

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE
NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



Aspergillus ochraceus Wilhelm COMO UN ORGANISMO
ANTAGONICO A *Phymatotrichum omnivorum* (Shear)
Duggar "in vitro".

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO

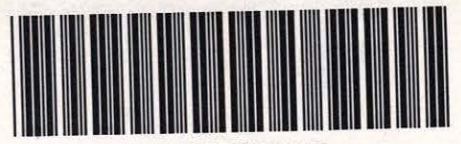
PRESENTA

ARTEMIO VILLANUEVA SILVA

MONTERREY, N. L.

DICIEMBRE DE 1980

T
SB733
V5
C-1



1080063376

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE
NUEVO LEON

A MIS PADRES:

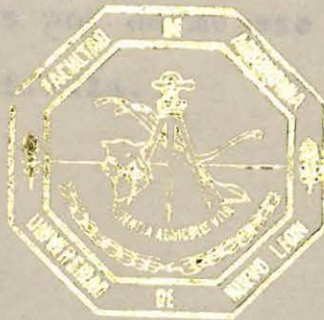
SR. FERNANDO VILLANUEVA

SRA. CONCEPCION FACULTAD DE AGRONOMIA

Por su gran amor, a los cuales los debo

lo que soy; gracias por el apoyo

tan grande. La Universidad



Aspergillus ochraceus Wilhelm COMO UN ORGANISMO

ANTAGONICO A *Phymatotrichum omnivorum* (Shear)

Duggar "in vitro".

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO

PRESENTA

ARTEMIO VILLANUEVA SILVA

MONTERREY, N. L.

DICIEMBRE DE 1980

T
SB 733
VS

040.589
FA2
1980



Biblioteca Central
Magna Solidaridad

F. Fesis



UANL
FONDO
TESIS LICENCIATURA

A MIS PADRES:

SR. FERNANDO VILLANUEVA SAUCEDO

SRA. CONCEPCION SILVA DE VILLANUEVA

Por su gran amor, a los cuales les debo
lo que soy; gracias por darme ese apoyo
tan grande. La Confianza.

A MIS HERMANOS:

MA. ELSA

MA. GUADALUPE

ANGELICA

FERNANDO

RODOLFO

ARMANDO

ROLANDO

AMERICO

ORLANDO

MA. CONCEPCION

Con cariño y amor,

A MI NOVIA CON AMOR

SRITA. TERESA DE JESUS RODRIGUEZ YAÑEZ

Por acompañarme en ésta etapa de mi vida,
a la que le doy gracias por su apoyo.

A MI ASESOR:

ING. M.C. ALFONSO TOVAR RODRIGUEZ

Con admiración y respeto por su colaboración desinteresada para la culminación de éste -- trabajo, le doy gracias por sus grandes consejos y orientaciones a lo largo de mi carrera.

AL BIOL. M.C. MARIO R. MORALES VALLARTA

Por sus consejos tan oportunos, así como su colaboración tan desinteresada para la culminación de éste trabajo.

AL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMETICAS
DEL I.M.S.S.

Por la gran ayuda brindada para poder llevar a cabo algunas pruebas.

A MIS AMIGOS:

JOSE APOLINAR LLANES LOPEZ
FERNANDO ARTURO ALARCON LOZANO
VICTOR MANUEL ZUÑIGA CRUZ
JAVIER GARCIA VALLEJO

Con los cuales pasé buenos momentos,
y ahora pasamos a formar parte de -
otro eslabón de ésta vida.

A LA SRITA. MARIA ELENA GARCIA G.

Por su colaboración en la mecanografía
de éste trabajo.

A mis Compañeros y Amigos que de alguna manera
hicieron alguna aportación directa o indirecta.

Gracias.

I N D I C E

| | PAGINA |
|---|--------|
| I N T R O D U C C I O N | 1 |
| L I T E R A T U R A R E V I S A D A | 3 |
| M A T E R I A L E S Y M E T O D O S | 30 |
| R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N | 39 |
| C O N C L U S I O N E S | 49 |
| R E C O M E N D A C I O N E S | 51 |
| R E S U M E N | 52 |
| B I B L I O G R A F I A | 54 |
| A P E N D I C E | 60 |

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

| TABLA | | PAGINA |
|--------|--|--------|
| 1 | Principales antagonistas en el control biológico de patógenos vegetales (Según Sánchez A.) | 6 |
| 2 | Principales enzimas y antibióticos producidos por el Género <u>Aspergillus</u> (Según Raper y Fennell). | 22 |
| 3 | Clasificación taxonómica subjetiva del Género <u>Aspergillus</u> (Según Raper y Fennell). | 24 |
| FIGURA | | |
| 1 | Vista de cordones miceliares por rizomorfos del hongo <u>Phymatotrichum omnivorum</u> y formación de esclerosis en medio artificial PDA. | 11 |
| 2 | <u>Aspergillus ochraceus</u> en medio de cultivo Czapek's-Agar | 25 |
| 3 | Cabeza conidial de <u>Aspergillus ochraceus</u> - mostrando sus estructuras (Según Raper y Fennell). | 27 |
| 4 | Fotografía mostrando la acción antagónica de <u>Aspergillus ochraceus</u> Vs. <u>Phymatotrichum omnivorum</u> | 40 |

FIGURA

PAGINA

- 5 Acercamiento de la acción antagónica de *Aspergillus ochraceus* Vs. *Phymatotrichum omnivorum*. Notese la zona de inhibición. 41
- 6 Fotografía mostrando al hongo *Phymatotrichum omnivorum* con un círculo de papel filtro Wathmann 3 mm. embebido de la solución o metabolito tóxico de *Aspergillus ochraceus*, en la cual no se presentó la inhibición *Phymatotrichum omnivorum*. 46
- 7 Tratamientos en donde se utilizó la técnica de liofilización con diferentes distancias entre *Phymatotrichum omnivorum* y el círculo de papel filtro embebido de la solución del metabolito tóxico de *Aspergillus ochraceus*. 48

I N T R O D U C C I O N

Las plantas son organismos vivos que ha utilizado el hombre desde tiempo inmemorial. La producción de éstas está en función de los diversos factores, siendo los problemas fitopatológicos de gran importancia ya que en algunas ocasiones se llegan a constituir en la limitante principal del cultivo.

Las plantas como cualquier organismo vivo están expuestas al ataque o daño de otros organismos patógenos tales como; hongos, bacterias, virus, etc.

En nuestro caso hablaremos en especial de las plantas que son atacadas por el hongo Phymatotrichum omnivorum (Shear) Duggar, que causa la enfermedad conocida como Podredumbre Radicular o Pudrición Texana de la Raíz. Este hongo ataca a más de 2,000 especies de plantas Dicotiledoneas, y solo las Monocotiledoneas no son atacadas (15, 22, 24, 34).

El hongo causa daño como su nombre lo dice, en el sistema radicular de las plantas atacadas. El control químico resulta demasiado costoso, ya que este produce una especie de resistencia homeostática que lo hace responder de forma diferente a las aplicaciones de los fungicidas, lo que limita a un selecto grupo de fungicidas; por tal causa su aplicación resulta costosa. Los altos costos de aplicación, así como un bajo número de fungicidas hacen que dicha enfermedad no sea controlada tan fácilmente.

Ya en 1929 cuando Alexander Fleming observó, que en una caja de agar sembrada con Staphylococcus aureus se había - contaminado por un hongo y que la colonia de ese moho estaba rodeada por una zona limpia que revelaba inhibición del crecimiento de las bacterias. Esto le sugirió la idea de aislar e identificar el hongo y estudiar sus propiedades. El uso de nuevas técnicas de control tales como el control biológico, hacen necesarias más investigaciones al respecto. Tal como - Fleming, el presente trabajo tiene como objetivo, el de demostrar el antagonismo que presentan dos organismos. En este caso Aspergillus ochraceus Wilhelm antogónico a Phymatotrichum omnivorum (Shear) Duggar. Se tratará de probar la existencia de la inhibición de crecimiento de Phymatotrichum - - omnivorum "in vitro", con el fin de encontrar alguna substancia que pueda ser utilizada para el control de éste hongo.

LITERATURA REVISADA

I.- Importancia del Antagonismo.

Las interacciones existentes entre microorganismos - juegan un papel de suma importancia (30).

La competencia que existe por la supervivencia entre los microorganismos del suelo es un principio biológico bien establecido (14).

Los microorganismos antagónicos al hongo Phymatotrichum omnivorum, parecen jugar un papel muy importante en el control de dicho hongo (14).

Entre los microorganismos que presentan mayor antagonismo contra este hongo, se encuentran los Actinomycetos y -- especialmente los pertenecientes al género Streptomyces. Las bacterias fluorescentes, generalmente Pseudomonas, pueden -- ser potencialmente importantes en el control de la enferme-- dad (14).

Ultimamente ha sido estudiado el control biológico de éste enfermedad, aislando y probando microorganismos que en - el laboratorio han dado los resultados más satisfactorios. - Estos estudios están encaminados a la sustitución de técnicas de control que por ser económicamente incosteables, no son -- factibles de aplicarse. El control biológico, tiene como ven-- tajas su bajo costo y además mantiene el equilibrio ecológi

co entre las especies, ésto último es de suma importancia (14).

Dentro del combate biológico, se puede decir que el antagonismo es una arma básica para controlar microorganismos (30).

A la acción letal o inhibición del crecimiento de una especie de microorganismos por otra especie, se conoce como antagonismo (30).

1.- FORMAS DE ANTAGONISMO:

La gran mayoría de los antagonistas son saprófitos y de las formas en que ejercen su influencia contra los microorganismos patógenos de vegetales, pueden ser:

- a) Competencia por nutrientes, oxígeno y espacio
- b) Predación
- c) Parasitismo
- d) Antibiosis

Porter en 1924, clasificó en cuatro grupos las interacciones de los microorganismos y cuatro de ellos fueron antagonicos, manifestando diferencias en la acción inhibitoria:

- a) Una especie sobrecrece e inhiba a otra
- b) Cada miembro del par ejerce una ligera y mutua inhibición.
- c) Uno de los pares crece estrechamente alrededor del otro.

d) La inhibición mutua se manifiesta a distancia considerable y las dos permanecen separadas (30).

2.- CLASES DE ANTAGONISTAS:

Los principales atagónistas en el control biológico de patógenos vegetales incluye:

1) Bacterias.- Son muy importantes, ya que pueden exceder en número y peso a cualquier otro grupo de microorganismos en el suelo; así como en la rapidéz de su crecimiento bajo condiciones diferentes y su habilidad para utilizar varios nutrientes.

2) Actinomycetos.- Como antagonistas son probablemente los segundos en importancia, después de las bacterias. Alexander en 1969, reportó que cerca del 75% de las especies de Streptomyces, producen antibióticos.

3) Hongos.- Estos microorganismos, han recibido tal vez más atención contra antagonistas, porque son muy fáciles de manejar e identificar relativamente, que las bacterias y Actinomycetos.

4) Fauna Predadora.- (Ver Tabla 1). Actualmente hay gran investigación en lo que concierne al control de patógenos (hongos) vegetales por medio del control biológico, como por ejemplo: El efecto antagónico de Aspergillus niger con Macrophomina phaseoli fué estudiada por David (1969), él con

TABLA N° 1 PRINCIPALES ANTIAGONISTAS EN EL CONTROL BIOLÓGICO
(TOMADA DE SÁNCHEZ & ARIZPE)

| BACTERIAS | ACTINOMYCETES | HONGOS | Fauna Predadora |
|-----------------------------|---|-------------------------------------|-----------------------------------|
| <u>BACILLUS GLOBIFORMIS</u> | <u>FUSARIUM SOLANI</u> | <u>Penicillium</u> | <u>DIPLODASTER</u> |
| <u>BACILLUS MEGISTERIUM</u> | <u>STREPTOMYCES</u> <u>FUSARIUM OXISPORIUM</u> | <u>TRICHODERMA VIRIDE</u> | <u>MONONCHUS</u> |
| <u>AEROBACTER CLOACAE</u> | <u>RHIZOCTONIA SOLANI</u> | <u>NECTRIA * MINNETA</u> | <u>TRIPYLA</u> |
| <u>BACILLUS SUBTILIS</u> | | <u>DIABROTICA</u> <u>CITRIBI</u> | |
| | | <u>BOLETTIS</u> <u>CINEREA</u> | <u>PHOROPHYA</u> |
| | | <u>HELIOSPORIUM SATIVA</u> | <u>PHOROPHYA</u> <u>GRANIS</u> |

* ES UN ASCOMYCETO, ESTADO PERFECTO DE VERTICILLIUM

cluyó que no fué detectada actividad antibiótica; y que A. niger produjo demasiados ácidos (glucónico, cítrico, oxálico) por lo que Macrophomina phaseoli no creció (17).

Huber (1966) estudió los mecanismos de control biológico en pudriciones radiculares del suelo en frijol, Fusarium y Rhizoctonia fueron hongos que se aislaron con más frecuencia, y Aspergillus y Penicillium son especies reportadas como antagonistas; y concluyen que Rhizoctonia fué controlada (por el hongo antagónico) circulando al rededor del micelio y penetrando después a él, mientras que Fusarium fué parasitado -- directamente (22).

La actividad antagónica "in vitro" de varias especies de Streptomyces contra especies de Pythium y Phytophthora fué estudiada por Knauss.

Fueron aislados cultivos de Actinomycetes que exhibian un potencial antagónico, y concluyó que varias especies de -- Streptomyces controlan a Pythium y Phytophthora (23).

Whaley y Boyle, estudiaron la producción de antibióticos por Streptomyces sp. de la rhizosfera de plantas desérticas. Ellos seleccionaron diez especies de Streptomyces de -- 386 aislamientos que eran antagónicos a Fusarium oxysporum, -- Phymatotrichum omnivorum, Rhizoctonia solani y Verticillium albo-atrum; y concluyeron que hubo producción y excreción de un antibiótico (Heptane) en la rhizosfera, y por lo tanto, es posible encontrar un substrato adverso para el crecimiento del

micelio (37).

Castrejon y Cervantes, estudiaron el aislamiento y la prueba de Actinomycetos antagónicos al hongo Phymatotrichum omnivorum. Ellos concluyeron que hubo un hongo que inhibió el desarrollo de P. omnivorum aproximadamente 50% en relación -- con el testigo. Sin embargo, es probable que estos microorganismos se comporten de manera diferente en el suelo; y que es necesario estudiar la capacidad antagónica de estos microorganismos bajo condiciones de invernadero, utilizando plantas vivas en el experimento (14).

II.- Phymatotrichum omnivorum

La posibilidad de realizar un control parcial de los patógenos del suelo, por métodos biológicos sería de grandes beneficios para los Agroecosistemas. Los procesos que entrena el control biológico de un patógeno del suelo con complejos, y mal conocidos, sin embargo, existen pruebas suficientes de la existencia de oportunidades reales para controlar, mediante métodos biológicos, algunos patógenos que se encuentran -- normalmente en el suelo (31).

Se dice que al incorporar en el suelo un abono verde, los daños causados por el hongo Phymatotrichum omnivorum -- (Shear) Duggar, que causa la pudrición radicular en más de -- 2,000 especies de plantas dicotiledoneas, la enfermedad o el ataque de el patógeno disminuye en la siguiente cosecha, esto

es debido a que la incorporación de materia verde aumenta los microorganismos antagónicos al hongo, produciendo estos una acción antibiótica sobre Phymatotrichum omnivorum (12, 16, 31).

Se ha señalado que especies del género Trichoderma y Chaetonium así como bacterias, poseen efectos antibióticos sobre hongos de el suelo (31).

La antibiósisis es extremadamente común entre los microorganismos. Las contaminaciones en los cultivos detienen con frecuencia, el desarrollo de hongos. En cajas Petri, puede observarse la inhibición entre una colonia de dos microorganismos diferentes (31).

En 1892 (Reinhart) demostró que ciertos mohos, como Penicillium glaucum, el moho azul común de los frutos y algunas especies del género Aspergillus, podrían detener el crecimiento de Peziza sp. un representante de los "hongos de copa" (31).

Huber, et al. (1966) reportó especies del género Penicillium y Aspergillus como microorganismos antagónicos para Fusarium y Rhizoctonia, estos últimos causando pudriciones radicualres en frijol (Phaseolus vulgaris L.)(22).

Knauss (1976) efectuando pruebas con Actinomycetes, observó el potencial antagónico hacia Pythium y Phytophthora, (23).

Existen un gran número de hongos y de bacterias, que detienen el crecimiento de un buen número de patógenos que -- habitan el suelo.

Hablaremos a continuación de algunos trabajos relacionados con cada hongo, así como investigaciones de antagonismos entre hongos.

Phymatotrichum ominorum (Shear) Duggar

Origen e Importancia:

La pudrición Texana (llamada también pudrición del algodón), es causada por el hongo Phymatotrichum ominorum; éste es nativo de las áreas semiáridas del suroeste de los Estados Unidos, y áreas adyacentes de México, y vive en la vegetación nativa sin causar daño aparente (33).

El hongo ataca a más de 2,000 especies de plantas -- (cultivadas y hornamentales) y sólo las Monocotiledoneas son inmunes al ataque del éste, aún cuando se pueden encontrar cordones miceliares o rizomorfos del hongo sobre las raíces de algunas gramíneas (12, 33, 36). Figura 1.

1.- Características ecológicas

El hongo ocurre naturalmente en las tierras alcalinas del suroeste de los Estados Unidos de Norteamérica y el norte de México, no habiéndose encontrado en otras partes del mundo (24, 28, 34, 36).

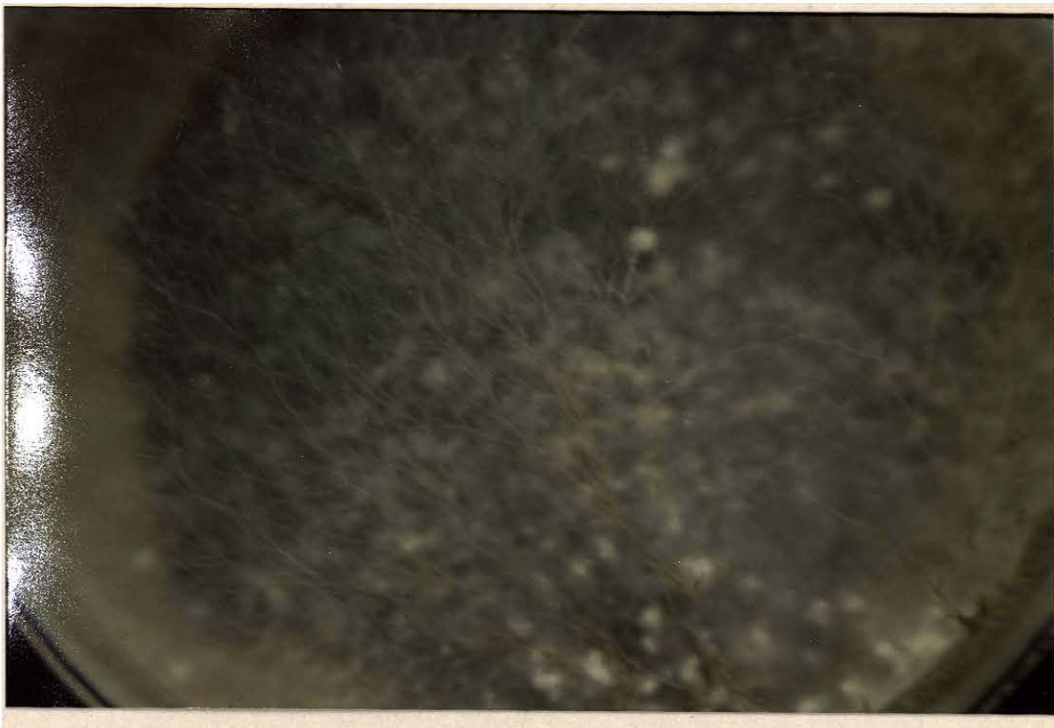


FIGURA 1.- Vista de cordones miceliares o rizomorfos del hongo Phymatotrichum omnivorum y formación de esclerosios en medio artificial PDA.

Mientras el hongo es más o menos activo en el año alrededor de las raíces de las plantas perennes, la enfermedad es visible sólo durante el tiempo de calor (Julio-Octubre) (1).

Durante este período, las plantas afectadas decaen y mueren repentinamente (33).

Las altas temperaturas y los altos porcentajes de humedad en la tierra, favorecen el desarrollo de la enfermedad (36).

El hongo puede vivir en el suelo durante años. Resiste a los inviernos y sobrevive a las sequías en estado activo en las raíces de las plantas vivas, o como esclerocios en forma latente (1).

El hongo no resiste temperaturas bajas por mucho tiempo (36).

La actual ocurrencia de la pudrición de la raíz es errática, depende de las cosechas o de las densidades de plantas en las áreas (33).

La enfermedad se ha incrementado considerablemente ya que la vegetación nativa, ha sido reemplazada en muchas áreas por otras plantas susceptibles. No existe una prueba segura para detectar el hongo en el suelo, salvo cultivando el predio con alguna variedad susceptible (12).

2.- Síntomas de la enfermedad

El primer síntoma que se presenta en una planta arriba de la superficie de la tierra, es un ligero amarillamiento o bronceado de las hojas, y la temperatura de las plantas aumenta a tal grado que puede sentirse fácilmente (1, 34, 36).

En un día ó dos ocurre el marchitamiento de las hojas e inmediatamente el follaje se seca y toma un color café, permaneciendo las hojas cafés en la planta por algún tiempo (12, 34).

Cuando se presentan lluvias durante la primera mitad del ciclo vegetativo, suelen aparecer las primeras plantas muertas poco después. Las plantas mueren repentinamente, casi siempre - después de haber tenido un excelente desarrollo (1).

En las plantas afectadas queda destruído todo el sistema radicular, pudiendose arrancar fácilmente la planta del suelo (1).

El hongo que causa la enfermedad destruye a las plantas en manchones circulares, cuyo tamaño varía desde algunos metros cuadrados hasta media hectárea o más (1).

3.- Etiología

El organismo causal fué descrito por primera vez por Pammel en 1889, clasificandolo como Ozonium auricomun Link. Shear en 1907 comparó el hongo de pudrición texana en el cul-

tivo típico de Ozonium auricomun Link, concluyendo que era -- una especie diferente, nombrándola Ozonium omnivorum (12).

Duggar demostró que las matas de esporas producidas - en la superficie del suelo provenían de hifas en el mismo suelo. Notó que las conidias nacen sobre esterigmas de conidióforos largos y globosas. Estas estructuras coincidieron con las descritas por Bonarden en 1851 para varias especies de - - - Phymatotrichum y de acuerdo a ésto, Duggar reclasificó al patógeno como Phymatotrichum ominorum (Shear) Duggar (8, 12).

El género Phymatotrichum fué establecido por Bonarden en 1851, y el nombre es de origen griego.

Phymato = Semejante a tumor

Tricho = Filamento

El hongo tiene varias formas o etapas para sobrevivir: la primera etapa o etapa vegetativa, consiste en la produc-- ción de filamentos individuales o hifas del hongo, pudiendo - unirse estos filamentos para formar hebras micelianas (36).

Las hifas son largas, septadas, con frecuencia ramifi-- cadas y polinucleadas. Las hifas poseen una característica -- distintiva, ya que son cruciformes (12).

La segunda etapa es la de colchones de esporas o fase fructificante. Phymatotrichum ominorum produce matas de esporas en la superficie del suelo, cerca de árboles, en alfalfa-

res o algodonaes, durante veranos lluviosos (12, 36).

Las conidias del hongo se consideraron estériles, por lo que durante 80 años fué clasificado entre mycelia sterilia (12).

La tercera fase es la de esclerocios o fase de reposo. Los esclerocios maduros son de un color café claro o café - - obscuro (36).

Los esclerocios son formados en el suelo cerca de la raíz y capacita al hongo a resistir condiciones adversas y favorecen la sobrevivencia del hongo en terrenos donde no se -- siembren hospederas susceptibles, logrando que el hongo sobreviva hasta por períodos de doce años. El esclerocio es una -- masa compacta de hifas (12, 33, 36).

El incremento de CO_2 en el suelo favorece la formación de esclerocios, los cuáles se encuentran abundantemente en suelos donde se sembró algodón y luego una gramínea; pero en un suelo sometido al monocultivo de algodón, no se encuentran estas estructuras, la razón de este fenómeno no es conocido (12).

Los esclerocios pierden rápidamente su viabilidad en suelos secos (12).

Lyda y Burnett observaron que Phymatotrichum ominorum formaba esclerocios con una mejor velocidad de desarrollo a una temperatura de 27°C. (25).

También estudiaron que la iniciación de esclerocios - coincidió con la elevada concentración de CO_2 , mientras que - el peso seco máximo del esclerocio fué obtenido en 8 semanas. Aparentemente el CO_2 en la disolución de iones de bicarbonato influyó en la formación de esclerocios en P. ominorum (26).

El hongo se propaga principalmente mediante el progre^{so} de las matas micelianas de raíz en raíz de las plantas - - huéspedes o por libre crecimiento a través de la tierra (8, - 12, 36).

Se ha observado que en suelos con alta capacidad de - retención de agua, el hongo avanza más rápidamente, el porcen^{taje} de infección y mortalidad de las plantas es mayor en sue^{los} alcalinos, que en suelos ácidos (12).

Cervantes, et al. observó que plantas de vid sanas - - atraían un mayor número de chicharritas que aquellos de plan^{tas} enfermas (15).

No parece que la propagen las labores ordinarias de - cultivo o los áperos de labranza. Sin embargo, existe el peli^{gro} de propagación en el traslado de plantas de viveros de - - una zona infestada, ya sea como micelios en las raíces o como esclerocios en el suelo (36).

Aparentemente la diseminación del hongo se debe al - - agua de río (12).

Taubenhaus, et al. realizaron una investigación con -

relación a la patogenicidad del hongo sobre la resistencia y susceptibilidad de las plantas a la "Putridión Texana", las plantas estudiadas se colocaron dentro de cinco categorías, que van desde plantas inmunes hasta plantas altamente susceptibles (35).

En 1969 Baniecki y Bloss descubrieron el estado sexual del hongo en un medio de cultivo, el cuál fué tratado con luz blanca o azul y colecalciferol (Vit D₃); este hongo fué identificado como Trichispora brinkmanii (Bress), Roger y Jackson (7,8,11,12,24) aunque ahora se tienen dudas al respecto. (Castrejon, S.A. comunicación personal).

Bloss trabajó con diez especies del género Phymatotrichum, reportando las características de cada especie. Las diez especies descritas de Phymatotrichum son clasificadas dentro de los Deuteromycetes, careciendo de estado sexual, con excepción de Phymatotrichum omnivorum cuyo estado sexual es Trichispora brinkmanii, tentativamente pertenece a los Thelephoraceae (8).

Baniecki y Bloss, estudiaron los efectos de esteroides y luz en la esporulación y germinación de conidias de Phymatotrichum omnivorum. Ellos trabajaron poniendo en medios de cultivo ergosterol y otros esteroides y exponiendo los medios de cultivo a lámparas de luz de blanco hasta azul fluorescente. En las hifas aparecieron cristales de ergosterol, en las conidias se observó un pigmento que fué llevado a los

conidioforos. Este fué el primer reporte en que las conidias del hongo germinan espontáneamente y producen cultivos que sobreviven. Los prerequisites para la producción de conidias son: pigmentación y luz, ésto indica que para que se lleve el mecanismo de esporulación el hongo es fotoreceptor (3).

Black y Tang, realizaron un estudio histológico de Phymatotrichum omnivorum infectando raíces de maíz. En arena estéril se sembró maíz Zea mays L. y se inoculó con el hongo Phymatotrichum omnivorum, y este creció y atacó a la raíz de maíz. La extensiva descomposición de la raíz, resultó ser el síntoma característico causado por Phymatotrichum omnivorum. El estudio histológico confirmó reportes previos y preliminares para una investigación de la resistencia en plantas monocotiledoneas para Phymatotrichum omnivorum (7).

Black, trabajó en la producción de enzimas pectolíticas por Phymatotrichum omnivorum. El hongo fué crecido en un medio líquido conteniendo sacarosa y pectina a pH 6.3. La actividad pectolítica del cultivo filtrado fué determinada viscometricamente usando sustratos de pectina y sodio polipectado. La reducción en viscosidad de sodio polipectado incrementó formalmente con 12 días, alargándose un pico en el día 14, rápidamente declinó. La producción de la actividad de la enzima que hidroliza a la pectina, continuó incrementandose hasta los 16 días.

Estos datos sugieren que Phymatotrichum omnivorum pro

duce al menos dos clases de polimerasas pectolíticas (6).

Bloss y Griess, estudiaron las respuestas fisiológicas de resistencia y susceptibilidad en tejidos de raíz infestados con Phymatotrichum omnivorum.

Análisis cromatográfico de extractos para raíces no infestadas e infestadas por el hongo muestran diferencias cuantitativas y cualitativas en el contenido de compuestos fenolíticos. Raíces de maíz infestadas con el hongo muestran un aparente cambio en (NADP), ácido ascórbico, cobre, enzimas fenolíticas en el sistema terminal de oxidación que es sensible al diethyl dithio carbamato de sodio. La respiración y la fosforilación oxidativa aumenta en los triturados clarificados en la punta de la raíz de maíz infestados, y se redujo marcadamente en preparaciones similares infestados en la punta de la raíz del algodón (9).

Castrejon y Cervantes, estudiaron los desechos metabólicos del hongo Phymatotrichum omnivorum (Shear) Duggar, relacionados con la sintomatología de la enfermedad. Ellos querían determinar la presencia de una vivotoxina como responsable de la sintomatología de la enfermedad; aquí se detectó la presencia de un fenol perteneciente al grupo de las flavonas. Por otro lado, estos extractos inhibieron "in vitro" el desarrollo del hongo (13).

Chávez, Bloss, Boyle y Gries, estudiaron los efectos

de los residuos de cosecha en el suelo sobre la pudrición --
radicular de la raíz por Phymatotrichum en algodón.

La descomposición de los residuos de cosecha, fueron estudiados durante cinco años y concluyeron que la reducción en la incidencia de la pudrición radicular, fué atribuida a la prematura germinación de las hifas que fueron vulnerables a la descomposición química y la competencia de la microflo--
ra en el suelo (16).

La influencia del pH en el crecimiento y la patogenicidad de Phymatotrichum omnivorum (Shear) Duggar, sobre plántulas de algodón fué estudiada por Zarazua, y concluyó que de acuerdo con los resultados estadísticos, el pH influyó moderadamente sobre la patogenicidad del hongo (40).

III.- El género Aspergillus

En un estudio sobre éste género-forma, se reconocen --
78 especies de Aspergillus. Este grupo está formado por hongos que comúnmente son llamados mohos negros. El género tiene amplia distribución desde las regiones frías, hasta los trópicos. El aire, en todas partes, parece contener conidias de --
estos organismos (2).

El suelo también contiene esporas de Aspergillus, pero no se ha determinado claramente si estos organismos desempeñan un papel importante en la ecología del suelo (2).

De la Jara menciona que algunos microorganismos - - (Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Trichoderma, etc.) biodegradan a los herbicidas en cuanto se ponen en contacto con ellos (18).

Los Aspergillus son capaces de utilizar una enorme variedad de sustancias como alimento, dada la gran cantidad de enzimas que producen (2).

Por su potente actividad enzimática los Aspergillus - son empleados en varios procesos industriales. Comercialmente se produce ácido cítrico, glucónico, además diversos productos químicos por la acción de miembros de este género. También se preparan productos enzimáticos, y se han aislado una gran cantidad de antibióticos, aunque ninguno en propiedades terapéuticas ha igualado a la penicilina o a los productos de los Actinomycetos. Además se usa para la fermentación de bebidas alcohólicas derivados del arroz, y para aflojar los tejidos duros de las semillas (2). Ver Tabla 2.

Porque algunas especies de Aspergillus exhiben un estado ascospórico, existe una considerable confusión para los nombres que son aplicados a los miembros de éste género (29).

Las condiciones uniformes de cultivo, las características que aparecen en la colonia son fundamentales y significantes en la identificación y descripción de especies de Aspergillus (29).

TABLA Nº 2

ALGUNAS SUBSTANCIAS QUE SON FORMADAS POR EL GENERO Aspergillus*

| ESPECIE | ANTIBIOTICOS PRODUCIDOS | ENZIMAS PRODUCIDAS | PIGMENTOS PRODUCIDOS | OTROS | UBERACIONES |
|----------------------|----------------------------------|--------------------|----------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| <u>A. OCHRACEUS</u> | Ac. Penicilico ¹ | CELULITICAS | ASPELINI | | 1 INHIBE STAPHYLOCOCCUS AUREUS |
| <u>A. OCHRACEUS</u> | Ac. Kojico | KERATINOLITICAS | ASPELUCIN | | 2 INHIBE ALGUNAS BACTERIAS |
| <u>A. CLAVATUS</u> | CLAVUSTIN ² | | | | 445 INHIBE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS |
| <u>A. GIGANTEUS</u> | Ac. GIGANTIC ³ | | | | 6 CONTRA RHIZOCTONIA |
| <u>A. GLAUCUS</u> | | | FLAVOGLAUCIN | | 7 CONTRA ALGUNAS BACTERIAS |
| <u>A. GLAUCUS</u> | | | AUROGLAUCIN | | 8 ANTI-PROTOZOICA (FUNGICIDAS) |
| <u>A. AMSTELDAMI</u> | AMODINS A ⁴ | | RUBROGLAUCIN | | 9 Y10 SE USA EN FERMENTACION |
| <u>A. AMSTELDAMI</u> | AMODINS B ⁵ | | | | 11 SUBSTANCIA ANTIBACTERIAL |
| <u>A. FUMIGATUS</u> | GILTOXIN ⁶ | | | | |
| <u>A. NIGER</u> | ASPERGILLIN ⁷ | | | Ac. Gallico ⁹ | |
| <u>A. NIGER</u> | ETHER-ETHER SOLUBLE ⁸ | | | Ac. Citrico ¹⁰ | |
| <u>A. GLAUCUS</u> | FLAVICIN ¹¹ | | | | |

* TOMADA DE ROSEL AND FRUNEL

El color de las partes aéreas de una colonia de Aspergillus, incluye el micelio vegetativo, la cabeza conidial, cleistotecios y esclerocios en caso de que aparezca; es usualmente una característica la pigmentación, que es utilizada universalmente en la caracterización de especies. Generalmente este rango de colores en las partes aéreas son para cada grupo de Aspergillus (29).

La producción de color fué usada por Bainier y Sartory para separar miembros de este grupo (Aspergillus glaucus) por observación de colonias, utilizando pruebas de solubilidad y precipitación (29).

La clasificación taxonómica subjetivamente del género Aspergillus está dentro de los Ascomycetos y los Hongos Imperfectos (29). Ver Tabla 3.

La composición natural de el sustrato produce marcados contrastes en el crecimiento, características y coloración en las dimensiones y morfología de la cabeza conidial (29). Figura 2.

Varios autores proponen fórmulas (medios de cultivos artificiales) para estandarizar y reproducir el hongo (29) (Ver Apéndice).

1.- Patogénesis en Humanos.

Existen tres tipos de enfermedad en el hombre causada por Aspergillus:

| ALEXOPOULOS * | | ALEXOPOULOS * | |
|---------------|--------------------|---------------|---|
| CLASE | DEUTEROMYCETES | CLASE | ASCOMYCETES |
| ORDEN | MONILIALES | SUB-CLASE | EUSSCOMYCETINSE |
| FAMILIA | MONILIACEAE | SERIE | PLECTOMYCETES |
| GÉNERO | <u>ASPERGILLUS</u> | ORDEN | EUROTIALES |
| | | FAMILIA | EUROTIAEAE |
| | | GÉNERO | <u>ASPERGILLUS</u> (EUROTIA, SARTORIA) |

| BESSEY | | BESSEY | |
|---------|-----------------------------------|---------|------------------------------|
| CLASE | ASCOMYCETES | CLASE | HONGOS IMPERFECTOS |
| ORDEN | ASPERGILLIALES (PLECTASCIALES) | ORDEN | MONILIALES (HYPHOMYCETES) |
| FAMILIA | ASPERGILLIAEAE | FAMILIA | MONILIACEAE |
| GÉNEROS | <u>ASPERGILLUS</u> (EUROTIA) | GÉNERO | <u>ASPERGILLUS</u> |

TABLA N°3 CLASIFICACION TAXONOMICA SUBJETIVA DEL GÉNERO ASPERGILLUS (ROPER-FENNEL)

* UTILIZAREMOS ESTA CLASIFICACION, YA QUE ES LA MAS ACTUALIZADA



FIGURA 2.- Aspergillus ochraceus en medio de cultivo
Czapek's-Agar.

I.- Infección (Micosis) la invasión en el tejido por el hongo.

- a) Primaria.- Entrada directa del hongo en un organo susceptible.
- b) Secundaria.- Resulta del crecimiento de el hongo en actividad teniendo lesiones de histoplasmosis, carcinona, etc.

II.- Alergia está asociada con la inoculación de conidias o por el contacto con el hongo. (29)

III.- Toxicosis por la ingestión de alimentos contaminados conteniendo el metabolito tóxico del hongo.

2.- Estructuras somáticas del género Aspergillus.

Las hifas bien desarrolladas, tabicadas e hialinas -- están muy ramificadas; sus células por lo general son multinucleadas (2).

En la reproducción asexual el micelio produce abundantes conidióforos, estos no se organizan en ningún modo, sino que nacen aislados directamente de las hifas somáticas. Los conidióforos son hifas largas, erguidas, cada una terminado en una cabeza llamada vesícula. Ver figura 3.

En la reproducción sexual, no se han descubierto los estados perfectos de la mayoría de las especies de Aspergillus,

FIGURA 3,- Cabeza conidial de Aspergillus ochraceus mostrando sus estructuras (Según Raper y Fennell).

y es muy posible que tales especies de Aspergillus hayan perdido su capacidad de reproducción sexual (2).

3.- Características externas de A. ochraceus.

1.- Cabezas conidiales globosas cuando están juvenes o agrupadas en columnas divergentes de color amarillo pálido, - naranja o canela.

2.- Conidióforos variables presentando una forma granular el cultivo.

3.- Vesículas principalmente globosas, ocasionalmente - alargadas.

4.- Esterigmas en dos series.

5.- Conidia globosa o elípticas, hialina, liza o delicadamente rugosa.

6.- Esclerocios típicos más no son producidos uniformemente, variando en forma y color en las especies (29).

4.- Sinónimos de A. ochraceus.

Aspergillus alutaceus Berkeley y Curtin

Aspergillus ochraceus var. microspora Tiraboschi

Aspergillus ochraceus var. microsporus f sp. floccosus

Ohmasa, Kawada y Nagashima

Sterigmatocystis helva Bainier (29).

5.- Características generales de A. ochraceus Wilhelm

El nombre de ochraceus, deriva del pigmento ochre, fué utilizado para especies viejas de este grupo por Wilhelm en 1877 y fué usado por Saccardo en cromatotaxia para designar más bien el color café-amarillo (29).

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología (3er. Piso) del edificio de la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L.

El estudio se dividió en las siguientes etapas:

- 1.- Se sembró en cajas Petri utilizando para ello, un medio de cultivo artificial (PDA) Papa-dextrosa-agar, el hongo causante de la pudrición texana Phymatotrichum omnivorum (Shear) Duggar. Inoculándose con el hongo antagónico Aspergillus ochraceus Wilhelm, para poder observar el efecto de inhibición.
- 2.- Se sembró en frascos con medio Bonner-Addicott líquido, Phymatotrichum omnivorum (Shear) Duggar y posteriormente se le inoculó con Aspergillus ochraceus Wilhelm.
- 3.- Se sembró en frascos conteniendo medio Bonner-Addicott Phymatotrichum omnivorum (Shear) Duggar, y para Aspergillus ochraceus Wilhelm se utilizó medio Czapek's líquido.
- 4.- En Bonner-Addicott líquido se sembró Aspergillus ochraceus con el fin de utilizarla en la siguiente etapa.
- 5.- Se sembró Phymatotrichum omnivorum en cajas Petri utilizando como medio PDA, para luego usar el medio líquido del punto anterior para observar si existía inhibición de crecimiento.

Materiales:

Se utilizó para el presente trabajo, el material propio para realizar la inoculación utilizando técnicas propias.

Métodos:

El objetivo primordial del presente trabajo es observar a Phymatotrichum omnivorum al ser inoculado con Aspergillus ochraceus, y en base a estas observaciones tratar de obtener datos respecto al control de dicho patógeno por medios biológicos.

El estudio se dividió para ello en cinco etapas, que son las siguientes:

1.- En cajas Petri utilizando medio de cultivo artificial (Papa-dextrosa-Agar) se sembró el hongo causante de la "Pudrición Texana", Phymatotrichum omnivorum (Shear) Duggar. Se dejó crecer dicho hongo y a los seis días de crecido se inoculó con el hongo antagónico Aspergillus ochraceus Wilhelm, y se le observó por 20 días.

La metodología de ésta etapa fué la siguiente:

Se preparó medio de cultivo artificial (PDA) Papa-Dextrosa-Agar, midiendosele el pH y resultó ser de 5.6; ya frío el medio se envolvieron con papel secante y se procedió a esterilizar, utilizando para ello una autoclave, el tiempo de esterilizar fué de 15 minutos y a 15 atmósferas de presión.

En el tiempo en que las cajas Petri con el medio de cultivo ya esterilizado tardaron en enfriarse, se procedió a esterilizar la cámara de transferencia utilizando para ello Fenol 10%.

Ya frío el medio de cultivo se procedió a sembrar el hongo Phymatotrichum omnivorum, para luego incubarlas a una temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2$.

En esta ocasión se sembraron 19 cajas Petri y siempre el hongo hacia el extremo de la caja, con el fin de que creciera hacia el otro extremo y poder medir su desarrollo. La medición tenía como objetivo el de observar si el hongo crecía más. Después de la medición se inoculó con el hongo antagónico Aspergillus ochraceus.

Un día antes de la inoculación de Aspergillus ochraceus se midió el crecimiento de Phymatotrichum omnivorum utilizando para ello un planímetro.

2.- En frascos de vidrio transparentes, utilizando como medio de cultivo Bonner-Addicott (líquido) se sembró Phymatotrichum

NOTA: Tanto la cámara de transferencia como toda la habitación se limpiaban con Fenol y después se prendía la lámpara de rayos ultravioleta con el fin de eliminar las esporas de los contaminantes que estuvieran en el aire. La lámpara permanecía prendida 20 minutos.

omnivorum inoculándose con Aspergillus ochraceus, haciendo -- variar la fecha de inoculación. El objetivo era el de encon-- trar la existencia de una inhibición por parte de Aspergillus ochraceus.

La metodología a seguir fué la siguiente:

Utilizando como medio de cultivo Bonner-Addicott (líquido) y siguiendo las técnicas de preparación se procedió a -- lo siguiente: se midió el pH al medio resultando ser 6.6, y -- se sembró como sigue:

- a) Se sembró Phymatotrichum omnivorum y al mismo tiem-- po Aspergillus ochraceus.
- b) Se sembró Phymatotrichum omnivorum y a los 10 días de crecido se inoculó con Aspergillus ochraceus.
- c) Se sembró Phymatotrichum omnivorum y a los 20 días de crecido se inoculó con Aspergillus ochraceus.
- d) Se sembraron como testigos 10 frascos de Phymato-- trichum omnivorum y 4 frascos de Aspergillus ochra-- ceus.

3.- La tercera etapa consistió en sembrar Phymatotrichum - - - omnivorum, utilizando como medio de cultivo artificial Bonner-Addicott (líquido) y Aspergillus ochraceus en medio de cultivo Czapek's (líquido), para luego aplicarle el medio donde se ha-- bía hecho crecer a Aspergillus ochraceus a Phymatotrichum - -

omnivorum.

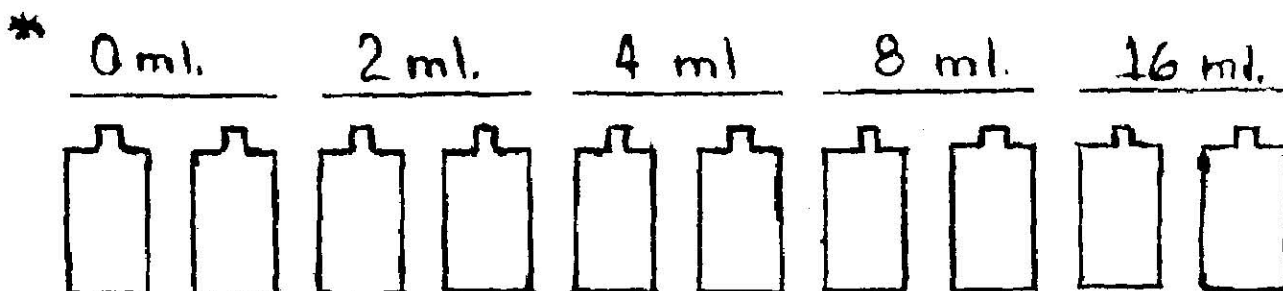
La metodología a seguir fué la siguiente:

Se preparó medio de cultivo Bonner-Addicott (líquido) y Czapek's (líquido); la técnica de preparación fué la misma que utilizamos en las etapas anteriores.

Además se tomaron los 10 frascos del paso anterior - que contenían Phymatotrichum omnivorum.

Se sembraron 22 frascos como sigue:

a) De los 10 frascos que tenían Phymatotrichum omnivorum ya crecidos se les aplicó la solución donde se había hecho crecer Aspergillus ochraceus.



* Fueron los mls. de la solución de Aspergillus ochraceus que se le aplicaron a Phymatotrichum omnivorum.

b) Se sembraron 12 frascos con Phymatotrichum omnivorum y a 4 de ellos se les aplicó 8 ml. de la solución del medio líquido de Aspergillus ochraceus, a otros 4 se les aplicó - - - 16 ml. de la solución del medio líquido de Aspergillus - - -

ochraceus y a los otros 4 se tomaron como testigo.

El objetivo era de observar si existía la inhibición del crecimiento de Phymatotrichum omnivorum por parte de Aspergillus ochraceus.

4.- Se sembró en frascos con Bonner-Addicott Aspergillus ochraceus, con el fin de utilizarlo en la siguiente etapa.

La técnica a seguir en la preparación del medio, así como la sembrada del hongo fué la misma utilizada en las etapas anteriores.

5.- Consistió en sembrar Phymatotrichum omnivorum en cajas Petri con medio de cultivo PDA y se les aplicaría el medio donde estaba Aspergillus ochraceus.

Se sembraron las cajas Petri como sigue:

a) 10 cajas Petri se sembraron con Phymatotrichum omnivorum y utilizando papel filtro (milipor) se les agregaría el medio donde se había crecido Aspergillus ochraceus.

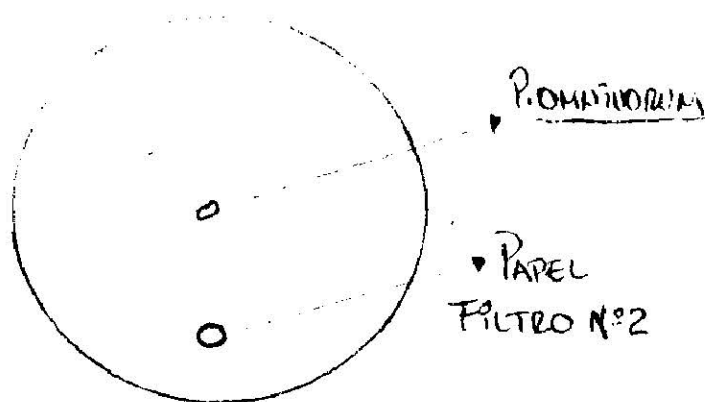
b) Se sembraron 10 cajas con Phymatotrichum omnivorum y a los 5 días se aplicaría la solución. Además se sembraron 5 cajas con Phymatotrichum omnivorum como testigo.

El objetivo de la etapa fué el saber si existía algo que Aspergillus ochraceus producía en el medio y que fuese capaz de inhibir el crecimiento de Phymatotrichum omnivorum.

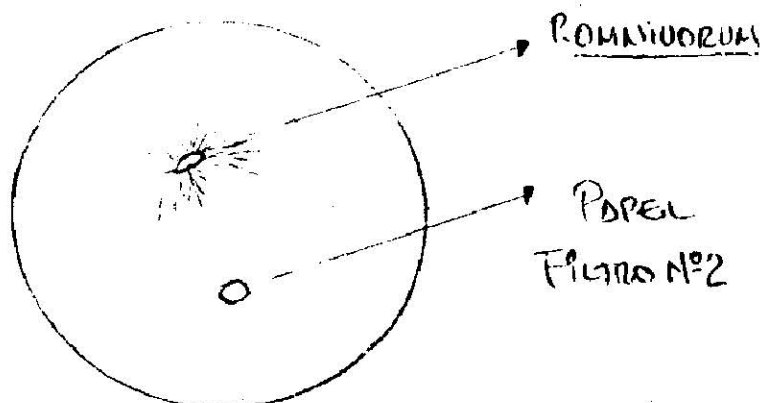
La metodología a seguir fué;

Se sembró Aspergillus ochraceus en Bonner-Addicott - (líquido) y después de 30 días de crecimiento se filtró la - solución utilizando para ello una bomba de vacío y como fil- - tro especial (milipor). Este filtro tiene la característica - de que el filtrado vaya libre de esporas.

Ya obtenido el filtrado se procedió a sembrar en ca- - jas Petri con PDA Phymatotrichum omnivorum y en la misma ca - ja, se ponía un circulito de papel filtro No. 2 embebido con la solución filtrada.



A los 5 días de crecido el Phymatotrichum omnivorum se les puso el papel filtro embebido con la solución filtra- - da de Aspergillus ochraceus.



Esta etapa se volvió a repetir, solamente que en lugar de filtrar la solución de Aspergillus ochraceus por medio del filtro milipor, se utilizó la técnica de la liofilización. Ya que se pensó que como se había trabajado la primera vez, el metabolito tóxico de Aspergillus ochraceus estuviera a muy baja concentración.

Frascos conteniendo Aspergillus ochraceus, se filtraron y luego se prepararon para liofilizarse.

La técnica de liofilización consiste en congelar una solución (Bonner-Addicott donde había crecido Aspergillus ochraceus) y luego someterla al vacío, para que el agua que contenía la solución se sublimara por efecto de la presión y solo quedarán los sólidos (que supuestamente era el metabolito tóxico de Aspergillus ochraceus).

Para esto se utilizó una liofilizadora marca Labconco, Modelo Freeze-Dry-12, propiedad de la Unidad Biomédica del Norte del I.M.S.S. Todo el proceso de la liofilización tardó 28 horas.

Se esterilizaron para traer la muestra liofilizada - tubos de tapón, y al mismo tiempo esterilizar papel Whatmann 3 mm, el cual se iba a utilizar en ésta etapa.

La muestra liofilizada se le agregaran 10 cc. de agua destilada estéril y luego se pasó por un papel filtro Whatmann No. 40 haciendo uso de una bomba de vacío; luego la solución

resultante se filtró utilizando para ello un papel filtro - - "Milipor", ya que este filtro ayuda a que el filtrado resulte sin esporas. Ya teniendo el filtrado se procedió a sembrar - - Phymatotrichum omnivorum en PDA (Papa-Dextrosa-Agar) y adjunto se pusieron papel filtro Whatmann 3 mm. que contenía la -- solución liofilizada. La forma en que se sembró fué la si- -- guiente:

- a) Se puso Phymatotrichum omnivorum y el papel filtro juntos.
- b) Se puso el Phymatotrichum omnivorum y a unos 1.5-2.0 cm. se puso el papel filtro.
- c) Se puso el Phymatotrichum omnivorum y a una distancia de 2.5 cm. el papel filtro.
- d) Se puso el Phymatotrichum omnivorum al centro y se rodeó con papel filtro.
- e) Además se puso en cajas Petri un papel aluminio que sirviera de división, y se sembraron en cada división Phymatotrichum omnivorum y solo a una parte se le puso adjunto papel filtro. La división donde iba a quedar Phymatotrichum omnivorum solo quedó como testigo de la otra división.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos del presente trabajo se contemplan a continuación:

El trabajo se dividió en 5 pasos o etapas, que son -- las siguientes:

1.- Cuando se sembró en cajas Petri (utilizando como substrato PDA Papa-Dextrosa-Agar) el hongo Phymatotrichum - - omnivorum con 6 días de crecimiento se inoculó con el hongo - antagónico Aspergillus ochraceus. Un día antes fué medido el crecimiento radial de Phymatotrichum omnivorum; a los tres días de haber inoculado con Aspergillus ochraceus, se notó que - en cajas donde existía mayor crecimiento de P. omnivorum empezaba la inhibición de éste mismo. Figuras 4 y 5.

Durante un tiempo de 20 días se observaron las cajas - Petri que contenían a los dos hongos, para observar la acción antagónica por parte de A. ochraceus para P. omnivorum. Ya cer - ciorados de que en realidad existía o se presentaba la inhibi - ción se planteó los siguientes experimentos:

a) Se sembró los dos hongos en medios líquidos para ob - servar si se presentaba la inhibición y

b) Hacer crecer en Bonner-Addicott (líquido) a P. - - omnivorum y en medio líquido Czapek's a A. ochraceus, ya que - se sospechaba que el hongo antagónico soltaba o desprendía - -



FIGURA 4.- Fotografía mostrando la acción antagónica de Aspergillus ochraceus Vs. Phymatotrichum omnivorum.



FIGURA 5.- Acercamiento de la acción antagónica de Aspergillus ochraceus Vs. Phymatotrichum omnivorum. Notese la zona de inhibición.

alguna substancia en el medio que hacia que se presentara la inhibición.

2.- Cuando se hizo crecer en medio líquido Bonner-Addicott a P. omnivorum, haicnedo variar la fecha de inoculación del hongo antagónico según los siguientes tratamientos:

T₁) Se sembró al mismo tiempo y en el mismo recipiente P. omnivorum y A. ochraceus.

T₂) Se sembró primero P. omnivorum y a los 10 días de crecimiento, se inoculó con A. ochraceus.

T₃) Se sembró primero P. omnivorum y a los 20 días de crecimiento, se inoculó con A. ochraceus.

T₄) Fué como testigo, sembrando a los dos hongos por separado.

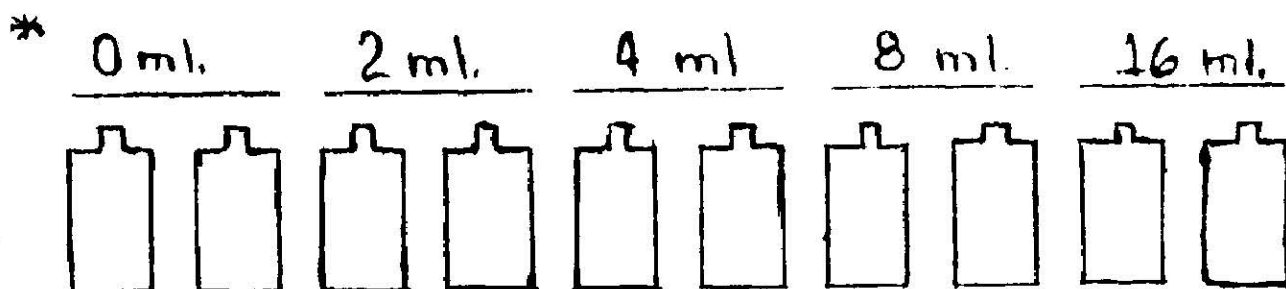
Los resultados que se obtuvieron fué que nuevamente se presentaba la inhibición del crecimiento de Phymatotrichum omnivorum por parte de Aspergillus ochraceus.

Dado lo acontecido en los dos pasos anteriores, se procedio a preparar el siguiente experimento:

3.- Se sembró en medio Bonner-Addicott (líquido) P. -

omnivorum y en Czapek's (líquido) a A. ochraceus, haciendo lo siguiente:

a) 10 frascos conteniendo como substrato el medio líquido Bonner-Addicott en los cuales había crecido P. omnivorum se les agregó la solución donde se había hecho crecer Aspergillus ochraceus haciendo variar los mililitros a cada frasco según lo siguiente:



b) Además se sembraron 12 frascos con Phymatotrichum omnivorum y se hizo lo siguiente:

T₁) 4 de ellos se les agregó 8 mls. de la solución del

medio líquido donde había crecido anteriormente A. ochraceus.

T₂) 4 de ellos se les agregó 16 mls. de la solución del medio líquido donde había crecido anteriormente A. ochraceus.

T₃) 4 de ellos fueron utilizados como testigos.

Obteniendose los siguientes resultados:

Se presentó la inhibición del crecimiento, solamente - que al filtrar el medio (de A. ochraceus) se pasaron esporas - lo que produjo que el hongo creciera. Debido a lo acontecido, se buscó alguna técnica para poder obtener el filtrado libre - de esporas, para lo cual se utilizó la técnica del filtrado -- por Milipor.

Ya que se conoció la técnica apropiada, se hicieron los siguientes dos experimentos que consistieron en:

4.- Sembrar en Bonner-Addicott (líquido) Aspergillus - ochraceus para que se utilizara en el siguiente experimento.

5.- Aquí se sembró Phymatotrichum omnivorum en cajas - Petri, utilizando como substrato PDA para luego hacer lo siguiente:

T₁) Se sembró Phymatotrichum omnivorum y al mismo tiem- po se pusieron en las cajas Petri papel filtro que estaba embe-

bido con el metabolito tóxico de Aspergillus ochraceus.

T₂) En cajas que contenías P. omnivorum con 5 días de crecimiento se pusieron trozos de papel filtro embebidos con la solución (metabolito tóxico) filtrada de Aspergillus ochraceus.

T₃) Como testigo solo se sembró Phymatotrichum omnivorum.

Obteniendo los siguientes resultados:

Tanto en el T₁ como T₂ se notó que en algunas cajas existió la inhibición solamente por 1 ó 2 días, creciendo después Phymatotrichum omnivorum. Por lo que se pensó que la solución filtrada por Milipor estaba en muy baja concentración el metabolito tóxico de Aspergillus ochraceus. Por tal motivo se pensó repetir el paso, haciendo crecer A. ochraceus y luego este medio, liofilizarlo para así disminuir el volumen pero para aumentar la concentración del metabolito tóxico en la solución.

En este paso se sembró Phymatotrichum omnivorum en cajas Petri utilizando como substrato PDA, y acomodando el papel filtro de la siguiente manera: Figura 6.

a) Phymatotrichum omnivorum y el papel filtro Wathmann 3mm. embebido con la solución liofilizada de A. ochraceus con 0.5 cms. de separación.

b) Phymatotrichum omnivorum y a 1.5-2.0 cms. del papel



FIGURA 6.- Fotografía mostrando al hongo Phymatotrichum -- omnivorum con un círculo de papel filtro Wathmann 3 mm. embebido de la solución o metabolito tóxico de Aspergillus ochraceus, en la cual no se presentó la inhibición Phymatotrichum omnivorum.

filtro.

- c) Phymatotrichum omnivorum y a 2.5 cms. el papel filtro.
- d) Phymatotrichum omnivorum al centro rodeado por 4 -- puntos de papel filtro.

e) Además en cajas Petri se dividió utilizando para ello papel aluminio para así obtener dos partes en la caja. En una -- parte se sembró Phymatotrichum omnivorum y adjunto se puso el -- papel filtro Whattman 3 mm. embebido de la solución liofilizada, y en la otra parte se sembró solamente Phymatotrichum omnivorum sirviendo este como testigo.

Lós resultados que se obtuvieron fueron de que no se -- presentó la inhibición de crecimiento de Phymatotrichum omnivorum.

Figura 7.



FIGURA 7.- Tratamientos en donde se utilizó la técnica de liofilización con diferentes distancias entre Phymatotrichum omnivorum y el círculo de papel filtro embebido de la solución del metabolito tóxico de Aspergillus ochraceus.

C O N C L U S I O N E S

Actualmente el uso del control biológico contra enfermedades, está siendo estudiada con gran interes. En el presente trabajo, las conclusiones de los resultados se contemplan a continuación:

El experimento para su estudio fué dividido en etapas, presentandose solamente la inhibición de crecimiento de Phymatotrichum omnivorum, usando como microorganismo antagónico a Aspergillus ochraceus, solo cuando el organismo vivo del hongo antagónico estaba presente. Con lo anterior se quiere decir de que solo en la primera, segunda y tercera etapa, existió la inhibición de crecimiento de Phymatotrichum omnivorum, y de que en la quinta etapa no se presentó la inhibición de crecimiento de Phymatotrichum omnivorum.

Debido a estos resultados se pueden hacer las siguientes conclusiones:

1.- De que probablemente el hongo antagónico (Aspergillus ochraceus) perdiera su patogenicidad.

2.- De que a la solución donde se había hecho crecer a Aspergillus ochraceus le pudiera haber afectado los rayos de la luz, y así descompondría el "metabolito tóxico".

3.- De que probablemente el hongo Aspergillus ochraceus

dejará de elaborar o producir la "substancia" o el "metabolito tóxico" y así no se presentará la inhibición.

4.- Y de que tal vez el medio (Bonner-Addicott líquido) no fuera el apropiado.

RECOMENDACIONES

Las recomendaciones que se pueden hacer después de haber sido observado tanto a Phymatotrichum omnivorum y a Aspergillus ochraceus son las siguientes:

- 1.- Probar como organismo antagónico a otros microorganismos, que inhiben el crecimiento de Phymatotrichum omnivorum.
- 2.- Utilizar otros medios de cultivo para que se pueda obtener el "metabolito tóxico" del hongo antagónico.
- 3.- Realizar mas pruebas de antagonismo, tales como el micro cultivo.
- 4.- Hacer la prueba de liofilización y casi al instante utilizar la solución.
- 5.- Hacer un buen manejo del frasco, procurando de que los rayos del sol le insidan lo menos posible.

Las anteriores recomendaciones se describen ya que si se presentó la inhibición, solamente que en partes.

R E S U M E N

Las pudriciones radiculares causadas por Phymatotrichum omnivorum, también conocido como "Pudrición Texana" es una de las enfermedades más destructivas, ya que ataca a cerca de - - 2,000 especies de plantas dicotiledoneas, las monocotiledoneas, no sufren daño aún cuando se pueden encontrar rizomorforos del hongo sobre las raíces de algunas gramíneas.

El control químico para esta enfermedad, resulta demasiado costoso e ineficiente. El uso de nuevas técnicas tales - como el control biológico ha dado resultados satisfactorios, - al menos a nivel de laboratorio.

Se han probado varios microorganismos que son antagóni - cos a este hongo, entre los que resaltan varias especies del - género Streptomyces, algunas bacterias como Pseudomonas, etc.

En este trabajo utilizamos como hongo antagónico a un miembro de los Deuteromycetes, Aspergillus ochraceus. Realizando pruebas de laboratorio, tales como sembrar en cajas - - Petri a los dos hongos; así como utilizando matraces para sem - brar los dos microorganismos en medios líquidos; y utilizando técnicas de filtrado tales como: "Milipor" y "Liofilización".

Los resultados obtenidos demuestran de que sí existe -

antagonismo entre los dos microorganismos, solamente que esta inhibición que se presenta no es satisfactoria totalmente. Obteniéndose como conclusión de que el hongo antagónico perdió su patogenicidad, según los resultados, ya que no existió inhibición de crecimiento para Phymatotrichum omnivorum utilizando solamente el "metabolito tóxico" de Aspergillus ochraceus.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- ANONIMO. 1969. Se pueden reducir las pérdidas causadas por la Pudrición de la raíz del algodón. Algodón Mexicano. Mayo-Junio 1969. pp. 53-57.
- 2.- ALEXOPOULUS, C.P. 1979. Introducción a la Micología, Ed. - Universitaria, Buenos Aires. pp. 265-278.
- 3.- BANIECKI, J.F. and BLOSS, H.E. 1969. Effects of sterols and light on sporulation and germination of conidia of - - Phymatotrichum omnivorum. Phytopathology 59: 680-684.
- 4.- _____ and BLOSS, H.E. 1969. The basidial stage of - - - Phymatotrichum ominorum. Mycología 61: 1054-1059.
- 5.- BARRAS, S.J. 1969. Penicillium implicatum antagonistic to Ceratocystis minor and C. ips. Phytopathology 59: 520.
- 6.- BLACK, H.S. 1968. Pectolytic enzyme production by Phymatotrichum omnivorum. Phytopathology 58: 1044 (Abstract)
- 7.- _____ and TANG, M. 1967. A histological study of - - - Phymatotrichum omnivorum infected corn roots. Bio-Science 57:903 (Abstract).
- 8.- BLOSS, H.E. 1970. Especies observadas de Phymatotrichum. The University of Arizona. Journal of Arizona Academic of Science Vol. 6 #2 Oct.

- 9.- _____ and GRIES, G.A. 1967. Physiologic responses of -
resistant and susceptible root tissues infected with
Phymatotrichum omnivorum. Phytopathology 57: 380-383.
- 10.- CASTREJON, S.A. 1974. Estudio químico y biológico del me
tabolito tóxico del hongo Phymatotrichum omnivorum. -
Tesis I.T.E.S.M. Programa de Graduados.
- 11.- _____ 1975. Estudio del desarrollo "in vitro" de - -
Phymatotrichum omnivorum (Shear) Duggar, utilizando -
tres diferentes medios artificiales de cultivo. CIANE-
INIA-SAG.
- 12.- _____ 1976. "Pudrición Texana" Organismo causal y - -
etiología de la enfermedad. CIANE-INIA-SAG.
- 13.- _____ y CERVANTES, M.C. 1974. Estudio preliminar de -
los desechos metabólicos del hongo Phymatotrichum - -
omnivorum, relacionados con la sintomatología de la -
enfermedad. CIANE-INIA-SAG.
- 14.- _____ y CERVANTES, M.C. 1974. Aislamiento y prueba de
Actinomyces antagónicos al hongo Phymatotrichum - -
omnivorum (Shear) Duggar, causante de pudriciones de
la raíz. CIANE-INIA-SAG.
- 15.- CERVANTES, CASTREJON y GUERRA. 1974. Atracción de chicha
rritas a fenoles extraídos de diferentes variedades -
de vid enfermas con Pudrición Texana en la Comarca La
gunera. CIANE-INIA-SAG.

- 16.- CHAVEZ, H.B. et al. 1977. Effects of crop residues in soil on Phymatotrichum omnivorum root rot of cotton. Mycopathologia 58: 1-7.
- 17.- DAVID, C.H. and HSI. 1968. Antagonistic effects of Aspergillus niger on Macrophomina phaseoli. Phytopathology 58: 729.
- 18.- DE LA JARA, A.F. 1975. La interacción de los herbicidas con el medio ambiente. Distribución Shell de México, S.A. 70/75, (Boletín).
- 19.- DUNLOP, A.A. 1941. A convenient soil-culture method for obtaining sclerotia of cotton root rot fungus. Amer. Jour. Bot. 28: 945-947.
- 20.- EZEKIEL, TAUBENHAUS y FUDGE. 1931. Nutritional studies on Phymatotrichum omnivorum. Phytopathology 21: 120, (Abstract).
- 21.- GARRET, S.D. 1970. Pathogenic Root-Infecting Fungi. Cambridge, Inglaterra, Cambridge at the University Press. pp. 95-96, 209-212.
- 22.- HUBER, ANDERSON y FINLEY. 1966. Mechanisms of biological control in a bean root rot soil. Phytopathology 56: 953-955.
- 23.- KNAUSS, J.F. 1976. In vitro antagonistic activity of several Streptomyces spp. against species of Pythium

- and Phytophthora. Plant Disease Report 60: 846-850.
- 24.- LYDA, S.D. 1978. Ecology of Phymatotrichum ominorum. -
Ann. Rev. Phytopathology 16: 193-209.
- 25.- _____ and BURNETT, E. 1971. Influence of temperature
on Phymatotrichum sclerotial formation and disease --
developmet. Phytopatology 61: 728-730.
- 26.- _____ and BURNETT, E. 1971. Changes in carbon dioxide
levels durin sclerotial formarion by Phymatotrichum -
omnivorum. Phytopathology 61: 858-861.
- 27.- MARROQUIN, V.J. 1978. Mecanismos de defensa de las plan-
tas contra los patógenos. Seminario de Tesis (Inédito).
Facultad de Agronomía de la U.A.N.L.
- 28.- NATIONAL ACADEMIC OF SCIENCE, U.S. 1978. Desarrollo y --
control de las enfermedades de las plantas. Tr. Manuel
Aragones A. México, Limusa. pp.
- 29.- RAPER, K.B. and FENNEL, D.L. 1973. The Genus Aspergillus
with a chapter on Pathogenicity, Robert. E. Krïeger -
Publishing Company. pp.
- 30.- SANCHEZ, A.A. 1978. Relaciones Ecológicas Interparasita-
rias. (Comensalismo, Sinergismo y Antagonismo). Semi-
nario de Tesis (Inédito). Facultad de Agronomía de la
U.A.N.L.

- 31.- STAKMAN, E.C. y HARRAR, J.G. 1968. Principios de Patología Vegetal. E.U.D.E.B.A., Buenos Aires. pp. 80, 466.
- 32.- STREETS, R.B. 1978. Texas root rot of Alfalfa. University of Arizona.
- 33.- _____ 1969. Disease of the cultivated plants of the southwest. Tucson, Arizona. The University of Arizona Press. pp. 7-20.
- 34.- _____ and BLOSS, H.E. 1976. Phymatotrichum Root Rot (Monograph # 8) The University of Arizona.
- 35.- TAUBENHAUS, J.J. et al. 1936. A rating of plants with reference to their relative resistance or susceptibility to Phymatotrichum root rot. Texas Agr. Exp. Sta. (Bulletin 527).
- 36.- U.S.D.A. Washington, D.C. 1965. Enfermedades de las Plantas. Ed. Herrero, S.A. México. pp. 343-346.
- 37.- WHALEY, J.M. and BOYLE, A.M. 1967, Antibiotic production by Streptomyces species from the rhizosphere of desert plants, *Phytopathology* 57: 347.
- 38.- WHEELER, J.E. and HINE, R.B. 1972. Influence of soil temperature and moisture on survival and growth of strands of Phymatotrichum ominorum, *Phytopathology* 62: 828-832.

- 39.- WOODS, R., BLOSS, H.E. and GRIES, G.A., 1967. Induction of sporulation of *Phymatotrichum* on a defined medium. *Phytopathology* 57: 228.
- 40.- ZARAZUA, G.A. 1980. Influencia del pH en el crecimiento y la patogenicidad de *Phymatotrichum omnivorum* (Shear) Duggar, sobre plántulas de algodón "in vitro". Tesis (Inédita). Facultad de Agronomía de la U.A.N.L.

A P E N D I C E

Medios de cultivos artificiales utilizados en el presente experimento:

Bonner-Addicott (Líquido)

| Reactivo - - - - - | Cantidad |
|---|------------|
| Ca(NO ₃) ₂ ·4 H ₂ O - - - - - | 1.425 gr. |
| MgSO ₄ ·7 H ₂ O - - - - - | 0.105 gr. |
| KNO ₃ - - - - - | 0.425 gr. |
| KCL - - - - - | 0.305 gr. |
| KH ₂ PO ₄ - - - - - | 0.100 gr. |
| Citrato Férrico - - - - - | 1.500 mgs. |
| Tiamina - - - - - | 1.000 mgs. |
| Ac. Nicotínico - - - - - | 1.000 mgs. |
| Glucosa - - - - - | 20.00 gr. |
| H ₂ O Destilada - - - - - | 1.000 mls. |
| Streptomycin - - - - - | 100 ppm. |

NOTA: La preparación del medio es la siguiente:

La sales que se utilizaron (KNO₃, KCL, MgSO₄·7 H₂O, etc.) se disolvieron en 500 mls. de agua destilada, haciendo lo mismo para los aminoácidos (Tiamina, Ac. Nicotínico, etc.) ya disueltas por separado se mezclaban los dos y se les aplicaba 100 p.p.m. de Streptomycin y se ponía a esterilizar a 15 lbs. de presión durante 15 minutos.

= P D A =

| | |
|--------------------------------------|------------|
| Papa - - - - - | 200 gr. |
| Dextrosa - - - - - | 20 gr. |
| Agar - - - - - | 20 gr. |
| H ₂ O Destilada - - - - - | 1.000 mls. |
| Streptomicina - - - - - | 100 ppm. |

NOTA: Se utiliza este medio para poder tener el hongo siempre "nuevo".

Para la preparación se debe de hacer lo siguiente:

En 500 mls. de agua destilada se agregan los 200 gr. - de Papa y se ponen a hervir, luego de algún tiempo, se cuela - la papa y solo se utiliza la solución.

Por separado en 500 mls. de agua destilada se le agre- ga la Dextrosa y el Agar y se deja hervir durante algún tiempo.

Ya teniendo las dos soluciones se procede a vertir el preparado de la papa al preparado de Dextrosa-Agar. Se dejan - hervir por algún tiempo agitandolo y se le agrega luego la - - Streptomicina. Esto se esteriliza a 15 lbs. de presión durante 15 minutos.

MEDIO DUNLOP

50 mls. de suelo cribado
10 mls. de semilla de sorgo
20-30 mls. de agua destilada

Esto se coloca en un matraz Erlenmeyer de 250 mls., primero el suelo, luego la semilla de sorgo distribuyéndola sobre la superficie del suelo y por último el agua destilada; ésta debe de humedecer perfectamente todo el suelo. Se tapa el matraz con una "turna" y se esteriliza (15 atm. de presión/30 minutos).

NOTA: En un trabajo realizado por Castrejon, S.A. (CIANE, INIA, SAG) menciona la siguiente metodología para que el hongo - - - Phymatotrichum omnivorum se desarrolle mejor, y es la siguiente:

En un matraz Erlenmeyer de 250 mls. se pone el suelo cribado, luego se pone el sorgo, agregándose que quede bien distribuido y después se pone el agua destilada. Se deja que germine -- el grano de sorgo y cuando esté rompa el tegumento de la semilla se procede a esterilizar a 15 atm. de presión durante 30 minutos.

