). Antifungal effect of an ectotrophic mycorrhizal fungus, *Lactarius* sp. associated with basswood seedlings. **Can. J. Microbiol.** **16**: 798-800.
- Pawuk, W.H. (1978). Damping-off of container-grown longleaf pine seedlings by seedborne fusaria. **Plant Disease Reporter** **62(1)**: 82-84.
- Pegg, G.F. (1976). The response of ethylene-treated tomato plants to infection by *Verticillium albo-atrum*. **Physiological Plant Pathology** **9**: 215-226.
- Pegg, G.F., and P.G., Ayres. (1987). **Fungal Infection of Plants**. Symposium of the British Mycological Society. Cambridge University Press.

- Peña C., J.J., y M., Valdéz H. (1973). Antagonismo de los hongos de la micorriza del oyamel (*Abies religiosa*) hacia algunos patógenos de especies forestales. **Rev. Latinoamericana Microbiol.** **15**: 107-111.
- Pratt, B.H. (1971). Isolation of Basidiomycetes from Australian eucalypt forest and assessment of their antagonism to *Phytophthora cinnamomi*. **Trans. Brit. Mycol. Soc.** **56**: 243-250.
- Rudawska, M. (1990). Some mechanism of resistance of mycorrhizae to pathogenic infections. **Bulletins of the Finnish Forest Research Institute** **360**: 191-199.
- Rzedowski, J. (1978). **Vegetación de México**. Ed. Limusa. 432 pp.
- Sampangi, R., and R., Perrin. (1985). Attempts to elucidate the mechanism involved in the protective effect of *Laccaria laccata* against *Fusarium oxysporum*. In **1<sup>st</sup> European Symposium on Mycorrhizae**. Dijon, France. pág. 53.
- Sampangiarmaiah, K., and R., Perrin. (1990). Interactions between isolates of ectomycorrhizal *Laccaria* spp. and root rot fungi of conifers. In **Trends in mycorrhizal research. Proceedings of the National Conference on Mycorrhiza**. Haryana Agricultural University, India. Jalali, B.L. y H. Chand (eds.). pp. 124-125.
- Sarjala, T. (1990). Effect of nitrate and ammonium concentration on nitrate reductase activity in five species of mycorrhizal fungi. **Physiologia Plantarum** **79**: 65-70.
- Schisler, D.A., and R.G., Linderman. (1989) Influence of humic-rich organic amendments to coniferous nursery soils on Douglas-fir growth, damping-off and associated soil microorganisms. **Soil Biol. Biochem.** **21(3)**: 403-408.
- Sinclair, W.A., Sylvia, D.M., and A.O., Larsen. (1982). Disease suppression and growth promotion in Douglas-fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. **Forest Science** **28**: 191-201.

- Slankis, V. (1973). Hormonal relationships in mycorrhizal development. In **Ectomycorrhizae: Their Ecology and Physiology**. G.C. Marks y T.T. Kozlowski (eds.). Londres. 232-291 pp.
- Soldevilla, C. (1996). Losses caused by fungi (damping-off) in *Pinus* sp grown in the greenhouse. **Forestry Abstracts 57(10)**: 1114.
- Stack, R.W., and W.A., Sinclair. (1975). Protection of Douglas-fir Seedlings Against *Fusarium* Root Rot by a Mycorrhizal Fungus in the Absence of Mycorrhiza Formation. **Phytopathology 65**: 468-472.
- Straatsma, G., Van Griensven, L.J.L.D., and J., Bruinsma. (1986). Root influence on in vitro growth of hyphae of the mycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius* replaced by carbon dioxide. **Physiologia Plantarum 67**: 521-528.
- Strobel, N.E., and W.A., Sinclair. (1991). Influence of temperature and pathogen aggressiveness on biological control of *Fusarium* root rot by *Laccaria bicolor* in Douglas-fir. **Phytopathology 81(4)**: 415-420.
- Sylvia, D.M. (1982). Role of *Laccaria laccata* in protecting premycorrhizal seedlings of Douglas-fir from root pathogens. In **IUFRO, Conference on Tree root systems and their mycorrhizas**. Edinburgh and Cantenbury. pág. 30.
- Sylvia, D.M., and W.A., Sinclair. (1983a). Suppressive Influence of *Laccaria laccata* on *Fusarium oxysporum* and on Douglas-fir Seedlings. **Phytopathology 73**: 384-389.
- Sylvia, D.M., and W.A., Sinclair. (1983b). Phenolic Compounds and Resistance to Fungal Pathogens Induced in Primary Roots of Douglas-fir Seedlings by the Ectomycorrhizal Fungus *Laccaria laccata*. **Phytopathology 73**: 390-397.
- Swart, A., and G.A., Kamerbeek. (1976). Different ethylene production *in vitro* by several species and formae speciales of *Fusarium*. **Netherlands. J. Plant Pathology 82**: 81-84.

- Tang, J., Zhou, J.S., Wang, K.X., and W.L., Kiu. (1988). Effects of ectomycorrhizal fungi on damping-off of pines. **Forest Pest and Disease 4**: 20-21.
- Thimann, K.V. (1969). The auxins. In **Physiology of Plant Growth and Development**. M.B. Wilkins (ed.). Mc Graw Hill. New York. pp 1-37.
- Trappe, J. (1962). Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. **Botanical Review 28**: 538-606.
- Trappe, J. M. (1977). Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. **Annu. Rev. Phytopathol. 15**: 203-222.
- Von Arx, J.A. (1987). **Plant Pathogenic Fungi**. J. Cramer. Germany. 288 pp.
- Wardlaw, J., and T., Phillips. (1990). Nursery diseases and their management at the Forestry Commission Nursery, Perth. **Tas-forest 2(1)**: 21-26.
- Yakimenko, E.E., and I.D., Grodnitskaya. (1997). Damping-off of conifer seedlings in forest nurseries in the Krasnoyarsk region. **Forestry Abstracts 58(7)**: 783.
- Zak, B. (1964). Role of mycorrhizae in root disease. **Annual Review of Phytopathology 2**: 377-392.



## APÉNDICES

### Análisis de varianza

#### 1.1 Crecimiento de HEM.

<i>FV</i>	<i>SC</i>	<i>Gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Prob.</i>	<i>Valor crítico</i>
HEM	689.481892	2	344.740946	4.40368818	0.02211984	3.3541312
ERROR	2113.68407	27	78.2845951			
Total	2803.16596	29				

#### 1.2 Crecimiento de cepas patógenas.

<i>FV</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Prob.</i>	<i>Valor crítico</i>
PATÓGENOS	86.4363225	2	43.2181612	0.2971493	0.74600549	3.46679485
ERROR	3054.29424	21	145.442583			
Total	3140.73056	23				

#### 1.3 Pareados in vitro de hongos ectomicorrícicos y cepas de *F. oxysporum*

<i>FV</i>	<i>SC</i>	<i>GL</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Prob.</i>	<i>Valor crit. F</i>
Cepas de <i>F.o.</i>	0.44	3	0.147	1	0.043629	3.863
HEM	97.13	3	32.38	220.7	9.6E-09	3.863
ERROR	1.32	9	0.147			
Total	98.89	15				

#### 1.4 Efecto de metabolitos micorrícicos difusibles a través de membranas de diálisis en el crecimiento de *F. oxysporum* (cepas A, B y C).

<i>FV</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Prob.</i>	<i>Valor crítico</i>
Cepas de <i>F.o.</i>	111.28	2	55.64	2.06	0.2088	5.14
HEM.	772.32	3	257.44	9.52	0.0107	4.76
ERROR	162.33	6	27.06			
Total	1045.93	11				

### 1.5 Valores de Biomasa de cepas patógenas en filtrados de cultivos de HEM.

FV	SC	gl	CM	F	Prob.	Valor crítico
Cepas de F.o.	0.0005	2	0.0002	0.354	0.715	3.463
HEM.	0.0981	3	0.0327	48.659	0.0001	3.289
ERROR	0.0040	6	0.0007			
Total	0.103	11				

### 1.6 Valores de pH en medio de cultivo de cepas patógenas creciendo en filtrados de HEM

FV	SC	gl	CM	F	Prob.	Valor crítico
Cepas de F.o.	0.0091	2	0.0046	1.1338	0.3822	5.1432
HEM.	0.0471	3	0.0157	3.9002	0.0735	4.7571
ERROR	0.0242	6	0.0040			
Total	0.0804	11				

### 1.7 Mortalidad de plántulas de *Pinus greggii* con cepas de *F. oxysporum*

FV	SC	gl	CM	F	Prob.	Valor crítico
Cepas de F.o.	15386.2847	3	5128.76	354.5	7.624E-09	4.06618028
ERROR	115.740741	8	14.47			
Total	15502.0255	11				

#### 1.7.1 Pruebas de medias. $q_{\alpha,01} = 6.2$ ; $DVS_{\alpha,01} = 13.616$

Diferencias observadas

Medias	A	C	B	T
T	0	100.00	45.83	0
B	45.83	54.17	0.00	-
C	61.11	38.89	0.00	-
A	100.00	0.00	-	-



**1.9 Longitud de raíz de plántulas de *P. greggii* con tratamientos de inoculación con *C. cibarius* y no inoculación (Cc y NM) y diferentes concentraciones de conidias de *F. oxysporum* [0,10<sup>5</sup>,10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>].**

<i>FV</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Prob.</i>	<i>Valor crítico</i>
[10 <sup>5</sup> ]	126.44	3	42.15	3.38188611	0.17183944	9.27661858
C.cibarius/NM	38.29	1	38.29	3.07273337	0.17790044	10.1279625
ERROR	37.39	3	12.46			
Total	202.12	7				

**1.10 Altura de plántulas de *P. greggii* con tratamientos de inoculación con *C. cibarius* y no inoculación (Cc y NM) y diferentes concentraciones de conidias de *F. oxysporum* [0,10<sup>5</sup>,10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>].**

<i>FV</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Prob.</i>	<i>Valor crítico</i>
[10 <sup>5</sup> ]	73.3217018	3	24.4405673	1.43220418	0.38747051	9.27661858
C.cibarius/NM	66.172368	1	66.172368	3.87766541	0.14356163	10.1279625
ERROR	51.1950061	3	17.065002			
Total	190.689076	7				

