

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS
SUPERIORES DE MONTERREY
DIVISION DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
Y MARITIMAS

METODO DE LABORATORIO PARA INDUCIR
MARCHITEZ EN ALFALFA Y ALGODON CON
Phymatotrichum omnivorum (Shear) Duggar

TESIS

EDUARDO BRAMBILA GOMEZ

1981

TL
SB205
.A4
B7
c.1

1966



1080110972

11-Dic-81

Dr. Isaias Flores:

Le agradezco sinceramente la ayuda que me brindó a lo largo de mi carrera ya que el interés que usted demuestra en el progreso de uno es algo que levanta mucho los ánimos y motiva a seguir superándose.

Su alumno y amigo:

E. Brambila

3 4644

24378

INSTITUTO TECNOLOGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY

DIVISION DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y MARITIMAS

METODO DE LABORATORIO PARA INDUCIR MARCHITEZ
EN ALFALFA Y ALGODON CON Phymatotrichum omni-
vorum (SHEAR DUGGAR).

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OPTAR AL TITULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGRONOMO EN PRODUCCION AGROPECUARIA

P O R

EDUARDO BRAMBILA G.

1 9 8 1

FTL
SB205
-AY
G76



A MIS PADRES:

Bertila Gómez de Brambila

Sergio Brambila de la Mora

Con todo mi cariño y profundo agradecimiento.

A MIS HERMANAS:

Dora y Julieta.

Mi sincero agradecimiento
al Dr. Agustín Sánchez O.
por la asesoría que me dió
en esta investigación.

Mi agradecimiento al Sr. Homero Flores
Flores por la ayuda desinteresada que
me brindó a lo largo de mis estudios
universitarios.

A MIS MAESTROS

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS.

INDICE

	<u>Página</u>
INTRODUCCION	1
LITERATURA REVISADA	4
Importancia económica	4
Distribución de patógeno	5
Hospederas	6
Altamente susceptibles	6
Susceptibles	7
Resistentes	7
Etiología del hongo	8
Estados que presenta el hongo	8
Vegetativo	8
Esclerocio	9
Conidial	10
Taxonomía	11
Bioquímica y Fisiología del hongo	14
Carbohidratos	14
Nitrógeno	14
Nutrición de minerales	15
pH	15
Metabolismo	16
Interacción CO ₂ , minerales y fuentes de carbono	16
Composición lípida del hongo	16

	<u>Página</u>
Enzimas	16
Epifitiología	17
Propiedades químicas y físicas del suelo donde se presenta la Pudrición Texana...	17
pH del suelo	18
Gases del suelo	18
Temperatura del suelo	18
Sodio en el suelo	19
Fisiología de la enfermedad	19
Resistencia química	19
Resistencia biológica	20
Sintomatología	21
Control	22
Rotación de cultivos	22
Intemperización y roturación	23
Escape	24
Incorporación de materia orgánica al sue lo	24
Control biológico	24
Fertilizantes y sustancias inorgánicas..	28
Plantas y productos químicos utilizados como barreras	29
Fungicidas y fumigantes	30
Variedades resistentes	32
Cuarentenas	33

Método Arizona	34
Métodos experimentales	35
Obtención de esclerocios en el laboratorio	35
Inoculación de plantas de algodón con el hongo bajo condiciones de invernadero y de campo.....	36
Inoculación de plantas de algodón con <u>P. omnivorum</u> bajo condiciones de invernadero, utilizando recipientes plásticos	37
Inoculación de plantas de algodón con el hongo, cultivadas en arena	37
Inoculación de plantas de algodón con esclerocios de <u>P. omnivorum</u>	39
Inoculación de plantas de algodón con el hongo en medio líquido y en arena.....	40
Inoculación de plantas de algodón utilizando semillas de sorgo infectadas con el micelio del hongo;.....	42
MATERIAL Y METODOS	45
Introducción	45
Obtención de cultivos puros	46
Multiplicación de <u>Phymatotrichum omnivorum</u>	50
Método de Dunlap modificado, con semillas de sorgo	51

Método de Dunlap modificado, con semillas de maíz	52
Inducción de la marchitez en plantas de alfalfa	53
Prueba 1. Efecto de dos niveles de tierra en la marchitez de alfalfa.....	53
Prueba 2. Efecto de la luz sobre el desarrollo del hongo y su patogenicidad.....	57
Prueba 3. Comparación de suelos de Nuevo León y arcilla negra de Houston (HBC) en el desarrollo de la enfermedad.....	59
Prueba 4. Influencia de la materia orgánica estéril sobre el desarrollo del hongo.....	61
Prueba 5. Efecto de niveles de sorgo en la marchitez de la alfalfa.....	63
Prueba 6. Comparación de dos tipos de inóculo.....	65
Prueba 7. Comparación de tres tipos de recipientes.....	66

Inducción de la marchitez en plantas de algodón	68
Prueba 8. Efecto de dos tipos de tierra sobre la marchitez del algodón	68
Prueba 9. Efecto de la tierra esterilizada y no esterilizada sobre la marchitez del algodón	71
Prueba 10 Inducción de la enfermedad en algodón utilizando tubos de vidrio de 3.6 cm de diámetro....	72
RESULTADOS Y DISCUSION.....	75
Obtención de cultivos puros	75
Multiplicación de <u>Phymatotrichum omnivorum</u> ...	78
Método de Dunlap modificado, con semillas de sorgo	78
Método de Dunlap modificado, con semillas de maíz	80
Inducción de la marchitez en plantas de alfalfa	80
Prueba 1. Efecto de dos niveles de tierra en la marchitez de alfalfa	81
Prueba 2. Efecto de la luz sobre el desarrollo del hongo y su patogenicidad.....	83
Prueba 3. Comparación de suelo de Nuevo	

León y arcilla negra de Houston (HBC) en el desarrollo de la en- fermedad	84
Prueba 4. Influencia de la materia orgáni- ca estéril sobre el desarrollo del hongo	86
Prueba 5. Efecto de niveles de sorgo en - la marchitez de la alfalfa.....	88
Prueba 6. Comparación de dos tipos de - inóculo.....	90
Prueba 7. Comparación de tres tipos de re- cipientes	92
Inducción de la marchitez en plantas de algo- dón	94
Prueba 8. Efecto de dos tipos de tierra - sobre la marchitez del algodón..	94
Prueba 9. Efecto de la tierra esteriliza- da y no esterilizáda sobre la - marchitez del algodón.....	96
Prueba 10. Inducción de la enfermedad en - algodón utilizando tubos de vi- drio de 3.6 cm de diámetro.....	98
CONCLUSIONES	100
RESUMEN	103
BIBLIOGRAFIA	113

INDICE DE TABLAS

<u>Tabla No.</u>		<u>Página</u>
1	Efecto de 20 y 30 gr de HBC en la marchitez de alfalfa (variedad comercial Velluda Peruana) a 28°C.....	55
2	Efecto de la luz sobre el desarrollo del hongo y su patogenicidad.....	58
3	Tratamientos efectuados con la finalidad de determinar el efecto de dos tipos de tierra sobre el desarrollo de la Pudrición Texana.....	60
4	Efecto de la materia orgánica estéril (granos de sorgo estériles) sobre el desarrollo del hongo.....	62
5	Efecto de 0, 10, 20, 30 y 40% de sorgo estéril sobre el desarrollo de la enfermedad en plantas de alfalfa.....	64
6	Comparación entre las semillas de sorgo y de maíz infectadas con el hongo, empleadas como inóculo.....	66

7	Comparación entre tubos de ensayo, matraces y botellas planas como recipientes empleados en la inducción de la enfermedad en alfalfa.....	67
8	Efecto de la tierra de Nuevo León y la arcilla negra de Houston (HBC) en el desarrollo de la enfermedad en algodón (v.c. Deltha Pine).....	70
9	Efecto de la tierra de Nuevo León estéril y no estéril sobre la Pudrición Texana en algodón (v.c. Deltha Pine)....	71
10	Inducción de la Pudrición Texana en plantas de algodón utilizando tubos de vidrio de 3.6 cm de diámetro.....	74
11	Procedimientos de aislamiento, número de tubos de ensayo utilizados, número de tubos contaminados, rizomorfos no viables y número de cultivos puros obtenidos.....	76
12	Días a la marchitez de la alfalfa sem-	

	brada en tubos de ensayo con 20 y 30 gr de arcilla negra de Houston (HBC).....	82
13	Días a la marchitez de la alfalfa sembrada en tubos de ensayo con 20 gr de HBC con y sin luz.....	84
14	Días a la marchitez de la alfalfa sembrada en tubos de ensayo con arcilla negra de Houston (HBC) y tierra de Nuevo León.....	85
15	Efectos que se presentaron en el desarrollo del hongo al incorporar materia orgánica estéril en la tierra en diferentes posiciones dentro del tubo de ensayo.....	87
16	Efecto de 0, 10, 20, 30, y 40% de sorgo estéril mezclado en la tierra, sobre el desarrollo del hongo y la enfermedad en plantas de alfalfa.....	89
17	Días a marchitez de alfalfa y % de mortalidad comparando semillas de sorgo y	

	maíz infectadas con el micelio del hon- go, utilizadas como inóculo.....	91
18	Comparación de tres tipos de recipien- tes en su efecto sobre los días a mar- chitez de alfalfa y % de mortalidad, -- utilizando tierra de Nuevo León.....	93
19	Días a la marchitez del algodón y % de mortalidad comparando los efectos de la arcilla negra de Houston con la tierra de Nuevo León en botellas de 1 lt.....	95
20	Días a la marchitez y % de mortalidad - en plantas de algodón en tierra esteril- izada y no esterilizada, utilizando bo- tellas de 1 lt.....	97
21	Días a la marchitez y % de mortalidad - de algodón sembrado en tubos de vidrio de 3.6 cm de diámetro con tierra de Nue- vo León y 10% de sorgo estéril.....	99

INDICE DE FIGURAS

Figura No.

Página

- | | | |
|---|---|----|
| 1 | Diagrama que muestra el proceso que se utilizó para la desinfección y siembra de rizomorfos de <u>Phymatotrichum omnivorum</u> con la finalidad de obtener cultivos puros..... | 50 |
| 2 | Diagrama que muestra la forma en que se multiplica el hongo utilizando frascos planos de 250 ml..... | 53 |
| 3 | Diagrama que muestra la forma en que se colocaron los tubos de ensayo con el objetivo de observar el efecto de dos niveles de tierra sobre la marchitez de la alfalfa..... | 56 |
| 4 | Diagrama que muestra la colocación de un gramo de sorgo dentro de los tubos de ensayo, para observar la influencia que tiene la materia orgánica estéril sobre el desarrollo del hongo..... | 63 |

5	Diagrama que muestra la comparación que se realizó entre tubos de ensayo, matraces y frascos planos, utilizados como recipientes en la inducción de la <u>Pudrición Texana</u> en alfalfa.....	68
6	Diagrama que muestra el tubo de vidrio utilizado en la inducción de la <u>enfermedad</u> en plántulas de algodón.....	74

INTRODUCCION

El 90% de la dieta humana lo constituyen las plantas cultivadas, las cuales se ven severamente afectadas por factores bióticos y abióticos, encontrándose entre los primeros principalmente a los insectos y a los hongos -- (96), las enfermedades fitopatológicas causan pérdidas en los cultivos al destruirlos parcial o totalmente.

Entre los microorganismos causantes de estas enfermedades sobresale por su gran importancia el Phymatotrichum omnivorum, ya que ataca a más de 2,000 especies de plantas dicotiledóneas cultivadas y silvestres, encontrándose entre ellas cultivos de gran importancia económica como lo son el algodón, la alfalfa, el frijol, la soya y los árboles frutales (6).

Esta enfermedad se encuentra distribuida en el suroeste de los Estados Unidos de América y el norte de México-- (55) y se considera que la Pudrición Texana causa su principal daño en el cultivo del nogal, llegando a ser el factor más limitante a este cultivo en la Comarca Lagunera-- (13).

El control de esta enfermedad se ha estudiado por -- casi 100 años (55), encontrándose productos químicos sin téticos con resultados favorables como el Benlate y el - TBZ (45), también es utilizado el tratamiento Arizona -- (94) que consiste en la aplicación al suelo de estiércol, azufre y sulfato de amonio. Estos medios de control tienen un costo muy elevado por lo que sólo son aplicables a cultivos altamente remunerativos como los árboles frutales. La rotación de cultivos es una práctica que ha resultado poco efectiva (74).

El principal problema al que se enfrenta la investigación en México, es la falta de un método que asegure la - muerte de las plantas inoculadas con el hongo, una vez - que se establezca el método se podrán llevar a cabo bioensayos tendientes a controlar esta enfermedad en el laboratorio y en el invernadero, utilizando sintéticos y - naturales, resistencia genética de las plantas, control biológico con bacterias, hongos u otros microorganismos - que sean parásitos de P. omnivorum. Esta metodología permitiría trabajar con el hongo bajo condiciones controladas de humedad, luz, temperatura, pH, nutrientes y evitaría el problema del ataque contaminantes en las unidades experimentales.

El objetivo de esta investigación es establecer el mé

todo óptimo para inducir esta enfermedad en algodón y al
falda, bajo condiciones controladas y pretende facilitar
los futuros trabajos de investigación que se realicen con
la finalidad de conocer mejor este importante patógeno, -
sus relaciones bióticas y abióticas con el medio y las --
formas en que este hongo puede ser controlado con eficien
cia.

LITERATURA REVISADA

Importancia Económica

Como se mencionó anteriormente, la Pudrición Texana es una de las enfermedades mas destructivas que se presentan en los cultivos de plantas dicotiledóneas (52), algunos de los cultivos más dañados por esta enfermedad son el algodón, la alfalfa, frutales (29), en especial el nogal (42).

En Texas las dos terceras partes del estado que se dedican al cultivo del algodón están atacadas por el hongo, causando pérdidas estimadas en 60 millones de dólares al año, en el mismo estado se considera que la pérdida ocasionada por el ataque del hongo en el conjunto de los distintos cultivos es de 100 millones de dólares (104, 98), y más de la mitad de los daños ocurren en la región de Blackland (65). En zonas cercanas a Temple Texas (44), se reportan incidencias que llegaron a ser del 74% en 1959. En campos experimentales cercanos a Meza, Arizona tuvieron pérdidas del 100% en 1958 y 1959 (88), y en todo el estado se calcula conservadoramente que el daño que causa el hongo tiene un valor de 5 millones de dólares (55).

En el cultivo del algodón los daños se manifestaron de la siguiente manera: reducción en el rendimiento y calidad de la fibra (97,108), y una disminución de la cantidad de aceite que contiene la semilla, la cual puede ser del 18 al 35% (55).

En el Norte de México se considera que el principal daño que causa esta enfermedad es en el nogal, debido al alto valor económico de estos árboles (42), Castrejón -- (13), afirma que la Pudrición Texana es el factor limitante más importante a este cultivo en la Comarca Lagunera.

Distribución del Patógeno

Bloss y Streets (55), reportan que el hongo es originario del sureste de los Estados Unidos de América y el norte de México, las áreas en donde se encuentra distribuido son: Texas, Arixona, Nuevo México, California, Arkansas, Utah, Nevada, Oklahoma, Lousiana, Sonora, Coahuila, Chiñhuahua, Baja California Norte, Sinaloa, Nuevo León, Durango, Tamaulipas.

Perches (42) menciona que el hongo se encuentra en el Bajío. Castro y Rodríguez (13) reportan el hongo en Querétaro, Aguascalientes, Zacatecas, Jalisco, Colima y Michoa

can.

Streets y Bloss (55), mencionan que el hongo se ha--
reportado en el Campo Experimental de Iguala, Guerrero.

Hospederas.

Altamente Susceptibles.-

Streets y Bloss (55), reportan la siguiente lista de
plantas hospederas clasificadas como altamente suscepti-
bles:

De la familia Compositae: Chrisanthemum maximum Ram.

Familia Convulvulaceae: Ipomoea batata L.

Fam. Chenopodiceae: Beta vulgaris L.

Fam. Ebanaceae: Diospyros kaki L.

Fam. Laureaceae: Persea gratissima Gaertn.

Fam. Leguminoseae: Acacia nerifolia Cunn., Glycine
max Merrill.

Medicago sativa L.: Phaseolus vulgaris L.

Fam. Malvaceae: Hibiscus esculentum L.; Gossypium
barbadense L. Gossypium hirsutum
L.

Fam. Moraceae: Ficus carica L.

Fam. Rosaceae: Prunus armeniaca L.; Prunus co-
mmunis L.; Pyrus malus L.; Rosa
multiflora Thunb.

Fam. Rutaceae: Citrus medica L.
Fam. Solanaceae: Capsicum frutescens L.
Fam. Ulmaceae: Ulmus americana L.
Fam. Vitaceae: Vitis vinifera L.

Suceptibles:

Fam. Cactaceae: Opuntia spp.
Fam. Compositae: Helianthus annus L.
Fam. Cucurbitaceae: Citrullus vulgaris Schrad.; Cucumis melo L.; Cucumis sativus L.; Cucumis pepo L.
Fam. Juglandaceae: Carya illinoensis Wang.
Fam. Pedaliaceae: Sesamum orientale L.
Fam. Rosaceae: Prunus americana Marsh; Prunus domestica L.
Fam. Rutaceae: Citrus medica L.
Fam. Solanaceae: Lycopersicum esculentum Mill.;-
Solanum melogena L.; Solanum tuberosum L.

Restistentes.-

Fam. Amayllidaceae: Agave americana L.
Fam. Gramineae: Avena satival L.; Secalé cereale L.; Setaria italica L.; Triticum aestivum L.; Zea mays L.
Fam. Leguminoseae: Acacia farnesiana L. Willd.
Fam. Liliaceae: Allium cepa L.; A sativum L. Asparragos officinalis L.

Etiología del Hongo

Este hongo del suelo presenta durante su desarrollo tres fases que son la vegetativa, la de esclerocio y la conidial.

Fase vegetativa.-

Durante la fase vegetativa del hongo se producen una gran cantidad de hifas, las cuales se agrupan alrededor de una larga hifa central, estas hifas se entrelazan y compactan formando lo que se llama un rizomorfo (69). Estas estructuras envuelven a la raíz y el hongo prolifera alrededor del hipocotilo produciendo un crecimiento algo donoso, debajo del cual el peridermo es destruido, el hongo continúa penetrando a través de la médula de la madera, obstruyendo los elementos vasculares (56).

Los rizomorfos son visibles a simple vista o con una lente de aumento, tienen un color blanco cuando son jóvenes y más tarde se tornan a un color canela (55), si se separan de la raíz pueden continuar su crecimiento en un medio de cultivo artificial (55).

Si se observan al microscopio las hifas del hongo es-

posible notar que son septadas, ramificadas y multinucleadas (55), se pueden observar hifas aciculares conramales en 90 grados, las cuales forman estructuras cruciformes, muy características de este hongo. (9,19).

Fase de Esclerocio

Esta fase fué descubierta por King y Loomis en 1929. (47).

Los esclerocios se forman a partir de los rizomorfos, las células del rizomorfo se dividen, y aumentan considerablemente detamaño, estos esclerocios son primero blancos, cambiando al madurar a color café y negro (47,71), su forma es irregular tendiendo a ser esféricos o a tomar la forma del espacio en donde fueron formados dentro del suelo- su tamaño es de 1mm a 1 cm de diámetro.

Presley (64) estudió la germinación de los esclerocios y encontró que cada una de las células en el esclerocio es capaz de germinar, mientras el esclerocio permanece viable.

Los esclerocios tienen cerca del 37% de su peso seco formado por glucógenos. Ergle (26) reportó que los esclerocios contienen un 2.17% lípidos, mientras que Gunaseka

ran y Weber (41), reportan 5.25%.

Los lípidos polares están en un 24.1% del total de lípidos del esclerocio. El 43.4% corresponde a mono, di- y triglicéridos. El 10% consiste de esteroides, el 11.16% son ésteres de esteroles y ácidos grasos libres 10.8%. El ácido Palmítico fué el ácido graso predominante en los lípidos polares de esclerocio (4).

Los esclerocios tienen la función de ser el estado de resistencia al medio ambiente del hongo, puede persistir viable bajo el suelo hasta 12 años (18), al madurar consisten en un centro de células parenquimatosas, varias capas de células de pared gruesa y una capa exterior compacta y gruesa.

Los esclerocios se pueden formar sobre las raíces de las plantas, pero es posible obtenerlos a partir de medios de cultivo sintéticos, llegando a medir 3 mm en 5 días. Chavez et al. demostró que se puede estimular su formación en cultivos puros con luz. Se utilizan en el laboratorio como medio de inóculo (55) y se pueden obtener cultivos puros a partir de ellos.

Fase Conidial.-

Después de períodos de lluvias o de fuertes riegos y

días nublados, se forma el estado conidial del hongo (56), se presenta como matas de esporas sobre todo en cultivos que tienen una gran densidad de vegetación, estas matas pueden tener de un cm a 40 cm de diámetro, tienen forma irregular pero pueden tener formas circulares, su color es blanco cuando está joven y al madurar se torna a color café, pudiendo tener solo el centro café y los bordes blancos, su aspecto es algodonoso compacto cuando es blanco y polvoso al madurar, su grosor varía de 4 mm a 2 cm. Las matas están compuestas por una gran cantidad de hifas ramificadas, las cuales producen esterigmas en las que se producen las esporas.

Taxonomía.

El agente causal de la Pudrición Texana fué descrito por primera vez por Pammel en 1889, pensó que este hongo era el Ozonium más tarde Shear concluyó que no era el -- Ozonium auricomum Lk (62), y concluyó que era otra especie llamándolo Ozonium annivorum Shear, más tarde Duggar encontró que las matas de esporas eran como las descritas por Bonorden en Alemania en 1851 y nombró al nuevo patógeno como Phymatotrichum omnivorum (Shear) Duggar.

Cumley and Goldsmith (17), concluyeron que este hongo podría tener relaciones taxonómicas con los Gasteromi

cetos o con algunos miembros de los Ascomicetos.

Duggar (19), afirmó que debido a la forma en que esporula este hongo está indudablemente relacionado con -- los géneros Phymatotrichum, Botrysporium, Rhinotrichum, -- tec., pero no exhibe todas las características de éstos -- géneros, excluyó al hongo del género Botrysporium porque los conidióforos no son erectos y las conidias no se producen en los esterigmas.

Von Arx (112), cree que el género Phymatotrichum es indistinguible del género Botrytis.

En 1969 Baniecki y Bloss (7), reportaron un estado basidial del hongo producido in vitro, llamaron a este estado perfecto Trechispora brinkmanii (Bres) Rogers and Jackson.

Bloss (9), haciendo estudios comparativos de tres especies de Phymatotrichum llegó a la conclusión de que sólo la especie omnivorum produce esclerocios.

Actualmente es necesario reexaminar este género, Duggar (19) afirmó que los esterigmas están ausentes y por lo tanto este hongo pertenece al género Phymatotrichum; -- sin embargo Bloss (9), encontró que los esterigmas son--

producidos por las tres especies.

La posición taxonómica del hongo según Roberts y Boo-
throyd (68) y según Streets (95 es:

Reino	Vegetal
División	Eumycota
Clase	Deuteromycetes
Orden	Moniliales
Género	<u>Phymatotrichum</u>
Especie	<u>Omnivorum</u>

La posición taxonómica de este hongo aún no ha sido
bien definido, hay autores que dan una posición taxonómi-
ca distinta a la anterior como la dá Stern y Chapa R.G.:

División	Eumycetalophyta
Clase	Deuteromicetos
Orden	Hyphomycetales
Género	<u>Phymatotrichum</u>
Especie	<u>omnivorum</u>

Este hongo estuvo clasificado entre los Mycelia steri-
lia, como Ozonium omnivorum; Shear en 1925 creyó haber -
encontrado las esporas sexuales y colocó al hongo dentro
del género Hydnum, pero hasta la fecha ésto no ha sido -
comprobado.

Bioquímica y Fisiología del hongo.

Carbohidratos.-

Este hongo puede desarrollarse sobre medios hechos a base de monosacáridos, disacáridos y polisacáridos (22, 39, 58). El hongo es capaz de hidrolizar la dextrosa, el almidón y la celulosa. Gunasekaran (39) observó que el almidón de las raíces atacadas por el hongo desaparece - gran rapidez. Si la planta se poda y se quitan sus frutos existiendo en el suelo una fertilización con grandes cantidades de nitrógeno, la planta es capaz de almacenar en sus raíces almidón y se vuelve menos susceptible el ataque del hongo (23,24), Una explicación de este fenómeno son los cambios que suceden en la vizóspera cuando la cantidad de carbohidratos aumenta en la raíz (56).

Nitrógeno.-

Neal et. al. (61), observó qu el crecimiento micelial fué inhibido en medio líquido conteniendo nitrógeno amoniacal en comparación con el crecimiento normal que tuvo el hongo cuando el medio líquido contenía nitrógeno en forma de nitratos. Neal y Collins (60), demostraron que al añadir agua amoniacal en arcilla negra de Houston se inhibió la formación de esclerocios a una concentración-

de 1025 ppm. Estos resultados fueron interpretados por Blank y Talley (58), como sigue: el hongo se inhibido debido al bajo PH que causaron en la arcilla las agua amoniacales.

Aún existe discrepancia en la literatura a cerca de la forma en que el hongo utiliza el nitrógeno amoniacal.

Nutrición de minerales.-

Se ha encontrado que el hongo en cultivo artificial se desarrolla mejor añadiendo al medio sulfato de zinc (200 ppm), se observaron efectos benéficos al añadir sulfato de fierro y sulfuro de manganeso, el sulfato de cobre en 200 ppm suprime su crecimiento (71).

Blank (5), determinó que los minerales esenciales para el crecimiento del hongo son el hierro, el manganeso y el zinc, el cobre es benéfico a 2 ppm pero inhibitorio a 10 ppm.

pH

El crecimiento del hongo en medio sintético puede lograrse en un rango de pH desde el 3 al 8, notándose un --

crecimiento óptimo con un pH de 5; en medio natural, el hongo sólo se desarrolla en suelos alcalinos (40).

Metabolismo.-

Las enzimas que regulan las reacciones de glicólisis y de la hexosa monofosfato se han estudiado utilizando glucosa con un átomo de carbón marcado (^{14}C). Gunasekaran (34), observó que el hongo libera primero el C-3,4 del $^{14}\text{CO}_2$ que el resto de los átomos de carbono. Esto indica que predomina la secuencia glicolítica estándar sobre la del monofosfato hexosa. Se observa que los carbonos 3 y 4 se liberan en el CO_2 proveniente de la descarboxilación del ácido pirúvico.

Interacción del dióxido de carbono, minerales y fuente de carbono.-

Gunasekaran (74), observó que de 0.03 a 0.5% de CO_2 es estimulante para el hongo, siendo inhibitorio si existe en el medio de 5.0 a 50% de CO_2 . Observó una correlación directa entre la velocidad de crecimiento y la concentración en el substrato de glicógeno y minerales.

Composición lípida del micelio y los esclerocios.-

Gunasekaran y Weber (41) determinaron que el micelio -

contiene 47.9% de lípidos polares y el esclerocio tiene sólo 24.1%.

Los esteroides forman el 10% de los lípidos del esclerocio mientras que sólo forman el 3.6 de los lípidos del micelio. Se encontró un 17.5% de monosacáridos en los esclerocios mientras que sólo fué el 1.6% en el micelio.

Enzimas.-

Gunasekaran (39), observó que el hongo es capaz de degradar la celulosa en un medio de Oximetilcelulosa que en uno de celobiosa.

El hongo no pudo degradar el papel filtro mientras que el Phymatotrichum fumicola Dring y P. y el P. fungicola Zeller sí lo hicieron, P. omnivorum fué capaz de sintetizar la enzima que hidroliza la celulosa natural a cadenas de -- productos de bajo peso molecular, pero no fué capaz de -- hidrolizar cadenas lineares de anhidroglucosa. Esto concuerda con las observaciones hechas a cerca de que el P. fumicola y el P. fungicola son iguales fisiológicamente -- pero diferentes morfológicamente, además se confirmó que el P. omnivorum es diferente de éstos dos hongos tanto -- fisiológica como morfológicamente.

Las enzimas que contribuyen a que la penetración del hongo en las raíces se facilite son: la pectinliasa, pectinesterasa y el pectatoliasa (113). El sistema proteolítico es activado con un pH de 4.5 y requiere de unión metálica divalente para ser activado (9).

Epifitiología.-

Propiedades químicas y Físicas del suelo.

La composición química del suelo afecta el crecimiento y supervivencia de este hongo, (3,4,99,107,109), se le encuentra en suelos de arcilla montmorillonítica, calcáreos y alcalinos, suelos que tienen una gran capacidad de expansión (56). El pH del suelo está cerca del 8.2 y el contenido de materia orgánica es mayor del 4% en los suelos vírgenes (56), la capacidad de intercambio iónico está sobre los 50 meg/100 gr de suelo y la capacidad de retención de humedad es aproximadamente de un 45% (48), mucho de este hongo crece en la arcilla negra de Houston - que tiene capas blancas o amarillentas de piedras sedimentarias (59).

Frapis y Fudge (34) observaron la relación entre la basicidad del suelo y la frecuencia en que aparece el hongo. Esta enfermedad también es encontrada en suelos con menos

de 1% de carbonato de calcio.

pH del suelo.-

La existencia de la enfermedad está fuertemente afectada por el pH (99), la enfermedad es raramente observada en suelos con un pH menos de 6 (56), Taubenhaus (109), concluyó que el hongo no puede sobrevivir en suelos ácidos.- Lyda y Burnett (56) encontraron que el hongo no forma esclerocios en suelos ácidos, pero esto puede ser cambiado si se añade limo a estos suelos. En un suelo de pH 4.77 no se observaron esclerocios pero sí fueron visibles las hifas.

El hongo crece en suelos ácidos, pero es incapaz de formar su estado de resistencia (56).

Gases del Suelo.-

La cantidad de aire que existe en el suelo tiene una gran influencia sobre el hongo (56) en el reporte de Pammel se afirmó que la enfermedad ocurre con frecuencia en suelos con un drenaje pobre. Shear y Miles (76), afirmaron "Este organismo crece mejor en donde la aereación del suelo es más pobre" y recomendaron un barbecho profundo como un método para controlar esta enfermedad.

Lyda y Burnett (52), encontraron que en cultivo puro sobre tierra estéril, el hongo crecía sobre un substrato de semillas de sorgo, el hongo produce bióxido de carbono el cual se acumula en el suelo y después de dos semanas el hongo cambia a un estado en que produce esclerocios.

Se cree que el ión bicarbonato juega un papel regulador en la inducción de esclerocios del hongo (42). El CO_2 además de afectar la formación de rizomorfos se cree que suprime el crecimiento de hongos saprofiticos competitivos con el P. omnivorum, por lo que se obtiene así un medio ambiente favorable para el crecimiento de los rizomorfos (56).

Temperatura del suelo.-

Este hongo crece más rápidamente a una temperatura de $28^{\circ}C$. El hongo produce esclerocios a temperaturas entre los 15 y $35^{\circ}C$ (51,70,71), pero el máximo rendimiento de esclerocios se obtiene a los $28^{\circ}C$.

Ezekiel (28), observó que el hongo persiste en lugares donde la temperatura no baja de los $23^{\circ}C$ y donde la temperatura anual en promedio es de $15.6^{\circ}C$ o mayor (28).

Sodio en el suelo.

Taubenhaus (89) observó que el cloruro de sodio fué efectivo en la inhibición del crecimiento del hongo.

Lyda y Kissel (56), observaron que en suelos infectados con el hongo existían de 4 a 10 veces menos sodio intercambiable en el suelo, en comparación con suelos no infectados.

Cuando el hongo infecta un terreno los esclerosios de éste se forman en zonas muy localizadas, la explicación que se dá para este fenómeno es que en un suelo sódico como los formados por arcilla negra de Houston, el sodio se encuentra en muy diferentes concentraciones que ván desde las 10 a las 2,000 ppm (56).

Fisiología de la enfermedad.-

Resistencia Química.

El mecanismo exacto de la patogenicidad del hongo permanece sin aclarar aún. Se cree que existen substancia tóxicas producidas por el hongo. Se han encontrado substancias que inhiben parcialmente el crecimiento del hongo --

en las plantas monocotiledóneas, por lo cual es posible que sean resistentes al ataque de este hongo (55) Milbrath y Gries(57), atribuyen que las raíces más maduras de maíz no pueden ser penetradas por el hongo debido a que tienen mayor cantidad de sustancias pectolíticas y pueden deber su resistencia al ataque del hongo debido a que tienen - sustancias fenólicas, oxidasas fenólicas y ácido ascórbico.

De cítricos se han aislado sustancias lactónicas, las cuales presentan características inhibitorias del crecimiento del hongo (55).

Varios alcaloides, como la berberina, tienen efectos inhibitorios del desarrollo del hongo, esta sustancia se obtiene de la Mahonia trifoliata, Fedde (36,37,38). Otros alcaloides que han resultado también inhibitorios son: - sanguinarina, protopina, cheleritina y licorina.

Resistencia biológica.

Las monocotiledóneas probablemente deben su resistencia a la microflora que existe en su rizófera, ya que esta inhibe el desarrollo del P. omnivorum, se considera - que el hongo se convertirá en un parásito eficiente solo

en caso de que la competencia de otros microorganismos sea baja.

A partir del hecho de que las plantas monocotiledóneas sí son atacadas por el hongo en condiciones estériles, se concluye que existe una importante relación entre la microflora de su rizófera y su aparente resistencia al hongo, pudiendo ser importantes en este aspecto las bacterias fluorescentes verde-azules (55).

Sintomatología.-

El primer síntoma que presenta la planta cuando tiene Pudrición Texana es un amarillamiento de las hojas y un crecimiento muy lento, las hojas tienen una temperatura superior a la normal, lo que se puede detectar en las primeras hojas de la mañana, es frecuente observar los síntomas a las 6 u 8 semanas de la siembra de las plantas.

El siguiente síntoma es la marchitez de las hojas, las cuales permanecen adheridas a la planta, si la planta es pequeña la muerte ocurre en pocos días (7 mínimo) y si la planta es grande puede morir entre 4 y 5 semanas después de la aparición de los primeros síntomas (6).

Los síntomas en la raíz son un amarillamiento y descortazamiento, siendo evidente la pudrición de ésta. En ocasiones se distinguen lesiones rojizas y necrosadas, - las plantas afectadas pueden arrancarse fácilmente del - suelo con un leve tirón.

Control.

La Pudrición Texana es una de las enfermedades de -- plantas más difíciles de controlar. El comportamiento -- del hongo en los diferentes cultivos y suelos y su actividad de año a otro en el mismo terreno es tan errático- que ha resultado ineficiente su control (55).

Rotación de Cultivos.

Se considera que se necesitan por lo menos 4 años -- cuando se hace una rotación de cultivos con monocotiledó- neas, sin embargo con 4 años y más los resultados han si- do muy variables dependiendo de la localidad, el tipo - de suelo y la secuencia de cultivos que ha existido en - el terreno. En algunos casos con esta rotación se ha dis- minuido en un 60% las incidencias de la enfermedad en -- cultivos de algodón, en otro caso rotaciones de dos o - tres años han sido ineficientes (74).

La cantidad de esclerocios viables que se pueden encontrar en un terreno no disminuyen a pesar de las rotaciones que se hacen con las monocotiledóneas, debido principalmente a que se puede sobrevivir como rizomorfos en raíces parcialmente descompuestas, las cuales le sirven de alimento, pudiendo así sobrevivir por varios meses, y los esclerocios permanecen viables indefinidamente bajo el suelo hasta que activados por aireación, presencia de nuevas raíces y aumento en la humedad del suelo (10).

Intemperización y roturación.

McNamara,(55), reportó una reducción en la incidencia de la enfermedad de un 64 a un 22% después de dejar libre de cultivo el terreno por un año, se cree que esto se debe a que el suelo se mantiene bajo condiciones anaeróbicas, por lo que los propágulos y rizomoforos no germinan ni crecen.

Se recomienda pasar la rastra sobre el cultivo de algodón y sobre las malezas que existen en el terreno tan pronto se coseche éste. Ezequiel (30) reporta que hay resultados favorables cuando se barbecha y subsolea el suelo en el otoño.

Lyle et.al. encontraron un buen método de control sem

brando e incorporando trébol dulce cada tercer año.

Escape.

Uno de los factores importantes de la reducción de los daños causados por esta enfermedad, es la utilización de variedades de algodón que maduren con rapidez, se considera que las variedades tardías de algodón reducen su rendimiento en un 20% a causa del hongo (82).

Incorporación de materia orgánica al suelo.

Se han logrado considerables avances en el control de esta enfermedad utilizando distintos cultivos para ser incorporados en el suelo (55). King et.al. (47), logró reducir la enfermedad en un 90% después de incorporar alfalfa al suelo por 4 años consecutivos en suelos infestados con esta enfermedad en Arizona, se observó una reducción de la infección de las plantas en el verano resultando en la existencia de más plantas en estado de madurez y un incremento en los rendimientos del 84%.

Control Biológico.

Eaton y Rigler (24), determinaron que la microflora existente en la rizófera de las raíces es un factor importa

tante en susceptibilidad o resistencia al ataque del hongo. En los casos en que el algodón tiene una alta población de bacterias fluorescentes, el hongo no ataca a la planta, estos investigadores concluyeron que la microflora asociada con las raíces de las plantas monocotiledóneas es en gran parte responsable de su aparente resistencia.

El control biológico de esta enfermedad es uno de los métodos más prometedores, sobretodo cuando se altera el medio biológico del suelo, una de las formas más eficientes para lograrlo es añadir materia orgánica al suelo, ya que de esta manera se altera el equilibrio que existe en la microflora, aumentando su población, logrando así que esta microflora destruya esclerocios y rizomorfos, se alimente del sustrato del cual depende el esclerocio para germinar o crecer, o puede tener esta microflora un efecto directamente antibiótico sobre el hongo (16, 11).

Taubenhauz y Ezekiel (110), comprobaron que el hongo Trichoderma lignorum resultó antagónico a P. omnivorum.

Algunas de las especies de hongos pertenecientes al género Trichoderma ofrecen posibilidades muy interesan-

tes como medio de control biológico, este tipo de control sobre hongos fitopatógenos es estudiado lográndose resultados interesantes, Elad et al. (25), reportan que el T. harzianum es capaz de destruir el micelio de Sclerotium rolfsii y de Rhizoctonia solani, se observó que el T. harzianum crece mejor que el S. rolfsii en medio de cultivo artificial y que el micelio de éste último es invadido por el T. harzianum al estar bajo condiciones de crecimiento adversas como niveles altos de pH o bajas temperaturas. Se efectuaron experimentos en invernadero y se observó una incidencia menor de la enfermedad que causa el S. rolfsii cuando se inoculó el suelo con T. harzianum. En experimentos de campo se obtuvo un aumento significativo en el rendimiento del frijol.

Harman (43), reporta que el tratamiento de semillas de chícharo y de rábano con conidias de T. hamatum las protegió del ataque de Phytium spp y de Rhizoctonia solani casi casi tan efectivamente como lo haría un fungicida sintético.

Liu y Baker reportan que en el campo los propágulos de Rhizoctonia solani son destruídos y reducidos en gran cantidad al aumentar la población de T. harzianum en el suelo.

En pruebas de laboratorio realizadas por el autor de esta tesis (datos no publicados), se observó que el Trichoderma viride crece con mayor rapidez que el Phymatotrichum omnivorum en medio de cultivo de papa dextrosa agar, en los casos en que se cultivaron ambos hongos en una misma caja petri el T. viride (= lignorum) resultó antagónico al desarrollo de P. omnivorum. En pruebas de laboratorio efectuadas con la finalidad de inducir la marchitez permanente en plantas de alfalfa y algodón, inoculado P. omnivorum en la tierra, se observó que cuando el T. viridae contaminaba esta tierra las plantas permanecían vivas aún después de haber concluido el experimento, mientras que el resto de las plantas sí presentaban la marchitez. Las plantas que se desarrollaron en la tierra que contenía ambos hongos no mostraban daño aparente causado por los hongos después de tres semanas en que se mantuvieron bajo observación.

Chet y Baker (15) mencionan como un agente de control biológico al Trichoderma viride.

Wright, J.M. reporta que el T. viride produce un antibiótico (gliotoxina), que tiene la capacidad de eliminar la microflora y microfauna y de aumentar la disponibilidad de compuestos nitrogenados y de carbono.

Los efectos antibióticos de la microflora fueron reportados por Whaley y Boyle (114), examinaron la microflora de plantas desérticas resistentes y encontraron 10 especies de Streptomyces con efectos tóxicos hacia el hongo, 6 de estas especies producen candicidina, un antibiótico poliénico efectivo para restringir el crecimiento del hongo. Cuatro especies produjeron varios heptanos o mezclas de candicidina con cicloheximidias, los cuales son fuertemente tóxicos al hongo in vitro. La exploración tendiente a mantener altas poblaciones de microflora competitiva y antibiótica al hongo, ofrece una real promesa en el progreso del control de la Pudrición Texana (55).

Fertilizantes y sustancias inorgánicas:

La observación de que la Pudrición Texana es menos severa en plantas creciendo en suelos ácidos de alta fertilidad, sugirió que la alteración del pH del suelo y su fertilidad deben ser factores benéficos para lograr el control de la enfermedad (99, 102).

La eficiencia de los fertilizantes comerciales como medio de control varía mucho dependiendo del tipo de suelo (33,34,66), resultados más prometedores se han obtenido en suelos arenosos. La enfermedad se ha logrado disminuir aplicando fertilizantes que contienen distintas for

mas de nitrógeno, este efecto parece deberse al incremento en el vigor de las plantas. Las sales de amonio también resultaron estimulantes a las raíces y presentan -- efectos tóxicos al hongo. La sal que ha resultado más eficiente es el sulfato de amonio (77,78,80,81,82, 83, 85, 87).

Streets y Blinkerhoff (90,91,92,93), emplearon grandes cantidades de sulfato de amonio, 4,000 lb/acre en combinación con azufre y materia orgánica logrando un control efectivo en árboles frutales, ornamentales y nogales en Arizona. El tratamiento es efectivo por un año cuando es aplicado a árboles que presentan los primeros síntomas y antes de que las raíces sean completamente invadidas por el hongo. El azufre aplicado como único tratamiento sólo resultó efectivo como una barrera química, impidiendo la dispersión de la enfermedad (102,105,115).

Plantas y productos químicos utilizados como barreras.

Incorporando plantas no susceptibles al hongo en el - suelo se han utilizado como barreras para evitar que la - enfermedad continúe extendiéndose (86), se emplean cultivos como el sorgo y el maíz, dos o tres surcos con sorgo han impedido que el hongo invada campos por espacio de 5 años o más (105).

Para evitar que el hongo se extienda en el suelo se han utilizado productos químicos como aceite crudo, lignita, azufre, clorato de calcio, etc. La aplicación de 8,000 gal de aceite crudo por acre en suelos de Texas redujo la incidencia de la enfermedad de un 14% a un 2% -- (55).

Ezekiel (105), construyó barreras con azufre que permitieron sobrevivir a las plantas del ataque del hongo por 7 años.

Fungicidas y Fumigantes.

El primer obstáculo que se presenta en el control de este hongo por medio de productos químicos es la colocación de éstos en el suelo, ya que tiene que ser a una profundidad suficiente pero sin que deje de ser económica la aplicación (55). Los esclerocios y rizomorfos se pueden encontrar a una profundidad de casi 4 metros sobre las raíces de árboles (55). Los productos que han tenido efectos directos o que han reducido el crecimiento del hongo o evitado la germinación de los esclerocios son: hidróxido de amonio al 6%, formaldehído al 4%, sulfato de aluminio, ácido bórico, cloratos de sodio, boro y calcio, cloruro de mercurio, disulfuro de carbono, cloroformo, benceno, xileno, etc. (27,31,32). A pesar de ser una lista-

muy grande ninguno es considerado como un fungicida eficiente.

Ultimamente nuevos fungicidas, como son la 8 - hidroxiquinolina y los benzimidazoles, han probado ser altamente efectivos en su capacidad para reducir el crecimiento del hongo, los cuales han sido aplicados principalmente en árboles. Hine et. at. (45) en Arizona reportó que el Benlate (butilcarbamoil -2- benzimidazol ácido carbámico) y el TBZ (2-4-tiazolil benzimidazolm) son altamente fungistáticos contra el hongo en el suelo y en agar a una concentración de 1 a 5 ppm.

Hubo suficiente efecto residual del Benlate, aplicado de 10 a 100 ppm en el suelo, ya que se evitó el crecimiento del hongo durante 4 meses (45).

Los hidrocarburos clorados han mostrado efectos residuales y han ayudado a la planta a incrementar su vigor después de su aplicación (89). El fumigante 1,3-dicloropropeno de 25 a 50 galones/acre fué inyectado a una profundidad de 8 pulgadas en el suelo y dió buen control en Nevada y en México. Se han utilizado con buenos resultados el dicloropropeno, la cloropicrina, Vapam, éste último utilizado como fumigante al momento de efectuar replantes de nogal (46).

El bromuro de metilo a sido útil para fumigar cuando algún árbol ha sido eliminado por la enfermedad (55).

Tratando de eliminar la enfermedad se han inundado terrenos en Texas y Arizona por un período de 6 meses, sin embargo los esclerocios no murieron, por lo que no se recomienda este método (55).

Variedades resistentes.

La obtención de resistencia genético ha resultado -- muy difícil de obtener debido a que el hongo es capaz de atacar a las plantas a pesar de sus diferencias fisiológicas (-5).

En algodón se ha obtenido un éxito muy reducido (35). Actualmente las selecciones en los híbridos de la F_2 de Hopi X Sudan en algodón son las más prometedoras (35). También resultan interesantes las selecciones hechas en algodón Pima en Arizona y el algodón hexaploide de probado por Muramoto en Arizona (55), Estas plantas han mostrado más que resistencia genética escape del hongo.

Se ha logrado un avance significativo en el control de la enfermedad en cítricos en el suroeste de los Esta-

dos Unidos de América utilizando patrones resistentes - como el Citrus aurantium L., el cual se emplea en el 95% de los árboles que se cultivan en Arizona (55).

Para vid se han reportado varias variedades resistentes al hongo como la Champanel, Dog Ringe, Margarite, -- Black Spanish, Mustang, etc. (59). Se considera que se pueden efectuar selecciones de variedades silvestres de Vitis vinifera L. ya que son altamente resistentes como la Planch y V. longi Price (55).

Para sembrar cortinas rompevientos con árboles resistentes a la enfermedad las especies que se recomiendan son: Platanus occidentales L., Juniperus virginiana L. - Thuja orientalis L., Bumelia lanuginosa (michx) Pers. y Tamarix gallica L.

Cuarentenas.

Como método de prevención, en los Estados Unidos de América se han impuesto algunas regulaciones para evitar el movimiento de tierra y plantas que puedan llevar el hongo en la raíz (55).

Las plantas que provienen de zonas infectadas con el

hongo pasan por un período de cuarentena, se analizan las raíces para observar si existen rizomorfos, se utilizan plantas de crecimiento rápido y que sean altamente susceptibles al hongo para detectar su presencia, como la okra (Hibiscus esculentus L.) y la higuera (Ricinus communis L.) (55).

Método Arizona.

Un método de combate que incluye varias de las prácticas antes citadas es el Tratamiento Arizona (55), el cual es muy utilizado debido a que a dado buenos resultados en árboles y arbustos que se encuentran en estado avanzado de ataque. Este método consiste en la aplicación de la cantidad suficiente de nitrato de amonio para controlar la enfermedad, pero sin dañar las raíces, se aplican fertilizantes suficientes para estimular el crecimiento de la raíz aflojando el suelo alrededor del árbol fuera de la zona de goteo, se coloca una capa de 6 cm de grosor de estiércol y sobre ésta capa se coloca otra de sulfato de amonio y sobre ésta una de azufre, después se inunda el suelo con una capa de agua de 7.6 cm y si el árbol se está defoliando o tiene síntomas demarchitez se poda la mitad de su follaje.

Métodos Experimentales.

Obtención de esclerocios en el Laboratorio.

Dunlap (21) desarrolló un método para la obtención de esclerocios en el laboratorio, los cuales fueron utilizados para inocular plantas de algodón con el hongo.

Con el método desarrollado se pueden obtener 5 ó más gramos de esclerocios utilizando un matraz de Erlenmeyer de 250 ml, en este matraz se colocan 100 gramos de arcilla negra de Houston secada al aire, se añaden 30 ml de agua y sobre la tierra se colocan 5 gr de granos de sorgo, el matraz se tapa con algodón, se esteriliza a $1.1 \text{--} \text{Kg/cm}^2$ durante una hora, después de que se haya enfriado, se inocula con el hongo, esto se puede hacer con un trozo de agar que tenga un cultivo puro del hongo de una semana de edad, este medio de cultivo puede ser de papa dextrosa agar. Otra fuente de inóculo puede ser un esclerocio proveniente de un cultivo puro.

Los frascos inoculados se mantuvieron a temperatura ambiente y después de seis días se observaron rizomorfos blancos creciendo sobre la tierra, más tarde estos rizomorfos se engrosaron y formaron esclerocios, también se

formaron bajo la superficie de la tierra del matraz, la máxima cantidad de esclerocio se obtuvo en matraces en que se desarrolló el hongo durante 5 ó 6 semanas.

Inoculación de Plantas de algodón con P. omnivorum bajo condiciones de invernadero y de campo.

El inóculo utilizado por Taubenhau (100), en estos experimentos consistió de raíces provenientes de plantas de algodón con poco tiempo de haber muerto por la Pudrición Texana, las raíces completamente muertas no resultaron efectivas como inóculo.

En el campo el inóculo se coloca en una perforación hecha en el suelo a una distancia de 3 cm del tallo de la planta, el inóculo se cubre y presiona con tierra. La profundidad de la perforación es de 2 a 5 cm, se requiere que el suelo tenga una humedad alta, los síntomas de marchitez comienzan a aparecer entre los 10 y 14 días, después de 3 ó 4 semanas mueren entre el 40 y el 80% de las plantas, el resto de las plantas muere en ocasiones después de 2 meses de haber sido inoculadas.

En inoculaciones realizadas en invernadero se requieren cantidades mucho mayores de inóculo y una humedad muy

Dunlap (20), utilizó en esta investigación plantas de algodón de la variedad Rogers' Acala, se sembraron en recipientes de 11 litros de capacidad, en arena de río lavada con adiciones diarias de un litro de una solución nutritiva de la siguiente concentración: N - 100 ppm; P-30 ppm; K - 40 ppm; Mg - 10 ppm; Ca - 10 ppm; B - 1 ppm; Estos elementos se suministraron como NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y H_3BO_3 , la solución nutritiva se ajustó a un pH de 5.8 con ácido sulfúrico, cuando se requería se añadió agua de pH 8, se mantuvieron en condiciones de invernadero en donde la temperatura de la arena varió de 26 a 34°C.

Las plantas se inocularon con el hongo después de tres meses de crecimiento, el procedimiento de inoculación fue el siguiente: se colocó una pequeña masa de tierra e inóculo alrededor del tallo de la planta a la altura de la superficie de arena, para lograr esto primero se removió la arena junto al tallo, dejando expuestas al aire las primeras raíces laterales, en la de presión que quedó en la arena se coloca arcilla negra de Houston no esteril formando un anillo de 2 cm de profundidad y 5 cm de diámetro, sobre esta capa de tierra se colocaron varios esclerocios cerca del tallo, algunas semillas estériles de algodón, después se colocó otra capa de arcilla sobre --

los esclerocios, dejando un montículo de 6 a 8 cm de altura.

El 91% de las plantas tratadas en esta forma presentaron síntomas de marchitez permanente a los 21 días de la inoculación, pero en promedio las plantas requirieron -- 14.5 días para mostrar esta marchitez. Los primeros síntomas en algunos casos aparecieron entre los 8 y 10 días a partir de la inoculación.

Inoculación de plantas de algodón con esclerocios de P. omnivorum.

Lyda y Burnett (49) utilizaron en estas pruebas arcilla negra de Houston (HBC), colocaron 2 Kg de esta tierra en recipientes metálicos galvanizados de 4.5 x 5 x 7 pulgadas de profundidad, la tierra se ajustó a una humedad de 35% y los recipientes se colocaron en un tanque con agua a 28°C.

Se utilizaron de 125 a 625 esclerocios por Kg de tierra, los cuales fueron mezclados homogéneamente en el HBC,

Las plantas comenzaron a morir después de tres semanas de haber sido sembradas e inoculadas, muriendo el 100% de ellas en 68 días.

Inoculación de plantas de algodón con el hongo en medio líquido y en arena.

Leta Henderson utilizó tubos de ensayo de 1.2 cm de diámetro por 20 cm de altura, se colocaron 40 cc de una solución nutritiva preparada de la siguiente manera: (Datos expresados en molaridad), .00394 m CaCl_2 ; .00263 m MgSO_4 ; .00005 m FeSO_4 ; .00255 m KH_2PO_4 ; .00005 de citrato de potasio; .000079 m K_2HPO_4 ; .00709 m KNO_3 y .00039 m $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se añade un 4% de dextrosa, el ph final es de 5.1 a 5.3.

El tubo con la sustancia nutritiva se esteriliza en autoclave durante 30 minutos, el inóculo utilizado es un cubo de 5 mm de un cultivo puro del hongo en agar. Este inóculo se coloca en la superficie del líquido nutritivo y se deja desarrollar por tres días, después se coloca una semilla de algodón con una radícula de 2 cm, la cual se coloca en la perforación central efectuada en un corcho estéril, este corcho se deposita sobre el líquido para mantenerlo en flotación con la semilla de algodón en proceso de germinación.

Los tubos se colocan en un baño de agua a 30°C. Se recomienda que la luz que reciban sea solar.

Las plantas mueren entre el octavo y el décimo día - después de colocarlas en los tubos, además se presenta el fenómeno de achaparramiento de la planta, se presentaron problemas en los casos en donde el inóculo cayó al fondo del tubo, y la planta nó resultó infectada, también se presentaron problemas por microorganismos contaminantes introducidos al momento de colocar las semillas dentro del tubo.

Para realizar el experimento en medio sólido, se utilizó arena sílica, 50 gr por tubo, se esterlizaron durante dos horas, se añadieron 20 cc de la sustancia nutritiva, se inocularon y se permitió que el hongo se desarrollara por tres días, se colocaron 10 cc de arena estéril seca a cada tubo y sobre esta capa de arena se colocó la semilla de algodón, enterrando la radícula en la arena, se añadió suficiente líquido nutritivo para mojar los 10 cc de arena seca colocados anteriormente.

La marchitez se presentó entre los 8 y 15 días, además se observó que el hongo cultivado durante 8 meses en medios sintéticos causaba la muerte delas plantas en 14 días, en comparación con los cultivos nuevos, obtenidos a partir de plantas enfermas de Pudrición Texana, los cuales lograban causar la muerte de las plantas entre 8 y 10 días.

Inoculación del hongo utilizando semillas de sorgo infectadas con micelio.

Chávez, McIntosh y Boyle (14) utilizaron tierra franco arcillosa y arena, semillas de algodón de la variedad Pine, recipientes de vidrio de 1 lt de capacidad, la metodología utilizada fué la siguiente: Se colocó en algunos frascos y arcilla en otros, los frascos se esterilizaron, se sembraron las semillas de algodón y al tener las plantas 4 hojas se introdujeron en la tierra 2 semillas-dos semillas de sorgo infectadas con el micelio del hongo a una profundidad de 7 cm los frascos se mantuvieron a una temperatura de 28°C en baño maría. Las pruebas concluyeron a los 20 días muriendo el 100 % de las plantas.

Debido a la falta de equipo apropiado, las personas que han trabajado con este hongo en este Instituto, no pudieron definir los efectos que tuvieron los fungicidas y extractos vegetales que probaron, siendo el principal problema la inconsistencia o la falta total que hubo en la aparición de los síntomas de esta enfermedad en las plantas. En base a las recomendaciones que dan las personas que han estudiado este hongo, se comenzaron a hacer pruebas con el objetivo de definir las razones por las cuales no se ha logrado inducir esta enfermedad en plan-

pas en el laboratorio, conociendo estas causas se pueden corregir los errores y buscar un método que se adapte a las condiciones de equipo existente en México y poder así asegurar la aparición de los síntomas de esta enfermedad en plantas bajo condiciones controladas.

MATERIAL Y METODOS

Introducción

Esta investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Nematología y Fitopatología, en el edificio de Graduados en Agricultura que se encuentra en el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey.

La metodología llevada a cabo en estos experimentos se basó principalmente en los trabajos que desarrolló -- Chávez (14) en 1967, quien realizó pruebas con la finalidad de infectar plantas de algodón con P. omnivorum bajo condiciones de invernadero, a temperatura de 28°C y en baño maría empleando plantas de algodón en tierra colocada en recipientes de vidrio e inoculadas con semillas de sorgo infectadas con el micelio del hongo.

Se efectuaron tratamientos en donde se observó la influencia de la cantidad de tierra utilizada, del tipo de recipiente, de la posición y cantidad de materia orgánica estéril (granos de sorgo) empleada como substrato del hongo, de la arcilla negra de Houston (HBC) y de la tierra de Nuevo León.

Todas las pruebas se realizaron con plántulas de al-

falfa y algodón inoculandolas al momento de la siembra con una semilla de sorgo o de maíz infectadas con el micelio del hongo.

En estas pruebas se modificó el método que recomienda Chávez ya que para obtener buenos resultados no fue necesario utilizar el baño maría, recipientes de vidrio de un litro, plantas de algodón con 4 hojas, granos de sorgo infectados con el micelio del hongo como fuente inóculo, introducir el inóculo a la tierra, tierra franco arcillosa del Estado de Arizona, ni arena.

Debido a que no se contó con el equipo especializado que se recomienda utilizar, se adaptó la metodología para poder obtener buenos resultados con equipo y materiales más sencillos.

A continuación se describe en detalle la metodología que se llevó a cabo en los experimentos realizados en este laboratorio.

Obtención de cultivos puros.

Con la finalidad de obtener cultivos puros de este hongo se extrajeron del suelo raíces de Fresno Fraxinus -

fresno enfermedades de Pudrición Texana, estas raíces se observaron bajo el microscopio de disección para detectar la presencia de rizomorfos, una vez localizados se procedió a separarlos de la corteza radicular por medio de dos métodos, uno de ellos consiste en lavar con una escobeta las raíces, bajo un chorro de agua que cae en una cubeta, el agua colectada contiene tierra, raicillas y rizomorfos, esta agua se decanta y se pasa a través de una malla No. 325 (abertura de 44 micras) lavando los residuos que quedan sobre la malla con agua corriente, estos residuos se colocan en una caja Petri y se observan al microscopio de disección, para lograr detectar los rizomorfos que tengan color blanco conviene colocar debajo de la caja Petri un fondo de papel o tela de color negro. Con la ayuda de unas pinzas se sacan del agua los rizomorfos blanquecinos y se colocan en una caja Petri que contiene agua destilada.

Otro método eficiente para separar los rizomorfos de la raíz es el siguiente, se colocan las raíces bajo el microscopio de disección y con una pinza se separan los rizomorfos de color blanco para ser colocados en una caja Petri con agua destilada.

Una vez colectados los rizomorfos se pasan con ayuda de una pinza a un tubo de ensayo que contiene agua desti-

lada estéril y dos granos de detergente, se tapa y se agita vigorosamente durante tres minutos con la finalidad de separar las partículas de tierra adheridas al hongo, después se pasan a otro tubo de ensayo que contiene una solución de cloralox al 2% y se agitan durante 45 segundos. Para eliminar el cloro es necesario pasar los rizomorfos a un tubo con agua destilada estéril y agitarlos durante dos minutos, esta operación se realiza dos veces y para evitar que se contaminen con otros hongos o bacterias -- conviene realizar el paso de rizomorfos dentro de un cuarto de transferencias esterilizado o una cámara de inoculación.

Debido a que las contaminaciones bacterianas son muy frecuentes y perjudiciales conviene pasar los rizomorfos a un tubo de ensayo que contenga agua destilada estéril con 200 ppm de sulfato de estreptomina.

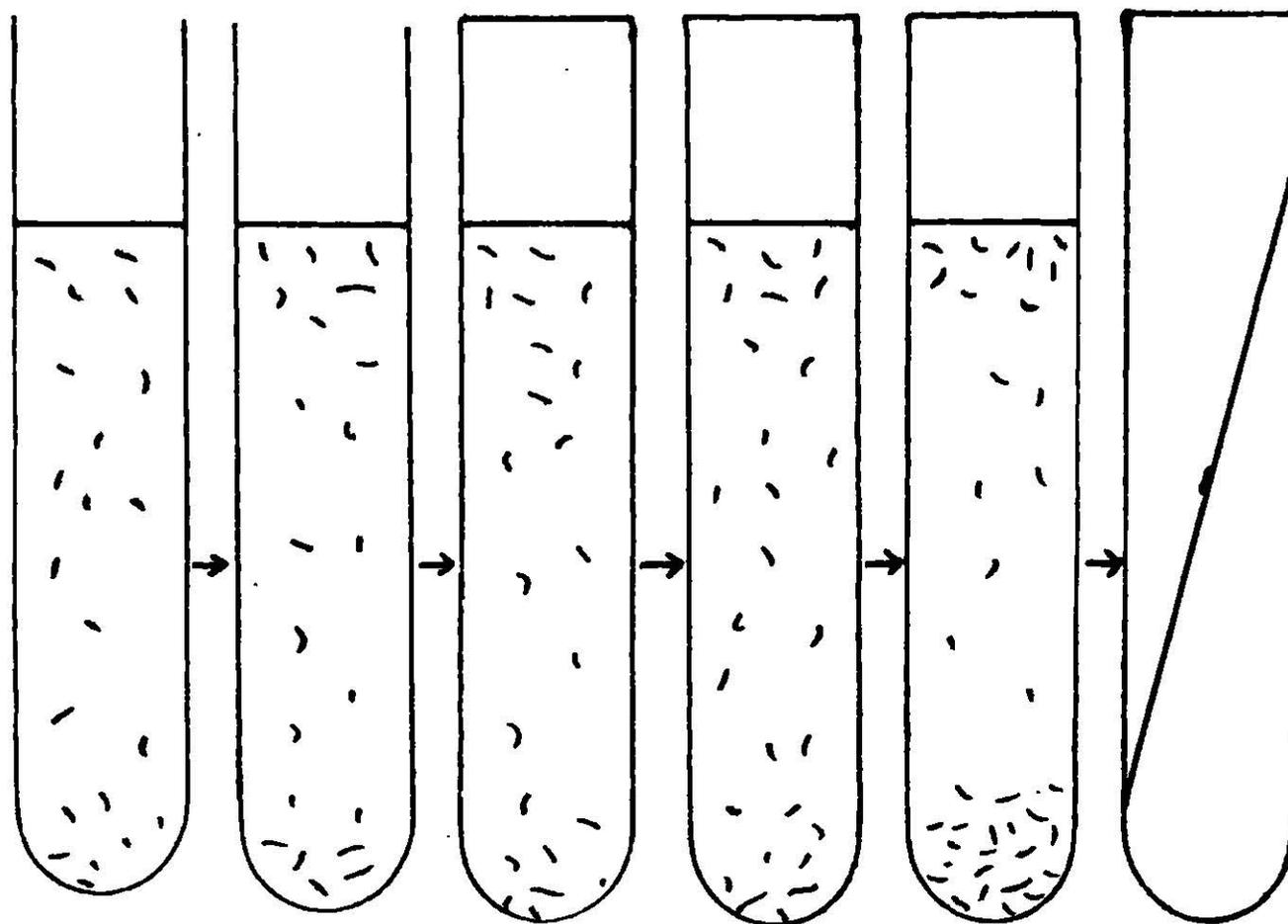
Estos rizomorfos se colocaron en tubos de ensayo sobre medio de cultivo estéril de papa dextrosa agar que contiene 200 ppm de sulfato de estreptomina. Debido a que las contaminaciones son muy frecuentes conveniente -- conveniente colocar un rizomorfo por tubo y realizar la operación con la mayor rapidez posible.

Tomando en cuenta que uno de los principales proble-

mas que presentan es el nulo crecimiento del hongo debido a que el rizomorfo no es viable, se realizaron las operaciones antes descritas y en el último paso los rizomorfos que están sumergidos dentro del agua con sulfato de esterptomícina, se dejaron en ella durante 24 horas, al observarse estos rizomorfos a simple vista y al microscopio de disección algunos presentaron un crecimiento muy notorio de micelio principalmente en los extremos de éstos. Éstos ^Z rizomorfos se seleccionaron y se sembraron en los tubos en la forma antes descrita.

Utilizando el método del lavado de raíces con agua se sembraron con rizomorfos 250 tubos de ensayo, los cuales se incubaron a 28°C. Mediante el método de la separación de rizomorfos directamente de la raíz bajo el microscopio, se sembraron 350 tubos dentro de un período de tres meses. Con el método de separar con pinzas los rizomorfos, lavarlos, desinfectarlos y dejarlos reposar durante 24 horas, se sembraron 30 tubos.

Las observaciones que se hicieron fueron: tubos con presencia de contaminantes, tubos con un crecimiento nulo del hongo y tubos en donde se desarrolló el P. omnivorum, mediante la observación del material e intervalos de 24 y 48 horas.



Agua + Agua + Agua Agua Agua + PDA+
detergente Cloro estéril estéril bactericida bactericida

FIGURA 1. Diagrama que muestra el proceso que se utilizó para la desinfección y siembra de rizomorfos de P. omnivorum con la finalidad de obtener cultivos puros.

Multiplicación de Phymatotrichum omnivorum

El objetivo de multiplicar el hongo es mantener cultii

vos puros viables constantemente y formar material para utilizarlo como inóculo en pruebas futuras.

El substrato utilizado para multiplicar el hongo fué tierra, granos de sorgo de maíz, y agua. Los recipientes que se emplearon fueron tubos de ensayo, matraces Erlenmeyer de 250 ml y frascos planos de 250 ml.

Durante un período de 4 meses se realizaron 120 siembras del hongo en distintos recipientes, los métodos más utilizados fueron:

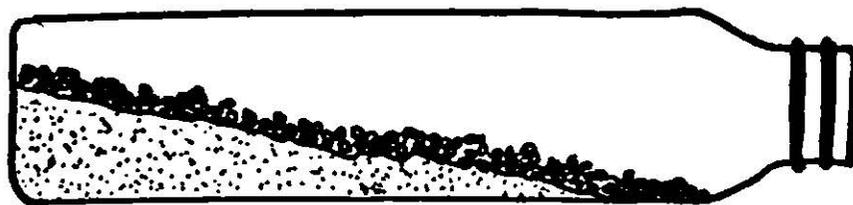
- a) Método de Dunlap modificado con semillas de sorgo. En un frasco plano de 250 ml se colocan 80 gramos de tierra cernida y secada al aire, teniendo el frasco en posición horizontal se colocan sobre la tierra 35 gr de sorgo y se añaden 50 ml de agua destilada, los frascos se mantienen horizontales para que la superficie expuesta de sorgo sea la máxima y para que sea fácil extraer el inóculo con las pinzas. En este método se utiliza tierra y sorgo para multiplicar el hongo, basándose en el método Dunlap (21).

Para evitar contaminaciones bacterianas es conveniente añadir al agua que se utiliza 200 ppm de sulfato de -

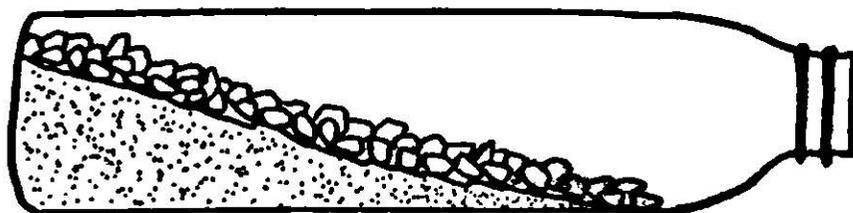
esterptomicina. Los frascos se tapan con algodón y se esterilizan en una autoclave a 1.1 kg/cm^2 durante 45 minutos, al enfriarse se abren junto a la flama del mechero bunsen y se inoculan con un trozo de agar que contenga micelio del hongo, o se utiliza una semilla de sorgo infectada con el hongo. El inóculo se coloca sobre la capa de semillas de sorgo.

b) Método de Dunlap modificado con semillas de maíz.

El método de multiplicación que más se utilizó fue similar al descrito anteriormente, con la diferencia de que en vez de utilizar semillas de sorgo se empearon granos de maíz y en vez de 50 ml de agua se añadieron 60 ml. Esta modificación al método anterior se llevó a cabo debido a que los granos de maíz resultaron más eficientes como medio de inóculo y más fáciles de manejar con las pinzas. La comparación experimental de estos dos tipos de inóculo se describe más adelante en la prueba No. 6



80 gr Tierra
35 gr Sorgo
50 ml Agua



80 gr Tierra
35 gr Maíz
60 ml Agua

FIGURA 2. Diagrama que muestra la forma en que se multi
plica el hongo utilizando frascos planos de -
250 ml.

Inducción de marchitez en plantas de alfalfa.

- a) Prueba 1. Efecto de dos niveles de tierra en la
marchitez de alfalfa.

El principal objetivo de esta prueba fué determinar-
el efecto que tienen dos cantidades distintas de tierra-
sobre la inducción de la Pudrición Texana en plantas de al
falfa. El objetivo secundario fué observar si la planta y

el hongo son capaces de desarrollarse bien dentro de un tubo de ensayo, infectándose la planta con el hongo.

Se utilizó arcilla negra Houston (HBC) tubos de ensayo de 50 ml de capacidad y semillas de alfalfa de la variedad comercial Velluda Peruana. Las plantas fueron inoculadas con una semillas de sorgo infectado con el micelio del hongo, la cual se colocó sobre la tierra al momento de sembrar las semillas de alfalfa, se colocaron dos semillas de alfalfa a 3 mm de profundidad junto a la pared de vidrio del tubo, estas semillas se desinfectaron previamente con lavado en cloro al 2% durante dos minutos. Los tubos fueron llenados con 20 y 30 gr de HBC, se añadieron 5 ml de agua y algodón y se esterilizaron en la autoclave a 1.1 kg/cm^2 durante 45 minutos, al enfriarse se sembró e inoculó simultáneamente junto a la flama del mechero bunsen. Los tubos se volvieron a tapar con el algodón y se colocaron con una ligera inclinación -- (70°) estando las semillas en lado inferior del tubo. Se incubaron a 28°C en una cámara bioclimática Biotronette-Mark III, y se expusieron a un fotoperíodo de 12 horas luz durante tres semanas. Los tratamientos se resumen en la Tabla 1.

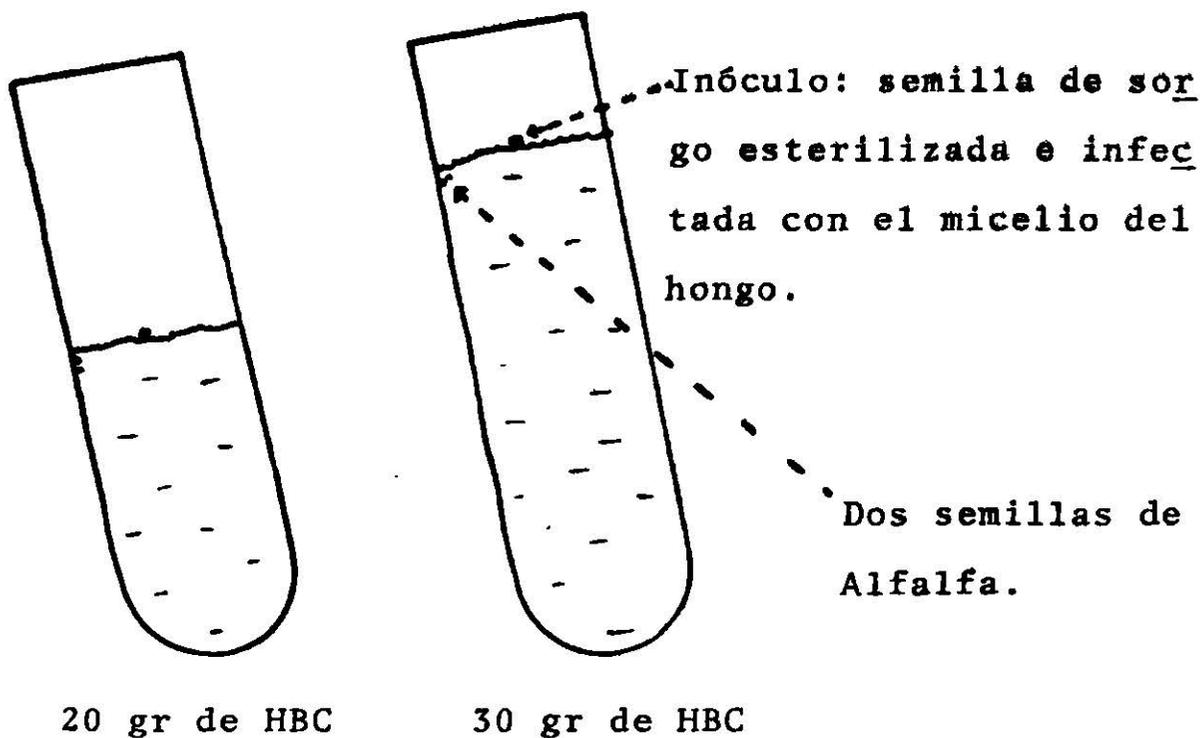
TABLA 1 Efecto de 20 y 30 gr de HBC en la marchitez -
de alfalfa (Variedad comercial Velluda Perua-
na a 28°C.

No. de Tubos	Cantidad de Tierra (gr)	Inoculación
15	20	+
15	20	-
15	30	+
15	30	-

(+) Plantas inoculadas con el hongo

(-) Plantas no inoculadas, testigos

FIGURA 3 Diagrama que muestra la forma en que se colocaron los tubos de ensayo con el objetivo de observar el efecto de dos niveles de tierra sobre la marchitez de la alfalfa.



Los datos que se tomaron de este experimento fueron:
Número de días a la marchitez.

La prueba se realizó con plantas de alfalfa por dos razones, es una planta altamente susceptible al hongo y su reducido tamaño permite la utilización de recipientes de fácil manejo.

Se escogió trabajar en tubos de ensayo debido a que tradicionalmente ha dado buenos resultados para cultivar hongos en forma pura.

El HBC se utilizó basándose en la recomendación de Dunlap (21) acerca de la multiplicación del hongo.

Las semillas de alfalfa se sembraron en número de dos, para evitar la pérdida de la unidad experimental a causa de fallas en la germinación de las semillas, éstas se colocaron junto a la pared inferior del tubo inclinado para que las raíces se desarrollaran sobre esta pared siendo así fáciles de observar, además de que se nota con claridad la forma en que éstas se ven afectadas por el ataque del hongo. La inclinación del tubo permite la entrada de luz eléctrica directamente.

Después de muertas las plantas tratadas, se siguieron observando durante 7 días más para confirmar que la planta vive bien bajo esas condiciones.

b) Prueba 2. Efecto de la luz sobre el desarrollo del hongo y su patogenicidad.

El objetivo de esta prueba fué determinar si la luz tiene influencia importante sobre el desarrollo del hongo y la enfermedad que produce en alfalfa.

En esta prueba se utilizó papel aluminio para cubrir el tubo en la región que tiene tierra, para evitar la entrada de luz, se empleó HBC y tubos de ensayo de 50 ml, - la metodología para el establecimiento de este experimento fué idéntica a la utilizada en la prueba anterior, -- ambas pruebas se realizaron simultáneamente.

La Tabla No. 2 muestra los tratamientos efectuados.

TABLA No. 2 Efecto de la luz sobre el desarrollo del -- hongo y su patogenicidad.

No. de Tubos	Tratamiento	Inoculación
15	con luz	+
15	sin luz	+
15	con luz	-

(+) Inoculados con P. omnivorum

(-) No inoculados, testigo

En esta prueba se utilizaron para todos los tratamientos 20 gr de HBC ya que en la prueba anterior se definió que es suficiente tierra para el buen desarrollo de raíz de la planta, y también así hay espacio suficiente para-

que crezca sin problemas la parte aerea de la alfalfa.

El aluminio se colocó cubriendo por completo la parte inferior del tubo hasta el nivel superior de la tierra, para evitar la falta de luz en la planta.

Los datos que se tomaron fueron los días en que se tardó en morir la primera planta y el tiempo en que murió la última planta. La duración de esta prueba fue de tres semanas, debido a que se deseó confirmar que las plantas no inoculadas no murieran por falta de agua, luz o aire.

c) Prueba 3. Comparación de suelos de Nuevo León y arcilla negra de Houston (HBC) en el desarrollo de la enfermedad.

El objetivo de esta prueba es determinar si es necesario utilizar HBC en todas las pruebas de laboratorio e invernadero, o si se pueden obtener buenos resultados con tierra de Nuevo León, la cual es más fácil de conseguir y tiene la característica de ser arcillosa y alcalina, como el hongo lo requiere.

En esta prueba se utilizaron los dos tipos de tierra mencionados en forma esterilizada y dentro de tubos de en

sayo de 18 x 150 mm (25 ml de capacidad). Los tubos fueron llenados de arcilla deambos tipos hasta la mitad de su capacidad, se humedecieron con 4 ml de agua destilada taparon y esterilizaron en autoclave a 1.1 kg/cm^2 durante 45 minutos, se sembraron dos semillas de alfalfa y en ese mismo momento se inoculó con una semilla de sorgo infectada con el micelio del hongo, no fué necesario tapar ningún tubo con papel aluminio, se colocaron los tubos ligeramente inclinados por razones antes descritas y se mantuvieron en cámara bioclimática a 28°C y con 12 horas diarias de luz, como en las dos pruebas anteriores no ha sido necesario introducir los tubos en baño maría. En la tabla No. 3 se muestran los tratamientos efectuados.

TABLA No. 3 Tratamientos efectuados con la finalidad de determinar el efecto de dos tipos de tierra sobre el desarrollo de la Pudrición Texana.

No. de Tubos	Tipo de Tierra	Inoculación
15	HBC	+
15	HBC	-
15	N.L.	+
15	N.L.	-

(HBC) Arcilla negra de Houston
(N.L.) Tierra de Nuevo León
(+) Plantas inoculadas con el hongo
(-) Plantas no inoculadas, testigos.

d) Prueba 4. Influencia de la materia orgánica esté
ril sobre el desarrollo del hongo.

El objetivo de esta prueba fue determinar si la mate
ria orgánica estéril influye de alguna manera sobre el de
sarrollo del hongo, se esperó aumentar el vigor del cre-
cimiento del hongo para inducir a marchitez las plantas-
de alfalfa en menos tiempo del que se había logrado sin-
la adición de esta materia al suelo.

Como fuente de materia orgánica se utilizaron granos
de sorgo, se colocó un gramo de sorgo por tubo de ensayo
de 18 x 150 mm, la cantidad de tierra de Nuevo León que
se empleó por tubo fué de 18 gr. El gramo de sorgo se --
colocó dentro del tubo en distintas posiciones, un tratau
miento consistió en colocarlo en la superficie de la tieu
rra, otro en colocarlo en la parte media, otro al fondo-
del tubo y un cuarto tratamiento consistió en mezclar el
gramo de sorgo homogéneamente en todo el volumen de la-
tierra.

Estos tubos fueron tapados con algodón, humedecidos,
esterilizados e inoculados como en las pruebas anterio-
res, en estos tratamientoseno se sembró ninguna planta. -

Estos tubos se colocaron en posición vertical. Los tratamientos efectuados en esta prueba se resumen en la tabla No. 4.

TABLA No. 4 Efecto de la materia orgánica estéril (granos de sorgo estériles) sobre el desarrollo del hongo.

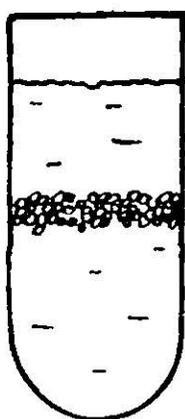
No. de tubos	Posición de un gramo de sorgo
10	Superficie de la tierra
10	Mitad del tubo
10	Fondo del tubo
10	Mezclado homogéneamente

La duración de esta prueba fué de 8 semanas y los datos que se tomaron fueron: Región del tubo en donde se desarrolló mejor el hongo, la existencia de un aumento de la cantidad de rizomorfos o una disminución de éstos, presencia de esclerocios y zona donde se observaron dentro del tubo.

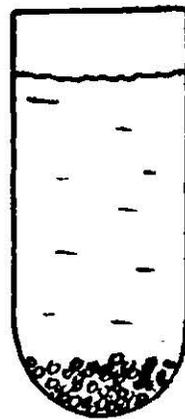
FIGURA No. 4 Diagrama que muestra la colocación de un gramo de sorgo dentro de los tubos de ensayo, para observar la influencia que tiene la materia orgánica estéril sobre el desarrollo del hongo.



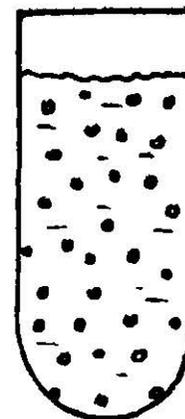
Superficie de la tierra



Parte Media del tubo



Fondo del Tubo



Mezclado homogéneamente

e) Prueba 5. Efecto de niveles de sorgo en la marchitez de la alfalfa.

Con el objeto de determinar si la cantidad de granos de sorgo estéril influye en la inducción de la enfermedad, se probaron 0,10,20,30 y 40% de granos de sorgo en peso mezclados con tierra de Nuevo León, se utilizaron tubos de ensayo de 18 x 150 mm, se llenaron con las mezclas hasta la mitad de la capacidad del tubo fueron tapados con algodón, esterilizados y sembrados con alfalfa

Velluda Peruana e inoculados con una semilla de sorgo infectada como testigos los mismos tratamientos pero sin - inocular con el hongo. La colocación, temperatura y foto periodo en que colocaron fué la misma que en pruebas anteriores. Los tratamientos efectuados se resumen en la - tabla No. 5.

TABLA No. 5 Efecto de 0,10,20,30 y 40% de sorgo estéril sobre el desarrollo de la enfermedad - en plantas de alfalfa.

No. de tubos	% de sorgo (en peso)	Inoculación
10	0	+
10	0	-
10	10	+
10	10	-
10	20	+
10	20	-
10	30	+
10	30	-
10	40	+
10	40	-

(+) Inoculadas

(-) No inoculadas, testigos

La duración del experimento fué de tres semanas y los datos que se tomaron fueron días a la marchitez y desarrollo de la planta.

f) Prueba 6. Comparación de dos tipos de inóculo

El objetivo de esta prueba es determinar si el grano de maíz infectado con el hongo es más eficiente como inóculo que un grano de sorgo ya que es deseable que el hongo se desarrolle en el 100% de los tubos inoculados con semillas infectadas de este hongo.

Para realizar esta prueba se utilizó tierra de Nuevo León, tubos de ensayo de 18 x 150 mm, y un 10% de sorgo mezclado en la tierra, los procesos de tapado con algodón, esterilización, siembra y forma de colocar los tubos es igual a las pruebas anteriores. En todos los tubos se sembraron dos semillas desinfectadas de alfalfa variedad Velluda Peruana. Los tratamientos se resumen en la tabla No. 6.

TABLA No. 6 Comparación entre las semillas de sorgo y de maíz infectadas con el hongo, empleadas como inóculo.

No. de Tubos	Semilla utilizada como inóculo
15	Sorgo
15	Maíz

La duración de esta prueba fué de tres semanas y como datos se tomaron los días a marchitez y presencia de P. omnivorum en la tierra del tubo.

Se escogió como una alternativa posible el grano de maíz porque ofrece la ventaja de que se puede manejar -- más fácil en el momento de la inoculación y debido a su volumen, mucho mayor que el del sorgo, tiene más posibilidades de permanecer húmedo y lograr el desarrollo del hongo dentro de la tierra de los tubos.

g) Prueba 7. Comparación de tres tipos de recipientes.

Para determinar la influencia que tiene el tipo de recipiente sobre la inducción de la enfermedad, se utilizaron tubos de ensayo de 18 x 150 mm, matraces Erlenmeyer de 250 ml y frascos planos de 250 ml. Todos los recipientes se llenaron hasta la mitad de su capacidad con una mezcla de tierra de Nuevo León con 10% de sorgo, se regaron, taparon con algodón, esterilizaron, sembraron con dos semillas de alfalfa e inocularon con una semilla de maíz infectada con el micelio del hongo. Los tratamientos efectuados se resumen en la Tabna No. 7

TABLA No. 7 Comparación entre tubos de ensayo, matraces y botellas planas como recipientes empleados en la inducción de la enfermedad en alfalfa.

No de recipientes	Tipo de recipiente	Inoculación
10	Tubo ensayo 18x150 mm	+
10	Tubo ensayo 18x150 mm	-
10	Matraz Erlenmeyer 250 ml	+
10	Matraz Erlenmeyer 250 ml	-
10	Frasco plano 250 ml	+
10	Frasco plano 250 ml	-

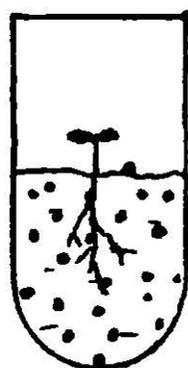
(+) Inoculadas

(-) No inoculadas, testigos

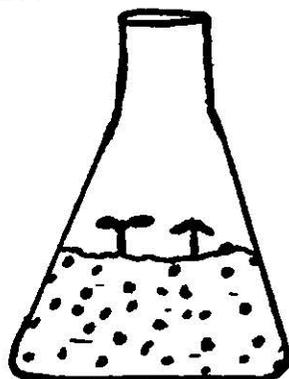
La duración de esta prueba fué de tres semanas, como datos se tomaron los días a marchitez y desarrollo de las plántulas de alfalfa.

Estos recipientes se escogieron para la prueba porque ofrecen la ventaja de que son de fácil manejo y no ocupan mucho espacio dentro del laboratorio, además de que las plantas de alfalfa se pueden observar perfectamente.

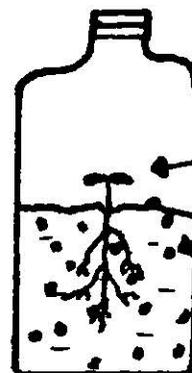
FIGURA 5. Diagrama que muestra la comparación que se realizó entre tubos de ensayo, matraces y frascos planos, utilizados como recipientes en la inducción de la Pudrición Texana en Alfalfa.



Tubo de ensayo
18 x 150 mm



Matraz 250 ml



Frasco plano 250 ml

Alfalfa
Tierra N.L.
+
10% sorgo

Inducción de marchitez en plantas de algodón.

- a) Prueba 8. Efecto de dos tipos de tierra sobre la Marchitez del algodón.

El objetivo de esta prueba fue determinar si existe influencia importante en el desarrollo del Producción Texana en algodón al utilizar arcilla negra de Houston (HBC) y tierra de Nuevo León.

Se utilizaron botellas de boca de 6 cm de diametro con

capacidad de un litro, la tierra se cernió, se colocó en los frascos y se regó, se taparon con papel para meterlos en la autoclave y esterilizarlos a una presión de 1.1 Kg/cm² durante 45 minutos, al enfriarse se sembraron en cada botella tres semillas de algodón de la variedad comercial Deltha Pine, previamente desinfectadas con un lavado de dos minutos en una solución de 2% de cloralex, en forma simultánea a la siembra se inoculó con una semilla de maíz infectada con el micelio del hongo, colocándola sobre la superficie de la tierra.

Los frascos se colocaron en una cámara bioclimática-Biotronette Mark III a 28°C, con un fotoperíodo de 12 -- horas luz durante cuatro semanas. Desde el momento de la siembra hasta la emergencia de las plántulas, los frascos se mantuvieron cerrados con tapa de metal, al emerger éstas los frascos se dejaron destapados. Los tratamientos se resumen en la tabla No. 8.

TABLA No. 8

Efecto de la tierra de Nuevo León y la arcilla negra de Houston (HBC) en el desarrollo de la enfermedad en algodón (v.c. Deltha Pine).

No. botellas 1 lt	Tipo de tierra	Inoculación
7	HBC	+
4	HBC	-
7	N.L.	+
4	N.L.	-

(HBC) Arcilla negra de Houston

(N.L.) Tierra de Nuevo León

(+) Plantas inoculadas

(-) Plantas no inoculadas, testigos

Los datos que se tomaron fueron días a la marchitez y presencia de contaminantes. Se utilizaron semillas de algodón porque son altamente susceptibles al ataque de este hongo y se emplearon de un litro en base a la recomendación hecha por Chávez (14) en 1967. Uno de los tratamientos consistió en sembrar las plantas en arcilla negra de Houston, esta tierra se recomienda utilizar en los experimentos efectuados por Lyda y Burnett (49) en 1969.

b) Prueba 9. Efecto de la tierra esterilizada y no esterilizada sobre la marchitez del algodón.

El objetivo de esta prueba fué determinar si es importante en la inducción de la enfermedad esterilizar la tierra.

La metodología utilizada en esta prueba fué la misma que se empleó en la prueba anterior, con la diferencia de que no se sembraron plantas en HBC algunas unidades experimentales no se esterilizaron. La tabla 9 resume los tratamientos.

TABLA No. 9 Efecto de la tierra de Nuevo León estéril y no estéril sobre la Pudrición Texana en algodón (v.c. Deltha Pine).

No. Botellas 1 lt	Esterilización	Inoculación
7	++	+
4	++	-
7	--	+
4	--	-

- (++) Tierra esterilizada
- (--) Tierra no esterilizada
- (+) Plantas inoculadas con el hongo
- (-) Plantas no inoculadas, testigos.

Los datos tomados fueron días a la marchitez y presencia de contaminantes. Se utilizó únicamente tierra de Nuevo León ya que en pruebas anteriores se observó que es un medio efectivo para desarrollar el hongo.

c) Prueba 10. Inducción de la enfermedad en algodón utilizando tubos de vidrio de 3.6 cm de diámetro.

El objetivo de esta prueba fué inducir la enfermedad en plantas de algodón evitando la presencia de contaminantes.

Los recipientes utilizados fueron tubos de vidrio de 3.6 cm de diámetro, estos tubos originalmente fueron focos de gas neón y se prepararon de la siguiente manera:

- Envolver el tubo en un costal u otra tela.
- Seccionar el tubo golpeándolo ligeramente con un varilla
- Sacar el tubo del costal y ajustar la altura del tubo a 30 cm a partir de la base de metal.
- Exponer a la flama del mechero bunsen el extremo cortado durante dos minutos para eliminar el filo de los bordes.
- Introducir 100 gr de arena y 200 cm³ de agua y agitar

vigorosamente el contenido, con esta práctica se desprende la capa de talco adherida a las paredes del tubo.

Enjuagar el tubo con agua limpia.

Una vez secos se llenaron de una mezcla de tierra de Nuevo León con 10% de sorgo (en peso) hasta una altura de 15 cm y se añadieron 75 ml de agua, se taparon con algodón, se esterilizaron en la autoclave a una presión de 1.1 kg/cm² durante 45 minutos.

En cada tubo se sembraron 2 semillas de algodón (v.c. Deltha Pine) previamente desinfectadas con una solución de cloralex al 2 % durante dos minutos. La siembra se hizo con pinzas de 20 cm de longitud, en forma simultánea a la siembra se inoculó con una semilla de maíz infectada con el micelio del hongo. La siembra y la inoculación se realizaron junto a la flama del mechero bunsen.

Los tubos permanecieron tapados con algodón durante las tres semanas que duró el experimento, estuvieron a temperatura ambiente de 26 a 31°C y con un fotoperíodo de 12 horas, se colocaron ligeramente inclinados (70°C). Los resultados se resumen en la tabla 10.

vigorosamente el contenido, con esta práctica se desprende la capa de talco adherida a las paredes del tubo.

Enjuagar el tubo con agua limpia.

Una vez secos se llenaron de una mezcla de tierra de Nuevo León con 10% de sorgo (en peso) hasta una altura de 15 cm y se añadieron 75 ml de agua, se taparon con algodón, se esterilizaron en la autoclave a una presión de 1.1 kg/cm² durante 45 minutos.

En cada tubo se sembraron 2 semillas de algodón (v.c. Deltha Pine) previamente desinfectadas con una solución de cloralex al 2 % durante dos minutos. La siembra se hizo con pinzas de 20 cm de longitud, en forma simultánea a la siembra se inoculó con una semilla de maíz infectada con el micelio del hongo. La siembra y la inoculación se realizaron junto a la flama del mechero bunsen.

Los tubos permanecieron tapados con algodón durante las tres semanas que duró el experimento, estuvieron a temperatura ambiente de 26 a 31°C y con un fotoperíodo de 12 horas, se colocaron ligeramente inclinados (70°C). Los tartamientos se resumen en la tabla 10.

vigorosamente el contenido, con esta práctica se desprende la capa de talco adherida a las paredes del tubo.

Enjuagar el tubo con agua limpia.

Una vez secos se llenaron de una mezcla de tierra de Nuevo León con 10% de sorgo (en peso) hasta una altura de 15 cm y se añadieron 75 ml de agua, se taparon con algodón, se esterilizaron en la autoclave a una presión de 1.1 kg/cm² durante 45 minutos.

En cada tubo se sembraron 2 semillas de algodón (v.c. Deltha Pine) previamente desinfectadas con una solución de cloralex al 2 % durante dos minutos. La siembra se hizo con pinzas de 20 cm de longitud, en forma simultánea a la siembra se inoculó con una semilla de maíz infectada con el micelio del hongo. La siembra y la inoculación se realizaron junto a la flama del mechero bunsen.

Los tubos permanecieron tapados con algodón durante las tres semanas que duró el experimento, estuvieron a temperatura ambiente de 26 a 31°C y con un fotoperíodo de 12 horas, se colocaron ligeramente inclinados (70°C). Los tartamientos se resumen en la tabla 10.

TABLA 10. Inducción de la Pudrición Texana en plantas- algodón (v.c. Deltha Pine) utilizando tubos - de vidrio de 3.6 cm de diámetro.

Número de Tubos	Inoculación
15	+
15	-

+ Plantas inoculadas

- Plantas no inoculadas, testigos.

Los datos que se tomaron fueron días a marchitez y - presencia de contaminantes. Se utilizaron tubos de neón- con la finalidad de mantener a la planta y al hongo en - un ambiente estéril, evitando así el efecto perjudicial de bacterias y hongos contaminantes.

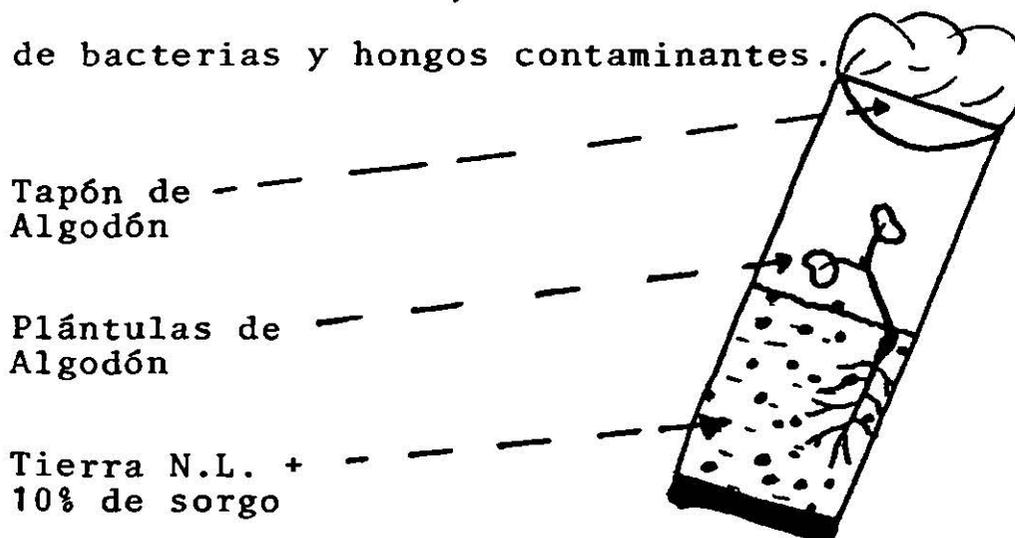


FIGURA 6. Diagrama que muestra el tubo de vidrio utilizando en la inducción de la enfermedad en plántulas de algodón.

RESULTADOS Y DISCUSION

1) Obtención de cultivos puros.

Para obtener cultivos puros de este hongo se extrajeron rizomorfos de raíces enfermas de fresno (Fraxinus fresno) lavando las raíces y tamizando los residuos, los rizomorfos se desinfectaron y sembraron en PDA, mediante este método se sembraron 250 tubos de ensayo y únicamente se obtuvo un cultivo puro del hongo.

Con el método de la separación de rizomorfos directamente de las raíces puestas bajo el microscopio se sembraron 350 tubos de ensayo, obteniéndose dos tubos con cultivo puro del hongo.

Utilizando el método en donde los rizomorfos desinfectados se mantuvieron dentro del agua durante 24 horas, se sembraron 30 tubos, obteniéndose cultivos puros del hongo en 4 de ellos. Los resultados obtenidos en estos procedimientos se resumen en la tabla 11.

TABLA 11. Procedimientos de aislamiento, número de tubos de ensayo utilizados, número de tubos contaminados, rizomorfos no viables y número de cultivos puros obtenidos.

No. de tubos utilizados	Procedimiento empleado	No. de tubos Contaminados	Rizomorfos no viables	Cultivos puros
250	Lavado de raíces	177	72	1
350	Separación en seco +	222	126	2
30	Germinación en agua ++	26	0	4

+ Rizomorfos separados de la raíz bajo el microscopio
 ++ Rizomorfos desinfectados colocados en agua durante 24 horas.

- + Rizomorfos separados de la raíz bajo el microscopio
- ++ Rizomorfos desinfectados colocados en agua durante-
24 horas.

El principal problema que se tuvo fué la presencia de hongos contaminantes, ya que al estar presentes no permiten el desarrollo del P. omnivorum por ser éste un competidor muy pobre en medios de cultivo sintéticos, los contaminantes entraron al tubo de ensayo en la mayor parte de las ocasiones al estar adheridos al rizomorfo, este problema se disminuyó en los casos en que se escogieron para la siembra rizomorfos de color blaquécino,

La mayor parte de los rizomorfos de color café nunca presentaron crecimiento de micelio, debido a que no eran viables, lo que se evitaba en gran parte utilizando rizomorfos jóvenes de color blanco, la metodología utilizada para asegurar la viabilidad de los rizomorfos resultó muy práctica ya que estando 24 horas bajo el agua, se vió claramente cuáles de ellos estaban vivos y eran aptos para ser sembrados, sin embargo el problema de las contaminaciones no se resolvió del todo con este método.

La forma de encontrar rizomorfos blancos es extrayendo raíces delgadas a una profundidad más de 20 cm. bajo el sue-

lo, en zonas en donde el suelo presenta humedad la mayor parte del año.

El crecimiento del hongo sobre PDA es fácil de reconocer, el micelio es blanco translúcido y no es algonoso ni denso, a simple vista se observan los rizomorfos que comienzan a crecer a partir de las 24 horas de haber sido colocado el rizomordo en el medio de cultivo. Después de tres o cuatro días de crecimiento el cultivo toma una coloración blanca y los rizomorfos crecen sobre las paredes del tubo, el hongo en este medio no esporula ni forma esclerocios, a 28°C presenta una gran velocidad de crecimiento, pudiendo cubrir la superficie de una caja Petri en 7 días,. Después de una semana de crecimiento el cultivo comienza a tomar una coloración café claro y el PDA se tiñe de color café oscuro. A los 15 días de crecimiento la colonia presenta color café y tiene aspecto algonoso compacto.

Multiplicación de Phymatotrichum omnivorum.

a) Método de Dunlap modificado, con semillas de sorgo.

El Método original de Dunlap multiplicando el hongo en matraces de 250 ml. presentó problemas debido a que al extraer las semillas de sorgo el cultivo se contaminaba, proba-

blemente debido a que el matraz tiene boca muy ancha y a que es necesario meter las pinzas a casi 10 cms. de la boca, con lo es fácil introducir hongos contaminantes.

Las contaminaciones se lograron evitar cuando se colocó el mismo medio de cultivo en tubos de ensayo, pero cada tubo puede contener una cantidad muy pequeña del cultivo.

El mejor método que se utilizó para la multiplicación del hongo sobre sorgo fué cuando el medio tierra-sorgo-agua se introdujo en las botellas planas de 250 ml., estos envases presentaron la ventaja de que cabía gran cantidad de inóculo en su interior y extraerlo con pinzas resultaba fácil ya que las semillas de sorgo estaban muy cerca de la entrada, también se evitó en gran parte el problema de las contaminaciones ya que la entrada de la botella es muy estrecha y se reducen así las posibilidades de que los contaminantes entren.

En este medio de cultivo se observaron gran cantidad de esclerocios dentro de la tierra.

El problema que se presentó al utilizar este método fué el manejo de las semillas con las pinzas, ya que son muy pequeñas y se aglomeran adhiriéndose unas a otras a causa del micelio del hongo que se ha desarrollado sobre ellas. Por es

ta razón se decidió modificar el método utilizando semillas de mayor tamaño como se describe a continuación.

Método de Dunlap modificado con semillas de maíz.

El método de multiplicación del hongo utilizado anteriormente resultó problemático debido a reducido tamaño de las semillas de sorgo, por esta razón el método se modificó utilizando semillas de maíz, de esta forma fué más fácil manejarlas con las pinzas al sacarlas de la botella.

El hongo se desarrolló con gran rapidez sobre estas semillas, cubriendo su totalidad en una semana y presentando un crecimiento algonoso y de color café a las dos semanas de crecimiento, también se observaron gran cantidad de rizomorfos creciendo sobre las paredes del recipiente y esclerocios formándose en los espacios porosos de la tierra, los cuales fueron pequeños y blancos en un principio, tornándose después grandes, esféricos o amorfos de color café, presentándose en ocasiones en forma de cadena. El hongo tampoco esporuló en este medio de cultivo.

Inducción de marchitez en plantas de alfalfa.

ta razón se decidió modificar el método utilizando semillas de mayor tamaño como se describe a continuación.

Método de Dunlap modificado con semillas de maíz.

El método de multiplicación del hongo utilizado anteriormente resultó problemático debido a reducido tamaño de las semillas de sorgo, por esta razón el método se modificó utilizando semillas de maíz, de esta forma fué más fácil manejarlas con las pinzas al sacarlas de la botella.

El hongo se desarrolló con gran rapidez sobre estas semillas, cubriendo su totalidad en una semana y presentando un crecimiento algonoso y de color café a las dos semanas de crecimiento, también se observaron gran cantidad de rizomorfos creciendo sobre las paredes del recipiente y esclerocios formándose en los espacios porosos de la tierra, los cuales fueron pequeños y blancos en un principio, tornándose después grandes, esféricos o amorfos de color café, presentándose en ocasiones en forma de cadena. El hongo tampoco esporuló en este medio de cultivo.

Inducción de marchitez en plantas de alfalfa.

a) Prueba 1. Efecto de dos niveles de tierra en la -
marchitez de alfalfa.

Este método consistió en la siembra e inoculación de -
las plantas de alfalfa en tubos de ensayo que contenían 20 y-
30 grs. de HBC, se inocularon con una semilla de sorgo infec-
tada con el micelio del hongo y los tubos se colocaron ligera-
mente inclinados en cámara bioclimática a 28°C y con 12 horas
de luz al día. No se utilizó el baño maría.

En esta prueba la cantidad de tierra utilizada no mos--
tró efecto sobre la inducción de la enfermedad, ya que todas-
las plantas inoculadas murieron a causa de 1 hongo, el 100%-
de las plantas murieron entre el noveno y el décimo quinto --
día, los resultados se resumen en la tabla 12.

TABLA 12. Días a la marchitez de la alfalfa sembrada en tubos de ensayo con 20 y 30 gr de arcilla negra de Houston (HBC).

No. de tubos	Gramos de tierra	Inoculación	Días de marchitez*
15	20	+	9 a 15
15	20	-	- - -
15	30	+	9 a 15
15	30	-	- - -

(+) Inoculadas con el hongo

(-) No inoculadas, testigos

* Tiempo que tardan en morir el 100% de las plantas

En los tubos inoculados se observó crecimiento del hongo en forma de rizomorfos que llegaron al fondo de éste en 5-días y crecieron también sobre la pared del tubo, no se observaron esclerocios. Las plantas inoculadas mostraron un crecimiento lento, seguidas de una marchitez permanente, el hongo se observó creciendo en la base del tallo de la plántula y sobre las raíces de ésta, causándole necrosis en forma de manchas de color café, el aspecto del hongo sobre las raíces fué algodonoso blanco compacto.

Las primeras plantas murieron al noveno día y el resto-

murió antes de los 15 días. Las plantas no inoculadas mostraron un crecimiento normal, pero en los tubos que contenían 30 gr de HBC tuvieron el problema de la falta de espacio aéreo - suficiente para crecer, ya que en pocos días llegaron al tapón de algodón, por esta razón en la prueba 2 se utilizaron 20 gr de tierra, con esta cantidad la planta no tiene problemas por falta de espacio radicular ni aéreo.

b) Prueba 2. Efecto de la luz sobre el desarrollo del hongo y su patogenicidad.

El objetivo de la prueba fué determinar si la luz tiene algún efecto sobre el desarrollo del hongo y la enfermedad, - para lo cuál se sembraron plantas de alfalfa en tubos de ensayo con 20 gr de arcilla negra de Houston, se inocularon y colocaron a 28°C, los testigos y plantas inoculadas se dejaron expuestos a la luz, pero 15 tubos con plantas inoculadas se cubrieron con papel aluminio para evitar la entrada de la luz a la zona radicular, la forma en que los resultados se elevaron fué tomando como datos el tiempo que tardaron las plantas en morir a causa de la Pudrición Texana.

En esta prueba no se observó ningún efecto importante de la luz sobre el desarrollo del hongo y la enfermedad, ya que - todas las plantas murieron entre el noveno y decimoquinto día. Los resultados se resumen en la tabla 13.

TABLA 13. Días a la marchitez de la alfalfa sembrada en tubos de ensayo con 20 gr de HBC con y sin luz.

No. de tubos	Tratamiento	Inoculación	Días a la marchitez*
15	con luz	+	9 a 15
15	sin luz	+	9 a 15
15	con luz	-	- - -

(+) Plantas inoculadas con el hongo

(-) Plantas no inoculadas, testigos.

(*) Días que tardaron en morir el 100% de las plantas.

En esta prueba no se observó ninguna diferencia en el comportamiento del hongo, por lo que se determinó que no es necesario cubrir los tubos y que evitar la luz no fomenta un desarrollo más vigoroso del hongo.

c) Prueba 3. Comparación de suelos de Nuevo León y arcilla negra de Houston (HBC) en el desarrollo de la enfermedad.

El objetivo de esta prueba fué determinar si era necesario utilizar HBC o era posible emplear tierra de Nuevo León con los mismos resultados, para esto se sembró alfalfa en tubos de ensayo de 18 x 150 mm que contenían HBC y en otras ---

tierras de Nuevo León, se inocularon y se colocaron en la cámara bioclimática 28°C,

En esta prueba no se observó diferencia en el desarrollo de la enfermedad ya que las plantas murieron en el mismo tiempo en ambos tratamientos. Los resultados se resumen en la tabla 14.

TABLA 14. Días a la marchitez de la alfalfa sembrada en tubos de ensayo con arcilla negra de Houston (HBC) y tierra de Nuevo León.

No. de tubos	Tipo de tierra	Inoculación	Días a marchitez *
15	HBC	+	9 a 15
15	HBC	-	- - -
15	Nuevo León	+	9 a 15
15	Nuevo León	-	- - -

(+) Plantas inoculadas con el hongo

(-) Plantas no inoculadas, testigos

* Días que tardaron en morir el 100 % de las plantas

Los resultados indican que sí es posible utilizar tierra de Nuevo León para obtener los mismos buenos resultados.

Se observó un número ligeramente mayor de rizomorfos dentro de la tierra de Nuevo León, probablemente debido a la mayor porosidad de este tipo de tierra, ya que los rizomorfos crecen con mayor vigor en los espacios porosos de la tierra.

d) Prueba 4. Influencia de la materia orgánica estéril sobre el desarrollo del hongo.

El objetivo de esta prueba fué determinar si era posible aumentar el vigor y desarrollo del hongo incorporando materia orgánica estéril a la tierra. Para efectuar esta prueba se colocó un gramo de sorgo en la parte superior, media y al fondo del tubo, y otro gramo fué mezclado en todo el volumen de tierra, se utilizó tierra de Nuevo León en tubos de ensayo de 18 x 150 mm, se tomaron como datos los días a la marchitez de la alfalfa y el desarrollo del hongo.

Los resultados de esta prueba indican que el hongo sí se vé afectado en su desarrollo por la presencia de la materia orgánica estéril en la tierra, en cada tubo se observó un gran desarrollo de rizomorfos en la zona en donde se colocó el gramo de sorgo, también se presentó un abundante crecimiento micelia en forma algodonosa y blanca que cubría por completo a los granos de sorgo, en esta región se observaron esclerocios formándose a partir de los rizomorfos existentes.

En el caso en donde el grano de sorgo se mezcló en la tierra se observó un crecimiento abundante del hongo en todo el tubo, se desarrollaron gran cantidad de rizomorfos y esclerocios.

Los resultados se resumen en la tabla 15.

TABLA 15. Efectos que presentaron en el desarrollo del hongo al incorporar materia orgánica estéril en la tierra en diferentes posiciones dentro del tubo de ensayo.

No. de tubos	Posición del sorgo	Crecimiento uniforme
10	Superficial	no
10	Mitad del tubo	no
10	Fondo del tubo	no
10	Mezclado en tierra	sí

Los resultados indican que sí es conveniente incorporar materia orgánica estéril a la tierra en forma de granos de sorgo, ya que el hongo se desarrolla con más vigor, se producen más rizomorfos, el grosor de éstos es mayor y se presentan esclerocios, estos fenómenos pueden deberse a que el sorgo es utilizado como fuente de alimento para el hongo y a que el sorgo provee de una mayor porosidad al suelo, con lo que este crece con más libertad.

Los resultados demuestran que la mejor forma de incorporar el sorgo es mezclándolo homogéneamente en todo el volumen, ya que así se obtiene un desarrollo aumentado y uniforme dentro del tubo, por esta razón en las pruebas posteriores se utilizó la tierra mezclada con sorgo.

e) Prueba 5. Efecto de niveles de sorgo en la marchitez de la alfalfa.

Con el objetivo de determinar cómo afectan al desarrollo del hongo y su patogenicidad las diferentes cantidades de sorgo mezcladas en la tierra, se probaron 0, 10, 20, 30 y 40% de sorgo en la tierra dentro de tubos de ensayo, utilizando tierra de Nuevo León, se esterilizaron, se sembraron dos semidesinfectadas y se colocaron en cámara bioclimática, los datos que se tomaron fueron días a la marchitez, desarrollo del hongo y de la planta.

Los resultados de esta prueba indican que al mezclar 40% de sorgo en la tierra existen problemas para el desarrollo del hongo, probablemente debido a que el grano de sorgo infectado con micelio utilizado como inóculo, se seca debido a que la tierra en donde fué colocado es demasiado porosa, evitándose que el micelio comience a crecer, en este caso sólo hubo 60% de mortalidad, en el tubo donde se mezcló 30% de

sorgo sucedió el mismo fenómeno en menor escala, existiendo - un 80% de mortalidad, en los de 0 y 20% de sorgo en la tierra existió un 90% de mortalidad.

Cuando se mezcló 10% de sorgo todas las plantas murieron. En las mezclas de sorgo del 10 al 40% las plantas que sí resultaron infectadas murieron entre el octavo y el décimo cuarto día, lográndose el objetivo de aumentar la patogenicidad del hongo con la incorporación de materia orgánica estéril a la tierra. La tabla 16 muestra los resultados resumidos.

TABLA 16. Efecto de 0, 10, 20, 30, y 40% de sorgo estéril mezclado en la tierra, sobre el desarrollo del hongo y la enfermedad en plantas de alfalfa.

No. de tubos	% de sorgo	Inoculación	% mortalidad	días a - marchitez
10	0	+	90	9 a 15
10	0	-	--	- - -
10	10	+	100	8 a 14
10	10	-	--	- - -
10	20	+	90	8 a 14
10	20	-	--	- - -
10	30	+	80	8 a 14
10	30	-	--	- - -
10	40	+	60	8 a 14
10	40	-	--	- -

(+) Inoculadas con el hongo

(-) No inoculadas, plantas testigo

Los resultados de estas pruebas demuestran que el 10% de sorgo mezclado en la tierra es la mejor cantidad, ya que no se presentaron problemas por falta de mortalidad y todas las plantas inoculadas con este porcentaje murieron entre los 8 a 14 días.

El hongo se vió muy bien desarrollado en todos los tubos en que éste se presentó, formándose gran cantidad de rizomorfos y esclerocios.

El problema de la baja mortalidad que se presentó en el resto de los tratamientos se debió a que la planta no fué infectada con el hongo, por la falla que hubo en la inoculación al sacarse el grano de sorgo con micelio del hongo.

Todas las plantas testigo mostraron un desarrollo normal.

f) Prueba 6. Comparación de dos tipos de inóculo.

Con el objetivo de evitar los problemas que presenta el grano de sorgo como fuente de inóculo, se probó y se comparó-

con éste el grano de maíz, para lo cuál se sembró alfalfa en tubos de ensayo, 15 de ellos fueron inoculados con una semilla de sorgo y otros 15 con una semilla de maíz infectada con micelio de Phymatotrichum omnivorum. Los datos que se tomaron fueron días a la marchitez y desarrollo del hongo.

Los resultados indican que cuando se inocula con una semilla sorgo la mortalidad es de 80%, y cuando se inocula con una de maíz la mortalidad es del 100%. La tabla 17 resume -- los resultados.

TABLA 17. Días a la marchitez de alfalfa y % de mortalidad -- comparando semillas de sorgo y maíz infectadas con el micelio del hongo, utilizadas como inóculos.

No. de tubos	Inóculo	Días a marchitez	% de mortalidad
15	sorgo	8 a 14	80
15	maíz	8 a 14	100

El 80% de mortalidad al inocular con semillas de sorgo con micelio del hongo se debe a que por ser ésta una semilla-pequeña, en ocasiones se seca y no se desarrolla el hongo en la tierra.

El grano de maíz ofrece la ventaja de que es más fácil manejarlo con las pinzas y al colocarlo sobre la tierra mezclada con sorgo, debido a su volúmen, no se seca y permanece el micelio viable, lográndose así el desarrollo del hongo -- dentro del tubo.

Prueba 7. Comparación de tres tipos de recipientes.

Con la finalidad de determinar la influencia que tiene el tipo de recipiente sobre la inducción de la enfermedad, se utilizaron tubos de ensayo, matraces Erlenmeyer de 250 ml y - botellas planas de 250 ml, se llenaron hasta la mitad de su - capacidad con una mezcla de tierra con 10% de sorgo, se esterilizaron tapados con algodón, se sembraron dos semillas de - alfalfa desinfectadas y se inoculó con una semilla de maíz infectada con el micelio del hongo. Los datos que se tomaron - fueron días a la marchitez y desarrollo de la planta.

Los resultados indican que cualquiera de los tres envases es eficiente para producir el 100% de mortalidad, la diferencia que se aprecia es en los días a la marchitez ya que en el tubo de ensayo las plantas murieron entre el octavo y - el décimocuarto día, mientras que en los otros dos recipientes las plantas murieron entre el décimo y el décimosexto día. Los resultados se resumen en la tabla 18.

TABLA 18. Comparación de tres tipos de recipientes en su efecto sobre los días a marchitez de alfalfa y % de mortalidad, utilizando tierra de Nuevo León.

No. de recipientes	Tipo de recipientes	Inoculación	Días a marchitez	% de mortalidad
10	Tubo de ensayo 18 x 150 mm	+	8 a 14	100
10	Tubo ensayo	-	- - -	- - -
10	Matraz Erl. 250 ml.	+	10 a 16	100
10	Matraz Erl.	-	- - -	- -
10	Botella plana 250 ml	+	10 a 16	100
10	Bot, plana	-	- - -	- -

(+) Plantas inoculadas

(-) Plantas no inoculadas, testigos

En los matraces y botellas planas, las plantas de alfalfa tardaron más días en morir probablemente debido a que existió menos contacto de las raíces de alfalfa con el hongo, pero presentaron la ventaja de que las plantas testigo se desarrollaron perfectamente, además es posible observar el desarrollo de las raíces en las botellas planas, lo que no es posible hacer con los matraces.

Introducción de la marchitez en plantas de algodón.

a) Prueba 8. Efecto de dos tipos de tierra sobre la marchitez del algodón.

Con el objetivo de determinar si existe influencia importante en el desarrollo de la enfermedad en algodón al utilizar arcilla negra de Houston y tierra de Nuevo León se utilizaron botellas con boca de 6 cm. de diámetro con capacidad de 1 litro, se llenaron de tierra, se esterilizaron, se sembraron tres semillas de algodón desinfectadas y se taparon las botellas con tapa metálica, se incubaron a temperatura de 28°C.

Las botellas se destaparon al emerger las plantas.

Los datos que se tomaron fueron días a la marchitez y presencia de contaminantes.

Los resultados de esta prueba indican que ninguna planta murió a causa de la Pudrición Texana, muriendo el 30% de ellas antes de las tres semanas por causa del ataque de hongos contaminantes el resto de las plantas no murieron en las tres semanas que duró el experimento. Los resultados se resumen en la tabla 19.

TABLA 19. Días a la marchitez del algodón y % de mortalidad comparando los efectos de la arcilla negra de --- Houston con la tierra de Nuevo León en botellas - de 1 lt.

No. de botellas	Tipo de tierra	Inoculación	Días a marchitez	% de mortalidad
7	HBC	+	--	30
4	HBC	-	--	-
7	N.L.	+	--	30
4	N.L.	-	--	-

- (HBC) Arcilla negra de Houston
- (N.L.) Tierra de Nuevo León
- (+) Plantas inoculadas con el hongo
- (-) Plantas no inoculadas, testigos
- (--) No existieron estos datos

En este experimento no se pudo evaluar el efecto de los dos tipos de tierra ya que los frascos se contaminaron y el P. omnivorum no se desarrolló bien, además los hongos contaminantes causaron la muerte del 30% de las plantas en ambos tipos de tierra, estas contaminaciones se deben a que los frascos permanecieron abiertos desde que la planta de algodón -- emergió.

- b) Prueba 9. Efecto de la tierra esterilizada y no esterilizada sobre la marchitez del algodón.

El objetivo de esta prueba fué determinar si la esterilidad de la tierra es un factor importante para inducir la Pudrición Texana en algodón. Se utilizaron frascos de 1 lt y tierra de Nuevo León, se sembraron tres semillas desinfectadas de algodón y hubo dos tratamientos, tierra esterilizada y tierra noesterilizada, los datos que se tomaron fueron días a la marchitez y presencia de contaminantes.

El efecto de la tierra no esterilizada mostró que aumenta la cantidad de hongos contaminantes, ya que todas las plantas murieron a causa de hongos distintos al P. omnivorum, en el caso de la prueba en donde sí se esterilizó la tierra el 60% de las plantas murieron a causa de hongos contaminantes y el resto de ellas no murió en las tres semanas que duró el experimento. Se observó que al quinto día de desarrollo del hongo éste dejó de crecer y no se desarrolló sobre las raíces de la plántula. Los resultados se resumen en la tabla 20.

TABLA 20. Días a la marchitez y % de mortalidad en plantas de algodón en tierra esterilizada y no esterilizada, utilizando botellas de 1 lt.

No. de botellas	Tratamiento	Inoculación	Días a marchitez	% de mortalidad.
7	T. estéril	+	- - - -	60
4	T. estéril	-	- - - -	- -
7	T. no estéril	+	- - - -	100
4	T. no estéril	-	- - - -	- -

(T. estéril) Tierra de Nuevo León esterilizada
 (T. estéril) Tierra de N.L. no esterilizada
 (+) Plantas inoculadas con el hongo
 (-) Plantas no inoculadas, testigos
 (--) No existieron esos datos

Con esta prueba se determinó que no es posible trabajar bajo condiciones de no esterilidad, ya que los hongos contaminantes afectan de manera importante el desarrollo del hongo y la planta.

La esterilización del suelo ayuda a controlar el problema de los contaminantes pero no es posible trabajar con frascos de boca ancha abiertos, ya que se contaminan con gran facilidad, alternando grandemente los resultados experimenta---

les.

- c) Prueba 10. Inducción de la enfermedad en algodón - utilizando tubos de vidrio de 3.6 cm. - de diámetro.

El objetivo de esta prueba fué inducir la marchitez de las plantas de algodón evitando la presencia de hongos y bacterias contaminantes. Para efectuar esta prueba se utilizaron secciones de focos de neón, se lavaron y se utilizó tierra de Nuevo León con 10% de sorgo, tapadas con algodón, sembradas con semillas desinfectadas de algodón e inoculadas junto a la flama del mechero bunsen con una semilla de maíz con el micelio del hongo, se tomaron como datos días a la marchitez.

Los resultados de esta prueba demuestran que este tipo de recipiente es muy efectivo para evitar las contaminaciones ya que el 100% de las plantas murieron a causa del P. omnivorum.

Se observó en la tierra un gran cantidad de rizomorfos y esclerocios, la raíz se vió envuelta en micelio y rizomorfos de P. omnivorum y esto causó subsecuentemente la marchitez

de planta.

TABLA 21. Días a la marchitez y/o de mortalidad de algodón. - sembrado en tubos de vidrio de 3.6 cm de diámetro - con tierra de Nuevo León y 10 % de sorgo estéril.

No. de tubos	Inoculación	Días a marchitez	% de mortalidad
15	+	9 a 15	100
15	-	- - -	- -

(+) Plantas inoculadas

(-) Plantas no inoculadas, testigos.

CONCLUSIONES

- 1.- Sí es posible inducir la Pudrición Texana en plántulas de alfalfa y algodón bajo condiciones controladas de luz, temperatura, humedad y sustrato.
- 2.- Los recipientes de vidrio cerrados con tapón de algodón son muy eficientes al ser utilizados en pruebas de inducción de marchitez en alfalfa y algodón.
- 3.- El tubo de ensayo de 18 x 150 mm (25ml) fué el recipiente que resultó más efectivo en la inducción de la enfermedad en alfalfa.
- 4.- El tubo de vidrio de 3.6 cm de diámetro fué el recipiente más efectivo para inducir la Pudrición Texana en algodón.
- 5.- El mejor método para evitar la presencia de hongos y bacterias contaminantes fué la esterilización de la tierra húmeda dentro de los recipientes de vidrio tapados con algodón.
- 6.- El mejor sustrato que se utilizó para inducir esta enfermedad en alfalfa y algodón fué la tierra de Nuevo

León; mezclada con 10% de sorgo (en peso) .

- 7.- No es necesario utilizar el baño maría para mantener -- las unidades experimentales a una temperatura constan-- te de 28°C, ya que la temperatura puede estar entre los 26°y 32°C sin que se afecten de manera importante los - resultados.
- 8.- No es necesario utilizar la arcilla negra de Houston -- (HBC) ni arena para inducir esta enfermedad en algodón- o alfalfa.
- 9.- La presencia o ausencia de luz no afecta de manera im- portante la inducción de esta enfermedad.
- 10.- La corta edad del algodón no impide que éste sea ataca- do por el hongo.
- 11.- El mejor método para la otención de cultivos puros del- hongo fué la separación con pinzas de los rizomorfos de la raíz, lavando, desinfectando y dejando sumergidos -- los rizomorfos bajo agua estéril durante 24 horas.
- 12.- El frasco plano de 250 ml fué el recipiente que resultó

más eficiente para multiplicar el hongo.

13.- El grano de maíz infectado con el micelio del hongo fué el material de inoculación más eficiente que se encontró.

14.- Para obtener esclerocios en el laboratorio es necesario añadir altas cantidades de materia orgánica estéril a la tierra que se utilice.

RESUMEN

Esta investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Nematología y Fitopatología, en la sección de Graduados en Agricultura del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey.

La Pudrición Texana causada por el hongo del suelo Phymatotrichum omnivorum es una enfermedad de las plantas muy destructiva y su control eficiente no se ha logrado aún en México, la principal barrera que existe para investigar este hongo es la falta de un método de laboratorio que asegure la muerte de las plantas inoculadas con el hongo, una vez establecido el método se podrán llevar a cabo bioensayos con fungicidas, resistencia genética de las plantas, control biológico, etc. El objetivo de esta tesis es establecer el método óptimo para inducir esta enfermedad en alfalfa y algodón bajo condiciones controladas. La metodología recomendada por distintos investigadores se simplificó y adaptó a las condiciones de material y equipo sencillo existentes en este laboratorio.

1) Obtención de cultivos puros.

Con esta finalidad se extrajeron raíces de fresno (Fraxinus -- fresno) atacadas por el hongo, se separaron los rizomorfos de las raíces en dos formas, lavando las raíces y tamizando el -- agua con residuos de tierra y rizomorfos, el método más efi- -

ciente fue separarlos directamente con una pinza colocando la raíz bajo el microscopio de disección, los rizomorfos se lavaron mediante agitación mecánica con soluciones jabonosas y de desinfectantes, después se pasaron a medio de cultivo de papa - dextrosa agar con 200 ppm de sulfato de estreptomicina dentro de tubos de ensayo, mediante las dos metodologías descritas se sembraron 600 tubos de ensayo, de los cuales sólo tres resultaron con cultivo puro.

Un método más eficiente fue el que se aplicó en el último paso del lavado, donde se dejan sumergidos los rizomorfos en agua - durante 24 horas, lográndose así sembrar únicamente rizomorfos con crecimiento micelial visible, por este método se sembraron 30 tubos y se obtuvieron 4 cultivos puros del hongo.

2) Multiplicación de Phymatotrichum omnivorum.

Para multiplicar el hongo se modificó el método Dunlap utilizando para ello frascos planos de 250 ml, en donde se colocaron 80 gr de tierra, 35 gramos de sorgo y 50 ml de agua destilada, después de esterilizados se inocularon con el hongo. Debido a que las semillas de sorgo utilizadas presentaron problemas de manejo por su reducido tamaño y a que no siempre se lograba inducir marchitez con ellas, se utilizaron para la multiplicación del hongo semillas de maíz, en este caso se añadieron 60 ml de agua, inoculando el frasco previamente esterilizado con el contenido de suelo-semillas-agua con un trozo de ---

agar llevando el cultivo del hongo. El hongo se desarrolló bien sobre este substrato formando gran cantidad de rizomorfos y esclerocios, el grano de maíz infectado con el micelio del hongo resultó ser un inóculo muy eficiente.

3) Inducción de la marchitez en plantas de alfalfa.

a) Efecto de dos niveles de tierra en la marchitez de alfalfa.

Con el objetivo de determinar si existe un efecto importante en la inducción de la enfermedad al utilizar dos cantidades distintas de arcilla negra de Houston (HBC), se colocaron 20 y 30 gr de arcilla en tubos de ensayo de 50 ml, se regaron, se taparon con algodón y se esterilizaron en autoclave, al enfriarse se sembraron dos semillas de alfalfa (v.c. Velluda Peruana) previamente desinfectadas, simultáneamente a la siembra se efectuó la inoculación con una semilla de sorgo infectada con el micelio del hongo, colocándola en la superficie de la tierra, los tubos se mantuvieron tapados con algodón en cámara bioclimática a temperaturas de 26 a 30°C y con 12 horas de luz al día. Como testigos se dejaron plantas sin inocular, cada tratamiento constó de 15 repeticiones.

No se observó ninguna influencia de la cantidad de tierra utilizada sobre el desarrollo de la enfermedad, ya que todas las plantas inoculadas murieron entre el noveno y el décimo quinto

día, mientras que los testigos permanecieron vivos.

- b) Efecto de la luz sobre el desarrollo del hongo y su patogenicidad.

Con el objetivo de determinar si la luz afecta el desarrollo del hongo se efectuó esta prueba, en donde se utilizó la misma metodología que en la prueba anterior, con la diferencia de que 15 tubos con alfalfa inoculada fueron envueltos en papel aluminio para evitar la entrada de luz a la sección del tubo que contenía tierra.

En esta prueba el 100% de las plantas inoculadas murieron entre el noveno y el décimoquinto día a partir de la inoculación, con lo que se concluye que la presencia o ausencia de luz no afecta de manera importante el desarrollo del hongo ni su patogenicidad.

- c) Comparación de suelos de Nuevo León y arcilla negra de Houston (HBC) en el desarrollo de la enfermedad.

Con la finalidad de determinar la posibilidad de utilizar tierra de Nuevo León en vez del HBC sin dejar de obtener buenos resultados en la inducción de la enfermedad, se sembraron dos semillas de alfalfa desinfectadas en los dos tipos de tierra, dentro de tubos de ensayo de 18 x 150 mm, se regaron con 4 ml

de agua y el resto de la metodología es la misma de las pruebas anteriores.

Los resultados obtenidos en esta prueba indican que utilizando cualquiera de los dos tipos de tierra se obtienen los mismos resultados, todas las plantas inoculadas murieron entre los 9 y los 15 días, los testigos presentaron un crecimiento normal.

d) Influencia de la materia orgánica estéril sobre el desarrollo del hongo.

El objetivo de esta prueba fue aumentar el grado en que se desarrolla el hongo y conocer de que manera es éste afectado por la adición de materia orgánica estéril a la tierra.

Para realizar esta prueba se incorporó a cada tubo de ensayo - un gramo de sorgo, las posiciones en que éste se colocó fueron: sobre la tierra, a mitad del tubo, en el fondo del tubo y un gramo mezclado en todo el volumen de la tierra, se utilizó tierra de Nuevo León, tubos de ensayo de 18 x 150 mm, en esta prueba no se sembró ninguna planta, los procesos de humedecimiento, tapado con algodón, esterilización e inoculación son iguales a los anteriormente descritos, la incubación fue a 28° C.

El hongo, después de 10 días de observación, se desarrolló in-

tensamente en la región del tubo que contenía sorgo, mostrando gran cantidad de rizomorfos y esclerocios, pero en el tubo don de se mezcló el gramo de sorgo en la tierra, el hongo se desarrolló con un gran crecimiento en todo el tubo, concluyéndose que la materia orgánica estéril provoca un aumento en el vigor de crecimiento del hongo y que para lograr este efecto en su mayor expresión es mejor mezclar el sorgo en la tierra.

e) Efecto de niveles de sorgo en la marchitez de la alfalfa.

Con el objetivo de determinar si la cantidad de sorgo mezclado en la tierra influye en la enfermedad, se probaron mezclas de sorgo de 0, 10, 20, 30, y 40% en peso, dentro de tubos de ensayo, se utilizó tierra de Nuevo León y se sembraron dos semi- -llas desinfectadas de alfalfa en cada tubo, se colocaron con un fotoperiodo de 12 horas de luz y a una temperatura de 26 a 31°C. Se prepararon 10 tubos por tratamiento y 10 tubos con alfalfa sin inocular por cada uno de estos tratamientos.

En esta prueba se presentó el problema de que no en todos los tubos inoculados se desarrolló el hongo, por lo que sólo se -- presentó el 100% de mortalidad en el caso donde se mezcló en la tierra 10% de sorgo, con 0 y 20% de sorgo hubo 90% de mortalidad y con 40% sorgo la mortalidad sólo fue del 60%.

En los casos donde el hongo si se desarrolló, éste mostró un desarrollo profuso de rizomorfos y esclerocios, todas las plan

tas infectadas murieron entre el octavo y el décimocuarto día, excepto en los tubos en donde no se mezcló sorgo, ya que la planta tardó en promedio un día más en morir, los testigos mostraron crecimiento normal observándose que el sorgo mezclado con la tierra no altera el crecimiento de la plántula de alfalfa.

De esta prueba se concluye que la mejor cantidad de sorgo a mezclar en la tierra es del 10% en peso.

f) Comparación de dos tipos de inóculo.

Con el objetivo de evitar los problemas que causó el grano de sorgo utilizado como inóculo, ya que éste se secaba, se comparó su eficiencia con la de granos de maíz infectados con el micelio del hongo, para lo cual se sembraron 15 tubos de ensayo con alfalfa y se inocularon con una semilla de sorgo y otros 15 tubos se inocularon con semilla de maíz. Se utilizó tierra de Nuevo León mezclada con 10% de sorgo.

Cuando se inoculó con grano de sorgo la mortalidad de las plantas de alfalfa fue del 80%, mientras que al utilizar semilla de maíz fue del 100% por lo que se concluye que ésta es mejor forma de efectuar las inoculaciones.

g) Comparación de tres tipos de recipientes.

Con la finalidad de determinar cual recipiente es más eficiente al utilizarlo en pruebas de inducción de la enfermedad en -

alfalfa, se compararon tubos de ensayo de 18 x 150 mm, matraces Erlenmeyer de 250 ml y frascos planos de 250 ml, se utilizó tierra de Nuevo León mezclada con 10% de sorgo y se colocó esta mezcla hasta la mitad de la capacidad de los recipientes, se regaron, taparon con algodón, esterilizaron, sembraron con alfalfa y se inocularon con una semilla de sorgo infectada -- con el micelio del hongo. Para cada tratamiento se ocuparon 10 recipientes inoculados y 10 no inoculados, como testigos.

Las plantas inoculadas en tubos de ensayo presentaron un 100% de mortalidad, muriendo entre los 8 y 14 días.

En los matraces y botellas probadas las plantas también presentaron un 100% de mortalidad pero tardaron entre 10 y 16 días en morir. Se concluye que el mejor recipiente para inducir la marchitez en alfalfa es el tubo de ensayo.

4) Inducción de la marchitez en plantas de algodón.

a) Efecto de dos tipos de tierra sobre la marchitez del algodón.

Con el objetivo de determinar si existe un desarrollo distinto de la enfermedad al emplear tierra de Nuevo León y arcilla negra de Houston (HBC), se utilizaron botellas de boca de 6 cm de diámetro, se llenaron de tierra, se esterilizaron, en cada botella se sembraron tres semillas de algodón desinfectadas y se inoculó con una semilla de maíz infectada con el micelio --

del hongo y se mantuvieron tapadas las botellas hasta que la planta emergió de la tierra. Se colocaron a una temperatura de 26 a 31°C y fotoperiodo de 12 horas.

Ninguna planta murió a causa de la Pudrición Texana, el 30% de ellas murió antes de tres semanas a causa del ataque de hongos contaminantes, se concluye que este método no fue eficiente en la inducción de la enfermedad en algodón debido a la presencia de una gran cantidad de contaminantes, los cuales entraron a la botella al ser destapados cuando la plántula de algodón emergió.

b) Efecto de la tierra esterilizada y no esterilizada sobre la marchitez del algodón.

Con el objetivo de determinar si este factor es importante en la inducción de la enfermedad, se utilizaron botellas de boca de 6 cm de diámetro de 1 lt y tierra de Nuevo León, se realizó el mismo procedimiento de la prueba anterior, con la diferencia de que 7 botellas no se esterilizaron.

En el caso en que se esterilizó la tierra, el 60% de las plantas murió a causa de hongos contaminantes, cuando no se esterilizó murieron todas las plantas por contaminaciones.

Se concluye que no es posible inducir la enfermedad en algodón con este método, debido a que los contaminantes alteran grande

mente el desarrollo del hongo y la planta.

c) Inducción de la enfermedad en algodón utilizando tubos de vidrio de 3.6 cm de diámetro.

El objetivo de esta prueba fue inducir la enfermedad en algodón evitando la presencia de contaminantes.

Para realizar esta prueba se utilizaron secciones de tubo provenientes de focos de gas neón, los cuales fueron cortados y lavados en el laboratorio, la longitud del tubo utilizado fue de 30 cm, se introdujo en ellos tierra de Nuevo León mezclada con 10% de sorgo hasta una altura de 15 cm, se añadieron 75 ml de agua, se taparon con algodón y se esterilizaron, se sembraron con dos semillas de algodón desinfectadas y 15 tubos se inocularon con una semilla de maíz con micelio del hongo, 15 tubos no se inocularon quedando como testigos. Se mantuvieron a una temperatura de 26 a 32°C.

En los tubos inoculados hubo un 100% de mortalidad y no se presentaron contaminaciones, las plantas murieron entre el noveno y el décimoquinto día a partir de la siembra e inoculación. Las plantas testigo mostraron un crecimiento normal.

Se concluye que para nuestras condiciones de laboratorio éste fue el mejor recipiente utilizado en la inducción de la enfermedad en algodón.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Acedo, J.A. 1968. Control de la Pudrición Texana /Phymatotrichum omnivorum (Shear) Duggar) en el cultivo del Algodonero. Ing. Resis., Universidad de Sonora. 32 p.
- 2.- Atkinson, G.F. 1893. Method of obtaining pure cultures - of Pammel's fungus of Texas root rot of cotton. Bot. Gaz. 18:16-19.
- 3.- Baniecki, J.F. and H.E. Bloss. 1969. The basidial stage of Phymatotrichum omnivorum. Mycologia 61:1054-1059.
- 4.- Blank, L.M. 1940. Infection of cotton seedlings in the - greenhouse by Phymatotrichum omnivorum. Phytopathology 30-702-703 (Abstr.)
- 5.- Blank, L.M. 1941. Response of Phymatotrichum omnivorum - to certain trace elements. J. Agric. Res. 62: - 129-159.
- 6.- Blank, L.M. 1953. The rot that attacks 2,000 species. US DA Yearbook of Agric. Plant Dis. p. 298-301.
- 7.- Blank, L.M., and P.J. Talley. 1941. The carbon utiliza--

tion and carbohydrase activity of Phymatotri-
chum omnivorum Amer. J. Bot. 28:564-569.

- 8.- Blank, L.M., and P.J. Talley. 1941. Are ammonia salts -
toxic to the cotton root rot fungus? Phytopa-
thology 31:926-935.
- 9.- Bloss, H.E. 1970. Observations on species of Phymatotri-
chum. J. Arizona Acad. Sci. 6:102-108.
- 10.- Bloss, H.E. and G.A. Gries. 1964. Polyphenol-polyphenol
oxidase sistem of Phymatotrichum omnivorum. Phy-
topathology 54: 888-889 (Abstr.)
- 11.- Bridge, C.W. 1979. The ecology of fungi. CRC Press Inc.
Florida Pp. 32-33.
- 12.- Brinkerhoff, L.A., and R.B. Streets. 1946. Pathogenicity
and pathological histology of Phymatotrichum - -
omnivorum in a woody perennial, pecan. Arizona
Agric. Exp. Stn. Bull. 111:103-126.
- 13.- Castrejón, A.A. y Lagarda A. 1977. Obtención de patrones
de nogal con tolerancia o resistencia a Phymato-
trichum omnivorum, mediante siembra de material
nativo en terreno infestado. Informe de Inves-

tigación Agrícola en la comarca lagunera CIANE, INIA, SARH. P. 10.1 a 10.6.

- 14.- Chávez, H.B., T.H. McIntosh, and Alice M. Boyle. 1967. - Greenhouse infestation of cotton by Phymatotrichum omnivorum. Plant Dis. Reprtr. 51:926-927.
- 15.- Chet, I. y Baker, R. 1981. Isolation and biocontrol potential of Trichoderma hamatum from soil naturally suppressive of Rhizoctonia solani. Phytopathology 71: 286-290.
- 16.- Cook, R.J., and R.D. Watson. 1969. Nature of the influenced root diseases. Washington Agric. Exp. Stn. Bull. 716. 32 p.
- 17.- Cumley, R.W., and G.W. Goldsmith. 1940. Preliminary serological studies of Phymatotrichum omnivorum. Phytopathology. 30:130-139.
- 18.- Dana, B.F. 1931. Soil cultures for the laboratory production of sclerotia in Phymatotrichum omnivorum. Phytopathology 21:551-556.
- 19.- Duggar, B.M. 1916. The Texas root rot fungus and its conidial stage. Ann. Mo. Bot. Gard. 3:11-23.

- 20.- Dunlap, A.A. 1941. Inoculation of cotton plants in sand culture with *Phymatotrichum* root rot. *Phytopathology* 31:358-361.
- 21.- Dunlap, A.A. 1941. A convenient soil culture method for obtaining sclerotia of the cotton root rot fungus. *Amer. J. Bot.* 28:945-947.
- 22.- Eaton, E.D., and C.J. King. 1934. A study of the cotton root rot fungus, *Phymatotrichum omnivorum* in -- the soil by the Cholodny method. *J. Agric. Res.* 49:1108-1113.
- 23.- Eaton, F.M., E.W. Lyle, and D.R. Ergle. 1947. Relations between carbohydrate accumulation and resistance of cotton plants to *Phymatotrichum* root rot in-dry summers. *Plant Physiol.* 22:181-192.
- 24.- Eaton, F.M., and N.E. Rigler. 1946. Influence of carbohydrate levels and root surface microfloras on *Phymatotrichum* root rot in cotton and maize plants. *J. Agric. Res.* 72:137-161.
- 25.- Elad, Y., Chet, I. y Katan, J. 1980. *Trichoderma harzia-*
num: A biocontrol agent affective against *Scle-*
rotium rolfsii and *Phytopathology* 70: 119-121.

- 26.- Ergle, D.R. 1947. The glycogen content of *Phymatotri--
chum sclerotia*. J. Amer. Chem. Soc. 69:2061-
2062.
- 27.- Ezequiel, W.N. 1938. Evaluation of some soil fungici--
des by laboratory tests with(Phymatotrichum --
omnivorum). Agric. Res. 56:553-578.
- 28.- Ezekiel, W.N. 1945. Effect of low temperatures on sur-
vival of *Ph-matotrichum omnivorum*. Phytopatho-
logy 35:296-301.
- 29.- Ezekiel, W.N., and D.C. Neal. 1930. Report on the cotton
root rot conference at Temple, Texas. Phytopa--
thology 20:889-894.
- 30.- Ezekiel, W.N., D.C. Neal, P.R. Dawson, and E.B. Reynolds.
1932. Report of the fifth annual cotton root -
rot conference. Phytopathology 22:983-993.
- 31.- Ezekiel, W.N., and J.J. Taubenhaus. 1934. Comparing soil
fungicides with special reference to *Phymatotri-
chum root rot*. Science 79:595-596.
- 32.- Ezekiel, W.N., and J.J. Taubenhaus. 1935. Field trails -
of pentachloroethane, tetrachloroethane, and - -

xylol as affecting *Phymatotrichum* root rot and host plants. *Phytopathology* 25:16 (Abstr.).

- 33.- Ezekiel, W.N., J.J. Taubenhau, and J.F. Fudge. 1932. - Concentration of salts and soil reaction as -- affecting growth of the root rot fungus.
- 34.- Fraps, G.S., and J.F. Fudge. 1935. Relation of the occurrence of cotton root rot to the chemical com position of soils. *Texas Agric. Exp. Stn. Bull.* 522-21 p.
- 35.- Goldsmith, G.W., and E.J. Moore. 1941. Field ests of -- the resistance of cotton to *Phymatotrichum omni* vorum. *Phytopathology* 31:452-163.
- 36.- Greathouse, G.A., and N.E. Rigler. 1940. Isolation of -- the alkaloids, berberine and berbamine from Maho nia swaseyi. *Plant Physiol.* 15:563-564.
- 37.- Greathouse, G.A., and N.E. Rigler. 1940. The chemistry - of resistance of plants to *Phymatotrichum* root - rot. V. Influence of alkaloids on growth of fun- gi. *Phytopathology* 30:475-485.
- 38.- Greathouse, G.A., and G.M. Watkins. 1938. Berberine as a factor in the resistance of *Mahonia trifoliata* - and *M. swaseyi* to *Phymatotrichum* root rot. *Amer.*

J. Bot. 25:743-748.

- 39.- Gunasekaran, M. 1970. Physiological studies on Phymato
trichum omnivorum (Shear) Duggar (with special
reference to glycogen metabolism). PhD Diss.
Tex. A & M Univ. 127 pp.
- 40.- Gunasekaran, M. 1972. Physiological studies on Phymato
trichum omnivorum. IV. Effect of pH and the in
teraction of temperature, minerals and carbon
source on growth in vitro. Mycopathol. Mycol.
Appl. 50: 313-321.
- 41.- Gunasekaran, M., Weber, D.J. 1974. Physiological stu--
dies on Phymatotrichum omnivorum VI. Lipid -
composition of mycelium and sclerotia. Myco- -
pathology. Mycol. Appl. 52: 261 - 66.
- 42.- Perches, E.S. 1970. La pudrición texana en el nogal. -
Primera reunión de técnicos especialistas en -
nogal. CIANE, INIA, SAG.
- 43.- Henderson, L. 1937. Studies of the infection of cotton
seedlings by Phymatotrichum omnivorum. Amer. J.
Bot. 24: 547-552.
- 44.- Hervey, R.J. 1959. Report of Phymatotrichum root rot --

committee. Proc. 20th Cotton Dis. Council. p.
36-39.

- 45.- Hine, R.B., D.L. Hohnson, and C.J. Wenger. 1969. The -
persistence of two benzimidazole fungicides in
soil and their fungistatic activity against --
Phymatotrichum omnivorum. Phytopathology 59:
798-801.
- 46.- Hine, R.B., S.V. Thomson, J.E. Wheeler, and A. W. John-
son. 1970. Control root rot in replants sites.
Prog. Agric. Arizona 22:3-5.
- 47.- King, C.J., Loomis, H.F. y Hope C. 1931. Studies on --
sclerotia and mycelial strands of the cotton -
root - rot fungus.
- 48.- Kunze, G.W. y Templin E.H. 1956. Houston black clay, --
the type grumusol. II. Mineralogical and chemi-
cal and chemical caracterizacion. Soil Sci. --
Soc. Am. Proc. 20: 91-96.
- 49.- Lyda, S. y Burnett, E. 1969. Sclerotial inoculum densi-
ty of *Phymatotrichum omnivorum* and development
Phymatotrichum root rot in cotton. Tex. Agric.
Exp. Stn. Phytopathology 60: 729-31.

- 50.- Lyda, S. y Burnett E. 1969. Influence of Benzimidazole Fungicides on Phymatotrichum omnivorum and Phymatotrichum root rot in cotton. Tex. Agric. -- Exp. Stn. Phytopathology 60: 726-728.
- 51.- Lyda, S.D., Burnett E. 1971. Influence of temperature - on Phymatotrichum sclerotial formation and disease development. Phytopathology 61: 728-30.
- 52.- Lyda, S.D. y Burnett, E. 1971. Changes in carbon dioxide levels during sclerotial formation by Phymatotrichum omnivorum. Phytopathology 61: 858-61.
- 53.- Lyda, S.D. 1974. Studies on Phymatotrichum omnivorum -- and Phymatotrichum root rot. In the relation of soil microorganisms to soilborne plant pathogens, ed. by G.C. Papavizas. 69-73. So. Coop. Ser. -- Bull. 183. Blacksburg, Va. Polytech. Inst. and State Univ.
- 54.- Lyda, S.D. y Burnet, E. 1975. The role of dioxide in--- growth and survival of Phymatotrichum omnivorum. In biology and control of soil-borne plant pathogens. ed. by G.W. Bruehl, pp. 63-68. St. Paul, - Minn. : Am. Phytopathol. Soc. 216 pp.
- 55.- Streets, R. y Bloss, H. 1976. Phymatotrichum root rot. -

Univ. of Arizona Press. Monogrf. No. 8. 38 pp.

- 56.- Lyda, S. 1978. Ecology of Phymatotrichum omnivorum. Ann. Rev. Phytopathol. 16: 193-209.
- 57.- Milbrath, ML. and G.A. Gries. 1967. Influence of age of roots on infection by Phymatotrichum omnivorum. Phytopathology 57: 100 (Abstr.)
- 58.- Moore, E. J. 1937. Carbon and oxygen requeriments of -- the cotton root-rot organism. Phymatotrichum om nivorum in culture. Phytopathology 27: 918-930.
- 59.- Mortensen, E. 1938. Nursey tests with grape rootstocks. Amer. Soc. Hort. Sci. Proc. 36: 153-157.
- 60.- Neal, D.C. and E. R. Collins. 1936. Concentration of -- ammonia necessary in a low-lime phase of Houston clay soil to kitt the cotton root rot fungus. - Phymatotrichum omnivorum. Phytopathology 26: -- 1030-1032.
- 61.- Neal, D.C., R.E. Wester, and K.C. Gunn. 1933. Growth of the cotton root-rot fungus in sinthetic media - and the toxic effect of ammonia on the fungus. J. Agric. Res. 47:107-108.

- 62.- Pammel, L. H. 1888. Root rot of cotton or "cotton --- blight". Texas Agric. Exp. Stn. Bull. 4: 50-65.
- 63.- Peltier, G.L. 1937. Distribution and prevalence of Ozonia root rot in the Shelter-Belt Zone of Texas. *Phytopathology* 27: 145-158.
- 64.- Presley, J.T. 1929. Unusual features in the behavior or sclerotia of Phymatotrichum omnivorum. *Phytopathology* 29: 498-502.
- 65.- Rea, H.E. 1939. Control of cotton root rot in the Blackland region of Texas. Texas Agric. Exp. Stn. -- Bull. 573. 36 p.
- 66.- Reynolds, E.B., and H.E. Rea. 1934. Effect of fertilizers on the yield of cotton and on the control of the root-rot disease of cotton on the Blackland Prairie Soils of Texas. *J. Amer. Agron. -- Soc.* 26: 313-318.
- 67.- Rigler, N.E., and G.A. Greathouse. 1940. Chemical investigations of resistance of plants to Phymatotrichum root rot. *Annu. Repl. Texas Agric. Exp. -- Stn.* 53: 83-87.
- 68.- Roberts, D.A. y Boothroyd, C.W. 1972. Fundamentals of -

plant pathology. Freeman and company. Pp: 50 - 51.

- 69.- Rogers, C.H. 1932. Development and structure of strands and sclerotia. Tex. Agric. Exp. Stn. Ann. Rept. 45: 148.
- 70.- Rogers, C.H. 1934. Soil temperature as affecting sclerotial production. Tex. Agric. Exp. Stn. Ann. - - Rept. 47: 174.
- 71.- Rogers, C.H. 1938. The relation of moisture and temperature to growth of the cotton rot fungus. J. -- Agric. Res. 58: 701 - 9.
- 72.- Rogers, C.H., Watkins, G.M. 1938. Strand formation in - Phymatotrichum omnivorum Am. J. Bot. 25: 244 - 46.
- 73.- Rogers, C.H. 1938. Growth of Phymatotrichum omnivorum in solutions with varying amounts of certain mineral elements. Amer. J. Bot. 25: 621-624.
- 74.- Scofield, C.S. 1921. Cotton root rot in San Antonio rotations. J. Agric. Res. 21: 117-125.
- 75.- Shear, C.L., and G.A. Miles. 1907. The control of Texas

root-rot of cotton. USDA Bull. 102: 5- 8.

- 76.- Shear, C.L., and G.A. Miles. 1908. Texas root-rot of -
cotton: Field experiments in 1907. USDA Circ.
9. 7 p.
- 77.- Streets, R.B. 1932. Texas root rot of cotton. Annu. --
Rept. Arizona Agric. Exp. Stn. 43:110-111.
- 78.- Streets, R.B. 1934. The treatment of deciduous fruit -
trees and nut trees infected by Phymatotrichum
omnivorum with ammonium compounds.
79: 417-418.
- 79.- Streets, R.B. 1934. Directions for use of ammonium sul-
fate for treatment of trees and shrubs infect-
ed with Phymatotrichum omnivorum. Arizona - -
Agric. Exp. Stn. Circ. 2 p.
- 80.- Streets, R.B. 1934. Texas root rot. Annu. Rept. Arizo-
na Agric. Exp. Stn. 40:78-80.
- 81.- Streets, R.B. 1934. Soil treatments for control of - -
cotton root rot caused by Phymatotrichum omni-
vorum. Phytopathology 24: 1147-1148.
- 82.- Streets, R.B. 1936. Texas root rot. Annu. Rept. Arizo-

na Agric. Exp. Stn. 47: 73-77.

- 83.- Streets, R.B. 1937. Soil treatment for Texas root rot. Annu. Rept. Arizona Agric. Exp. Stn. 48: 77-91.
- 84.- Streets, R.B. 1937. Phymatotrichum (cotton or Texas) - root rot in Arizona. Arizona Agric. Exp. Stn. Tech. Bull. 71:299-410.
- 85.- Streets, R.B. 1938. Control of Phymatotrichum (cotton - or Texas), root rot in Arizona. Arizona Agric. Exp. Stn. Circ. 103. 80 p.
- 86.- Streets, R.B. 1939. The effect of intercrops and forage crops on the incidence and severity of Phymatotrichum root rot on pecan. Phytopathology 29: 827 (Abstr.).
- 87.- Streets, R.B. 1939. Phymatotrichum (Texas or cotton) -- root rot in Arizona. Annu. Rept. Arizona Agric. Exp. Stn. 50: 89-91.
- 88.- Streets, R.B. 1951. Control of Phymatotrichum root rot in irrigated lands. Annu. Rept. Arizona Agric. Exp. Stn. 62: 1-3.
- 89.- Streets, R.B. 1953. Field and laboratory tests of cal--

cium polysulfides and chlorinated hydrocarbons for the control of the cotton root rot fungus (*Phymatotrichum omnivorum*). *Phytopathology* 43: 589 (Abstr.).

- 90.- Streets, R.B. and L.A. Brinkerhoff. 1938. Control measures for *Phymatotrichum* root rot of the pecan. *Phytopathology* 28: 673 (Abstr.).
- 91.- Streets, R.B., and L.A. Brinkerhoff. 1938. Effects of soil treatments for the control of *Phymatotrichum* root rot in the soil and the pecan. *Phytopathology* 28: 674 (Abstr.).
- 92.- Streets, R.B., and L.A. Brinkerhoff. 1939. Further studies on the control of *Phymatotrichum* root rot in pecan by soil treatments. *Phytopathology* 29: 827 (Abstr.).
- 93.- Streets, R.B., and L.A. Brinkerhoff. 1940. Results of three years treatment of pecan groves for control of *Phymatotrichum* root rot. *Phytopathology* 30:789-790.
- 94.- Streets, R.B. 1969. Control of Texas root rot in trees and shrubs. Cooperative Extension Service and Agricultural Experiment Station. The University

of Arizona. Folder 157. G.

- 95.- Streets, R.B. 1975. The diagnosis of plants diseases. - The University of Arizona Press. Tucson, Arizona Pp. 7.10 y 7.16.
- 96.- Strobel, G.A. y Mathre, D.E. 1970. Outlines of plant pathology Ed. Van Nostrand Rein hold. Co. p. 3-4.
- 97.- Stroman, G.N., J.J. Taubenhau, and W. N. Ezekiel. 1935. Some effects of Phymatotrichum root rot on the microscopie characters of cotton fibers. Phytopathology 25: 126-130.
- 98.- Taubenhau, J.J., and D.T. Killough. 1923. Texas root -- rot of cotton and methods of its control. Texas Agric. Exp. Stn. Bull. 307. 98 p.
- 99.- Taubenhau, J.J., W.N. Ezekiel, and D.T. Killough. 1928. Relation of cotton root rot and Fusarium will - to the acidity and alkalinity of the soil. Texas Agric. Exp. Stn. Bull. 389. 19 p.
- 100.- Taubenhau, J.J., B.F. Dana, W.N. Ezekiel, W.J. Bach, and J.P. Lusk. 1929. A method of inoculation for Phymatotrichum root rot investigations. Phytopathology 19: 167-170.

- 101.- Taubenhau, J.J., B. F. Dana, and S.E. Wolff. 1929. --
Plants susceptible or resistant to cotton root
rot and their relation to control. Texas Agric.
Exp. Stn. Bull. 393. 30 p.
- 102.- Taubenhau, J.J., and W.N. Ezekiel. 1929. Report of --
Phymatotrichum omnivorum. Annu. Rept. Texas --
Agric. Exp. Stn. 42: 66-67.
- 103.- Taubenhau, J.J., and W.N. Ezekiel. 1930. Recent stu--
dies on Phymatotrichum root rot. Amer. J. Bot.
17: 554-571.
- 104.- Taubenhau, J.J., and W.N. Ezekiel. 1931. Cotton root-
rot and its control. Texas Agric. Exp. Stn. Bull.
423, 39 p.
- 105.- Taubenhau, J.J., and W.N. Ezekiel. 1932. Sulfur barr-
iers and graminaceous crop barriers to prevent
spread of Phymatotrichum root rot. Phytopatholog
y 22:26 (Abstr.).
- 106.- Taubenhau, J.J., W.N. Ezekiel, and J.F. Fudge. 1932. -
Incidence of root rot as affected by field additi
tions of fertlizer and other salts to the soil.
Tex. Agric. Exp. Stn. Ann. Rept. 45: 70.

- 107.- Taubenhause, J.J., W.N. Ezekiel. 1922. Additions of chemicals for the control of root rot. Tex. Agric. Exp. Stn. Ann. Rept. 46: 80-83.
- 108.- Taubenhause, J.J., and W.N. Ezekiel. 1935. The quality of lint and seed from cotton plants with *Phymatotrichum* root rot. *Phytopathology* 25: 104-113.
- 109.- Taubenhause, J.J., W.N. Ezekiel, and J.F. Fudge. 1937. - Relation of soil acidity to cotton root rot. *Texas Agric. Exp. Stn. Bull.* 545. 39 p.
- 110.- Thom, E. and Marie B. Morrow. 1937. Experiments with mold inoculation in cotton root rot areas. *Proc. Soil Sci. Soc. Amer.* 223 p.
- 111.- Toussoun, T.A., A.R. Weinhold, R.G. Linderman, and Z.A. Patrick. 1968. Nature of phytotoxic substances produced during plant residue decomposition in soil. *Phytopathology* 58:41-45.
- 112.- Von Arx, J.A. 1970. The genera of fungi sporulating in pure culture. Vaduz, Germany: Cramer. 288 pp.
- 113.- Wenger, Carlton, J. 1970. Pectic enzymes of the fungus *Phymatotrichum omnivorum* Ph.D. Diss. Univ. Ari-

zona. 63 p.

- 114.- Whaley, J. W., and Alice M. Boyle. 1967. Antibiotic -- production by *Streptomyces* species from the rhi zosphere of desert plants. *Phytopathology* 57: - 347-353.
- 115.- Young, P.A. 1950. Soil treatments with sulfur and other chemicals to control root rot in central Texas. *Prog. Rept. Texas Agric. Exp. Stn. 1254: 1-3.*

