



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**ESPECIES DE *Fusarium* ASOCIADAS A LA SECADERA Y PUDRICIÓN DE RAÍZ
DE PINO EN VIVEROS FORESTALES DEL CENTRO DE MÉXICO:
PATOGENICIDAD Y BIOCONTROL**

SILVIA EDITH GARCÍA DÍAZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

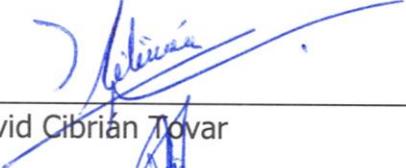
2017

La presente tesis titulada: **Especies de *Fusarium* asociadas a la secadera y pudrición de raíz de pino en viveros forestales del Centro de México: patogenicidad y biocontrol**, realizada por la alumna: Silvia Edith García Díaz, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORADO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD-FITOPATOLOGÍA

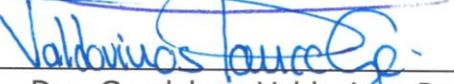
CONSEJO PARTICULAR

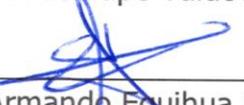
CONSEJERO: 
Dr. Dionicio Alvarado Rosales

ASESOR: 
Dr. David Cibrian Tovar

ASESOR: 
Dr. José Tulio Méndez Montiel

ASESOR: 
Dr. Arnulfo Aldrete

ASESOR: 
Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce

ASESOR: 
Dr. Armando Equihua Martínez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Junio de 2017

AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento durante mi programa de estudios doctorales.

Al Fideicomiso 167304 por convocatoria en la Modalidad 3 de financiamiento a Proyectos de Investigación 2013, por el apoyo a mi trabajo de investigación.

Al Colegio de Postgraduados (CP) y al Instituto de Fitosanidad-Fitopatología, por abrigarme nuevamente en su confort y dar un paso más en mi formación doctoral.

A cada uno de los viveros que en todo momento me abrieron las puertas y siempre sentí su confianza y amabilidad en las diferentes etapas de la investigación durante la producción de planta de 2014 y 2015, 2015 y 2016 durante los muestreos en campo y toma de muestras de material de semilla, sustratos, planta enferma y tubetes con mosca fungosa al vivero Monte Noble, Hidalgo; a la Sra. Patricia Hernández Monter y sus mujeres, al Mayor Teodoro Ake Dzib y el personal del vivero forestal militar de Temamatla, al Capitán Octavio Hernández y al personal del VFM de Cuernavaca, Morelos; al Sr. Felipe García, al Sr. Ricardo Amado Herrera, al Ing. Juan Luis García y el personal del vivero forestal de la Unión de Ejidos de Ixtlahuaca, Puebla; al VF de Pueblo Nuevo al Sr. Antonio y Juan Luis Pacheco, del vivero Los Insurgentes al Sr. Oscar y Noé González y al Capitán Eduardo Manzano e Ing. Miguel Yañez del VFM de Atlangatepec, Tlaxcala. A todas aquellas personas de los viveros que podría haber omitido sus nombres sin ser mi intención.

Al Dr. Dionicio Alvarado Rosales, por su incondicional apoyo para ser mi consejero e invaluable dirección de esta investigación. Por confiar en mí, su paciencia, su comprensión y por su amistad. Por compartir lo que más nos apasiona la Patología Forestal.

Al Dr. David Cibrián Tovar, con quien me he formado en esta carrera de la Patología Forestal, por su apoyo y sugerencias positivas como asesor durante mi investigación y al final del escrito de esta tesis.

Al Dr. Arnulfo Aldrete, quien siempre mostró su apoyo en transmitir sus conocimientos, acertadas sugerencias al trabajo, por ser un gran investigador y al finalizar esta etapa me doy cuenta que es una persona muy valiosa y accesible, en el desarrollo de la investigación en viveros forestales.

A la Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce, por su asesoría, amabilidad y confianza para esta investigación y sus acertadas sugerencias en todo momento.

Al Dr. José Tulio Méndez Montiel, quien siempre ha confiado en mi capacidad, me ha orientado a donde debo ir, hemos vivido momentos inolvidables incursionando siempre la Sanidad Forestal y me oriento como asesor con sus conocimientos en las diferentes etapas de esta investigación.

Al Dr. Armando Equihua Martínez, por su apoyo y amistad, acertadas sugerencias durante la realización del trabajo de investigación.

Al M. C. Manuel Aguilera, por su incondicional apoyo en todo momento y aclarar todas mis dudas, en su pasión de generar investigación en viveros forestales.

Al Dr. Sergio Aranda Ocampo por su apoyo incondicional en el conocimiento de las bacterias en los viveros forestales y ser parte de mi etapa final al fungir como mi sinodal.

Al Dr. Cristian Nava por su incondicional apoyo y su amabilidad en todo momento en cualquier duda de mi investigación.

A los profesores e investigadores del Colegio de Postgraduados por transmitir sus conocimientos y ser partícipes en mi formación y desarrollo profesional.

A los compañeros y amigos del vivero de la DiCiFo, el M. C. José Luis, Mauricio e Israel, por su apoyo incondicional durante mis muestreos y experimentos.

A la Dra. Hilda Silva Rojas y al M. C. César R. Martínez G., por ser mis guías, por transmitir sus conocimientos y por su apoyo en las bases y conocimientos de biología molecular y análisis filogenéticos.

A Edith Méndez Lugo y Sadahy Rodríguez, por su amistad, compañía y su invaluable apoyo en todo momento durante mi investigación.

Al CICY, al M. C. Andrés, a la Dra. Deysi y al Dr. Raúl Tapia por su asesoría en el programa de análisis *in silico* PCR-RFLP para *Fusarium* spp.

Al Dr. Jairo Cristobal Alejo, por su apoyo incondicional y contar con su sincera amistad en todo momento.

A Verónica, Hilda, Silvia, Macrina, Juan, por su amable atención y apoyo en los diversos trámites realizados en el postgrado de Fitosanidad.

Al Técnico-laboratorista Carlos Martínez, por su apoyo y amistad en todo momento.

A Hugo Ontiveros, Alma, Gerardo y Mary por su incondicional apoyo y grandes amigos. A todos mis compañeros de la DiCiFo.

A mis compañeros y amigos del postgrado de Fitopatología: Luz, Alejandra, Sergio, Edgar, Claudia, Yeni y Viky, con quienes pasamos momentos de apoyo y convivencia diaria.

A la CONAFOR por su apoyo en el acceso a los viveros forestales y al personal técnico que labora en la institución.

En general a todas las personas que de una u otra manera estuvieron involucrados en este trabajo y que por alguna razón omití su nombre, no por menospreciarlas.

Muchas gracias a todos

DEDICATORIA

A Dios y a la memoria de mis padres Inocencia † y Felipe †, que me enseñaron que con perseverancia se logran las cosas, que siempre confiaron en mi capacidad, por darme la fuerza y fortaleza para concluir esta etapa de mi vida, que aunque ya no están presentes viven en mi corazón.

A mi esposo Alejandro por su amor, cariño y comprensión incondicional, porque fuiste el apoyo constante, el silencio cómplice y el regazo donde siempre quiero estar.

A mis adorables hijos Alejandra y Leonel, por robar su tiempo y paciencia, han sido mi motor, mi fuerza, mi lucha para impulsar y alcanzar esta meta de mi formación y sea un ejemplo a seguir para ellos. Los amo con todo mi corazón.

A mi hermana Lupita, su esposo Rodolfo y mis queridos sobrinos Huitzi y familia, Toni, Yuri y su adorable hija Mónica, por su apoyo en todo momento y convivencia familiar.

A las familias Méndez Aguilar, Santiago Ayala, Cristóbal Franco, Cordero Paoli, Martínez Campos, Royan Ángel y López Salazar, por su sincera amistad y apoyo en todo momento, por ser parte del diario convivir.

A mis hermanos Angelita †, Inés, Felipe, Agustín, Teresa, Armando, Rosio, Guadalupe, Mary, José Antonio, Raúl †, María Helena y Martha, por confiar en mí y su motivación en todo momento en esta meta.

A todos mis sobrinos y sus hijos que si los mencionara son muchos.

A mis amigos, compañeros y a las personas que pueda omitir sin ser mi intención.

Con todo mi cariño

**ESPECIES DE *Fusarium* ASOCIADAS A LA SECADERA Y PUDRICIÓN DE RAÍZ
DE PINO EN VIVEROS FORESTALES DEL CENTRO DE MÉXICO:
PATOGENICIDAD Y BIOCONTROL**

**Silvia Edith García Díaz, DC.
Colegio de Postgraduados, 2017.**

RESUMEN

A nivel mundial y en México, algunas especies del género *Fusarium*, ocasionan pérdidas económicas de gran importancia en los viveros forestales; los ataques se presentan durante las etapas de preemergencia, postemergencia y cuando la planta está en desarrollo. En México, se tiene poco conocimiento de las especies de *Fusarium* que se presentan en los viveros de coníferas. Ante tal problemática, los objetivos de este estudio fueron identificar las especies de *Fusarium* causantes de la secadera y pudrición de raíz en tres especies de *Pinus* (*P. greggii*, *P. pseudostrobus* y *P. montezumae*); evaluar en tres sustratos diferentes el efecto y patogenicidad de *Fusarium* sp. en semilla de *P. greggii* y medir la respuesta de *Trichoderma harzianum* como biocontrol de *Fusarium circinatum* con tres sustratos en plántulas de *P. greggii*. Los aislamientos de hongos, se obtuvieron de raíz de plantas enfermas, semillas, sustratos y larvas de la mosca fungosa *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae), de los estados de Puebla, México, Hidalgo, Morelos y Tlaxcala. Para la caracterización se utilizaron tres medios de cultivo (PDA, SNA y CLA) y se identificaron morfológica, molecular y filogenéticamente con tres marcadores moleculares (ITS, TEF e IGS). Se obtuvieron 145 aislados de *Fusarium* y se identificaron morfológicamente, donde se aisló de *P. greggii* a *F. avenaceum*, *F. circinatum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans*. De *P. pseudostrobus* a *F. circinatum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F.*

subglutinans y *F. pseudocircinatum*. De *P. montezumae* a *F. circinatum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. pseudocircinatum*. La identificación molecular y filogenética arrojaron las mismas especies excepto *F. proliferatum* y *F. pseudocircinatum*, posiblemente por el número de aislamientos. Para determinar el efecto de *Fusarium* sp. en la germinación y patogenicidad, se utilizó el aislado PGAT, el cual se inoculó a semilla de *Pinus greggii* y otra parte de la semilla no se inoculó, se sembraron en tres sustratos distintos (S1 = Turba de musgo, vermiculita y perlita; S2 = aserrín, turba de musgo y corteza y S3 = corteza de pino, turba de musgo y aserrín; en proporción 60:20:20), mediante un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial y cuatro repeticiones. Se empleó el procedimiento mixto de SAS para su análisis versión 9.0 y para la comparación de medias, la prueba de Duncan. El aislamiento PGAT se identificó como *F. circinatum* y se comprobó su patogenicidad en semilla, donde se encontró un efecto negativo en la germinación de *P. greggii* y en la supervivencia en postemergencia de las plántulas. No se encontraron diferencias significativas entre los sustratos utilizados. La respuesta de *T. harzianum* como biocontrol se evaluó con el aislamiento de *F. circinatum* (SF5), en los tres sustratos antes citados, se empleó un diseño experimental completamente al azar, con arreglo factorial y cuatro repeticiones. Se empleó para su análisis el procedimiento mixto de SAS, versión 9.0 y para la comparación de medias, la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). *Fusarium circinatum* mostró ser patogénico en plántulas de *P. greggii* en los tres sustratos, pero el sustrato a base de aserrín y la aplicación de *T. harzianum* reduce la incidencia de la enfermedad y se observó una respuesta positiva de biocontrol en la producción de plántula en las primeras semanas.

Este es el primer trabajo en donde se lleva a cabo la identificación morfológica, molecular y filogenéticamente de especies de *Fusarium* en los viveros forestales de México; se obtienen aislados a partir de larvas de la mosca fungosa y se demuestra que el sustrato a base de aserrín es una alternativa para reducir la incidencia de la secadera en pinos.

Palabras clave: ITS, IGS, TEF, antagonista, mosca fungosa, *F. circinatum*.

***Fusarium* SPECIES ASSOCIATED TO DAMPING OFF AND ROOT ROT OF PINE
IN FOREST NURSERIES OF CENTRAL MEXICO: PATHOGENICITY AND
BIOCONTROL**

**Silvia Edith García Díaz, DC.
Colegio de Postgraduados, 2017.**

ABSTRACT

Worldwide and in Mexico, some species of the genus *Fusarium* causes economic losses of great importance in forest nurseries; the attacks occur during pre and post-emergence, and in the developing stages of the plant. In Mexico, there is little knowledge of the *Fusarium* species that affect coniferous nurseries. Due to this problem, the objectives of this study were to identify the *Fusarium* species that causes damping off and root rot in three pine species (*P. greggii*, *P. pseudostrobus*, and *P. montezumae*); evaluate in three different substrates, the effect and pathogenicity of the *Fusarium* sp on *P. greggii* seeds, and to measure the response of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol agent against *Fusarium circinatum* using three substrates in *P. greggii* seedlings. The fungal isolates were obtained from the roots of diseased plants, seeds, substrates, and the fungus gnat larvae, *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae), in the states of Puebla, Mexico, Hidalgo, Morelos, and Tlaxcala. In order to characterize the isolates three culture media (PDA, SNA, and CLA) were used and were identified morphologically, molecularly and phylogenetically using three molecular markers (ITS, TEF and IGS). Finally, 145 *Fusarium* isolates were obtained and identified morphologically, where *Fusarium avenaceum*, *F. circinatum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans* were isolated from *P. greggii*. *F. circinatum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* and *F. pseudocircinatum* from *P. pseudostrobus*, and *F. circinatum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* and *F. pseudocircinatum*

from *P. montezumae*. The species that were identified using molecular biology and phylogenetic analysis were classified as the same species except for *F. proliferatum* and *F. pseudocircinatum*, possibly due to the number of isolates that were used. With the purpose of characterize the effect of *Fusarium* spp. The *Fusarium* isolate (PGAT) was inoculated on *Pinus greggii* seeds and the other part to seeds without inoculum in three different substrates (S1 = peat moss, vermiculite and perlite, S2 = sawdust, peat moss and pine bark, and S3 = pine bark, peat moss and sawdust in a ratio of 60:20:20), the effect of *Fusarium* sp was observed in germination and pathogenicity, using a completely randomized experimental design with factorial arrangement and four replicates. A mixed procedure using SAS version 9.0 was used and for the means comparison, the Duncan test was applied. The isolate was identified as *F. circinatum* and its pathogenicity was verified in seeds, where a negative effect was found during the germination of *P. greggii*, meanwhile, seedling survival in postemergence showed no significant differences in the substrates. The response of a commercial strain *T. harzianum* used as the biocontrol agent against the *F. circinatum* isolate (SF5) with the three previous substrates was evaluated, using a completely randomized experimental design with factorial arrangement and four replicates. A mixed procedure using SAS version 9.0 was used and for the means comparison, the Tukey test ($p \leq 0.05$) was applied. *Fusarium circinatum* proved pathogenic in *P. greggii* seedlings in all three substrates, the sawdust-based substrate reduces the incidence of the pathogen and there is a positive response when applying the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* since it decreased the incidence in seedling production in the first week. This is the first study in which the morphological, molecular and phylogenetic identification of *Fusarium* species were carried out in the forest nurseries in Mexico; the isolates obtained

from fungus gnat larvae demonstrates that the sawdust substrate is an alternative to reduce the incidence of damping off in pines.

Key Words: ITS, IGS, TEF, antagonist, fungus gnat, *F. circinatum*.

CONTENIDO

RESUMEN	vi
ABSTRACT	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xvii
ÍNDICE DE CUADROS	xx
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
II. OBJETIVO GENERAL	6
III. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
IV. LITERATURA CITADA	7

CAPÍTULO I. DIVERSIDAD DE ESPECIES DE *Fusarium* spp. EN VIVEROS FORESTALES DEL CENTRO DE MÉXICO.

RESUMEN	14
ABSTRACT	16
INTRODUCCIÓN	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
Área de estudio.....	21
Caracterización de síntomas e incidencia de la secadera de pino	22
Recolecta de material de raíz, semilla, sustrato y larvas de mosca fungosa.....	23
Aislamientos en laboratorio	23
a) Raíz	23
b) Semilla	24
c) Sustratos	24
d) Larvas de mosca fungosa	25

e) Reaislamientos y cultivos monospóricos	25
Identificación morfológica	26
Identificación molecular	28
Extracción de DNA	29
PCR y secuenciación	29
Ensamble de las secuencias	34
Análisis filogenético	34
Análisis Bayesiano	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
Caracterización de síntomas e incidencia de la secadera de pino	36
Recolecta de material de raíz, semilla, sustrato y larvas de mosca fungosa.....	40
a) Raíz	40
b) Semilla	41
c) Sustratos	44
d) Larvas de mosca fungosa.	46
Identificación morfológica	50
<i>Fusarium avenaceum</i> (Fr.) Sacc.	51
<i>Fusarium circinatum</i> (Nirenberg y O'Donnell).....	53
<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl.	56
<i>Fusarium proliferatum</i> (Matsushima) Nirenberg	58
<i>Fusarium subglutinans</i> (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas.....	60
<i>Fusarium pseudocircinatum</i> Nirenberg & O'Donnell.....	62
Identificación Molecular	66
Búsqueda en el GenBank mediante BLAST	66
Registro de las secuencias en el GenBank	69
Análisis filogenético	72
Análisis Bayesiano	77

CONCLUSIONES	79
AGRADECIMIENTOS	80
LITERATURA CITADA	81

CAPÍTULO II. EFECTO DE *Fusarium* sp. EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLA Y CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE *Pinus greggii* EN TRES SUSTRATOS.

RESUMEN	92
ABSTRACT	93
INTRODUCCIÓN	94
MATERIALES Y MÉTODOS	96
Recolecta, manejo de material enfermo y área de estudio	96
Identificación morfológica	96
Microscopia convencional	96
Microscopia electrónica de barrido (MEB)	97
Identificación molecular	97
Inoculación de semilla de <i>P. greggii</i> con <i>Fusarium</i> sp.	99
Efecto de <i>Fusarium</i> sp. en semilla de <i>P. greggii</i> (pre-emergencia) en tres sustratos..	99
Diseño experimental y análisis estadístico	100
Variables evaluadas	100
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	102
Identificación morfológica, molecular y filogenética.....	102
Efecto de <i>F. circinatum</i> en semilla de <i>P. greggii</i> (pre-emergencia)	105

Efecto de <i>F. circinatum</i> en plántulas de <i>P. greggii</i> (post-emergencia).....	106
Recuperación del patógeno	107
Incidencia de <i>F. circinatum</i> en plántulas de <i>P. greggii</i> creciendo en tres sustratos..	108
CONCLUSIONES	110
AGRADECIMIENTOS	110
LITERATURA CITADA	111

CAPÍTULO III. BIOCONTROL CON *Trichoderma harzianum* Rifai SOBRE *Fusarium circinatum* (Nirenberg & O'Donnell) EN PLÁNTULAS DE *Pinus greggii* Engelm. EN TRES SUSTRATOS.

RESUMEN.....	116
ABSTRACT	118
INTRODUCCIÓN	120
MATERIALES Y MÉTODOS.....	123
Área de estudio.....	123
Sustratos, fertilizantes y semilla.....	123
Inoculación de las plantas con <i>Fusarium circinatum</i> (Fc)	124
Inoculación de las plantas con el hongo antagonista <i>Trichoderma harzianum</i> (Th). 124	
Inoculación de las plantas con <i>F. circinatum</i> más el hongo antagonista <i>T. harzianum</i> (Fc+Th).....	125
Tratamientos sin inocular (Te)	126
Diseño experimental y análisis estadístico	126
Variables evaluadas.....	127

Patogenicidad e incidencia	127
Uso de <i>T. harzianum</i> como biocontrol de <i>F. circinatum</i>	128
Estándares e índices morfológicos	128
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	130
Patogenicidad de <i>F. circinatum</i> en plántulas de <i>P. greggii</i>	130
Incidencia de <i>F. circinatum</i> (Fc) en plántulas de <i>P. greggii</i>	133
Uso de <i>T. harzianum</i> como biocontrol de <i>F. circinatum</i>	134
Estándares e índices morfológicos para evaluar plántulas de <i>P. greggii</i> con el uso de <i>T. harzianum</i> como biocontrol en tres sustratos.....	137
CONCLUSIONES	140
AGRADECIMIENTOS	140
LITERATURA CITADA	141
ANEXOS	147

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de los viveros forestales muestreados en el Centro de México.	22
Figura 2. Crecimiento, desarrollo y esporulación de especies de <i>Fusarium</i> , en medios de cultivos PDA, SNA y CLA en los viveros del Centro de México.....	27
Figura 3. Imagen de la electroforesis de ITS.	31
Figura 4. Imagen de la electroforesis de TEF.....	32
Figura 5. Imagen de la electroforesis de IGS.....	33
Figura 6. Síntomas en plántulas de pino en pre y postemergencia por <i>Fusarium</i> spp.	37
Figura 7. Síntomas en plántulas de las tres especies de pino a los tres y cinco meses de edad causados por <i>Fusarium</i> spp.....	38
Figura 8. Porcentaje de aislamientos de raíz con <i>Fusarium</i> spp; por especie de pino y por vivero del Centro de México, en los ciclos de producción 2013-2014 y 2014-2015.	41
Figura 9. Porcentaje de aislamientos de semillas desinfectadas con presencia de <i>Fusarium</i> spp. y otros hongos asociados, por especie de pino y por viveros del Centro de México, en los ciclos de producción 2013-2014 y 2014-2015.....	43
Figura 10. Porcentaje de aislamientos de semillas sin desinfectar con presencia de <i>Fusarium</i> spp. y otros hongos asociados, por especie de pino y por viveros del Centro de México, en los ciclos de producción 2013-2014 y 2014-2015.....	44
Figura 11. Aislamientos de sustratos con unidades formadoras de colonias (ufc) de <i>Fusarium</i> spp.	45
Figura 12. Aislamientos de sustratos con unidades formadoras de colonias (ufc) de <i>Fusarium</i> spp.	46

Figura 13. Recolecta de larvas de mosca fungosa (<i>Bradysia impatiens</i>) y aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. de los viveros forestales evaluados.....	48
Figura 14. Porcentaje de aislamientos de raíz, semilla, sustratos y larvas de mosca fungosa con <i>Fusarium</i> spp	49
Figura 15. Características macro y microscópicas de <i>Fusarium avenaceum</i>	52
Figura 16. Características macro y microscópicas de <i>Fusarium circinatum</i>	55
Figura 17. Características macro y microscópicas de <i>Fusarium oxysporum</i>	57
Figura 18. Características macro y microscópicas de <i>Fusarium proliferatum</i>	59
Figura 19. Características macro y microscópicas de <i>Fusarium subglutinans</i>	61
Figura 20. Características macro y microscópicas de <i>Fusarium pseudocircinatum</i>	63
Figura 21. Porcentaje de los aislamientos de <i>Fusarium</i> , identificados por morfología a nivel de especie.....	65
Figura 22. Árbol filogenético que muestra el agrupamiento de los aislados de <i>Fusarium</i> encontrados en los viveros forestales de la región Centro, amplificadas por PCR-ITS	74
Figura 23. Árbol filogenético que muestra el agrupamiento de los aislados de <i>Fusarium</i> encontrados en los viveros forestales de la región Centro, amplificadas por PCR-TEF	75
Figura 24. Árbol filogenético que muestra el agrupamiento de los aislados de <i>Fusarium</i> encontrados en los viveros forestales del Centro de México, amplificadas por PCR-IGS ..	76
Figura 25. Árbol de Inferencia Bayesiana basado en las secuencias concatenadas con tres marcadores (ITS; TEF e IGS) de <i>Fusarium</i>	78
Figura 26. Características de <i>Fusarium circinatum</i>	103
Figura 27. Árbol filogenético del aislado de <i>Fusarium circinatum</i>	104
Figura 28. Síntomas de la secadera causada por <i>F. circinatum</i>	108

Figura 29. Incidencia semanal de <i>Fusarium circinatum</i> en plantas de <i>Pinus greggii</i>	110
Figura 30. Efecto de tres sustratos con <i>F. circinatum</i> y <i>T. harzianum</i> como biocontrol en <i>P. greggii</i>	129
Figura 31. Patogenicidad de <i>F. circinatum</i> en plantas de <i>P. greggii</i>	132
Figura 32. Incidencia semanal de <i>F. circinatum</i> en plantas de <i>P. greggii</i> creciendo en tres sustratos diferentes	134

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Aislamientos de <i>Fusarium</i> seleccionados para la identificación molecular y filogenética .	28
Cuadro 2. Incidencia de la enfermedad por <i>Fusarium</i> spp. en plantas de pino de tres meses de edad. Ciclos de producción 2013 -2014 y 2014 - 2015.	39
Cuadro 3. Sinopsis morfológica de las especies de <i>Fusarium</i> spp. durante los muestreos en los viveros del Centro de México.	47
Cuadro 4. Identidad de especies de <i>Fusarium</i> spp. mediante la herramienta BLAST, con tres marcadores moleculares	67
Cuadro 5. Nombres de las especies y número de accesión del GenBank para los aislamientos de <i>Fusarium</i> con los tres marcadores (ITS, TEF e IGS) incluidos en el análisis filogenético.	69
Cuadro 6. Identificación morfológica y molecular de las especies del género <i>Fusarium</i> .	71
Cuadro 7. Tratamientos utilizados en la producción de <i>Pinus greggii</i> Engelm., en tubetes individuales de 170 mL.	101
Cuadro 8. Germinación de semilla de <i>Pinus greggii</i> en tres sustratos con diferentes proporciones de materiales en la mezcla.	106
Cuadro 9. Tratamientos utilizados en la producción de <i>Pinus greggii</i> en tubetes individuales de 170 mL.	126
Cuadro 10. Efecto de <i>T. harzianum</i> como biocontrol sobre <i>F. circinatum</i> a los 30, 60 y 90 días después de la inoculación en plantas de <i>Pinus greggii</i> creciendo en tres sustratos diferentes.	135
Cuadro 11. Valores promedio por tratamiento para las características morfológicas e índices de calidad de planta de <i>Pinus greggii</i> , a los seis meses de edad.	139

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Dentro de los hongos fitopatógenos del género *Fusarium*, *F. circinatum* es una de las especies de mayor importancia al afectar a más de 60 especies de pino. Su impacto es a nivel mundial en plantaciones y viveros (Dwinell *et al.*, 1985; Wingfield *et al.*, 2002 y Wingfield *et al.*, 2008). También se reconoce al hongo en su fase sexual (*Giberella circinata*) como un patógeno de gran importancia fitosanitaria, que causa pérdidas económicas en viveros, bosques naturales y plantaciones de pino a nivel mundial. Barnard y Blakeslee (1980), Storer *et al.* (1998) y Wingfield *et al.* (2008), lo reportan como un patógeno que puede infectar semillas y plántulas en viveros. Viljoen *et al.* (1994) y Wingfield *et al.* (2008), mencionan que en Sudáfrica aparece en viveros y causa severas enfermedades, como la pudrición de raíz y la afectación de esquejes; en plántulas de pino es conocida como la enfermedad del mal de talluelo o “damping-off”. Por su parte, Dwinell *et al.* (1985) reportan la presencia de *F. circinatum* en plántulas causando el síntoma conocido como cancro resinoso (“pitch canker”). Dwinell y Adams (2001), describen que este síntoma se debe al flujo excesivo de resina que emerge de los canchros formados en troncos, ramas y raíces expuestas. La enfermedad es de importancia en pinos de Estados Unidos, México, Japón, Sudáfrica y otros lugares (Gordon y Fine, 1996; Viljoen *et al.* 1994; Owen y Adams, 2001).

Landeras *et al.* (2005), lo reportan en los viveros del Norte de España afectando a *P. radiata*, *P. pinaster* y *P. sylvestris*. Alonso y Bettuci (2009), lo hacen para Uruguay en *Pinus taeda*. Viljoen *et al.* (1997) y Gordon *et al.* (1998), señalan que afecta a *P. patula* y *P.*

radiata comportándose en estas especies muy virulento. Britz *et al.* (2001), lo encontraron produciendo graves pérdidas de plántulas en *P. elliotii*, *P. greggii* y *P. radiata*. Wingfield *et al.* (2008), reportan a *F. circinatum* como el agente causal del cancro resinoso en varias especies de pino y es considerada una enfermedad de importancia económica en plantaciones. Esta enfermedad apareció por primera vez en 1946 en el Norte de California en *Pinus virginiana* (Correll *et al.*, 1991). Por su parte, Britz *et al.* (2001), demostraron la patogenicidad de *F. circinatum* en plántulas de 3 a 4 años de edad en *P. radiata* utilizando 19 aislados de México y dos cepas patógenicas conocidas de California, los primeros síntomas los observaron a los 41 días.

Booth (1971) y Leslie y Sumerall (2006), mencionan que *Fusarium* es conocido alrededor del mundo, pero presenta una taxonomía muy complicada en sus caracteres morfológicos y fisiológicos, esto dificulta la clasificación por morfología. Sampietro *et al.* (2010), señalan que la caracterización convencional de especies se basa principalmente en criterios morfológicos, fisiológicos y por fertilidad. Leslie y Sumerall (2006), clasifican la fase sexual de *Fusarium* dentro de la división Ascomycota, clase Euascomycetes, orden Hypocreales y familia Hypocreaceae (*Albonectria*, *Gibberella* y *Haematonectria*).

En años recientes mediante técnicas moleculares, la comparación de secuencias de ADN facilitó el estudio de la genética de poblaciones, taxonomía, filogenia y sistemática del género *Fusarium* (O' Donnell *et al.*, 2012). Así, Floyd *et al.* (2002), mencionan que en la actualidad se trabaja con más de un gen con la finalidad de realizar análisis multigénicos para incrementar la confiabilidad de las especies obtenidas. Steenkamp *et al.* (1999),

desarrollaron una técnica de PCR-RFLP, basada en el gen histona (H3), el cual distingue a *F. circinatum* de otras especies en el complejo de *Gibberella fujikuroi*. Schweigkofler *et al.* (2004), desarrollaron primers específicos para amplificar un fragmento con espaciadores intergénicos (IGS). Pérez-Sierra *et al.* (2007), caracterizaron a *F. circinatum* con PCR-RFLPs con el gen histona (H3), la región IGS amplificando con primers específicos de CIRC1A Y CIRC4A desarrollados por Schweigkofler *et al.* (2004) y el gen del factor de elongación 1-alpha (TEF) con los primers EF1 y EF2 usados por Geiser *et al.* (2004). Britz *et al.* (2002), trabajaron con la PCR de secuencias cortas internas repetidas (PCR-ISSR) para reconocer especies de *Fusarium*. Baayen *et al.* (2000), estudiaron el complejo de *Fusarium oxysporum* con las técnicas de RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción) y RAPD (amplificación aleatoria de DNA polimórfico). En estudios recientes, Kvas *et al.* (2009) y Gräfenhan *et al.* (2011), demostraron que el género *Fusarium* incluye diversos clados filogenéticos y los agrupan en complejos de especies, como: complejo *F. solani* (CFS), complejo *F. oxysporum* (CFO), complejo *F. incarnatum-equiseti* (CFIE), complejo *F. chlamydosporum* (CFC), complejo *F. tricinctum* (CFT), complejo *F. dimerum* (CFD) y complejo *Gibberella fujikuroi* (CGF).

Aunado a lo anterior, las moscas fungosas del género *Bradysia impatiens* Johannsen (= *Bradysia difformis* Frey) (Diptera: Sciaridae), conocido como “fungus gnats” (Hurley *et al.* 2007), son plagas comunes en los sistemas de producción de cultivos en invernadero, principalmente bajo condiciones de humedad excesiva. Sus larvas habitan en el suelo donde se alimentan de materia orgánica y hongos (Mansilla *et al.* 2001, Vaughan *et al.* 2011 y Cloyd, 2015); sin embargo, son capaces de consumir raíces primarias, tallos suaves o

esquejes de plantas sanas cuando el alimento escasea, lo cual ocasiona marchitamiento, retraso de crecimiento y el debilitamiento de la planta (Braun *et al.*, 2010). Marín-Cruz *et al.* (2015), reportan dos especies de mosca fungosa negra, *Lycoriella ingenua* Dufour y *B. impatiens*, afectando a plántulas de *Pinus montezumae* (Lamb) en viveros forestales.

Landis *et al.* (1989) argumentan que la enfermedad de la chupadera (secadera) se presenta por factores culturales y ambientales propicios para la enfermedad. Entre ellos destacan la calidad de semillas que pueden estar contaminadas por hongos y producir plántulas débiles que hacen susceptibles al patógeno. De aquí la importancia de realizar tratamientos en la semilla con remojos de peróxido de hidrógeno al 30 % por 40 minutos, hipoclorito de sodio al 5.25 % por 5 minutos o fungicidas como captan, thiram y benomil (Kolotelo *et al.*, 2001). Couteaudier y Alabouvette (1981), mencionan que se deben utilizar sustratos libres de patógenos y con buena porosidad. El pH de 4.5 a 6 es idóneo para que no se presente la enfermedad. El manejo de enfermedades en vivero, debe ser mediante un Manejo Integrado de Plagas (MIP) que involucre diferentes medidas de control.

La enfermedad de la secadera y pudrición de raíz en pino, es una de las principales que limita la producción de planta en los viveros forestales de México. Existen 265 viveros distribuidos en todo el país, 148 pertenecen a organizaciones sociales, 29 a gobiernos de los estados, 22 a la Comisión Nacional Forestal, 25 a la Secretaría de la Defensa Nacional y 41 a otros organismos (Comunicación personal del Ing. Rafael Álvarez Reyes, CONAFOR 2017).

Alvarado *et al.* (2004), señalan que la secadera de almácigos o “damping-off” es causada por los oomicetos *Pythium* y *Phytophthora*, y los anamórficos *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Cylindrocladium* y *Botrytis*. Para la pudrición de raíz en plántulas asocian a *Fusarium* como el causante del “damping-off” tardío y mencionan varias especies como *F. roseum*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. subglutinans* y *F. lateritium*. Don Juan (2006), evaluó el complejo de hongos causantes del “damping-off” (*Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cinnamomi* y *Pythium debaryanum*) en *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* Shaw, encontrando que *F. oxysporum* causó la mayor afectación. García *et al.* (2007), asocian el “damping-off” y podrición de raíz con *F. oxysporum* en *P. ayacahuite*, *P. montezumae* y *P. michoacana*.

Cibrián *et al.* (2008), reportan al género *Fusarium* en viveros forestales afectando varias especies de pino y mencionan a *F. oxysporum* como una de las especies involucradas. Roldan (2008), reporta a *Pinus michoacana* y *Pinus pseudostrobus* como especies susceptibles al patógeno *Fusarium oxysporum* durante la fase de producción de planta. Navarro y Rodríguez (2010), evaluaron a *F. oxysporum* en *Pinus patula* Schl. et Cham., en vivero, buscando métodos alternativos para su manejo.

En estudios recientes Islas (2014), reporta a *F. circinatum* en *P. patula* en las reforestaciones en el Municipio de Zacualpan, Veracruz. Marín-Cruz *et al.* (2015), realizaron un estudio en un vivero forestal militar de Temamatla, Estado de México y encontraron a *F. circinatum* afectando a *P. montezumae*. Robles *et al.* (2016), demostraron la patogenicidad de *F. solani* y *F. oxysporum* y por lo tanto, como responsables de la

mortandad de plántulas de *Pinus patula* y *Pinus pseudostrobus* en un vivero forestal del estado de Guerrero. Sin embargo, existe poca información de este patógeno sobre su identidad, sintomatología, incidencia, patogenicidad y alternativas de manejo en los viveros forestales del Centro de México, por lo cual en la presente investigación se plantearon los siguientes objetivos:

II. OBJETIVO GENERAL

Identificar las especies de *Fusarium* que causan la secadera y pudrición de raíz en pino, en ocho viveros forestales del Centro de México, evaluar su efecto en la germinación y desarrollo de plántulas y determinar la respuesta de *Trichoderma harzianum* como biocontrol en tres sustratos diferentes.

III. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar las especies de *Fusarium* causantes de la secadera y pudrición de raíz en tres especies de pino: *Pinus montezumae*, *P. greggii* y *P. pseudostrobus*.
- b) Evaluar el efecto de *Fusarium* sp. en la germinación y desarrollo de plántulas de *P. greggii* en tres sustratos diferentes.
- c) Determinar la respuesta de *Trichoderma harzianum* como biocontrol de *Fusarium circinatum* en *P. greggii* en tres sustratos diferentes.

IV. LITERATURA CITADA

- Alvarado R., D., S. Castro Z., C. Cigarrero C., R. Álvarez R., y L. de L. Saavedra R. 2004. Manual de detección y manejo de enfermedades bajo el sistema de “contenedor”: caso vivero San Luis. CONAFOR. Gobierno del Distrito Federal, Secretaría del Medio Ambiente y Colegio de Postgraduados. 73 p.
- Alonso, R. and L. Bettucci. 2009. First report of the pitch canker fungus *Fusarium circinatum* affecting *Pinus taeda* seedlings in Uruguay. Australasian Plant Disease Notes 4: 91-92.
- Baayen, R. P., K. O'Donnell, P. J. M. Bonants, E. Cigelnik, L. P. N. M. Kroon, E. J. A. Roebroek, and C. Waalwijk. 2000. Gene genealogies and AFLP analysis in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and root disease. Phytopathology 90: 891-900.
- Barnard E. L. and G. M. Blakeslee. 1980. Pitch canker of slash pine seedlings: A new disease in forest nurseries. Plant disease 64: 695-696.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 237 p.
- Braun, S. E., L. A. Castrillo, J. P. Sanderson, M. L. Daughtrey, and S. P. Wraight. 2010. Transstadial transmission of *Pythium* in *Bradysia impatiens* and lack of adult vectoring capacity. Phytopathology 100: 1307-1314.
- Britz, H., T.A. Couinho, T.R. Gordon, and M.J. Wingfield. 2001. Characterization of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, from México. South African Journal of Botany 67: 609-614.

- Britz, H., B. D. Wingfield, T. A. Coutinho, and M. J. Wingfield. 2002. Sequence characterized amplified polymorphic markers for the pitch canker pathogen, *Fusarium circinatum*. *Molecular Ecology Notes* 2: 577-580.
- Cibrián T., D., S.E., García D., y B. Don Juan M. 2008. Manual de identificación y manejo de plagas y enfermedades en germoplasma y planta producida en viveros. CONAFOR. 155 p.
- Correll, J. C., T. R. Gordon, A. H. McCain, J.W. Fox, C.S. Koehler, D.L.Wood, and M.E. Schultz. 1991. Pitch canker disease in California: pathogenicity, distribution, and canker development on Monterey pine (*Pinus radiata*). *Plant Disease* 75: 676-682.
- Couteaudier, Y., and C. Alabouvette. 1981. *Fusarium* wilt in soilless culture. *Acta Horticulturae* 126: 153-158.
- Cloyd, R. A. 2015. Ecology of fungus gnats (*Bradysia* spp.) in greenhouse production systems associated with disease-interactions and alternative management strategies. *Insects* 6: 325-332.
- Don Juan, M. B. 2006. Efectividad biológica de *Trichoderma* spp., contra hongos causantes de Damping-off en Viveros Forestales. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Edo. De México. 67 p.
- Dwinell, L. D., B. J. Barrows-Broadus, and G. E. Kuhlman. 1985. Pitch canker: a disease complex. *Plant Disease* 69 (3): 270.
- Dwinell, L. D., S. W. Fraedrich, and D. Adams. 2001. Diseases of pines caused by the pitch canker fungus. *In*: Summerell, B.A., J.F. Leslie, D. Backhouse, W. L. Bryden, and L. W. Burgess (eds.), *Fusarium*: Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press, St. Paul, Minnesota. pp: 225-232.

- Floyd, R., E. Abebe, A. Papert, and M. Blaxter. 2002. Molecular barcodes for soil nematode identification. *Mol. Ecol.* 11(4): 839-850.
- García D., S. E., D. Cibrián T., y D. Alvarado R. 2007. Damping –off y pudrición de raíz por *Fusarium*. *Fusarium oxysporum* Schltdl (Moniliales, Moniliaceae). *In*: Cibrián T., D., D. Alvarado R. y S.E. García D. (eds.). Enfermedades forestales en México/Forest diseases in México. Universidad Autónoma Chapingo; CONAFOR-SEMARNAT, México; USDA Forest Service, EUA; NRCAN Forest Service, Canadá y Comisión Forestal de América del Norte, (COFAN), FAO. Chapingo, México pp: 502-505.
- Geiser, D. M., M. Jiménez- Gasco, M. Kang S. I. Makalowska, N. Veeraraghavan, T.J. Ward, N. Zhang, G. A. Kuldau, and K. O'Donnell. 2004. FUSARIUM-ID v 1:0 a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 473-479.
- Gordon, A. L., and R. A. Fine. 1996. Pathways of water between the Pacific and Indian Oceans in the Indonesian Seas *Nature*. 379: 146-149.
- Gordon, T. R., A. J. Storer, and D. Okamoto. 1998. Susceptibility of five landscape pines to pitch canker disease, caused by *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*. *Hort. Science* 33: 868-871.
- Gräfenhan, T., H. Schroers, H. Nirenberg, and K. Seifert. 2011. An overview of the taxonomy, phylogeny and typification of some necrotrophic fungi classified in *Cosmopora*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Stilbella* and *Volutella*. *Stud. Mycol.* 68: 79-113.

- Hurley, B. P., Slippers, B. D. Wingfield, P. Govender, J. E. Smith, and M. J. Wingfield. 2007. Molecular detection of fungi carried by *Bradysia difformis* (Sciaridae: Diptera) in South Africa forestry nurseries. *Biological invasions* 12 (4): 729-733.
- Islas A., M., A. 2014. Identificación de *Fusarium circinatum*, en reforestaciones de *Pinus patula*, en el Municipio de Zacualpan, Veracruz. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Edo. de México. 73 p.
- Kolotelo, D., E.V. Steenis, M. Peterson, R. Bennett, D. Trotter and J. Dennis. 2001. Seed handling guidebook. British Columbia. Canadá. 106 p.
- Kvas, M. W., F. O. Marasas, B.D. Wingfield, M. J. Wingfield, and E. T. Steenkamp. 2009. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Diversity* 34: 1-21.
- Landeras, E., P. García, Y. Fernández, M. Braña, O. Fernández-Alonso, S. Méndez-Lodos, A. Pérez-Sierra, M. León, P. Abad-Campos, M. Berbegal, R. Beltrán, J. García-Jiménez, and J. Armengol. 2005. Outbreak of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus* spp., in Northern Spain. *Plant Disease* 89: 1015.
- Landis, T. D., R.W. Tinus, S. E. McDonald, and J. P. Barnett. 1989. The biological Component: Nursery pest and mycorrhizae. Vol. 5. The container tree nursery manual. *Agric. Handbk.* 674. U. S. Department of Agriculture, Forest Service. Washington, DC: 159 p.
- Leslie, J. F., and B A. Summerell. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. First edition, 2006. Blackwell Publishing Professional 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA. 388 p.

- Mansilla, J. P., M. Pastoriza I., y R. Pérez. 2001. Estudio sobre la biología y control de *Bradysia paupera* Tuomikoski (= *Bradysia difformis* Frey) (Diptera: Sciaridae). Bol. San. Veg. Plagas 27: 411-417.
- Marín-Cruz, V. H., D. Cibrián-Tovar, J. T. Méndez-Montiel, O. A. Pérez-Vera, J. A. Cadena-Meneses, H. Huerta, G. Rodríguez-Yam y J. A. Cruz-Rodríguez. 2015. Biología de *Lycoriella ingenua* y *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae) Madera y Bosques 2 (1):113-128.
- Navarro S., J., L., y M. I. Rodríguez J. 2010. Métodos alternativos para el manejo de plagas en la producción en vivero de *Pinus patula* Schl. et Cham. y su efecto en la calidad de planta. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Edo. de México. 103.
- Owen, D., and D. Adams. 2001. Impact of pitch canker on ornamental Monterey pines in Santa Cruz County, California, U.S., 1987-2000. Journal of Arboriculture 27: 298-305.
- Pérez-Sierra A., E. Landeras, M. León, M. Berbegal, J. García-Jimenez, and J. Armengol. 2007. Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. in Northern Spain. Mycological Reserch 111: 832-839.
- Robles Y., L., S. G. Leyva M., A. Cruz G., M. Camacho T., D. Nieto A., J. M. Tovar P. 2016. *Fusarium oxysporum* Schltdl y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., causantes de la marchitez de plántulas de *Pinus* spp., en vivero. Revista Mexicana de Ciencias Forestales. 7 (36): 25-36.

- Roldan C., M., A. 2008. Control Biológico de *Fusarium oxysporum* en dos especies de Pino. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma CHapingo. DiCiFo. Chapingo, México. 115 p.
- Sampietro, D., P. Marín, J. Iglesia, D. Presello, M. Vattuone, and C. Catalan. 2010. A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina. Fungal. Biol. 114: 74-81.
- Schweigkofler, W., K. O'Donell, and M. Garbelotto. 2004. Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using a real-time PCR approach combined with a simple spore trapping method. Applied and Environmental Microbiology 70: 3512-3520.
- Steenkamp, E. T., B. D. Wingfield, T.A. Coutinho, M. J. Wingfield, and W. F. O. Marasas. 1999. Differentiation of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* by histone gene. Applied and Environmental Microbiology 65: 3401-3406.
- Storer, A. J., T., R. Gordon, and S. L. Clark. 1998. Association of the pitch canker fungus *Fusarium subglutinans* f. sp., *pini* with Monterey pine seeds and seedlings in California. Plant Pathology 47: 649-656.
- Vaughan, M. M., D. Tholl, and J. G. Tokuhsa. 2011. An aeroponic culture system for the study of root herbivory on *Arabidopsis thaliana*. Plant Methods 7: 5.
- Viljoen, A., M. J. Wingfield, and W. F. O. Marasas. 1994. First report of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* on pine seedlings in South Africa. Plant Disease 78: 309-312.

- Viljoen, A., W. F. O. Marasas, M. J. Wingfield, and C. D. Viljoen. 1997. Characterization of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* causing root disease of *Pinus patula* seedlings in South Africa. *Mycol. Res.* 101: 437- 445.
- Wingfield, M. J., A. T. Jacobs, R. Coutinho, R. Ahumada, and B. D. Wingfield. 2002. First report of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, on pines in Chile. *Plant Pathology* 51: 397.
- Wingfield, M. J., A. Hammerbacher, R. J. Ganley, E. T. Steenkamp, T. R. Gordon, B. D. Wingfield, and T. A. Coutinho. 2008. Pitch canker caused by *Fusarium circinatum*, a growing threat to pine plantations and forests worldwide. *Australasian Plant Pathology* 37: 319-334.

CAPÍTULO I

DIVERSIDAD DE ESPECIES DE *Fusarium* spp. EN VIVEROS FORESTALES DEL CENTRO DE MÉXICO

Silvia Edith García Díaz, DC.
Colegio de Postgraduados, 2017.

RESUMEN

El principal problema que enfrentan los responsables de los viveros en nuestro país es la enfermedad conocida como “damping-off”, secadera o ahogamiento o pudrición de raíz. En este estudio se caracterizaron los síntomas y se evaluó la incidencia de la secadera en tres especies de *Pinus* (*P. greggii*, *P. pseudostrobus* y *P. montezumae*) en ocho viveros forestales del Centro de México. Se aislaron los hongos asociados a raíz, semilla, sustrato y larvas de mosca fungosa. Los aislados de *Fusarium* spp. se identificaron morfológica, molecular y filogenéticamente con tres marcadores moleculares ITS, TEF e IGS. Se caracterizaron los síntomas de la secadera de pino en los viveros y se realizó un muestreo al azar de 100 plantas de cada especie de pino para medir la incidencia. En los viveros se recolectaron cinco plántulas con síntomas durante los tres muestreos en cada ciclo de producción, semilla, sustrato, tubetes y plantas con daño causado por larvas de mosca fungosa. Los hongos que se aislaron se cultivaron en los medios de cultivo PDA, CLA y SNA. De cultivos monoconidiales se llevó a cabo la extracción de ADN, se hizo la PCR, se secuenciaron los amplicones, se alinearon y editaron para posteriormente realizar el análisis filogenético con MEGA 7 y Bayesiano. Los resultados mostraron que los principales síntomas fueron baja germinación, secadera del tallo en la etapa de plántula y pudrición de raíz en las diferentes etapas de su desarrollo. La incidencia fue muy variable entre las

especies de pino y los viveros, oscilando entre 2 y 35 %. Se obtuvieron 145 aislamientos de *Fusarium* spp., y se caracterizaron por morfología, para la identificación molecular y filogenética se realizó con 50 aislamientos. De raíz se obtuvieron las especies de *F. avenaceum*, *F. circinatum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. pseudocircinatum*. De semilla a *F. circinatum*, *F. oxysporum*, *F. subglutinans* y *F. proliferatum*. A partir de sustratos se obtuvieron a *F. circinatum* y *F. oxysporum*. De las larvas de mosca fungosa a *F. circinatum*, *F. oxysporum*, *F. subglutinans* y *F. pseudocircinatum*. Se confirmaron las mismas especies molecular y filogenéticamente con excepción de *F. proliferatum* y *F. pseudocircinatum*, esto posiblemente al tamaño reducido de aislamientos analizados. La especie de mayor frecuencia fue *F. circinatum*.

Palabras claves: *Pinus greegii*, *P. montezumae*, *P. pseudostrobus*, ITS, TEF, IGS, análisis filogenético y Bayesiano.

CHAPTER I
DIVERSITY OF SPECIES OF *Fusarium* IN FOREST NURSERIES OF CENTRAL MEXICO

Silvia Edith García Díaz, DC.
Colegio de Postgraduados, 2017.

ABSTRACT

The main challenge experienced by nursery operators in our country is the disease known as damping-off and root rot. In this study, symptoms were characterized and damping off incidence in three *Pinus* species (*P. greggii*, *P. pseudostrobus* and *P. montezumae*), were these parameters evaluated in eight forest nurseries in Central Mexico. Fungi associated with the root, seed, substrate and the fungus gnat larvae were isolated. *Fusarium* spp. were identified morphologically, molecularly and phylogenetically with three molecular markers ITS, TEF and IGS. Dry wilt symptoms were characterized in the nurseries and random sampling of 100 pine plants of each species was performed to measure incidence. In the nurseries, five seedlings with symptoms were collected during the three samplings in each production cycle, seeds, substrates, forest tubes and plants with damage caused by fungus gnat larvae were collected. The isolated fungi were cultured in the PDA, CLA, and SNA medium. DNA extraction was performed using monoconidial cultures, PCR was carried out, the amplicons were sequenced, aligned and edited for later phylogenetic analysis with MEGA 7 and Bayesian. The results indicated that the main symptoms were low germination, stem dry wilt during the seedling and root rot stages from the seedling to plant development stage. The incidence was very variable between pine species and nurseries,

from 2 to 35 %. Now, 145 *Fusarium* spp. isolates were obtained and characterized for morphological purposes, meanwhile, 50 isolates were used for the molecular and phylogenetic analysis. *F. avenaceum*, *F. circinatum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* and *F. pseudocircinatum* were obtained from the root. While, *F. circinatum*, *F. oxysporum*, *F. subglutinans* and *F. proliferatum* were isolated from the seed. *F. circinatum* and *F. oxysporum* were obtained from the substrate, and *F. circinatum*, *F. oxysporum*, *F. subglutinans* and *F. pseudocircinatum* from the fungus gnat larvae. The same species were confirmed molecularly and phylogenetically except for *F. proliferatum* and *F. pseudocircinatum*. The most frequent species was *F. circinatum*.

Key Words: *Pinus greggii*, *Pinus montezumae*, *Pinus pseudostrobus*, fusariosis.

INTRODUCCIÓN

El proceso de producción de planta forestal de calidad está dirigido a los programas de reforestación con fines de conservación, restauración y establecimiento de plantaciones comerciales. Para ello, la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) estableció la meta de restaurar un millón de hectáreas durante el periodo 2013-2018, con un promedio de reforestación de 170 mil hectáreas anuales en las que se plantarán un promedio de 180 millones de plantas en ecosistemas de clima templado-frío, tropical, y árido-semiárido. Para asegurar la producción de planta, la CONAFOR cuenta con 341 viveros forestales, de los cuales 297 corresponden a viveros de organizaciones sociales, gobiernos municipales o estatales; 25 son viveros forestales militares y 19 están a cargo de la CONAFOR. Dentro de los programas de reforestación en la Región Centro de México, las especies de *P. greggii* (pino prieto), *P. montezumae* (pino ocote o pino real) y *P. pseudostrobus* (pino lacio o pino blanco) son ampliamente utilizadas; sin embargo, el principal problema que se tiene en los viveros es la enfermedad por *Fusarium* en preemergencia, postemergencia y desarrollo de plántula.

García *et al.* (2007) y Cibrián *et al.* (2008), señalan que *Fusarium* spp. puede llegar a ocasionar pérdidas económicas hasta de un 30 y 40 % en las diferentes especies de pino de algunos viveros forestales. Viljoen *et al.* (1994), mencionan que el primer reporte de *F. circinatum* fue con producción de planta en vivero en Mpumalanga, en Sudáfrica y posteriormente apareció en árboles maduros de *P. radiata*. En nuestro país, Guerra-Santos y Cibrián-Tovar (1998), reconocieron por primera vez al cancro resinoso de los pinos en plantaciones de coníferas en el año 1987 y se determinó por morfología al agente causal

como *F. subglutinans* (Wollenw y Reink) Nelson, Tousson y Marasas, en la región Centro y Norte de México.

Britz *et al.* (2001), señalan a *F. circinatum* (= *F. subglutinans* f. sp. *pini*) como el agente causal del “pitch canker” y confirman la transmisión de este patógeno en las semillas de conos de árboles infectados, y la infección a los viveros a través de semilla. Los autores trabajaron con aislamientos de México provenientes de árboles con síntomas de la enfermedad, y con semilla de conos infectados de plantaciones de *P. patula*, *P. greggii*, *P. teocote* y *P. leiophylla*, identificándolos morfológicamente. También realizaron estudios de compatibilidad y con RFLPS-H3 para confirmar la presencia de *F. circinatum* en México.

Ocamb *et al.* (2002), trabajaron con *P. strobus* L. en plántulas enfermas, sustratos y semillas, obteniendo aislamientos de *F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. chlamyosporum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. poae*, *F. polyphialidicum*, *F. heterosporum*, *F. proliferatum*, *F. sambucinum*, *F. solani* y *F. oxysporum*.

Además, existen métodos moleculares con PCR, RAPD, PCR-RFLP, ERIC-PCR y RAMS, entre otros, para caracterizar las especies del complejo *Fusarium oxysporum* (Leong *et al.*, 2010). En el Norte de España, Pérez-Sierra *et al.* (2007), caracterizaron a *F. circinatum* con técnicas moleculares de PCR-RFLP, el gen histona (H3), la región IGS y el gen del factor de elongación de traducción 1-alpha (TEF).

Britz (2002), realizó un trabajo sobre taxonomía y poblaciones genéticas de *F. subglutinans sensu lato* en pino y mango, argumentando que es necesario trabajar con aislamientos de este género utilizando técnicas moleculares, características morfológicas y estudios filogenéticos. Leslie y Summerell (2006), indican que las especies son reconocidas bajo tres conceptos: especie biológica, morfológica y filogenética.

Para obtener mayor información sobre las especies de *Fusarium* que causan la secadera y pudrición de raíz en viveros forestales, se plantearon los siguientes objetivos:

- a) Caracterizar los síntomas e incidencia de la secadera y pudrición de raíz en tres especies de *Pinus* (*P. greggii*, *P. pseudostrobus* y *P. montezumae*) de ocho viveros forestales del Centro de México.
- b) Reconocer los hongos asociados con la secadera de pino de raíz, semilla, sustrato y larvas de mosca fungosa.
- c) Identificar las especies de *Fusarium* morfológica, molecular y filogenéticamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La recolecta de muestras de *P. greggii*, *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*; se llevó a cabo en ocho viveros forestales del Centro de México (Figura 1). Del estado de México: el vivero forestal militar de Temamatla con producción de las tres especies de pino y el vivero forestal de la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma Chapingo con solo *P. pseudostrobus*. Tlaxcala: vivero forestal militar Atlangatepec con producción de las tres especies de pino. Puebla: vivero forestal Ixtlahuaca, vivero forestal los Insurgentes y vivero forestal Pueblo Nuevo con producción de las tres especies de pino. Hidalgo: vivero forestal Monte Noble con solo *Pinus greggii*. Morelos: vivero forestal militar con las tres especies de pino.

La toma de muestras de raíz, semillas, sustratos y larvas de mosca fungosa, y el registro de datos se realizó de diciembre a julio, durante los ciclos de producción de planta 2013 - 2014 (excepto el vivero de la División de Ciencias Forestales, que no hubo producción) y en el ciclo 2014 – 2015 para evaluar incidencia y registro de síntomas.



Figura 1. Ubicación de los viveros forestales muestreados en el Centro de México.

Caracterización de síntomas e incidencia de la secadera de pino

La caracterización de síntomas de la secadera de pino se realizó en los ocho viveros forestales en tres etapas de la producción de planta: preemergencia, postemergencia y a los cinco meses de desarrollo de la planta.

Para determinar el porcentaje de incidencia de la secadera en pino, se realizó a los cuatro meses de edad, se tomo en base a la meta de producción de planta por vivero y especie de pino mediante la fórmula $n = \frac{Npq}{(N-1) \frac{B^2}{t^2} + pq}$ y se obtuvo un tamaño de muestra de 100 plantas tomadas al azar.

Donde:

n = Tamaño de muestra

N = Universo muestral

B = 10%, valor de error de estimación

t = 1.96, que es un valor fijo para una confiabilidad de 95%

p = 0.5, valor de la probabilidad de ocurrencia

q = 0.5, valor de probabilidad de no ocurrencia.

Recolecta de material de raíz, semilla, sustrato y larvas de mosca fungosa

Se tomaron los siguientes datos de colecta, los cuales se registraron en una bitácora: vivero, localidad, origen, fecha de colecta y registro de síntomas en campo durante los dos ciclos de producción de planta (2013 - 2014 y 2014 - 2015). Se asignó un número consecutivo a cada muestra recolectada. Se recolectaron cinco plantas de cinco meses de edad por especie de pino con síntomas característicos de la secadera por *Fusarium* spp. y se obtuvieron las raíces para sus aislamientos en el laboratorio. Las semillas se obtuvieron de acuerdo a la disponibilidad de cada vivero de las tres especies de pino y también se llevaron al laboratorio. Se tomaron los materiales por separado (turba de musgo, perlita, vermiculita, corteza, aserrín) y las mezclas utilizadas en cada vivero. Las larvas de mosca fungosa se recolectaron de cinco plantas con daño. El sustrato con larvas de mosca fungosa también se llevó al laboratorio.

Aislamientos en laboratorio

a) Raíz

Las raíces se fragmentaron en segmentos de 1.0 cm, se lavaron con agua destilada estéril y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3%, durante 1.5 min. Posteriormente se lavaron 3 veces con agua destilada estéril para quitar el exceso de cloro (Don Juan, 2006).

Al término de este proceso se realizó el secado de las mismas con papel filtro para quitar el exceso de humedad. Posteriormente, se sembraron en medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar) para obtener los aislamientos del hongo de interés.

b) Semilla

La obtención de hongos de semilla se realizó con dos tratamientos, con y sin desinfestación de semilla, posteriormente se sembraron en medio de cultivo Komada específico para *Fusarium* spp. (Komada, 1975).

En el ciclo de producción 2013-2014 se obtuvieron 2, 200 semillas de pino y 3,000 en el ciclo 2014-2015, dando un total de 5,200 semillas analizadas. La desinfestación de las mismas se realizó con hipoclorito de sodio al 3% por 20 minutos, posteriormente dos lavados de agua destilada estéril. Para las semillas sin desinfestar únicamente se realizó el remojo de semillas por 20 minutos y dos lavados con agua destilada estéril (González *et al.*, 2008). Se tomaron 100 semillas desinfestadas y 100 semillas sin desinfestar por cada especie de pino, colocando 20 semillas por caja, dando un total de 260 cajas. Se evaluó el desarrollo de hongos asociados a la semilla, pero únicamente se separaron los aislamientos de *Fusarium* por ser de interés en esta investigación.

c) Sustratos

En cada uno de los ocho viveros se tomaron muestras de sustratos por separado, directamente de bolsas selladas (agrolita, vermiculita y turba de musgo), también del aserrín apilado y de la mezcla preparada al momento de llenar sus charolas y se llevaron al laboratorio para su análisis. Se utilizó la técnica de dilución de suelo PDA-TS (Papa-Dextrosa-Agar-Tergitol-Sulfato de Estreptomicina) de Steiner y Watson (1965). Se tomaron por separado 10 g de perlita, 10 g de vermiculita, 10 g de turba de musgo, 10 g de aserrín y

10 g de la mezcla utilizada en cada vivero para el llenado de sus charolas. Cada uno de los sustratos se colocó por separado en un matraz Erlenmeyer con 90 mL de agua destilada estéril (10^{-1}). De esta suspensión se tomó 1 mL y se colocó en un tubo con 9 mL de agua destilada estéril (10^{-2}), y se repitió el procedimiento para obtener la dilución de 10^{-3} . Se agregaron 0.2 mL de la última dilución a una caja petri, el medio de cultivo se agitó ligeramente con un triángulo de vidrio por caja para cada sustrato y la mezcla. Se realizaron cinco repeticiones por cada sustrato utilizado en cada vivero, dando un total de 56 cajas, las cuales se mantuvieron a temperatura ambiente ± 25 °C, revisándose diariamente. Posteriormente, se transfirieron y purificaron las cepas de *Fusarium* spp. Después de los 10 días, se realizó la cuantificación de los hongos encontrados para obtener las unidades formadoras de colonias (ufc).

d) Larvas de mosca fungosa

De los viveros que tuvieron plantas con daño de mosca fungosa, se colocaron cinco larvas de los estadios II y III en cajas petri con-medio de cultivo PDA-A (Papa-Dextrosa-Agar-Sulfato de Estreptomina), dejándose a temperatura ambiente ± 25 °C, para su posterior revisión diaria, con la finalidad de aislar las cepas positivas a *Fusarium* sp. (Marín-Cruz *et al.*, 2015).

e) Reaislamientos y cultivos monospóricos

Las colonias que se obtuvieron de raíz, semillas, sustratos y larvas de mosca fungosa, se purificaron por medio de reaislamientos en cajas de PDA. A los ocho días después de la siembra, se realizó una dilución de conidios con 10 mL de agua destilada estéril por cada aislamiento. El agua se mezcló con el micelio y los conidios se desprendieron con ayuda de una varilla de vidrio estéril. Se recuperó 1 mL de la suspensión de conidios, se colocó en una

caja Petri con agua agar y se distribuyó en toda la caja, dejándose reposar por 10 segundos. Posteriormente, se desechó toda el agua sobrante en sanitas estériles. El aislamiento se incubó a 27⁰C durante 24 horas. En un microscopio compuesto se seleccionó un conidio germinado y se transfirió a medio PDA para la obtención de cultivos monoconidiales (Dick y Dobbie, 2002).

Identificación morfológica

Para la identificación morfológica de las especies de *Fusarium* obtenidas de raíz, semilla, sustratos y mosca fungosa, se utilizaron tres medios de cultivo: PDA (papa dextrosa agar), medio SNA específico para *Fusarium* (spezieller Nährstoffarmer agar) y CLA (agar con hoja de clavel), (Figura 2) (Anexo I).

Se observó el tipo de crecimiento, aspecto del micelio, coloración de la colonia y formación de macroconidios, microconidios, fialides, clamidosporas y esporoquios (Burgess *et al.* 1994 y Morales *et al.*, 2007). Los montajes permanentes se hicieron con glicerina deshidratada y azul de metileno, midiéndose 50 polifialides, 50 microconidios, 50 macroconidios y 50 clamidosporas. Con estos datos se procedió a realizar su identificación con las claves y manuales de Nelson *et al.* (1983); Booth (1971), Leslie y Summerell, (2006), y Kvas *et al.* (2009).

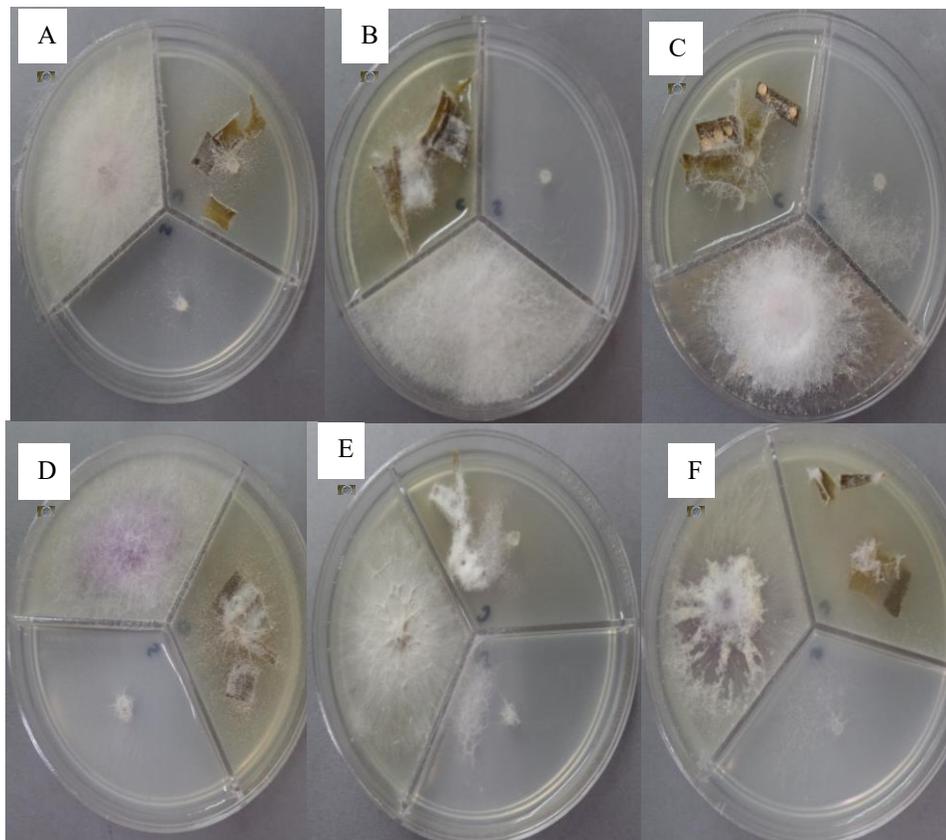


Figura 2. Crecimiento, desarrollo y esporulación de especies de *Fusarium*, en medios de cultivos PDA, SNA y CLA en los viveros del Centro de México. **A)** *F. circinatum* de larvas de mosca fugosa de Ixtlahuaca. **B)** *F. circinatum* de raíz de *P. montezumae* de Morelos. **C)** *F. circinatum* de raíz de *P. montezumae* de Temamatla. **D)** *F. circinatum* de raíz de *P. pseudostrobis* de Los Insurgentes. **E)** *F. oxysporum* de semilla de *P. greggii* de Atlangatepec. **F)** *F. oxysporum* de raíz de *P. pseudostrobis* de la DiCiFo.

Identificación molecular

Se tomaron 50 aislados obtenidos en los ocho viveros muestreados (Cuadro 1).

Cuadro 1. Aislamientos de *Fusarium* seleccionados para la identificación molecular y filogenéticamente.

Clave del aislamiento	Hospedante	Origen del aislamiento	Vivero	Estado
SF1	<i>P. greggii</i>	Raíz	VF_Monte_Noble	Hidalgo
SF2	<i>P. montezumae</i>	LMF	VFM_Atlangatepec	Tlaxcala
SF3	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VF_Los Insurgentes	Puebla
SF4	<i>P. greggii</i>	Raíz	VF_Monte_Noble	Hidalgo
SF5	<i>P. greggii</i>	Raíz	VFM_Atlangatepec	Tlaxcala
SF6	<i>P. pseudostrobis</i>	Semilla	VFM_Atlangatepec	Tlaxcala
SF7	<i>P. greggii</i>	Raíz	VF_Monte_Noble	Hidalgo
SF8	<i>P. greggii</i>	Raíz	VFM_Atlangatepec	Tlaxcala
SF9	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VFM_Atlangatepec	Tlaxcala
SF10	<i>P. greggii</i>	Semilla	VF_Ixtlahuaca	Puebla
SF11	<i>P. greggii</i>	Raíz	VF_Monte_Noble	Hidalgo
SF12	Sustrato	Mezcla	VFM_Morelos	Morelos
SF13	<i>P. montezumae</i>	Raíz	VFM_Temamatla	Edo. de México
SF14	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VF_Ixtlahuaca	Puebla
SF15	<i>P. pseudostrobis</i>	LMF	VF_Los Insurgentes	Puebla
SF16	<i>P. pseudostrobis</i>	Semilla	VFM_Atlangatepec	Tlaxcala
SF17	<i>P. greggii</i>	Raíz	VFM_Atlangatepec	Tlaxcala
SF18	<i>P. greggii</i>	Raíz	VFM_Morelos	Morelos
SF19	<i>P. greggii</i>	Raíz	VFM_Temamatla	Edo. de México
SF20	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VFM_Temamatla	Edo. de México
SF21	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VFM_Temamatla	Edo. de México
SF22	<i>P. greggii</i>	Raíz	VFM_Temamatla	Edo. de México
SF23	<i>P. greggii</i>	Raíz	VF_Monte_Noble	Hidalgo
SF24	<i>P. greggii</i>	Raíz	VF_Pueblo_Nuevo	Puebla
SF25	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VFM_Temamatla	Edo. de México
SF26	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VFM_Temamatla	Edo. de México
SF27	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VF_Los Insurgentes	Puebla
SF28	<i>P. pseudostrobis</i>	LMF	VF_Ixtlahuaca	Puebla
SF29	<i>P. montezumae</i>	Raíz	VFM_Temamatla	Edo. de México
SF30	<i>P. montezumae</i>	Raíz	VFM_Temamatla	Edo. de México
SF31	<i>P. greggii</i>	Semilla	VFM_Atlangatepec	Tlaxcala
SF32	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VF_DiCiFo	Edo. de México

SF33	<i>P. montezumae</i>	Raíz	VF_Ixtlahuaca	Puebla
SF34	<i>P. montezumae</i>	Raíz	VFM_Morelos	Morelos
SF35	<i>P. montezumae</i>	Raíz	VFM_Temamatla	Edo. de México
SF36	<i>P. pseudostrobus</i>	Raíz	VF_Pueblo_Nuevo	Puebla
SF37	<i>P. montezumae</i>	LMF	VFM_Morelos	Morelos
SF38	<i>P. greggii</i>	LMF	VFM_Atlangatepec	Tlaxcala
SF39	Sustrato	Mezcla	VF_Monte_Noble	Hidalgo
SF40	<i>P. montezumae</i>	Raíz	VFM_Morelos	Morelos
SF41	<i>P. montezumae</i>	Raíz	VF_Pueblo_Nuevo	Puebla
SF42	<i>P. greggii</i>	LMF	VFM_Atlangatepec	Tlaxcala
SF43	<i>P. pseudostrobus</i>	Raíz	VF_Pueblo_Nuevo	Puebla
SF44	<i>P. greggii</i>	Semilla	VFM_Atlangatepec	Tlaxcala
SF45	<i>P. greggii</i>	Raíz	VFM_Temamatla	Edo. de México
SF46	<i>P. montezumae</i>	Raíz	VFM_Atlangatepec	Tlaxcala
SF47	<i>P. montezumae</i>	Raíz	VFM_Temamatla	Edo. de México
SF48	<i>P. pseudostrobus</i>	Raíz	VF_DiCiFo	Edo. de México
SF49	<i>P. greggii</i>	Raíz	VFM_Morelos	Morelos
SF50	<i>P. greggii</i>	Semilla	VF_Monte_Noble	Hidalgo

LMF (larva de mosca fungosa), VF (vivero forestal) y VFM (vivero forestal militar).

Extracción de DNA

El DNA se extrajo a partir de micelio por el método de CTAB (Weising, 1995), con algunas modificaciones para eliminar la mayor cantidad de pigmentos y compuestos fenólicos. El DNA se cuantificó en un Nanodrop (Thermo, USA). De cada una de las muestras se prepararon diluciones a 20 ng para la amplificación de los genes.

PCR y secuenciación

Para la amplificación de la región del ITS se utilizaron los iniciadores universales ITS5 e ITS4 (White *et al.*, 1990), para el espaciador intergénico IGS se utilizaron los iniciadores universales CNS1F y NL11R (Collins and Cunningham's, 2000) y para el factor de elongación (TEF), con los iniciadores universales 728F y 986R (Carbone y Kohn, 1999 y Van't Klooster *et al.*, 2000). La mezcla de reacción para PCR se preparó en un volumen

final de 25 μ L conteniendo: buffer de la enzima 1 x *Taq* DNA polimerasa, 0.8 mM deoxinucleósido trifosfatos (0.2 mM cada uno), 100 ng DNA, 20 pmol de cada iniciador y 2 unidades de *GoTaq* DNA (Promega, USA). Las amplificaciones se realizaron con un ciclo inicial de desnaturalización a 96°C por 2 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, la hibridación con los iniciadores a 57, 50 y 48°C, respectivamente durante 1 min, seguido de una extensión final de 5 min a 72°C. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Peltier Thermal Cycler PTC-200 (BIORAD, México).

Las amplificaciones se verificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% preparado con 1x TAE buffer (Tris Acetate-EDTA) y corrido a 87 V cm^{-3} durante 1 h. El gel se tiñó con Gel red (Biotium, USA) y las bandas se visualizaron en un transiluminador (Infinity 3000 Vilber Lourmat, Germany) (Figura 3 - 5). Los productos amplificados se limpiaron con ExoSAP (Affymetrix, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante (Número de catálogo 78201), se prepararon para la reacción de secuenciación usando el Bigdyeterminator v.3.1 (AppliedBiosystem). Estos productos se enviaron a secuenciar al Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) con un secuenciador Applied Biosystems modelo 3730xL (Applied BioSystems, USA).

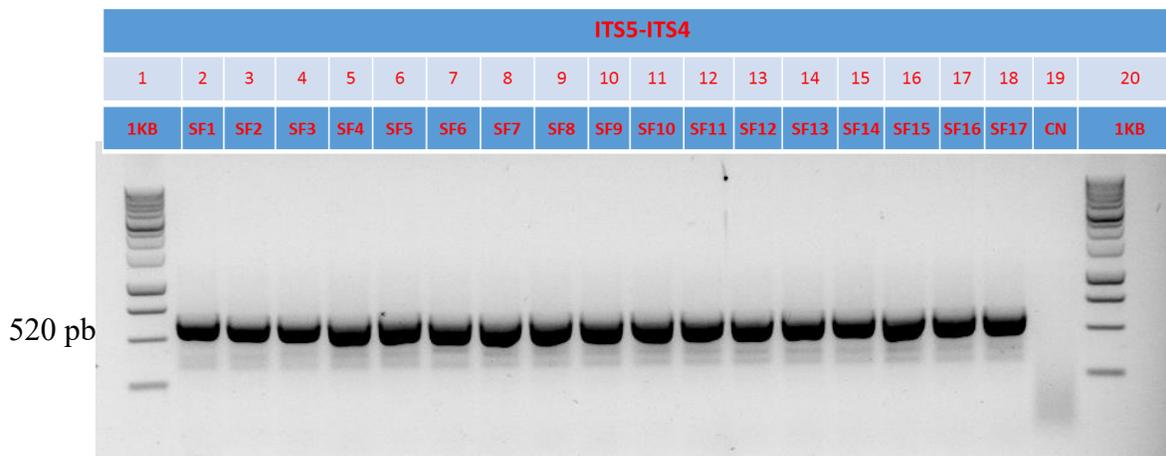


Figura 3. **Imagen de la electroforesis de ITS.** Carril 1. Marcador de peso molecular 1 KB (Promega, USA); carril 2. *Giberella circinata* de raíz de *Pinus greggii* (SF1); carril 3. *F. oxysporum* de Larva de mosca fungosa (SF2); carril 4. *Fusarium* sp. de raíz de *P. pseudostrobus* (SF3), carril 5. *G. circinata* de raíz de *P. greggii* (SF4); carril 6. *G. circinata* de raíz de *P. greggii* (SF5); carril 7. *F. temperatum* de semilla de *P. pseudostrobus* (SF6); carril 8. *Fusarium* sp. de raíz de *P. greggii* (SF7); carril 9. *F. oxysporum* de raíz de *P. greggii* (SF8); carril 10. *F. sterilihyphosum* de raíz de *P. pseudostrobus* (SF9); carril 11. *Fusarium* sp. de semilla de *P. greggii* (SF10); carril 12 *F. proliferatum* de raíz de *P. greggii* (SF11); carril 13. *F. oxysporum* de la mezcla de sustrato (SF12); carril 14. *F. proliferatum* de raíz de *P. montezumae* (SF13); carril 15. *F. avenaceum* de raíz de *P. pseudostrobus* (SF14); carril 16. *F. sterilihyphosum* de larva de mosca fungosa (SF15); carril 17. *F. oxysporum* de semillas de *P. pseudostrobus* (SF16); carril 18. *F. sterilihyphosum* de raíz de *P. greggii* (SF17); carril 19. Control negativo (CN) y carril 20. Marcador de peso molecular 1 KB (Promega, USA).

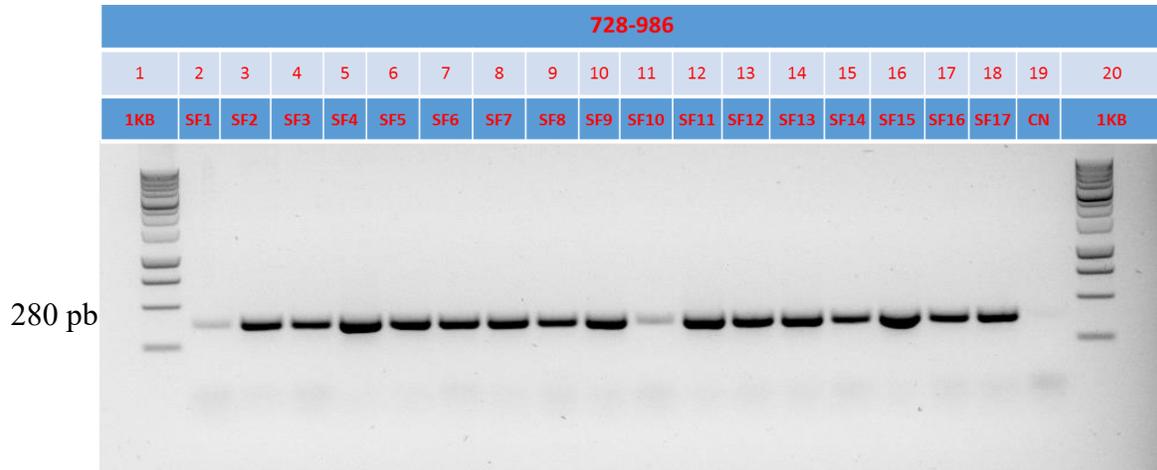


Figura 4. **Imagen de la electroforesis de TEF.** Carril 1. Marcador de peso molecular 1 KB (Promega, USA); carril 2. *Fusarium succisae* de raíz de *Pinus greggii* (SF1); carril 3. *F. oxysporum* de Larva de mosca fungosa (SF2); carril 4. *Fusarium* sp. de raíz de *P. pseudostrobus* (SF3); carril 5. *Fusarium* sp. de raíz de *P. greggii* (SF4); carril 6. *F. succisae* de raíz de *P. greggii* (SF5); carril 7. *F. succisae* de semilla de *P. pseudostrobus* (SF6); carril 8. *F. succisae* de raíz de *P. greggii* (SF7); carril 9. *F. oxysporum* de raíz de *P. greggii* (SF8); carril 10. *F. succisae* de raíz de *P. pseudostrobus* (SF9); carril 11. *Fusarium* sp. de semilla de *P. greggii* (SF10); carril 12 *F. succisae* de raíz de *P. greggii* (SF11); carril 13. *F. oxysporum* de la mezcla de sustrato (SF12); carril 14. *F. succisae* de raíz de *P. montezumae* (SF13); carril 15. *F. avenaceum* de raíz de *P. pseudostrobus* (SF14); carril 16. *F. succisae* de larva de mosca fungosa (SF15); carril 17. *F. oxysporum* de semillas de *P. pseudostrobus* (SF16); carril 18. *F. succisae* de raíz de *P. greggii* (SF17); carril 19. Control negativo (CN) y carril 20. Marcador de peso molecular 1 KB (Promega, USA).

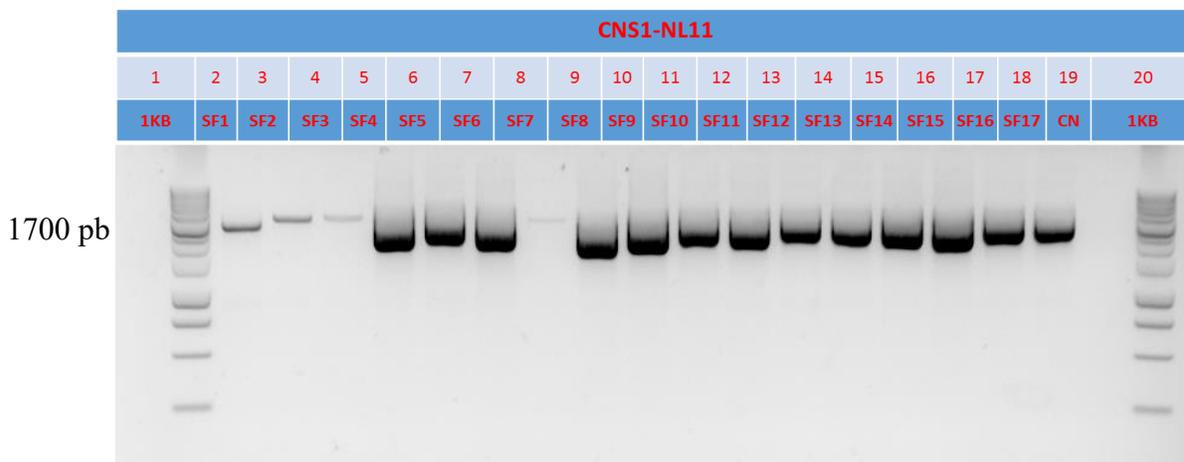


Figura 5. **Imagen de la electroforesis de IGS.** Carril 1. Marcador de peso molecular 1 KB (Promega, USA); carril 2. *Fusarium circinatum* de raíz de *Pinus greggii* (SF1); carril 3. *F. oxysporum* de Larva de mosca fungosa (SF2); carril 4. *Fusarium* sp. de raíz de *P. pseudostrobus* (SF3); carril 5. *F. circinatum* de raíz de *P. greggii* (SF4); carril 6. *F. circinatum* de raíz de *P. greggii* (SF5); carril 7. *F. subglutinans* de semilla de *P. pseudostrobus* (SF6); carril 8. *F. circinatum* de raíz de *P. greggii* (SF7); carril 9. *F. oxysporum* de raíz de *P. greggii* (SF8); carril 10. *F. subglutinans* de raíz de *P. pseudostrobus* (SF9); carril 11. *Fusarium* sp. de semilla de *P. greggii* (SF10); carril 12. *F. circinatum* de raíz de *P. greggii* (SF11); carril 13. *F. oxysporum* de la mezcla de sustrato (SF12); carril 14. *F. circinatum* de raíz de *P. montezumae* (SF13); carril 15. *F. avenaceum* de raíz de *P. pseudostrobus* (SF14); carril 16. *F. circinatum* larva de mosca fungosa (SF15); carril 17. *F. oxysporum* de semillas de *P. pseudostrobus* (SF16); carril 18. *F. circinatum* de raíz de *P. greggii* (SF17); carril 19. Control negativo (CN) y carril 20. Marcador de peso molecular 1 KB (Promega, USA).

Ensamble de las secuencias

Las secuencias de nucleótidos de las especies de *Fusarium* se ensamblaron y editaron usando BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999) para crear una secuencia consenso. La secuencia consenso se comparó con las depositadas en GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), empleando la herramienta BLASTN 2.2.19 (Zhang *et al.*, 2000).

Análisis filogenético

Para obtener las agrupaciones de las especies de *Fusarium* trabajadas con biología molecular, se realizó un análisis filogenético con los tres marcadores moleculares ITS, TEF e IGS para tener un soporte con las secuencias de referencia del GenBank, con la finalidad de generar árboles individuales. Las secuencias se alinearon usando Clustal W 1.8.1. (Thompson *et al.*, 1994), incluido en el programa Mega 7 (Tamura *et al.*, 2014) y analizado con el método de Máxima Parsimonia. Para determinar los valores de confianza de los agrupamientos dentro del árbol resultante, se realizó un análisis de bootstrap con 1000 repeticiones (Felsestein, 1985). Los clados del árbol filogenético muestran un valor de soporte del 100%

Análisis Bayesiano

Para obtener un árbol concatenado de las especies de *Fusarium* bajo estudio, con los tres marcadores moleculares (ITS, TEF e IGS) y tener el soporte con las secuencias de referencia del GenBank. Se realizó el análisis con MrBayes 3.2.2 (Ronquist *et al.*, 2012) declarando tres particiones correspondientes a los tres marcadores utilizados, empleando la estrategia de salto reversible para la selección de modelos de sustitución (Huelsenbeck *et al.*, 2004). La heterogeneidad de tasas se modeló con referencia a la distribución Gamma empleando cuatro categorías. Adicionalmente, se incluyó un parámetro para el porcentaje de sitios invariantes. Todos los parámetros fueron desligados entre particiones; la cadena de MCMC (Cadenas de Markov Monte Carlo) se ajustó para cuatro cadenas por duplicado durante 3.5 millones de generaciones con un porcentaje de burn-in del 25%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de síntomas e incidencia de la secadera de pino

La sintomatología que se observó en la etapa de preemergencia, consistió en la inhibición de germinación de la semilla (Figura 6 A), en la cual, al extraerse del sustrato se observó que hay muerte del embrión y pudrición de la radícula recién emergida (Figura 6 B). En postemergencia hubo secamiento y pudrición del tallo después de que las plántulas emergen del suelo, por lo cual se le da el término de chupadera, y es muy notorio en la etapa de plántula (Figura 6 C y D). Los síntomas aéreos fueron muy variables, pero en general, las plántulas presentaron acículas esparcidas y cloróticas, o acículas retorcidas, seguidas por una muerte descendente. Posteriormente el follaje se torna de color café- rojizo antes de morir, síntomas que coinciden con lo reportado por Landis *et al.* (1989), Gordon *et al.* (1998) y James (2012).

En *P. greggii*, hubo marchitez, las acículas se tornan de color rojizo (Figura 7 A), el brote principal se dobla (Figura 7 B) y finalmente se presenta una muerte descendente acompañada del secamiento del tallo (Figura 7 C). En raíz se presentó abundante pudrición. En *P. montezumae* las acículas de la base del cuello de la raíz se ponen de color rojizo (Figura 7 D). Se observa una pudrición a partir del cuello hacia abajo y hacia arriba, que llega a presentar micelio blanco y conidios (Figura 7 E). Las acículas muestran una coloración violácea a partir de la parte basal (Figura 7 F), la plántula muere de forma ascendente. De igual forma se observa abundante pudrición del cuello de la raíz y sus raíces.



Figura 6. Síntomas en plántulas de pino en pre y postemergencia por *Fusarium* spp.

A) Semillas de *P. montezumae* con inhibición en la germinación y pudrición. **B)** Pudrición de la radícula. **C y D)** Plántulas con secadera en *P. greggii*.

En *P. pseudostrobus*, comienza con las acículas de color rojizo (Figura 7 G y H), el brote principal se pone de color violeta como si fuera daño por helada y causa una muerte descendente en la plántula (Figura 7 I). También presentó pudrición en raíces secundarias de color café que ocasionan su muerte como lo señalan Alvarado *et al.* (2004) y Cibrián *et al.* (2007). Esta pudrición fue frecuente en las tres especies de pino, y concuerda con lo que señalan Maphosa, *et al.* (2016), al mencionar que en Sudáfrica el patógeno inicialmente aparece en los viveros ocasionando pudrición de raíz en plántulas de pino.

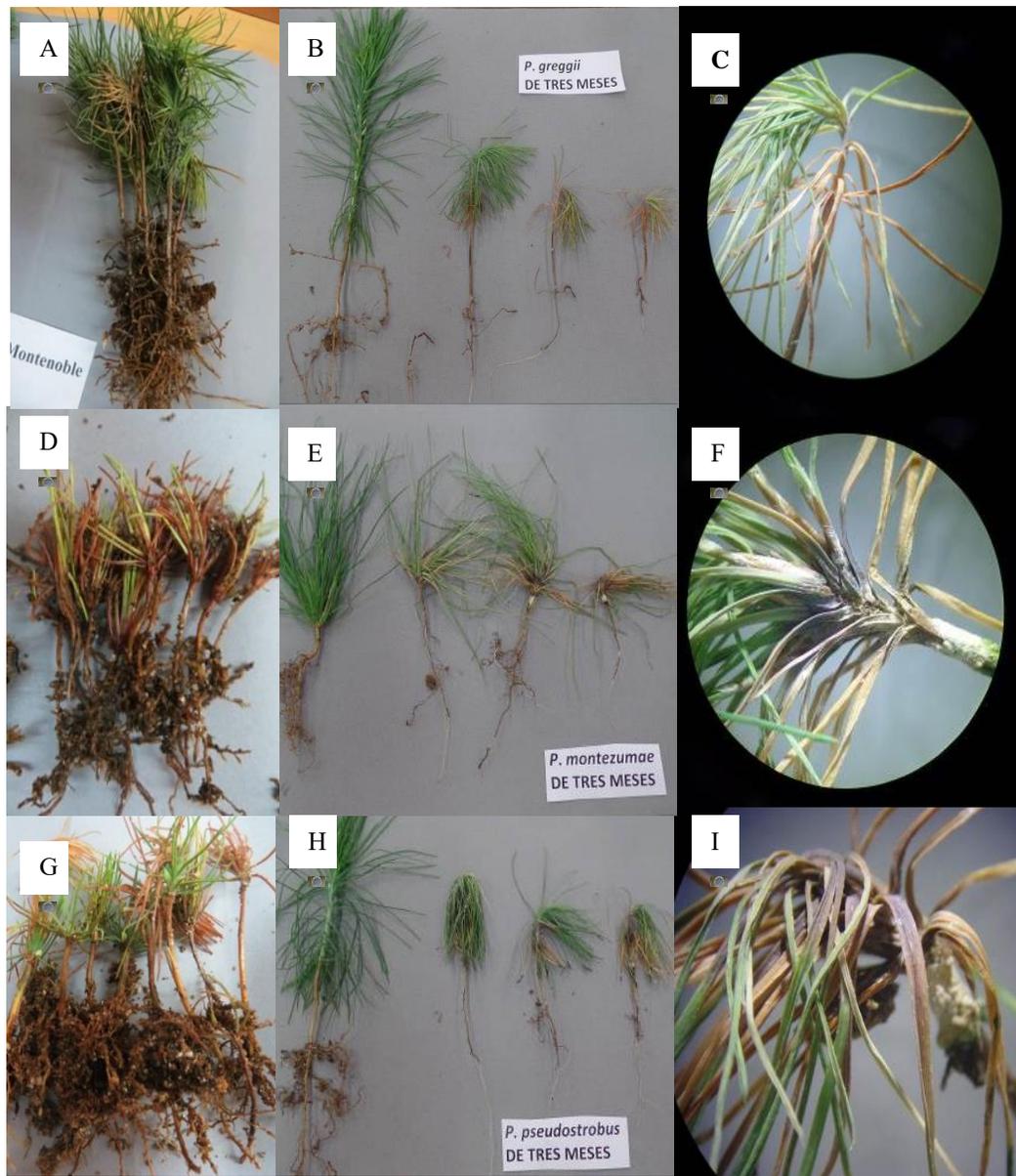


Figura 7. Síntomas en plántulas de las tres especies de pino a los tres y cinco meses de edad causados por *Fusarium* spp. **A)** Plántulas de *P. greggii* de Monte Noble. **B)** Doblamiento del brote principal y acículas de color rojizo. **C)** Acercamiento de la plántula con estrangulamiento en el tallo. **D)** Plántulas de *P. montezumae* de Ixtlahuaca. **E)** Afectación a partir del cuello de la raíz. **F)** Muerte basal del cuello de la planta y acículas color violeta. **G)** Plántulas de *P. pseudostrobus*. **H)** Doblamiento del brote principal, pero el centro se manifiesta de color violeta. **I)** Brote principal con acículas de color violeta.

El muestreo de las 100 plantas en cada uno de los ocho viveros, para el ciclo de producción 2013-2014, mostró que la mayor incidencia de *Fusarium* sp. se presentó en los viveros de Atlangatepec y de Ixtlahuaca en *P. montezumae* y *P. greggii*. Las incidencias por vivero y por año son muy variables, estas pueden ir desde un 2% hasta un 35 % (Cuadro 2). Sin embargo, el comportamiento de incidencia durante el ciclo de producción 2014-2015, fue muy similar al que señalan Alvarado *et al.* (2004), con mortalidad de planta por *Fusarium* entre 5 y 10% en el vivero de San Luis Tlaxialtemalco, D. F. García *et al.* (2007) reportan pérdidas de planta en vivero hasta un 40 %. Cibrián *et al.* (2008) y Marín-Cruz *et al.* (2015), reportan al género *Fusarium* spp. y a *Fusarium circinatum* obtenido de adultos de mosca fungosa, afectando en un 30 % a la especie de *P. montezumae* en el vivero forestal militar de Temamatla, Estado de México.

Cuadro 2. Incidencia de la enfermedad por *Fusarium* spp. en plantas de pino de tres meses de edad. Ciclos de producción 2013-2014 y 2014-2015.

Vivero	Especie	% Incidencia	
		2013-2014	2014-2015
Atlangatepec	<i>P. montezumae</i>	30	35
	<i>P. pseudostrobis</i>	8	12
	<i>P. greggii</i>	20	28
Temamatla	<i>P. montezumae</i>	25	26
	<i>P. pseudostrobis</i>	10	8
	<i>P. greggii</i>	15	23
DiCiFo	<i>P. pseudostrobis</i>	NA	4
Morelos	<i>P. montezumae</i>	2	3
	<i>P. pseudostrobis</i>	0	0
	<i>P. greggii</i>	6	5
Ixtlahuaca	<i>P. montezumae</i>	12	25
	<i>P. pseudostrobis</i>	6	15
	<i>P. greggii</i>	15	13
Pueblo Nuevo	<i>P. montezumae</i>	5	2
	<i>P. pseudostrobis</i>	0	0
	<i>P. greggii</i>	7	4
Monte Noble	<i>P. greggii</i>	12	8
Los Insurgentes	<i>P. montezumae</i>	8	10
	<i>P. pseudostrobis</i>	6	6
	<i>P. greggii</i>	6	9

NA (No tuvo producción de planta en este ciclo).

Recolecta de material de raíz, semilla, sustrato y larvas de mosca fungosa

a) Raíz

De las muestras de raíz de plántulas enfermas procesadas durante los dos ciclos de producción (2013–2014 y 2014–2015), se obtuvieron los siguientes registros promedios de aislamientos positivos a *Fusarium* spp. por vivero: para Atlangatepec 45 y 55 % , para Temamatla 40 y 34 % , en el de la DiCiFo un 20 % (únicamente en el ciclo 2014- 2015), en Ixtlahuaca 17 y 28 %, en Monte Noble 16 y 36 %, en los Insurgentes 23 y 19 %, en Pueblo Nuevo 8 y 12 % y en Morelos un 8 y 9 %. La especie de pino con mayor porcentaje de aislamientos de *Fusarium* spp. en raíz, fue *P. montezumae* con un promedio de 27 y 33 % y para *P. greggii* un 27 y 32 % (Figura 8). Las especies que se obtuvieron fueron: *F. avenaceum*, *F. circinatum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. pseudocircinatum*. Algunas especies coinciden con las que menciona James (2012), que son: *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. avenaceum*, *F. solani*, *F. acuminatum*, *F. sambucinum*, *F. sporotrichioides* y *F. equiseti*.

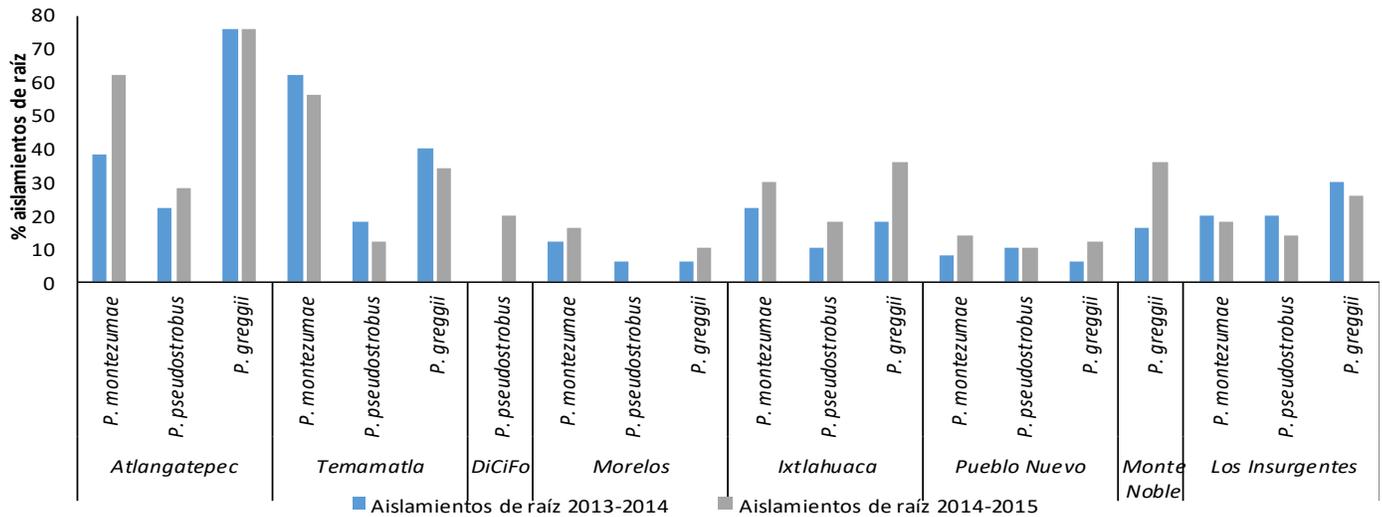


Figura 8. Porcentaje de aislamientos de raíz con *Fusarium* spp; por especie de pino y por vivero del Centro de México, en los ciclos de producción 2013-2014 y 2014-2015.

b) Semilla

Las semillas forestales son consideradas como la fuente más importante del germoplasma primario para la producción de planta en vivero y requiere de semillas con buenas características sanitarias. En esta investigación se encontró al género *Fusarium* en semilla, por lo que tiene la posibilidad de transmitir la enfermedad de la secadera y pudrición de raíz en pino. Se encontró asociado a semilla principalmente cuando ésta se desinfectó con hipoclorito de sodio, a las especies de *F. circinatum*, *F. oxysporum*, *F. subglutinans* y *F. proliferatum*, que presentaron pudrición de semilla y no hubo germinación, lo cual indica que el hongo puede ser un patógeno interno (Figura 9), como lo señalan Ocamb *et al.* (2002) para la especie *F. moniliforme* que se transmite por semilla y afecta la germinación de la misma. Los viveros donde se encontró semilla con *Fusarium*

spp. en el ciclo de producción de 2013-2014 (1), fueron Ixtlahuaca en *P. greggii*, Morelos en *P. montezumae*, Monte Noble en *P. greggii*, Atlangatepec en *P. pseudostrobus*, todos con semilla desinfectada. Para el ciclo de producción 2014-2015 (2), los viveros que presentaron semillas con *Fusarium* spp. fueron Pueblo Nuevo en *P. pseudostrobus* con y sin desinfección de semilla se encontró a *F. oxysporum*, lo cual indica que el hongo se encontraba de forma interna y externa. Esto coincide con lo que señala Fraedrich y Cram (2012), al mencionar que *F. circinatum* y *F. oxysporum* son hongos patogénicos y asociados a semillas de coníferas. En Atlangatepec el hongo *Fusarium* spp., se obtuvo de semilla desinfectada de *P. pseudostrobus* y *P. greggii*. Ésto coincide con lo que reporta Barrows-Broadus y Dwinell (1985), Storer *et al.* (1998) y Britz *et al.* (2001), al señalar que *F. circinatum* se encuentra en las semillas de *P. patula*, *P. greggii*, *P. teocote* y *P. leiophylla*. Por su parte, Graham y Linderman (1983) reportaron a *F. oxysporum* aislado de semillas de *Pseudotsuga menziesii* con “chupadera”. González *et al.* (2008) y Storer *et al.* (1998), reportan que *Fusarium* puede ir externa e internamente en la semilla y mencionan a *F. circinatum*, *F. verticilloides* y *F. proliferatum* que afectan los tejidos internos en las semillas de pino. También coincide con Ocamp *et al.* (2002) y Kolotelo *et al.* (2001), al señalar la presencia de *Fusarium* spp. en semillas de pino durante el transporte, la extracción y la siembra. La posibilidad que se encuentre *Fusarium* de manera interna en las semillas es un forma de dispersarse en áreas no contaminadas y diseminarlas de una región a otra, complicando los tratamientos para el control de la enfermedad.

Además de *Fusarium* spp., se encontraron otros hongos asociados a la semilla de forma interna y externa en los viveros del Centro de México (Figura 9 y 10), durante los dos ciclos de producción de planta, estos fueron: *Aspergillus nigrum*, *Trichoderma harzianum*,

Penicillium spp., *Rhizopus* spp., *Paecilomyces* spp., *Stemphylium* spp., *Curvularia* spp., y *Alternaria alternata*. El género *Aspergillus nigrum* inhibió la germinación y ocasionó pudrición en la semilla. *Trichoderma harzianum* estuvo presente en la testa de la semilla. Los géneros de *Curvularia* spp., *Stemphylium* spp. y *Paecilomyces* spp., causaron una radícula corta y pudrición. *Rhizopus* spp. y *A. alternata* ocasionaron pudrición de radícula. Lo anterior coincide con lo que reporta Arguedas (1995), al señalar que existen varios hongos que se desarrollan en semilla y se debe a las condiciones en la recolecta de conos y en el almacenamiento de la misma.

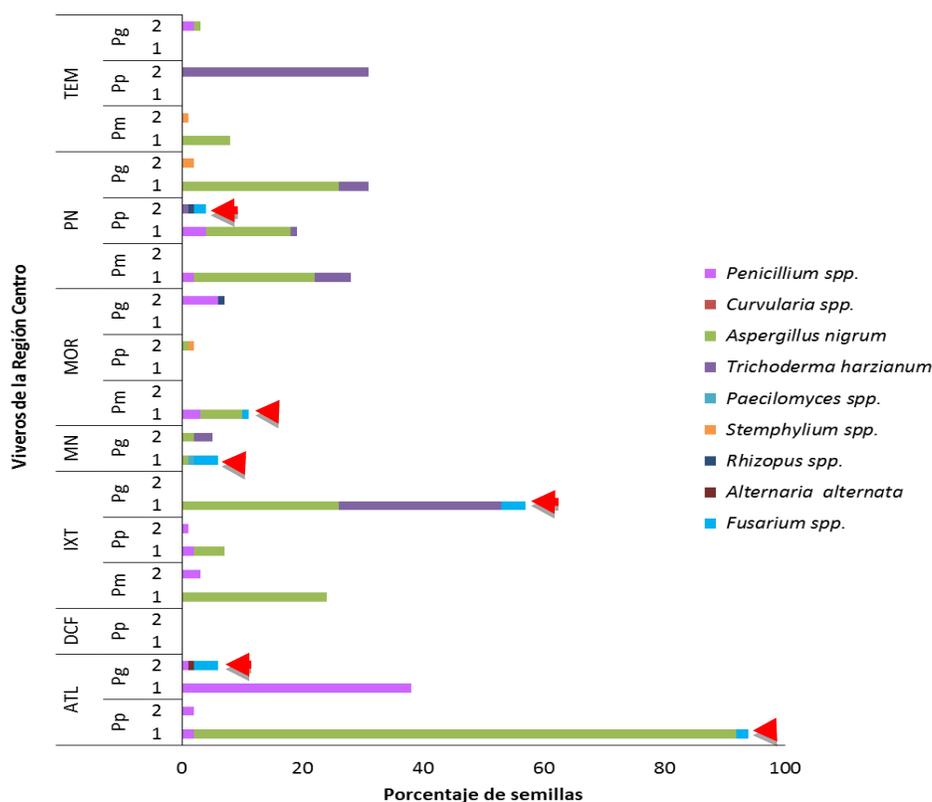


Figura 9. Porcentaje de aislamientos de semillas desinfestadas con presencia de *Fusarium* spp. (flecha) y otros hongos asociados, por especie de pino y por viveros del Centro de México, en los ciclos de producción 2013-2014 (1) y 2014-2015 (2). Pm = *Pinus montezumae*, Pp = *P. pseudostrobus* y Pg = *P. greggii*.

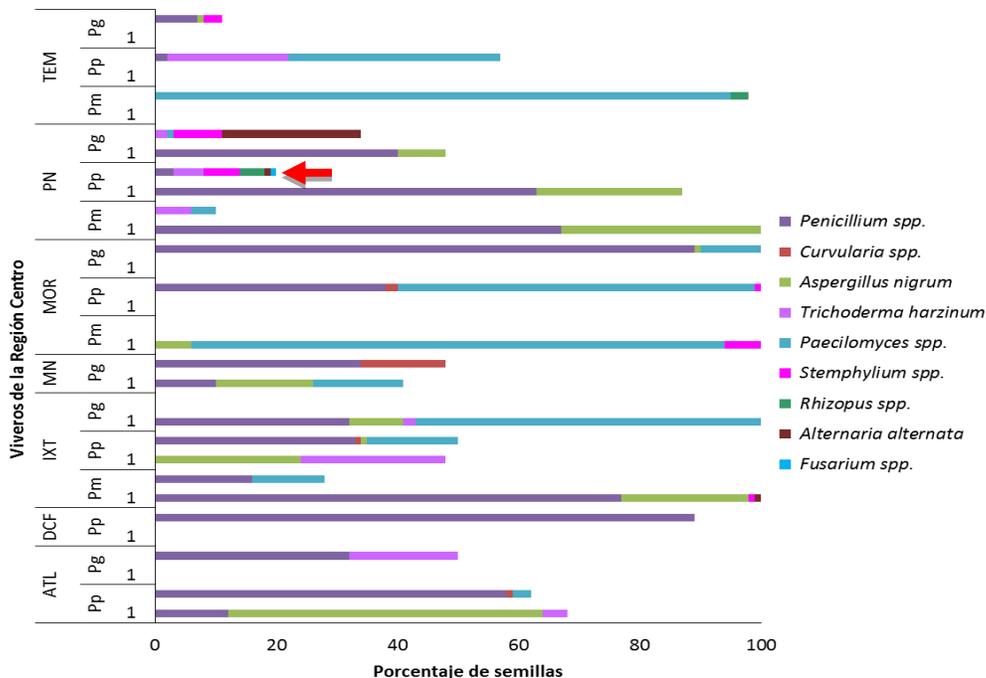


Figura 10. Porcentaje de aislamientos de semillas sin desinfectar con presencia de *Fusarium* spp. (flecha) y otros hongos asociados, por especie de pino y por viveros del Centro de México, en los ciclos de producción 2013-2014 (1) y 2014-2015 (2). Pm = *Pinus montezumae*, Pp = *P. pseudostrobus* y Pg = *P. greggii*.

c) Sustratos

Se encontraron propágulos en turba de musgo donde se aisló a *F. oxysporum* (6,000 ufc/g) y en la mezcla a *F. circinatum* (4,000 ufc/g) en los viveros de Temamatla, durante el ciclo de producción de planta 2013-2014. También en mezcla se encontró a *F. circinatum* de los viveros Monte Noble (8,000 ufc/g); los Insurgentes (8,000 ufc/g) y Morelos (3, 000 ufc/g). Esto comprueba lo que señalan Kilic *et al.* (1998) y Peterson (2008), cuando mencionan que el género *Fusarium* spp. y *F. oxysporum*, puede venir en el suelo, en el aire, en el agua, en conos y en semillas. En el ciclo de producción de planta 2014-2015, no se desarrolló *Fusarium* spp; pero es muy evidente la presencia de propágulos de *Trichoderma harzianum*, que pudo influir para que no se presentara la secadera y pudrición de raíz en

pino, al inicio del desarrollo de las plántulas, tal como lo señalan Mukherjee *et al.* (2013). Otros hongos aislados de sustratos fueron: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nigrum*, *Penicillium spp.*; *Paecilomyces spp.*; *Trichothecium spp.* y *Cladosporium spp.*; en los dos ciclos de producción de planta (Figuras 11 y 12). Se observó que los sustratos con mayor número de propágulos de los hongos anteriores, se presentaron en el peat moss (turba de musgo) y en las mezclas que se realizan en los diferentes viveros forestales. Cabe señalar que existe poca información en artículos científicos que señalen dicha información por lo que se requiere mayor investigación en la micoflora de los sustratos utilizados en los viveros.

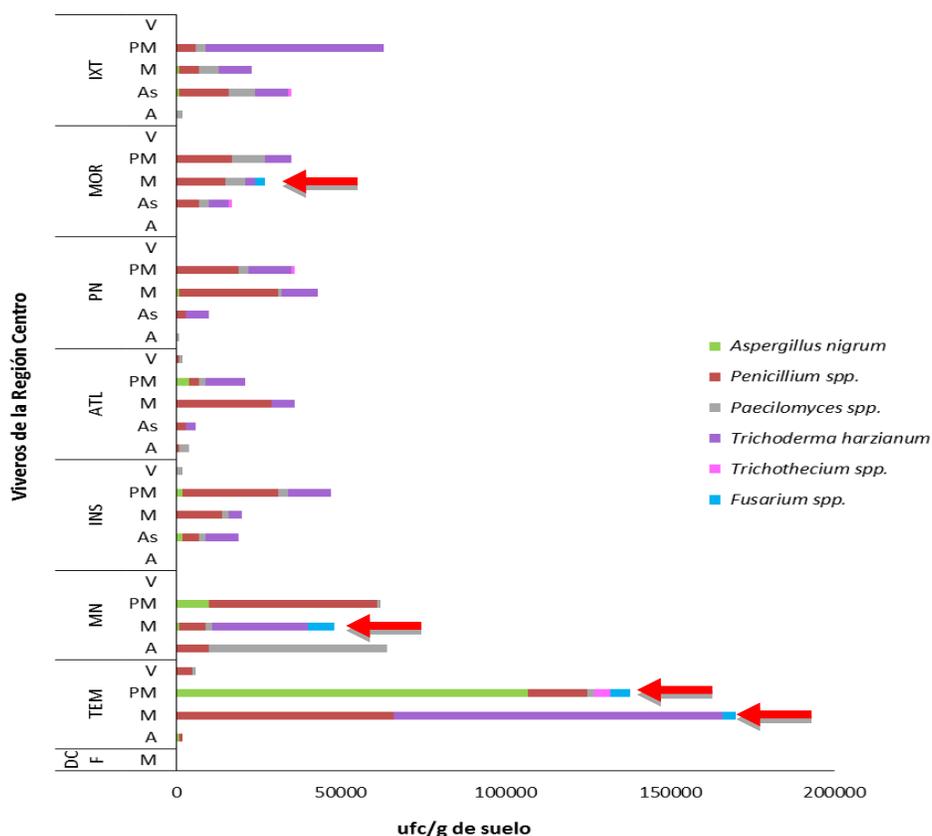


Figura 11. Aislamientos de sustratos con unidades formadoras de colonias de *Fusarium spp.* y otros hongos asociados en los viveros del Centro de México, en los ciclos de producción de planta 2013-2014. V = vermiculita, PM = peat moss (turba de musgo), M = mezcla, As = aserrín y A = agrolita.

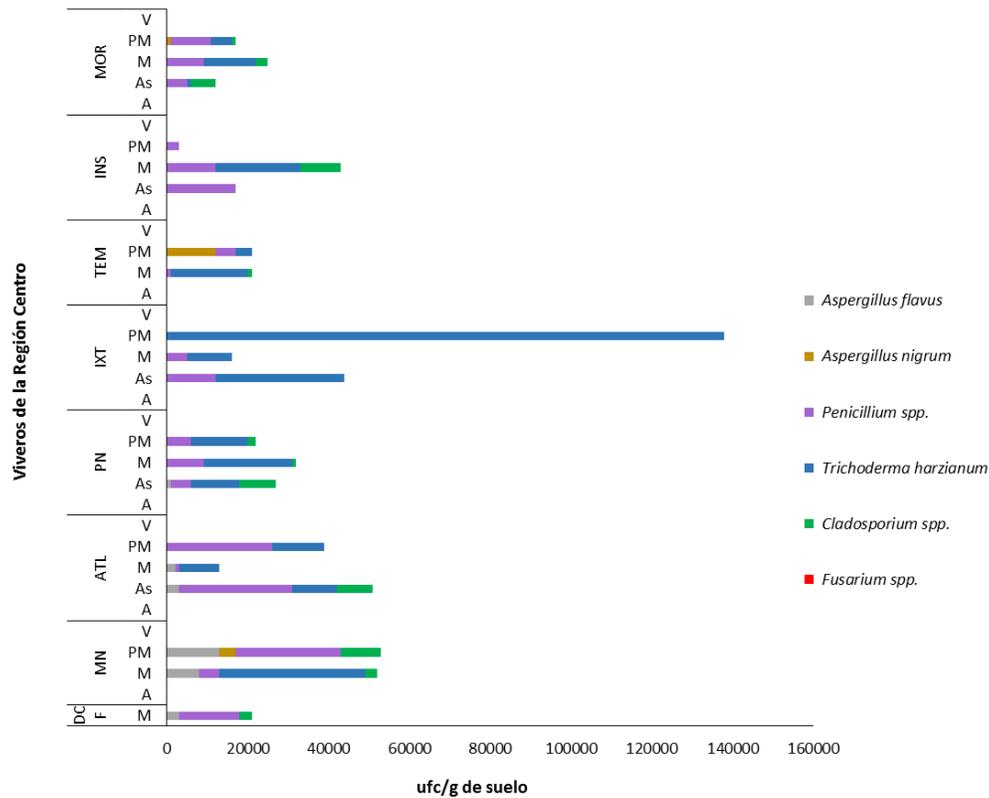


Figura 12. Aislamientos de sustratos con unidades formadoras de colonias de *Fusarium* spp. y otros hongos asociados en los viveros del Centro de México, en los ciclos de producción de planta 2014-2015. V = vermiculita, PM = peat moss (turba de musgo), M = mezcla, As = aserrín y A = agrolita.

d) Larvas de mosca fungosa.

Se aisló *Fusarium* spp. de larvas de mosca fungosa de las especies *Bradysia impatiens* y *Lycoriella ingenua* (Figura 13 A - D) en los ciclos de producción de planta 2013-2014 y 2014-2015. En los viveros de Atlangatepec, Temamatla, Morelos y Los Insurgentes el muestreo se realizó en *P. montezumae* y *P. greggii*, en el vivero de la División de Ciencias Forestales en *P. pseudostrobis* durante el ciclo 2014-2015 y en Ixtlahuaca de *P. greggii*. En los dos viveros restantes, Pueblo Nuevo y Monte Noble, no se encontró mosca fungosa. El desarrollo de micelio en las cajas petri con medio PDA + Antibiótico, era de color blanco al

principio y luego se tornaba de color violeta ligero a rojo, y en todo momento estuvo acompañado de bacterias (Figura 13 E - G), de las cuales se identificaron dos cepas con técnicas moleculares y alinearon con *Serratia marcescens* (con número de accesión KX306885 y KX306886). Esta situación puede estar relacionada con lo que mencionan Gaio *et al.* (2011), de que existen bacterias asociadas a la mosca fungosa y que pueden tener un impacto sustancial en el ciclo de la biología y la vida de su hospedante. Los mismos autores señalan cuatro especies de bacterias, *Asaia* sp. *Chryseobacterium* sp. *Klebsiella* sp. y *Serratia* sp., en el intestino medio de *Bradysia hygida*. Las especies de *Fusarium* spp. obtenidas de larvas de mosca fungosa fueron: *F. circinatum* (Figura H e I), *F. oxysporum*, *F. subglutinans* y *F. pseudocircinatum*. Se comprueba lo que señalan James *et al.* (1995) y El-Hamalawi y Stanghellini (2005), en el sentido de que las larvas pueden transmitir a los hongos *Fusarium oxysporum* y *Fusarium avenaceum*, entre otros como, *Thielaviopsis basicola* y *Verticillium alboatrum*, que están en el tracto digestivo e inoculando a plantas sanas durante su alimentación. Sin embargo, Kalb y Millar (1986), El-Hamalawi y Stanghellini (2005), reportan que los adultos de la mosca fungosa pueden llevar externamente en su cuerpo conidios de hongos patógenos como *Fusarium*, *Thielaviopsis*, y *Verticillium* spp. y depositarlos en plantas sanas.

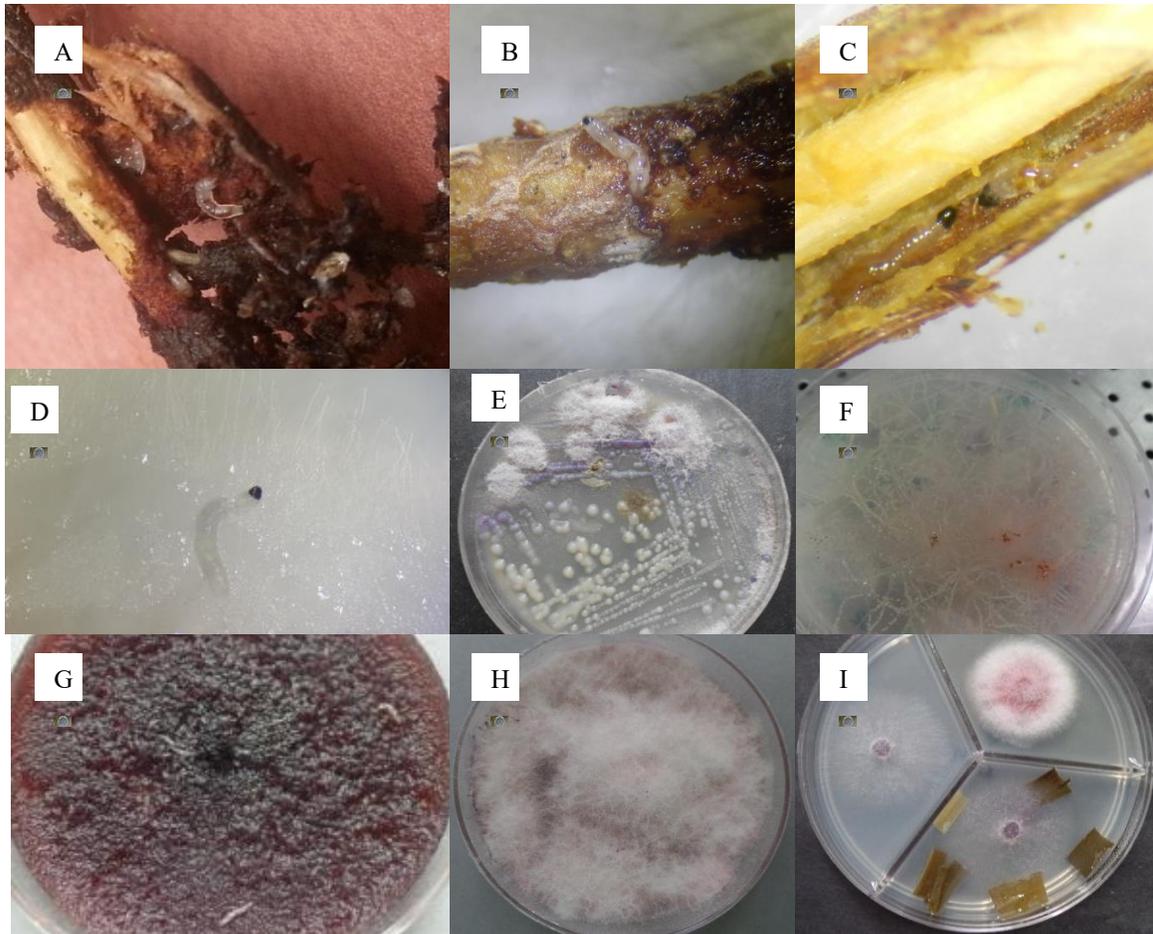


Figura 13. Recolección de larvas de mosca fungosa (*Bradysia impatiens*) y aislamientos de *Fusarium* spp. de los viveros forestales evaluados. **A**, **B** y **C**) Larvas de mosca fungosa en diferentes estadios con daño en plántulas de pino. **D** y **G**) Larvas en movimiento desarrollando micelio de *Fusarium* sp. **E** y **F**) Desarrollo de *F. circinatum* y *F. oxysporum* con la bacteria. **H**) Aislamiento de *F. circinatum*. e **I**) Aislamiento de *F. circinatum* en tres medios de cultivo para su esporulación.

En resumen, se obtuvieron en total 145 aislados de *Fusarium* spp., a partir de raíz, semilla, sustrato y larvas de mosca fungosa que se evaluaron y muestrearon en los dos

ciclos de producción de planta en los viveros (2013-2014 y 2014-2015). El vivero donde se obtuvo el mayor número de aislamientos fue Atlangatepec con un 33 % del total, seguido de Temamatla con 25 % y Monte Noble con un 17 %. Las especies de pino de donde se obtuvo el mayor número de aislamientos fueron *P. greggii* con 42 %, *P. montezumae* con 38 % y *P. pseudostrabus* con 20 %. Por origen de aislamientos, fue a partir de raíz de donde se obtuvo el mayor porcentaje con 74 %; 15 % a partir de larvas de mosca fungosa, 8 % de semilla y 3 % de sustratos (Figura 14).

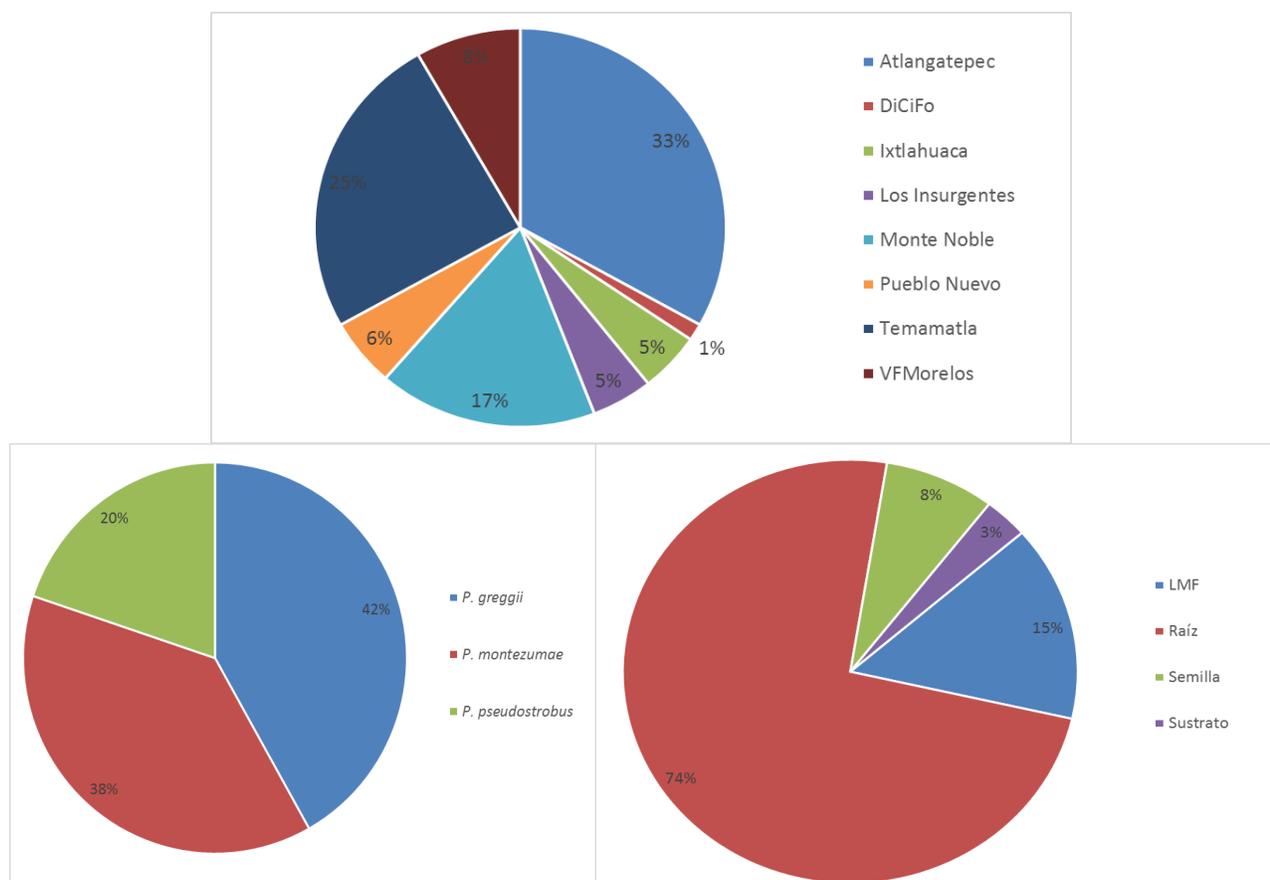


Figura 14. Porcentaje de aislamientos de raíz, semilla, sustratos y larvas de mosca fungosa con *Fusarium* spp; por vivero, por especie de pino y por origen del aislamiento. En los dos ciclos de producción de planta (2013–2014 y 2014-2015).

Identificación morfológica

Una vez obtenidos los 145 aislamientos de los viveros bajo estudio se procedió a su caracterización morfológica (Cuadro 3) y se reconocieron las siguientes especies aisladas de raíz, semilla, sustratos y larvas de mosca fungosa (Figuras 15-20):

Cuadro 3. Sinopsis morfológica de las especies de *Fusarium* spp. durante los muestreos en los viveros del Centro de México.

	MACROCONIDIOS		MICROCONIDIOS							ARREGLO			CONIDIÓFOROS		Clamidosporas	Hifas estériles	Esporodocios	Figuras	
	Forma típica	No. de septos	Fusiformes	Oval	Oval a alantoides	Oval a ovoide	Ovoide	Clavado	Piriformes	No. De septos	Cadenas cortas	Cadenas largas	Falsas cabezas	Monofálides					Polfálides
<i>F. avenacuem</i>	+	3-5	+							0-1				+	+			Color crema	Figura 14
<i>F. circinatum</i>	+	3			+	+	+			0			+	+	+	+		Naranja pálido	Figura 15
<i>F. oxysporum</i>	+	3-5		+						0-1			+	+		+		Naranja violeta	Figura 16
<i>F. proliferatum</i>	+	3-5				+		+	+	0		+	+	+	+			Naranja pálido	Figura 17
<i>F. subglutinans</i>	+	3		+		+				0			+	+	+			Crema a naranja	Figura 18
<i>F. pseudocircinatum</i>	+	3			+	+				0-1	+		+	+	+		+	Escasos	Figura 19

***Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc.**

Presentó micelio algodonoso con crecimiento ligero en medio PDA (Figura 15 A) y el color varió de crema a amarillo ligero, lo cual concuerda con Leslie y Summerell (2006), al señalar que el color del micelio es de blanco a amarillo claro y rosa grisáceo, pero difiere con lo que señalan Nelson *et al.* (1983) y Sangalang *et al.* (1995), quienes reportan que el color es rojizo a café. El pigmento formado en el agar es de color borgoña a marrón (Figura 15 B), tal como lo indican Nelson *et al.* (1983), Sangalang *et al.* (1995) y Leslie y Summerell (2006). Desarrolló esporodoquios (Figura 15 C) de color blanco a crema, amarillo y naranja pálido, lo cual coincide con lo reportado por Nelson *et al.* (1983) y Leslie y Summerell (2006).

Los macroconidios fueron largos, delgados, de rectos a ligeramente curvados (Figura 15 D y E). Su célula apical curvada, termina en punta o en forma de gancho y la basal con escaso desarrollo, por lo general, con muescas, aunque algunas cepas las presentan en forma de pie y el número de septos fue de 3-5 (en promedio 4), las medidas se encuentran dentro del rango que señala Booth (1971), de 4 a 7. El tamaño de los macroconidios obtenidos es de 26.9-37.1 x 2.2-3.5 μm (en promedio de 34.2 x 3.5 μm), lo cual difiere con las medidas que menciona Booth (1971) y (1977), las cuales van de 40-80 x 3.5-4 μm y con las de Sangalang *et al.* (1995), quienes reportan que el ancho de los macroconidios es de 4-5 μm (Both, 1971 y Nelson, 1983).

Los microconidios fueron de muy escasos a ausentes (Figura 15 F), fusiformes, de una longitud de 9.3-9.9 x 1.8-3.5 μm (en promedio de 9.6 x 2.3 μm), sin septos o de un solo septo, formados en micelio aéreo sobre mono y polifiálides, coincidiendo con lo señalado por Leslie y Summerell (2006). No presentó su fase sexual *Gibberella avenacea*.

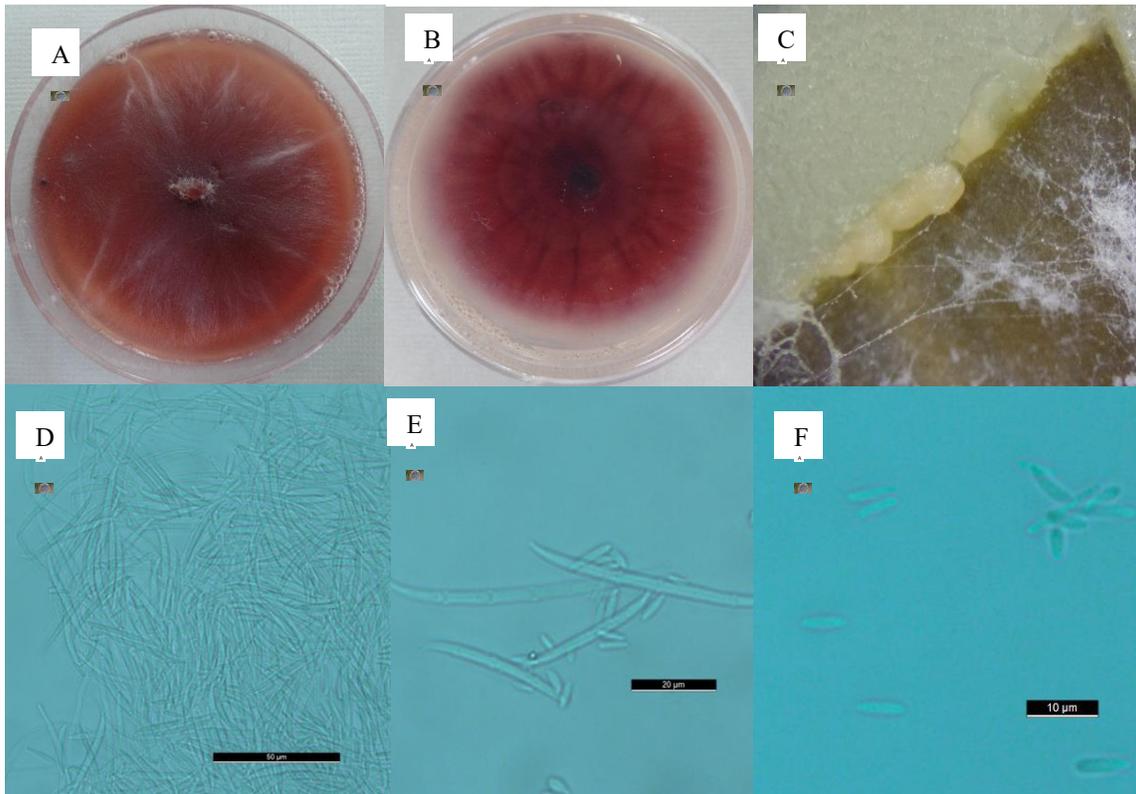


Figura 15. Características macro y microscópicas de *Fusarium avenaceum*. **A y B)** Micelio de color blanco (anverso) y pigmento en el agar borgoña (reverso). **C)** Esporodocios de color crema. **D y E)** Macroconidios largos y delgados. **F)** Microconidios muy escasos.

***Fusarium circinatum* (Nirenberg y O'Donnell)**

El micelio fue de color blanco con tonos rojos o violetas (Figura 16 G), generalmente violeta fuerte en medio de cultivo PDA (Figura 16 A), de consistencia pilosa o lanosa, como lo mencionan Nirenberg y O'Donnell (1998) y Leslie y Summerell (2006). Produjo un pigmento de color violeta en el agar (Figura 16 B), características que concuerdan con las reportadas por Nirenberg y O'Donnell (1998), Leslie y Summerell (2006) y Pérez-Sierra (2007). La formación de esporodoquios fue difícil, pero se desarrollaron en el medio de cultivo CLA (Agar-Hoja de clavel) y fueron de color naranja pálido (Figura 16 C), tal como lo señalan Leslie y Summerell (2006). Se observó el desarrollo de hifas estériles en forma de espiral conocidas como circinas en medio de cultivo SNA, lo cual fue una característica distintiva y presente en los aislamientos de *F. circinatum* (Figura 16 H), tal como lo señalan Herrera y Ulloa (1990), Leslie y Summerell (2006), y Kvas *et al.* (2009).

Los macroconidios son delgados, sin curvatura, tienen de 1-4 septos, predominando el de 3 (Figura 16 F), midieron de 32-40 x 3.3-3.8 μm , (con un promedio de 40 x 3.6 μm). Las mediciones concuerdan con las señaladas por Nirenberg y O'Donnell (1998), quienes mencionan que estos miden en promedio de 32-48 x 3.3-3.8 μm . Presenta la célula apical curvada y la basal poco desarrollada.

Los microconidios fueron de forma ovoide a alatoide, unicelulares, se produjeron sobre mono y polifálides (Figuras 16 D y E), estas últimas fueron abundantes, lo cual concuerda con lo que señalan Nirenberg y O'Donnell (1998), Leslie y Summerell (2006) y Kvas *et al.* (2009), al mencionar que son de forma ovalada y se producen en falsas cabezas sobre polifálides aéreas. Midieron de 7.7-10.8 x 1.6-3.3 μm , el promedio de los microconidios fue de 10 x 2.8 μm , como lo mencionan Nirenberg y O'Donnell (1998).

Leslie y Summerell (2006) y Nirenberg y O'Donnel (1998), mencionan que las clamidosporas están ausentes, pero que algunos aislados pueden producir hifas hinchadas que pueden semejar a clamidosporas o pseudoclamidosporas, pero en los aislados bajo estudio ninguno presentó clamidosporas. Morfológicamente, *F. circinatum*, *F. pseudocircinatum* y *F. sterilihyphosum* son las únicas especies que producen hifas en espiral estéril.

Esta especie a sido reportada como *F. moniliforme* Sheldon var. *subglutinans* Wollenw., Reinking, luego cambio a *F. subglutinans* f. sp. *pini* (Viljoen *et al.*, 1997).

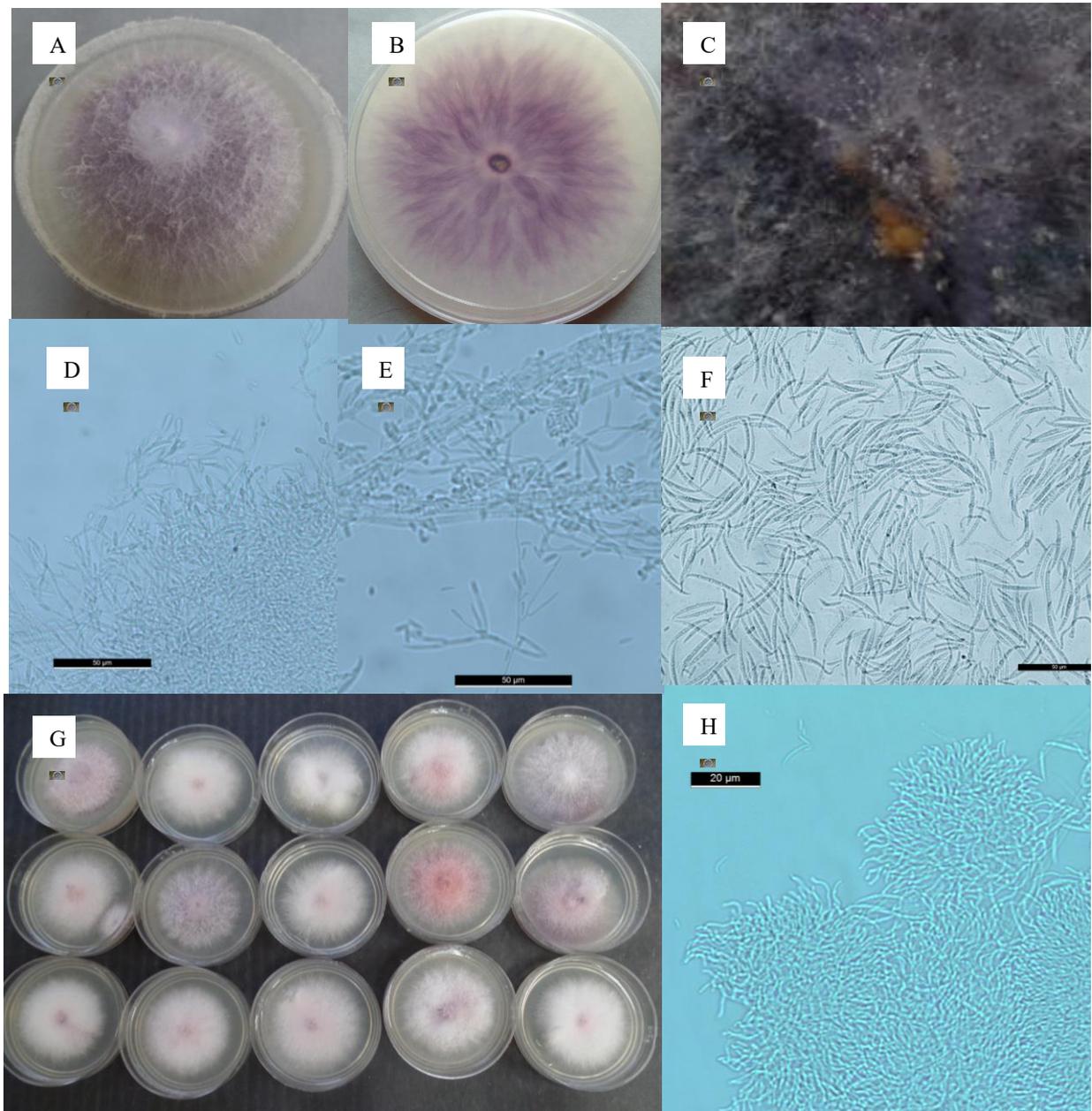


Figura 16. Características macro y microscópicas de *Fusarium circinatum*. . **A y B)** Micelio de color blanco (anverso) y pigmento violeta (reverso). **C)** Formación de esporoquios de color naranja pálido. **D)** Monofiálides y polifiálides de los microconidios. **E)** Microconidios en falsas cabezas. **F)** Macroconidios alantoides con la célula basal poco desarrollada. **G)** Desarrollo de micelios con diferentes coloraciones. **H)** Hifas estériles en forma de espiral (circinas).

***Fusarium oxysporum* Schltdl.**

Las colonias presentaron en el medio de PDA micelio flocoso a algodonoso, escaso o abundante y variaron en color, blanco, rosado, violáceo a violeta pálido (Figura 17 A). La pigmentación fue frecuentemente color violeta pálido en el agar (Figura 17 B), características que concuerdan con Booth (1971) y (1977). Se formaron esporodoquios de color crema (Figura 17 C), difiriendo de lo que señalan Burgess *et al.* 1994 y Leslie y Summerell (2006), al decir que son de color naranja o violeta pálido.

Los macroconidios fueron fusoides (Figuras 17 F y H), de paredes delgadas y de 3-5 septos, tal como lo mencionan Booth (1971) y Arbeláez (2000). La célula apical es cónica y curvada con un gancho ligero; la célula basal en forma de pie, con escaso desarrollo y se forman a partir de monofiálides, lo cual concuerda con lo reportado por Leslie y Summerell (2006). Midieron de 23-35 x 2.6-4.4 μm , (con un promedio de 35 x 3.5 μm), difiriendo con lo que señalan Nelson *et al.* (1981), al mencionar que miden 27-46 x 3-4.5 μm y Córdova *et al.* (2014), quienes mencionan que miden de 50.5- 73.19 x 3-4.5 μm , sin embargo, caen dentro del rango que manejan ambos autores.

Los microconidios fueron abundantes, de 0-1 septo (Figura 17 G), midiendo de 7.1- 12.4 x 2.2-3 μm , (con un promedio 9 x 3 μm), tal y como lo señalan Booth (1971) y Nelson *et al.* (1981). De forma oval (Figura 17 I), se forman abundantemente en falsas cabezas en monofiálides cortas (Figura 17 D), estas características concuerdan con lo reportado por Arbeláez (2000), Leslie y Summerell (2006) y Fourie *et al.* (2011).

Las clamidosporas se formaron rápidamente en algunos aislamientos aproximadamente de 2-4 semanas en medio CLA, por lo general se forman por separado o en pares, pero también se pueden encontrar en racimos o en cadenas cortas terminales o intercalares,

solitarias o en cadenas (Figura 17 E), esto coincide con Booth (1977) y Nelson *et al.* (1981); miden de 7.4-9.9 μm (con un promedio de 8.4 μm), tal como lo mencionan Leslie y Summerell (2006) y Fourie *et al.* (2011).

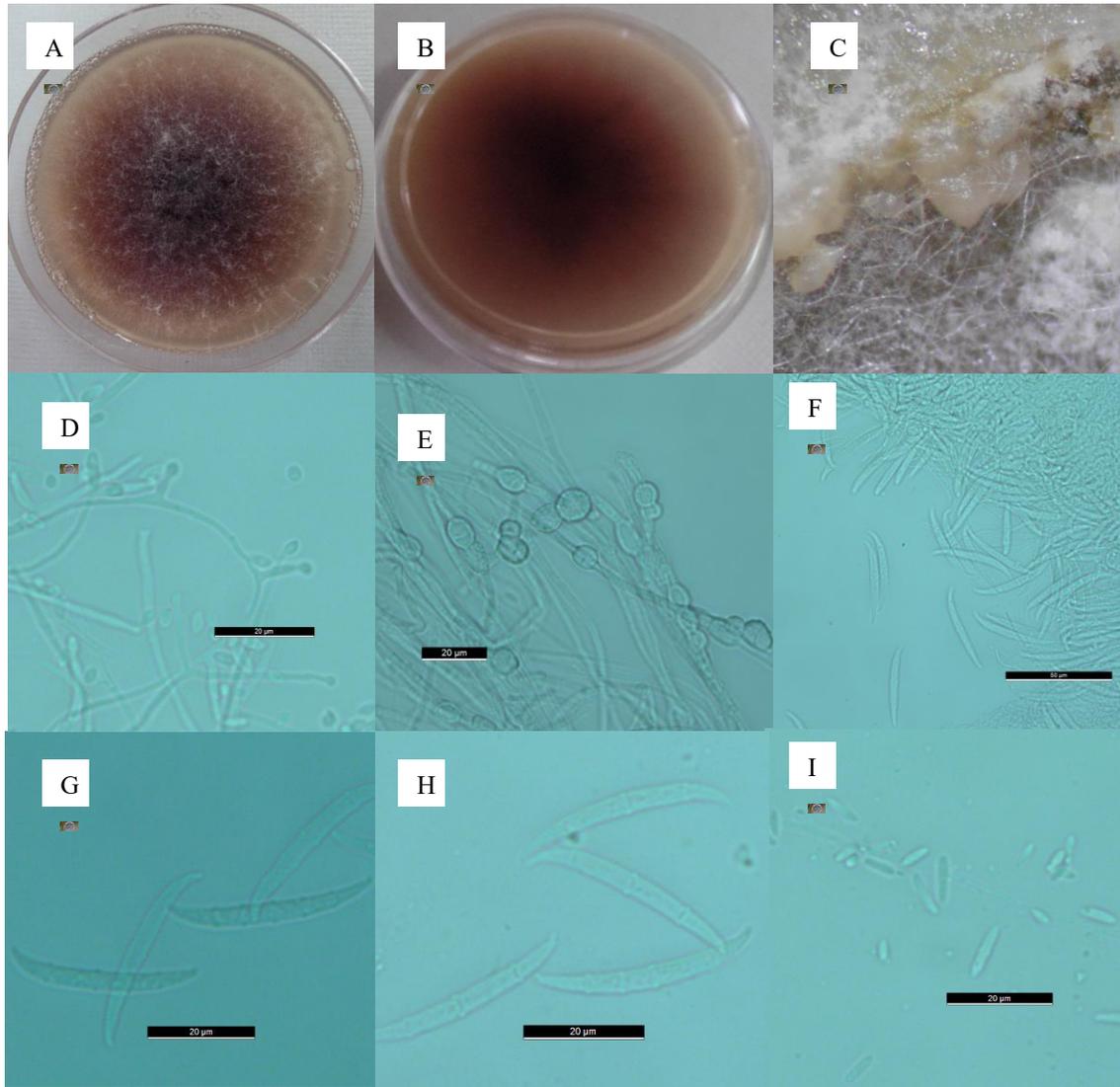


Figura 17. Características macro y microscópicas de *Fusarium oxysporum*. **A y B)** Micelio de color blanco (anverso) y pigmento en el agar violeta pálido (reverso). **C)** Esporodocios de color crema. **D)** Monofiálides cortas. **E)** Clamidosporas presentes. **F, G y H)** Macroconidios fusoides. **I)** Microconidios ovoides.

***Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg**

Presentó micelio aéreo abundante floccoso e inicialmente de color blanco a rosa claro en PDA (Figura 18 A), pero puede llegar a tornarse de color púrpura-violeta, el pigmento en medio de PDA es violeta (Figura 18 B), variando en intensidad, esto concuerda con lo que reportan Leslie y Summerell (2006) y Shahnazi *et al.* (2012), ya que señalan que puede ser rosa claro a beige púrpura, violeta o vinoso, pero difiere con lo que señala Quazi *et al.* (2013), al decir que los aislamientos son de color blanco rosáceo y de pigmentación color blanco, marrón amarillento claro a rosa claro o marrón rojizo. Se observó la formación de esporodocios en medio CLA de color crema (Figura 18 C), esto difiere con Nelson *et al.* (1981) y Leslie y Summerell (2006), ellos mencionan que son de color naranja pálido y llegan a ser poco frecuentes.

Los macroconidios fueron esbeltos, casi rectos (Figuras 18 D y E) y de 3-5 septos, aunque el promedio fue de 3, con célula apical curvada y la basal con escaso desarrollo, coincidiendo con lo reportado por Shahnazi *et al.* (2012) y Quazi *et al.* (2013). Midieron de $19-38 \times 2.2-3.6 \mu\text{m}$ (con un promedio de $27 \times 3 \mu\text{m}$), están dentro del rango que menciona Shahnazi *et al.* (2012), ya que señalan que el tamaño de los macroconidios es de $23-50 \times 2.4-4 \mu\text{m}$.

Las colonias desarrollaron abundantes microconidios (Figura 18 F), no se formaron en falsas cabezas con monofialides y polifialides, se observaron en cadenas no muy largas y sus polifialides son en forma de "V", como lo señalan, Nelson *et al.* (1981). Son unicelulares, de forma piriformes, como lo reportado por Leslie y Summerell (2006), Shahnazi *et al.* (2012) y Quazi *et al.* (2013). Midieron de $7-10 \times 1.5-2.8 \mu\text{m}$, (con un

promedio de $9 \times 2 \mu\text{m}$), medidas que difieren con Quazi *et al.* (2013) al reportar medidas más grandes, de $2.4\text{-}11.9 \times 1.2\text{-}3.8 \mu\text{m}$.

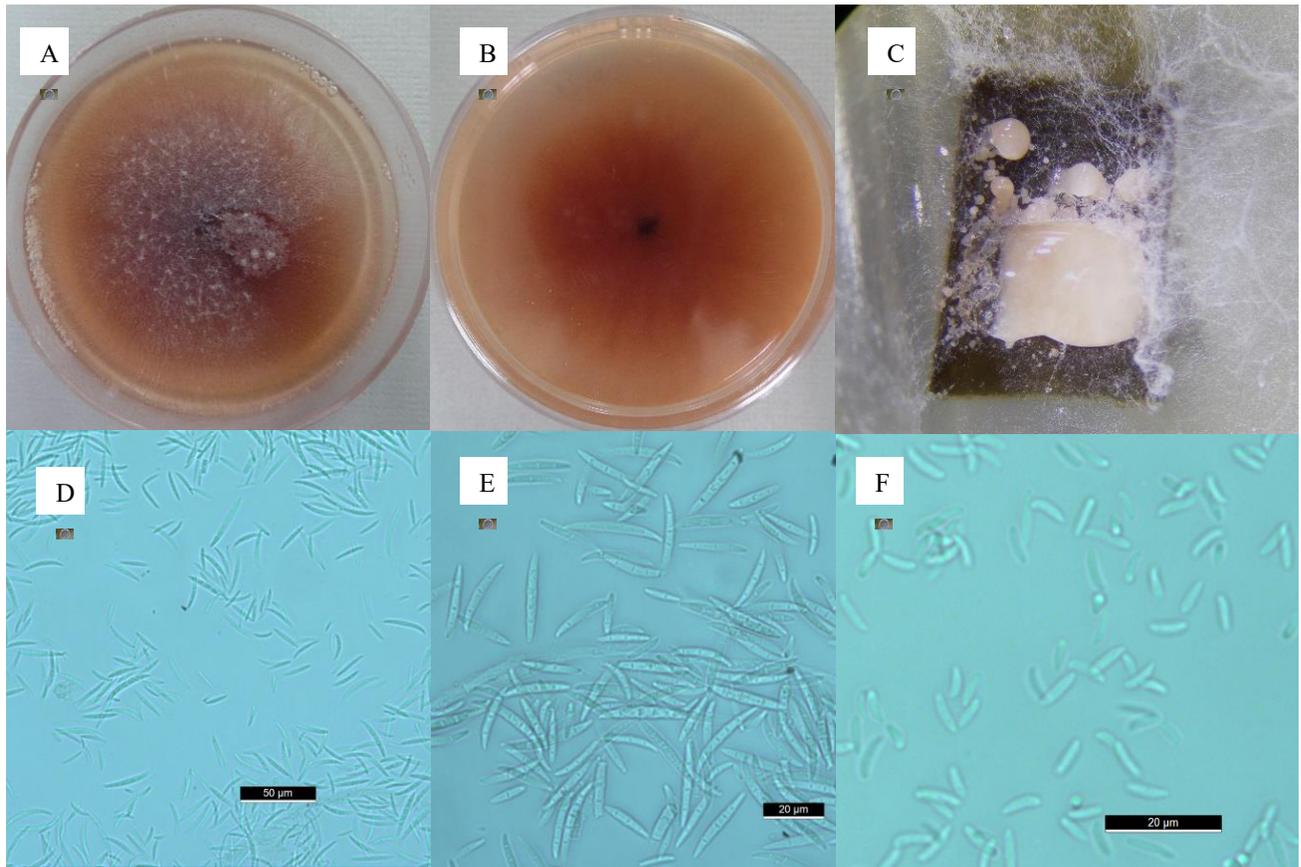


Figura 18. Características macro y microscópicas de *Fusarium proliferatum*. **A y B)** Micelio de color blanco a púrpura (anverso) y pigmento en el agar de color vino a marrón rojizo (reverso). **C)** Esporodocios de color naranja muy pálido. **D y E)** Macroconidios delgados, casi rectos. **F)** Microconidios ovalados.

***Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas**

Presentó micelio algodonoso en medio PDA, inicialmente de color blanco y tornándose a violeta (Figura 19 A) con el envejecimiento de la cepa. Su pigmentación en el agar variaba de incoloro a un color púrpura oscuro (Figura 19 B), esto concuerda con Leslie y Summerell (2006), pero difiere con Viljoen *et al.* (1997), quien reporta que pueden ser de color azul a negro. Se formaron esporodocios de color crema a naranja (Figura 19 C) ligero en medio CLA.

Los macroconidios se formaron escasamente (Figura 19 F), esbeltos, encorvados y de paredes delgadas, con 3 septos. Midieron de 37.8-42 x 2.7-3.5 μm , (con un promedio de 38 x 3.4 μm), se encuentran dentro del rango de 24-45 x 3-4 μm reportado por Viljoen *et al.* (1997). Su célula apical es curvada y la basal relativamente poco desarrollada donde se observa una muesca tal como lo reportan Leslie y Summerell (2006).

Los microconidios se produjeron en falsas cabezas, no los formó en cadenas y presentó monofiálides y polifiálides (Figura 19 D y E), esto concuerda con lo que mencionan Nelson *et al.* (1983) y Burgess *et al.* 1994. Son de forma ovalada o reniforme, de 0-2 septos, predominando los unicelulares y midieron de 9.2-10.9 x 2.6-2.8 μm , (con un promedio de 10 x 2.7 μm), lo cual difiere con lo reportado por Viljoen *et al.* (1997), ya que menciona que miden 5-17 x 2-4 μm . Su fase sexual es *Gibberella subglutinans* (Leslie y Summerell, 2006).

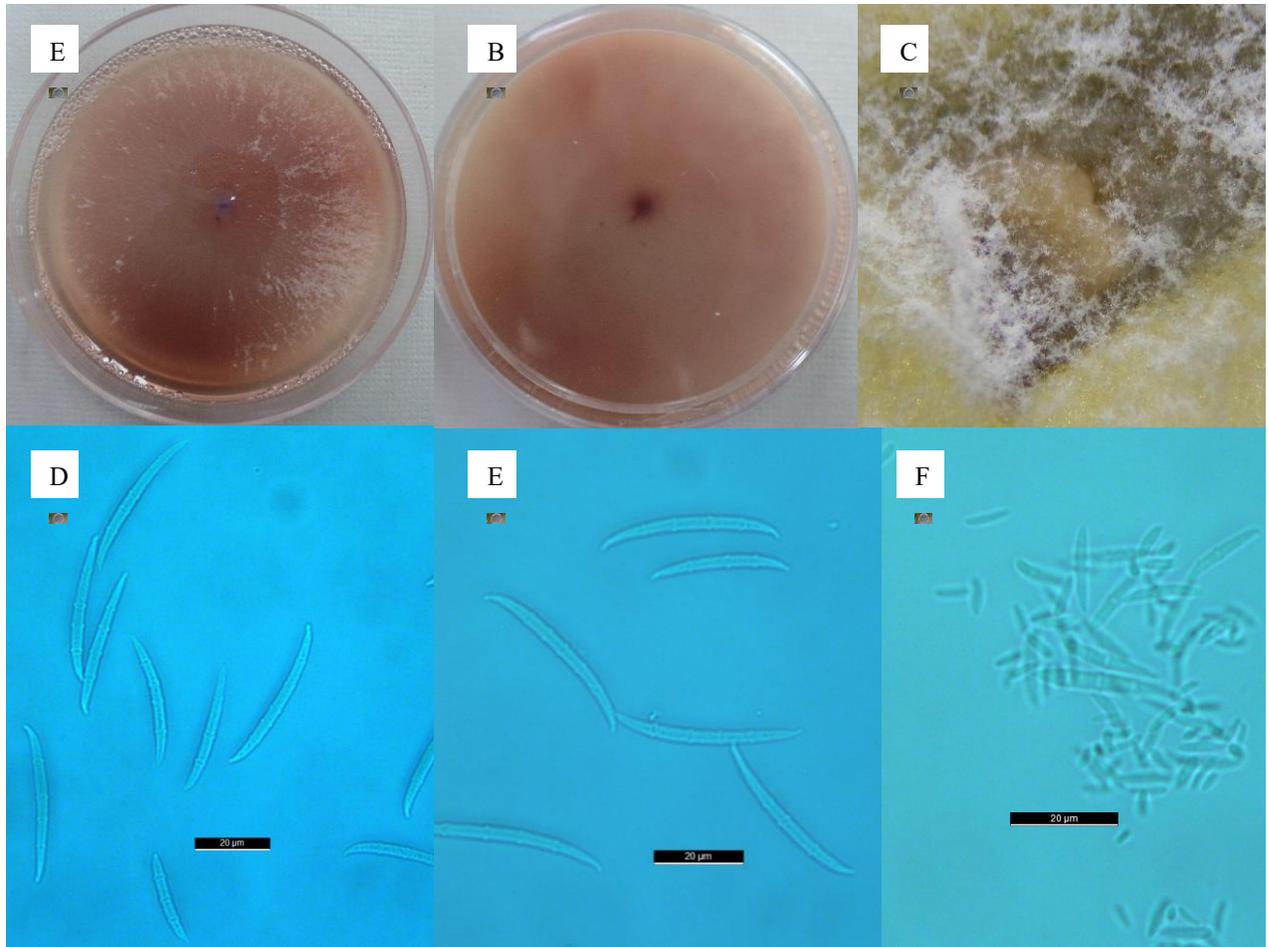


Figura 19. Características macro y microscópicas de *Fusarium subglutinans*. **A y B)** Micelio de color blanco a violeta (anverso) y pigmento en el agar púrpura oscuro (reverso). **C)** Esporodocios de color crema a naranja. **D y E)** Monofiálides y polifiálides en microcnidios ovales. **F)** Macroconidios delgados y ligeramente encorvados.

***Fusarium pseudocircinatum* Nirenberg & O'Donnell**

Las colonias presentaron micelio algodonoso de color blanco a violáceo (Figura 20 A), con pigmentación en el medio de color violeta (Figura 20 B), sobre todo en el centro de la colonia. Sus esporodoquios fueron muy escasos, estas características coinciden con las reportadas por O'Donnell *et al.* (1998) y Leslie y Summerell (2006).

Los macroconidios fueron escasos, pero los que se encontraron eran delgados y ligeramente encorvados (Figura 20 F), de paredes delgadas, con célula apical en terminación de pico y la basal en forma de pie, coincidiendo con lo que señalan O'Donnell *et al.* (1998), Leslie y Summerell (2006) y Freeman *et al.* (2014). Con 3-5 septos, predominando los de 3, midieron de 28.7- 40.7 x 2.1-3 μm (con un promedio de 33 x 2.5 μm), valores que están dentro del rango reportado por Freeman *et al.* (2014) para los conidios de 3 septos, que son de 25-58 x 2-3 μm y para conidios de 5 septos de 33.5-76.5 x 2.5-6 μm .

Microconidios ovoides a ovales de 0-1 septos (Figura 20 C), se producen abundantemente en monofiálides y polifiálides, sobre falsas cabezas y con cadenas cortas (< 10 esporas), midieron 6-10 x 1.6-2.6 (con un promedio de 8.7 x 2.1), produce hifas estériles en forma de espiral en medio SNA (Figura 20 D y E), este es un carácter de gran relevancia taxonómica, como lo señalan Leslie y Summerell (2006). El número de septos y la medición de los microconidios concuerdan con lo reportado por O'Donnell *et al.* (1998) y Freeman *et al.* (2014), al señalar a los microconidios generalmente sin septos pero ocasionalmente de 1 a 3 y miden de 4-19 x 1.5-4 μm (con un promedio de 8.7 x 2.6 μm).

O'Donnell *et al.* (1998) y Leslie y Summerell (2006), mencionan que morfológicamente tiene similitudes con *F. sterilihyphosum* y *F. circinatum* ya que estas tres especies son las

únicas que tienen hifas en espiral. *F. pseudocircinatum* presenta la formación de cadenas cortas de microconidios y *F. circinatum* produce los microconidios sólo en falsas cabezas, tal como lo señalan Nirenberg y O'Donell (1998).

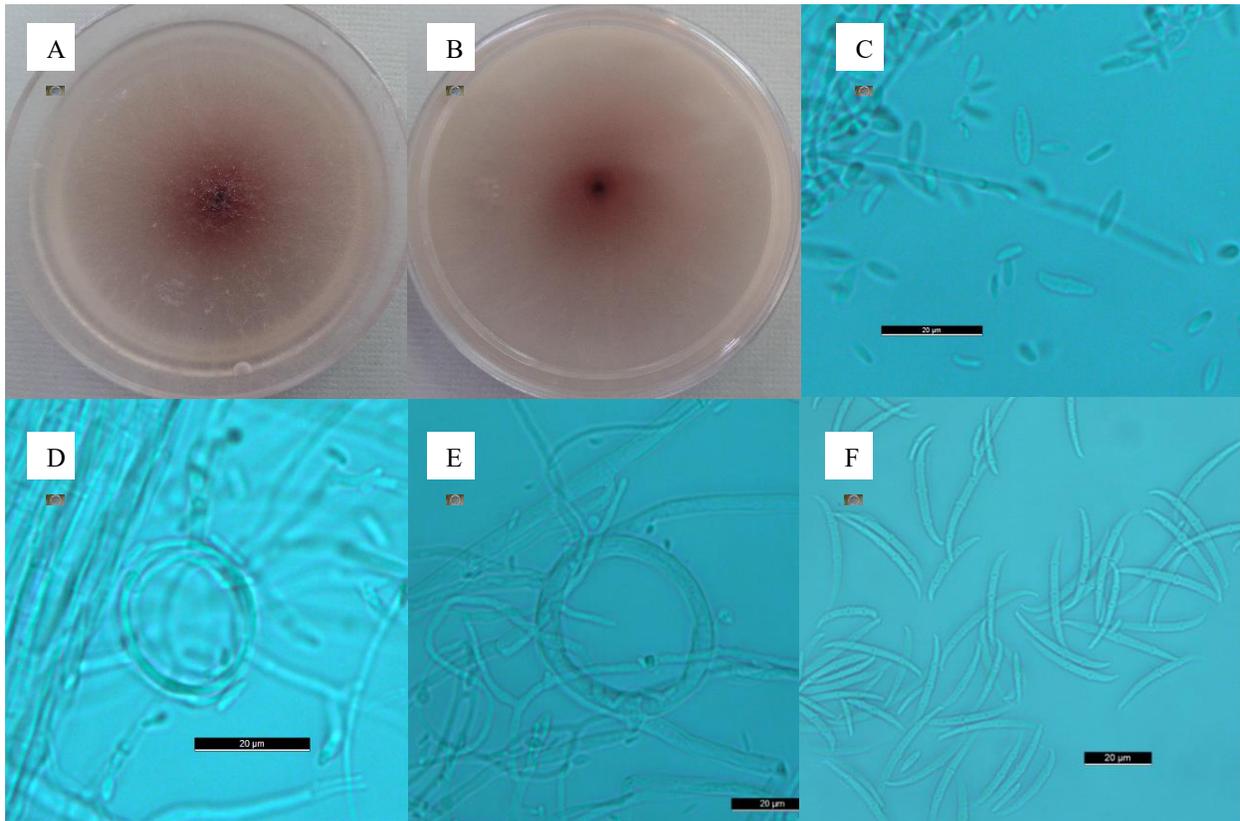


Figura 20. Características macro y microscópicas de *Fusarium pseudocircinatum*. **A y B)** Micelio de color blanco (anverso) y pigmento en el agar violeta sobre todo en el centro (reverso). **C)** Microconidios de ovoides a elípticos y sin septos. **D y E)** Hifas en espiral enrolladas. **F)** Macroconidios delgados y ligeramente encorvados.

Se asociaron las siguientes especies de *Fusarium* en:

- a) ***P. greggii***. Raíz: *F. avenaceum*, *F. circinatum*, *F. oxysporum* y *F. proliferatum*. Semilla: *F. circinatum* y *F. oxysporum*. Larvas de mosca fungosa: *F. circinatum*, *F. oxysporum* y *F. subglutinans*.
- b) ***P. pseudostrobis***. Raíz: *F. circinatum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. pseudocircinatum*. Semilla: *F. circinatum* y *F. subglutinans*. Larvas de mosca fungosa: *F. circinatum* y *F. oxysporum*.
- c) ***P. montezumae***. Raíz: *F. circinatum*, *F. oxysporum* y *F. proliferatum*. Semilla: *F. circinatum* y *F. proliferatum*. Larvas de mosca fungosa: *F. circinatum*, *F. oxysporum* y *F. pseudocircinatum*.
- d) En sustrato: *F. circinatum* y *F. oxysporum* en las mezclas que se utilizó en los viveros y a *F. oxysporum* de turba de musgo.

Las especies de *Fusarium* sp. (Figura 21) aisladas con mayor frecuencia en los ocho viveros con las tres especies de pino en el Centro de México fué *F. circinatum* con un 58 % de aislamientos, ésto refleja la importancia de este hongo como uno de los principales patógenos en viveros forestales y que pueden llevarse en plantas infectadas a los sitios de plantación durante las reforestaciones para ser diseminados en las diferentes regiones de nuestro país. Este patógeno lo reportan Guerra-Santos y Cibrián-Tovar (1998), al señalar a *F. subglutinans* (= *F. circinatum*) que afectó en áreas naturales y plantaciones de reforestación. Landeras *et al.* (2005) y Wingfield *et al.* (2008), mencionan que afecta en plantaciones y que existe una relación con la afectación en viveros a través de semillas.

Fusarium oxysporum tuvo una frecuencia menor con el 21 %, le siguió *Fusarium subglutinans* con un 9 %, *F. pseudocircinatum* con 6 %, *F. proliferatum* con 4 % y *F. avenaceum* con 1 %.

En este estudio se logró identificar morfológica, molecular y filogenéticamente las especies de *Fusarium* asociadas a raíz y semillas de *P. greggii*, *P. pseudostrobus* y *P. montezumae*; así como en sustratos y en larvas de mosca fungosa, en los viveros muestreados en el Centro de México. Dick y Dobbie (2002), realizaron un trabajo similar en Nueva Zelanda para identificar con características morfológicas los aislamientos de *Fusarium* en suelo, semilla y raíz en plantaciones de pino y obtuvieron a *F. oxysporum* y *F. solani*. Pérez-Sierra (2007), trabajó en España con 157 aislamientos con morfología y técnicas moleculares en *P. radiata*, *P. nigra* y *P. sylvestris* identificando todos los aislamientos como *F. circinatum*.

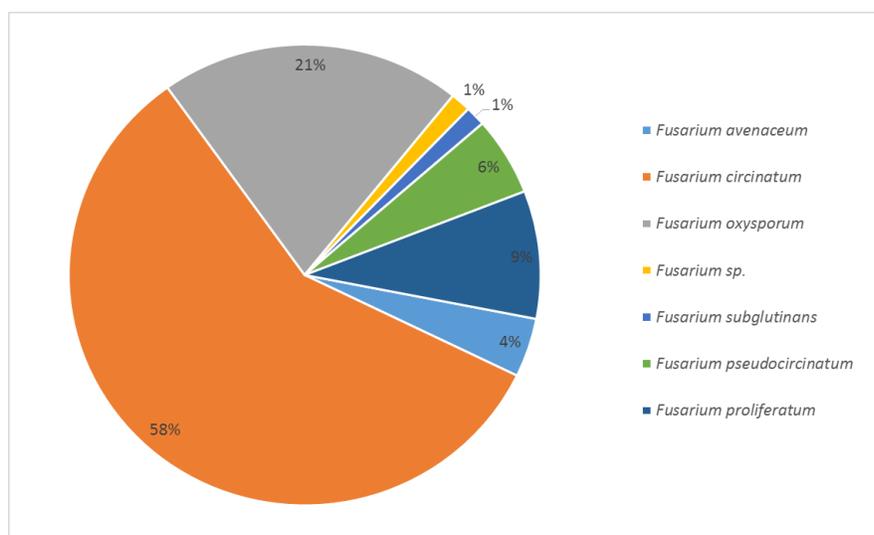


Figura 21. Porcentaje de los aislamientos de *Fusarium*, identificados por morfología a nivel de especie en los muestreos de los viveros del Centro de México. En los ciclos de producción de planta (2013-2014 y 2014-2015).

Identificación Molecular

Búsqueda en el GenBank mediante BLAST

Al trabajar con cada uno de los tres marcadores ITS, TEF e IGS, se visualizó con la herramienta BLAST que los marcadores ITS y TEF, no discriminaron a nivel de especies (Cuadro 4), ya que manifestaron distintas especies de *Fusarium* en la identidad de los aislamientos como: *Gibberella circinata*, *F. sterilihyphosum*, *F. proliferatum*, y *F. succisae* con el marcador ITS. El marcador TEF en todo momento manifestó su identidad con *F. succisae*, a pesar que este marcador, ha mostrado una alta señal taxonómica para este género, a nivel de intraespecies y alto grado de concordancia con los resultados de otros estudios, en la presente investigación, no tuvo buena discriminación en las especies, pero se mantuvieron dentro del complejo *Gibberella fujikuroi*, que son: *F. circinatum*, *F. fujikuroi*, *F. proliferatum*, *F. pseudocircinatum*, *F. succisae*, *F. verticilloides*, *F. sterilihyphosum*, *F. subglutinans* y *F. moniliforme* (Nirenberg y O'Donnell, 1998). Esto coincide con Britz (2002) y Kvas *et al.* (2009), al señalar que las especies del complejo *G. fujikuroi* son justificadas y soportadas con trabajos de características morfológicas y filogenia molecular.

En el análisis molecular se logró reconocer a *F. circinatum* como uno de los aislamientos con mayor frecuencia en los viveros forestales evaluados, y el marcador que mejor discriminó para la especie fue el IGS (Cuadro 4). Un resultado similar fue referido por Schweigkofler *et al.* (2004), quienes trabajaron con el marcador molecular IGS y desarrollaron primers específicos para determinar a *F. circinatum*.

Para las especies de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium avenaceum* y *F. subglutinans*, los tres marcadores moleculares (ITS, TEF e IGS) dieron una buena discriminación para la

identidad a nivel de especies (Cuadro 4). Así mismo, Robles *et al.* (2016) trabajaron con el marcador molecular ITS e identificaron a *F. oxysporum* y *F. solani* en un vivero forestal de Chilpancingo, Guerrero en *P. patula* y *P. pseudostrobus*.

En el Anexo II se puede observar la comparación de las 47 secuencias consenso de los aislados con la herramienta Blast, para ver la secuencia más relacionada con el GenBank de los tres marcadores moleculares.

Cuadro 4. Identidad de especies de *Fusarium* spp; mediante la herramienta BLAST, con tres marcadores moleculares.

AI SLAMI ENTO	ITS	TEF	IGS
SF1	<i>Gibberella circinata</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF2	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
SF3	NA	NA	NA
SF4	<i>Gibberella circinata</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium circinatum</i>
SF5	<i>Gibberella circinata</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF6	<i>Fusarium temperatum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium subglutinans</i>
SF7	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF8	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
SF9	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium subglutinans</i>
SF10	NA	NA	NA
SF11	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF12	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
SF13	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF14	<i>Fusarium avenaceum</i>	<i>Fusarium avenaceum</i>	<i>Fusarium avenaceum</i>
SF15	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF16	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
SF17	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF18	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF19	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF20	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>

SF21	<i>Fusarium circinatum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF22	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF23	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF24	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF25	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF26	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF27	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF28	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF29	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF30	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF31	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
SF32	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
SF33	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
SF34	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF35	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF36	<i>Fusarium circinatum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF37	<i>Fusarium circinatum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF38	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF39	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF40	<i>Fusarium sterilihyphosm</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF41	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF42	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium subglutinans</i>
SF43	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF44	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF45	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF46	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF47	NA	NA	NA
SF48	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF49	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	<i>Fusarium succisae</i>	<i>Fusarium circinatum</i>
SF50	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium circinatum</i>

Registro de las secuencias en el GenBank

Todas las secuencias consenso fueron registradas en el GenBank, por lo cual se obtuvo el número de accesoión para cada gen de todos los individuos, con los tres marcadores moleculares (Cuadro 5).

Cuadro 5. Nombres de las especies y número de accesoión del GenBank para los aislamientos de *Fusarium* con los tres marcadores (ITS, TEF e IGS) incluidos en el análisis filogenético.

Especie de <i>Fusarium</i>	Cepas	Accesión al GenBank		
		ITS	TEF	IGS
<i>F. circinatum</i>	SF1, SF4, SF5, SF7, SF9, SF11, SF13, SF15, SF17, SF18, SF19, SF20, SF21, SF22, SF23, SF24, SF25, SF26, SF27, SF28, SF29, SF30, SF34, SF35, SF36, SF37, SF38, SF39, SF40, SF41, SF42, SF43, SF44, SF45, SF46, SF48, SF49, SF50	KX276593, KX276595,	KZ337002, KZ337004,	KX306887, KX306889,
		KX276596, KX276598,	KZ337005, KZ337007,	KX306890, KX306892,
		KX276600, KX276601,	KZ337009, KZ337010,	KX306894, KX306895,
		KX276603, KX276605,	KZ337012, KZ337014,	KX306897, KX306899,
		KX276607, KX276608,	KZ337016, KZ337017,	KX306901, KX306902,
		KX276609, KX276610,	KZ337018, KZ337019,	KX306903, KX306904,
		KX276611, KX276612,	KZ337020, KZ337021,	KX306905, KX306906,
		KX276613, KX276614,	KZ337022, KZ337023,	KX306907, KX306908,
		KX276615, KX276616,	KZ337024, KZ337025,	KX306909, KX306910,
		KX276617, KX276618,	KZ337026, KZ337027,	KX306911, KX306912,
		KX276619, KX276620,	KZ337028, KZ337029,	KX306913, KX306914,
		KX276624, KX276625,	KZ337033, KZ337034,	KX306918, KX306919,
		KX276626, KX276627,	KZ337035, KZ337036,	KX306920, KX306921,
		KX276628, KX276629,	KZ337037, KZ337038,	KX306922, KX306923,
		KX276630, KX276631,	KZ337039, KZ337040,	KX306924, KX306925,
		KX276632, KX276633,	KZ337041, KZ337042,	KX306926, KX306927,
		KX276634, KX276635,	KZ337043, KZ337044,	KX306928, KX306929,
KX276636, KX276637,	KZ337045, KZ337046,	KX306930, KX306931,		
KX276638, KX276639.	KZ337047, KZ337048	KX306932, KX306933.		
<i>F. oxysporum</i>	SF2, SF8, SF12, SF16, SF31, SF32, SF33	KX276594, KX276599,	KZ337003, KZ337008,	KX306888, KX306893,
		KX276602, KX276606,	KZ337011, KZ337015,	KX306900, KX306915,
		KX276621, KX276622,	KZ337030, KZ337031,	KX306916, KX306917
		KX276623	KZ337032	
<i>F. subglutinans</i>	SF6	KX276597	KZ337006	KX306891
<i>F. avenaceum</i>	SF14	KX276604	KZ337013	KX306898

En la identificación molecular se obtuvieron las siguientes especies de *Fusarium* para las especies de pino bajo estudio. ***P. greggii***. Raíz: *F. circinatum* y *F. oxysporum*. Semilla: *F. circinatum* y *F. oxysporum*. Larvas de mosca fungosa: *F. circinatum*, *F. oxysporum* y *F. subglutinans*. ***P. pseudostrobis***. Raíz: *F. avenaceum* y *F. circinatum*. Semilla: *F. oxysporum* y *F. subglutinans*. Larvas de mosca fungosa: *F. circinatum*. ***P. montezumae***. Raíz: *F. circinatum* y *F. oxysporum*. Larvas de mosca fungosa: *F. circinatum* y *F. oxysporum*. De la mezcla de los viveros se obtuvo a *F. circinatum* y *F. oxysporum*.

En las muestras trabajadas con biología molecular no se identificó a *F. proliferatum* y *F. pseudocircinatum* debido, posiblemente, al número de aislamientos trabajados.

Los aislamientos de *Fusarium* obtenidos de los viveros del Centro de México, se reafirmó la identidad de sus especies con la caracterización morfológica, molecular y filogenética (Cuadro 6).

Cuadro 6. Identificación morfológica y molecular de las especies del género *Fusarium*, en los muestreos de los viveros del Centro de México. En los ciclos de producción de planta (2013-2014 y 2014-2015).

Clave del aislamiento	Hospedante	Origen del aislamiento	Vivero	Identificación
SF1	<i>P. greggii</i>	Raíz	VF_Monte_Noble	<i>Fusarium circinatum</i>
SF2	<i>P. montezumae</i>	LMF	VFM_Atlangatepec	<i>Fusarium oxysporum</i>
SF3	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VF_Los Insurgentes	<i>Fusarium sp.</i>
SF4	<i>P. greggii</i>	Raíz	VF_Monte_Noble	<i>Fusarium circinatum</i>
SF5	<i>P. greggii</i>	Raíz	VFM_Atlangatepec	<i>Fusarium circinatum</i>
SF6	<i>P. pseudostrobis</i>	Semilla	VFM_Atlangatepec	<i>Fusarium subglutinans</i>
SF7	<i>P. greggii</i>	Raíz	VF_Monte_Noble	<i>Fusarium circinatum</i>
SF8	<i>P. greggii</i>	Raíz	VFM_Atlangatepec	<i>Fusarium oxysporum</i>
SF9	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VFM_Atlangatepec	<i>Fusarium subglutinans</i>
SF10	<i>P. greggii</i>	Semilla	VF_Ixtlahuaca	<i>Fusarium sp.</i>
SF11	<i>P. greggii</i>	Raíz	VF_Monte_Noble	<i>Fusarium circinatum</i>
SF12	Sustrato	Mezcla	VFM_Morelos	<i>Fusarium oxysporum</i>
SF13	<i>P. montezumae</i>	Raíz	VFM_Temamatla	<i>Fusarium circinatum</i>
SF14	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VF_Ixtlahuaca	<i>Fusarium avenaceum</i>
SF15	<i>P. pseudostrobis</i>	LMF	VF_Los Insurgentes	<i>Fusarium circinatum</i>
SF16	<i>P. pseudostrobis</i>	Semilla	VFM_Atlangatepec	<i>Fusarium oxysporum</i>
SF17	<i>P. greggii</i>	Raíz	VFM_Atlangatepec	<i>Fusarium circinatum</i>
SF18	<i>P. greggii</i>	Raíz	VFM_Morelos	<i>Fusarium circinatum</i>
SF19	<i>P. greggii</i>	Raíz	VFM_Temamatla	<i>Fusarium circinatum</i>
SF20	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VFM_Temamatla	<i>Fusarium circinatum</i>
SF21	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VFM_Temamatla	<i>Fusarium circinatum</i>
SF22	<i>P. greggii</i>	Raíz	VFM_Temamatla	<i>Fusarium circinatum</i>
SF23	<i>P. greggii</i>	Raíz	VF_Monte_Noble	<i>Fusarium circinatum</i>
SF24	<i>P. greggii</i>	Raíz	VF_Pueblo_Nuevo	<i>Fusarium circinatum</i>
SF25	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VFM_Temamatla	<i>Fusarium circinatum</i>
SF26	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VFM_Temamatla	<i>Fusarium circinatum</i>
SF27	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VF_Los Insurgentes	<i>Fusarium circinatum</i>
SF28	<i>P. pseudostrobis</i>	LMF	VF_Ixtlahuaca	<i>Fusarium circinatum</i>
SF29	<i>P. montezumae</i>	Raíz	VFM_Temamatla	<i>Fusarium circinatum</i>
SF30	<i>P. montezumae</i>	Raíz	VFM_Temamatla	<i>Fusarium circinatum</i>
SF31	<i>P. greggii</i>	Semilla	VFM_Atlangatepec	<i>Fusarium oxysporum</i>
SF32	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VF_DiCiFo	<i>Fusarium oxysporum</i>
SF33	<i>P. montezumae</i>	Raíz	VF_Ixtlahuaca	<i>Fusarium oxysporum</i>
SF34	<i>P. montezumae</i>	Raíz	VFM_Morelos	<i>Fusarium circinatum</i>

SF35	<i>P. montezumae</i>	Raíz	VFM_Temamatla	<i>Fusarium circinatum</i>
SF36	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VF_Pueblo_Nuevo	<i>Fusarium circinatum</i>
SF37	<i>P. montezumae</i>	LMF	VFM_Morelos	<i>Fusarium circinatum</i>
SF38	<i>P. greggii</i>	LMF	VFM_Atlangatepec	<i>Fusarium circinatum</i>
SF39	Sustrato	Mezcla	VF_Monte_Noble	<i>Fusarium circinatum</i>
SF40	<i>P. montezumae</i>	Raíz	VFM_Morelos	<i>Fusarium circinatum</i>
SF41	<i>P. montezumae</i>	Raíz	VF_Pueblo_Nuevo	<i>Fusarium circinatum</i>
SF42	<i>P. greggii</i>	LMF	VFM_Atlangatepec	<i>Fusarium subglutinans</i>
SF43	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VF_Pueblo_Nuevo	<i>Fusarium circinatum</i>
SF44	<i>P. greggii</i>	Semilla	VFM_Atlangatepec	<i>Fusarium circinatum</i>
SF45	<i>P. greggii</i>	Raíz	VFM_Temamatla	<i>Fusarium circinatum</i>
SF46	<i>P. montezumae</i>	Raíz	VFM_Atlangatepec	<i>Fusarium circinatum</i>
SF47	<i>P. montezumae</i>	Raíz	VFM_Temamatla	<i>Fusarium</i> sp.
SF48	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VF_DiCiFo	<i>Fusarium circinatum</i>
SF49	<i>P. greggii</i>	Raíz	VFM_Morelos	<i>Fusarium circinatum</i>
SF50	<i>P. greggii</i>	Semilla	VF_Monte_Noble	<i>Fusarium circinatum</i>

Análisis filogenético

El análisis filogenético se realizó utilizando las secuencias consenso de los 47 aislados, con los tres marcadores moleculares ITS, TEF e IGS. Se generaron tres árboles en el cuál se agruparon las especies de *Fusarium* con el número de accesión de las especies reportadas en el GenBank.

Con el marcador ITS, se generó un árbol filogenético donde se observan los clados de las especies reportadas dando un árbol con mayor robustez formando clados muy claros con cada una de las especies del banco de genes que son: Clado I con *F. subglutinans*, Clado II con *F. circinatum*, Clado III con *F. oxysporum* y Clado IV con *F. avenaceum*. Los clados del árbol filogenético muestran un valor de soporte del 100 %, esto permite una identificación confiable de los aislamientos de *Fusarium* spp. procedentes de los viveros forestales muestreados del Centro de México (Figura 22). En comparación con el marcador

TEF que formó cinco Clados y el IGS siete Clados, que muestra un árbol poco robusto y no hay un buen agrupamiento de los aislados con las especies de *Fusarium*, reportadas en el GenBank (Figura 23 y 24).

Los resultados obtenidos difieren con los de Herron *et al.* (2015), quienes trabajaron la diversidad de especies de *Fusarium* con *P. patula*, *P. tecunumanii*, *P. kesiya* y *P. maximinoi* en Colombia, con el gen TEF y β -tubulina con 57 aislamientos de plantación y vivero, encontrando que TEF funcionó bien para reconocer a *F. circinatum*.

Melisa (2014), señala la importancia de realizar la filogenia con métodos moleculares del género *Fusarium*, al trabajar con microsecuencias de genes conservados para resolver problemas de clasificación taxonómica, utilizando β -tubulina, calmodulina, citocromo oxidasa 1, factor de elongación 1α , histonas 3 y 4 y subunidad pequeña de RNA.

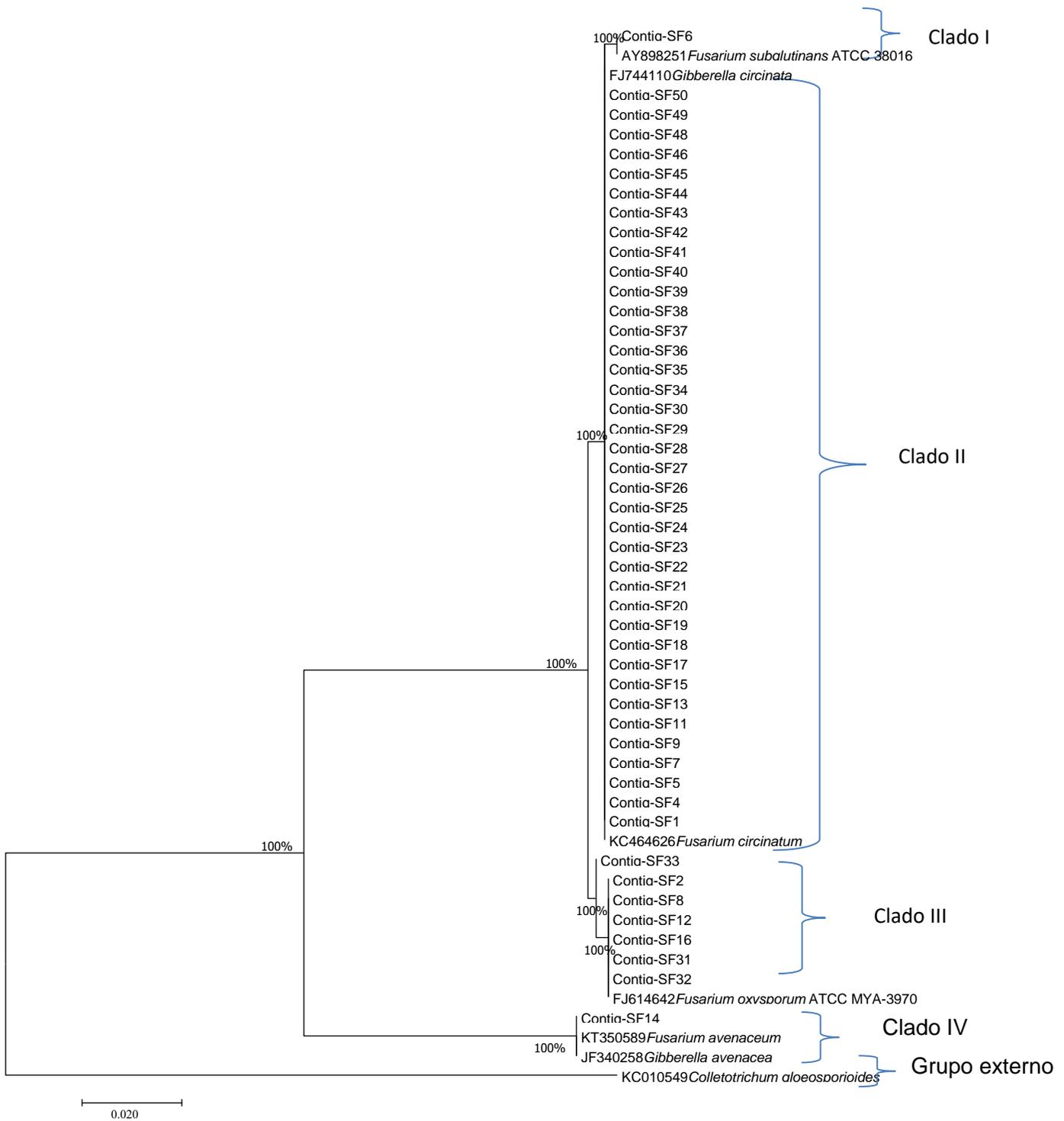


Figura 22. Árbol filogenético que muestra el agrupamiento de los aislados de *Fusarium* encontrados en los viveros forestales de la región Centro, amplificados por PCR-ITS con los iniciadores ITS5 e ITS4 y sus secuencias agrupadas con el software MEGA 7 y construido con el método de Máxima Parsimonia.

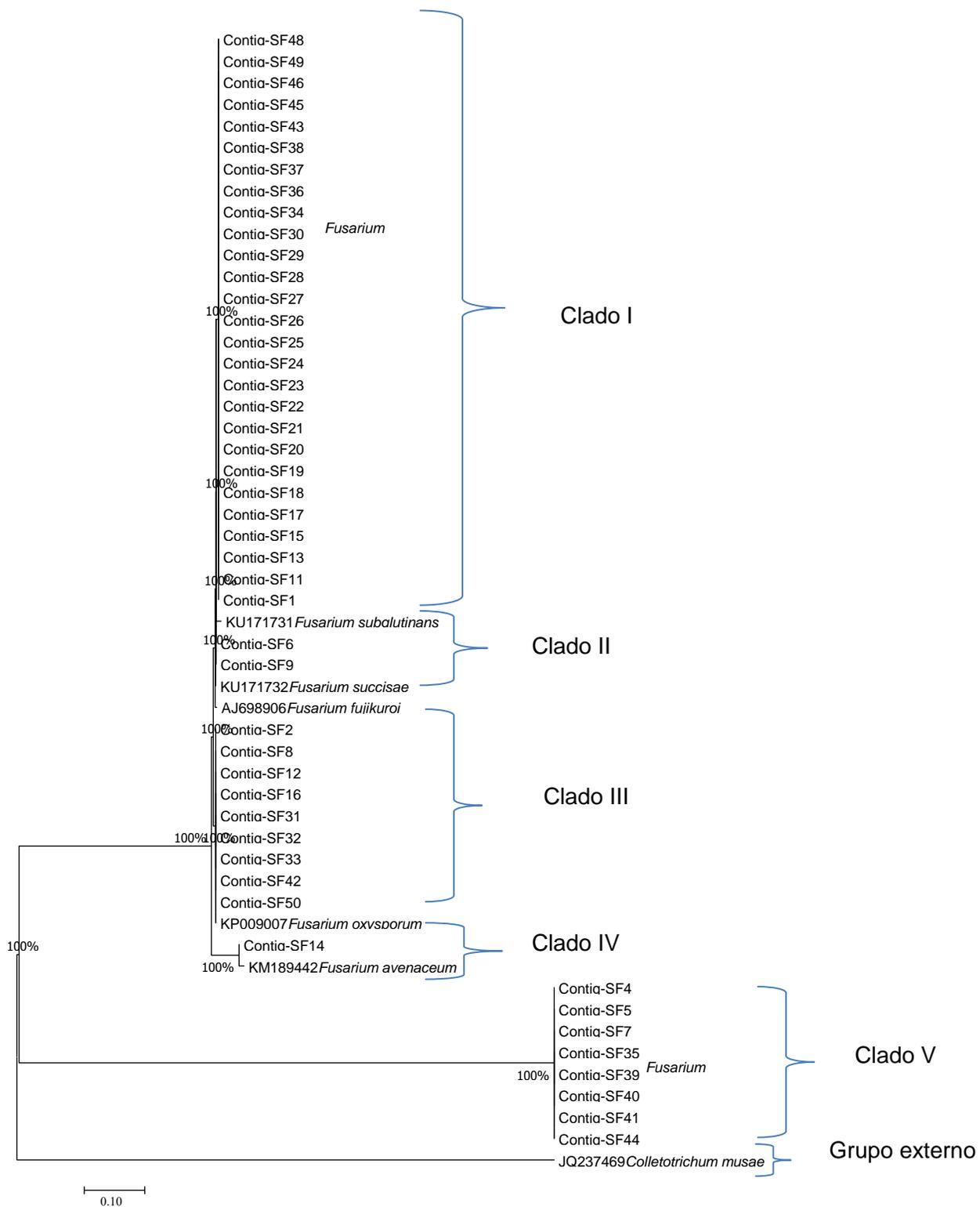


Figura 23. Árbol filogenético que muestra el agrupamiento de los aislados de *Fusarium* encontrados en los viveros forestales de la región Centro, amplificadas por PCR-TEF, con los iniciadores 728F y 986R y sus secuencias agrupadas con el software MEGA 7 y construido con el método de Máxima Parsimonia.

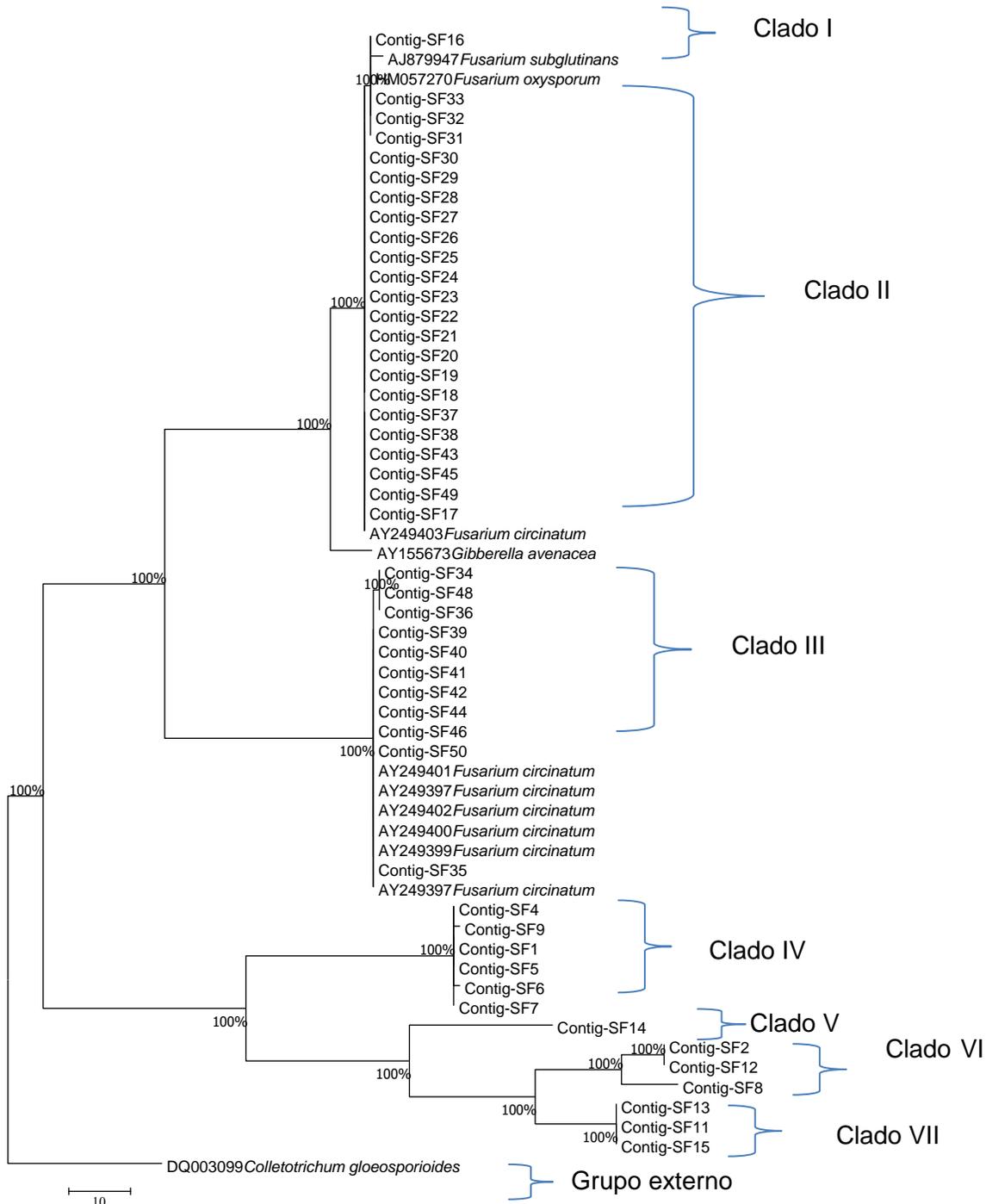


Figura 24. Árbol filogenético que muestra el agrupamiento de los aislados de *Fusarium* encontrados en los viveros forestales del Centro de México, amplificados por PCR-IGS, con los iniciadores CNS1F y NL11R y sus secuencias agrupadas con el software MEGA 7 y construido con el método de Máxima Parsimonia.

Análisis Bayesiano

En el análisis Bayesiano de los 47 aislados de *Fusarium*, se formaron cuatro clados bien definidos, el primer clado asocia un aislado de *F. subglutinans*, el segundo asocia a 38 con *F. circinatum*, el tercero con siete de *F. oxysporum* y el cuarto con uno de *F. avenaceum* (Figura 25).

El presente estudio concuerda con lo que mencionan, O' Donnell *et al.* (2008) y O' Donnell *et al.* (2010), al señalar la importancia de trabajar las especies de *Fusarium* en humanos, animales, insectos, plantas y hongos de importancia agrícola y médica, con estudios filogenéticos moleculares y con análisis multilocus, para crear bases de datos y para la identificación correcta de especies. En otro estudio de O'Donell *et al.* (2012), realizaron la diversidad filogenética y análisis multilocus con *Fusarium* para la identificación de especies insectícolas con la finalidad de uso de especies como biocontrol, trabajando las secuencias de ADN con cuatro genes *Efl- α* , *GCPSR*, *RPBI* y *RPB2*.

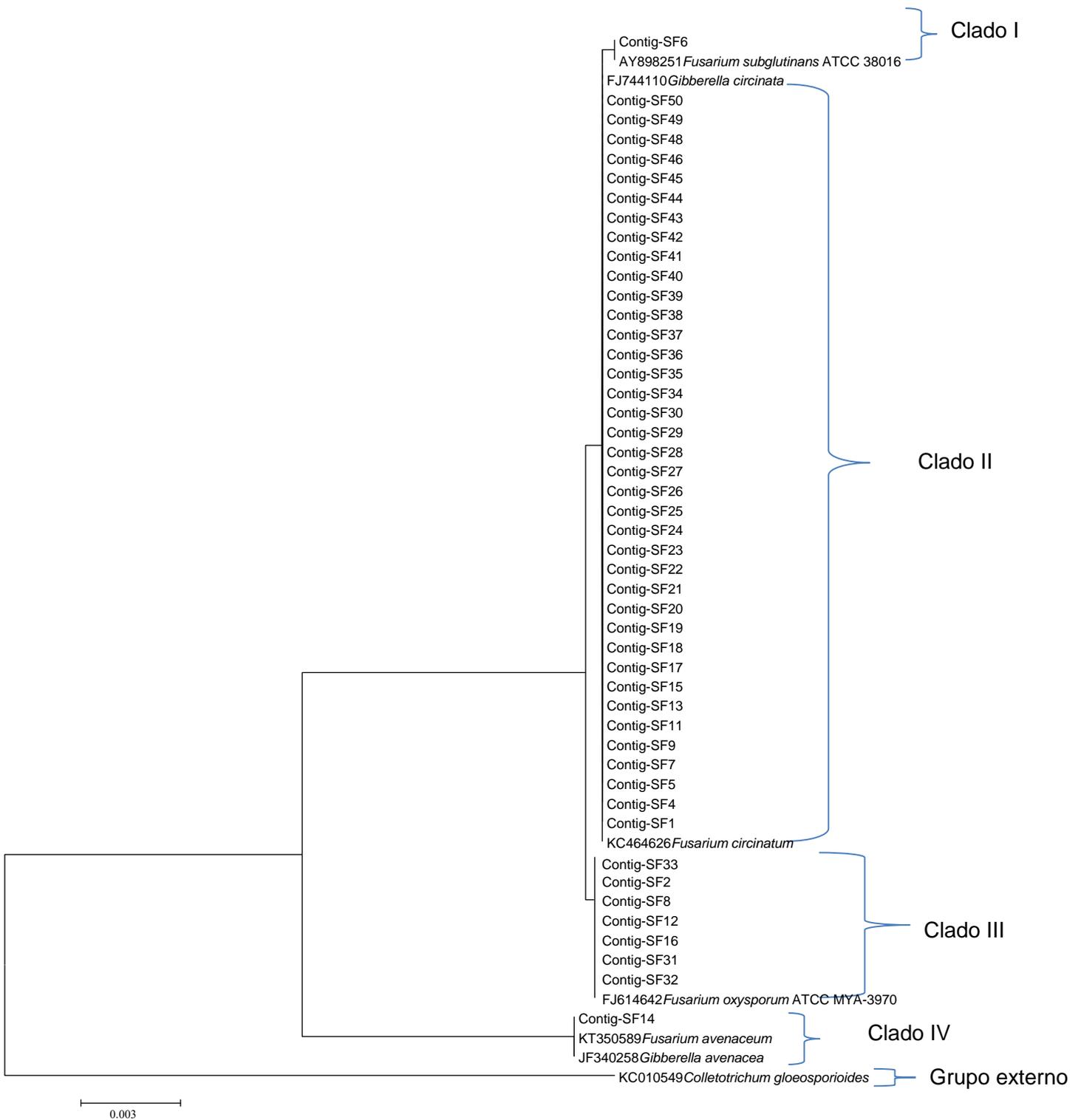


Figura 25. Árbol de Inferencia Bayesiana basado en las secuencias concatenadas con tres marcadores (ITS; TEF e IGS) de *Fusarium* encontrados en los viveros forestales del Centro de México.

CONCLUSIONES

- a) La sintomatología de la secadera y pudrición de raíz se observó en las etapas de preemergencia, con inhibición en la germinación; en postemergencia, con constricción del tallo en la etapa de plántula; y durante el desarrollo de la plántula, con síntomas de amarillamiento y color rojizo en las acículas, marchitamientos, doblamiento apical de la plántula, deshidratación del tallo y muerte de la misma. En *P. greggii* el síntoma característico es el doblamiento del brote apical, marchitamiento y muerte descendente. En *P. montezumae* las acículas de la base del cuello de la raíz se tornan de color rojizo y presenta muerte descendente. En *P. pseudostrobus* el brote principal se torna de color violeta y presenta muerte descendente. En las tres especies de pino se manifiesta pudrición de raíz principal y raíces secundarias.
- b) La incidencia de la secadera y pudrición de raíz por *Fusarium* spp. durante los dos ciclos de producción de la planta (2013-2014 y 2014-2015) fue muy variable en cada vivero, la mayor incidencia se observó en el vivero de Atlangatepec, Temamatla, Ixtlahuaca y Los Insurgentes. La menor incidencia se presentó en los viveros de Morelos, Monte Noble y Pueblo Nuevo. La especie con mayor incidencia en promedio de los dos ciclos fue *P. montezumae* con un 22 %, seguida de *P. greggii* con 18 % y *P. pseudostrobus* con 11 %.
- c) Los aislamientos de *Fusarium*, asociados a raíz tuvieron una mayor frecuencia en *P. greggii* con 42 %, en *P. montezumae* con un 38 % y en *P. pseudostrobus* 20 %. Se identificó *F. avenaceum*, *F. circinatum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. pseudocircinatum*. De semilla, se aisló internamente a *F. circinatum*, *F.*

oxysporum, *F. subglutinans* y *F. proliferatum* y externamente a *F. oxysporum*, donde la frecuencia fue de 4% en *P. greggii*, 2% en *P. montezumae* y 2% en *P. pseudostrobilus*. Se confirma la transmisión por semilla. En sustratos, la frecuencia de aislamientos de *Fusarium* spp. fue de un 3% para el ciclo 2013-2014 y se obtuvieron unidades formadoras de colonias de *F. circinatum* y *F. oxysporum* en la mezcla y *F. oxysporum* en turba de musgo. En el ciclo de producción 2014-2015 no se aislaron propágulos de *Fusarium* spp., pero presentaron mayor ufc de *Trichoderma harzianum*. De los aislamientos para larvas de mosca fungosa, se logró apreciar que *P. montezumae* tuvo un promedio de 9 %, *P. greggii* un 5 % y *P. pseudostrobilus* un 1 % y se identificó a *F. circinatum*, *F. oxysporum*, *F. subglutinans* y *F. pseudocircinatum*, lo cual confirma que es un vector de este patógeno en los viveros forestales. Se confirmaron las mismas especies molecularmente y filogenéticamente con excepción de *F. proliferatum* y *F. pseudocircinatum*.

- d) El árbol filogenético concatenado con los tres marcadores moleculares fue el que mejor discriminó a las especies del género *Fusarium* en pino.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Colegio de Postgraduados (COLPOS), gracias a la concesión de una beca de formación de doctorado por CONACyT y al otorgamiento del Fideicomiso 167304, en la modalidad 3, de financiamiento a Proyectos de Investigación 2013.

LITERATURA CITADA

- Alvarado R., D., S. Castro Z., C. Cigarrero C., R. Álvarez R., y L. de L. Saavedra R. 2004. Manual de detección y manejo de enfermedades bajo el sistema de “contenedor”: caso vivero San Luis. CONAFOR. Gobierno del Distrito Federal, Secretaría del Medio Ambiente y Colegio de Postgraduados. 73 p.
- Arbeláez T., G. 2000. Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Colombiana* 17: 11-22.
- Arguedas M. 1995. Enfermedades forestales en Costa Rica. Cartago, Costa Rica. ITCR. Serie de apoyo académico No. 19.
- Barrows-Broaddus J. B., and L. D. Dwinell. 1985. Branch dieback and cone and seed infection caused by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* in a loblolly pine seed orchard in South Carolina. *Phytopathology* 75: 1104–1108.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 237 p.
- Booth, C. 1977. *Fusarium*: laboratory guide to the identification of the major species. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 58 p.
- Britz, H. H., T. A. Couhnho, T. R. Gordon, and M. J. Wingfield. 2001. Characterization of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, from Mexico. *South African Journal of Botany* 67: 609-614.
- Britz, H. H. 2002. Taxonomy and population genetics of *Fusarium subglutinans sensu lato* on pine and mango. Ph. D Thesis. Faculty of Natural and Agricultural Science University of Pretoria, Pretoria, South Africa. 177 p.

- Burgess, L. W., B. A. Summerell, S. Bullock, P. G. Kathryn and D. Backhouse. 1994. Laboratory manual for *Fusarium* research. 3ra (ed). Crop Sciences and Royal Botanic Gardens. University of Sydney. Sydney, Australia. 136 p.
- Carbone, I. and L. M. Kohn. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycological Society of America, Lawrence. Mycología. 91 (3): 553-556.
- Cibrián T. D., D. Alvarado R. y S. E. García D. (eds.). 2007. Enfermedades Forestales en México/Forest Diseases in México. Universidad Autónoma Chapingo; CONAFOR-SEMARNAT, México; USDA Forest Service, EUA; NRCAN Forest Service, Canadá y Comisión Forestal de América del Norte, COFAN, FAO. Chapingo, México. 587 p.
- Cibrián T. D., S. E. García D. y B. Don Juan M. 2008. Manual de identificación y manejo de plagas y enfermedades en germoplasma y planta producida en viveros. CONAFOR. 155 p.
- Córdova-Albores, L. C., S. Bautista-Baños, J. Martínez-Herrera, L. L. Barrera-Necha, M. Hernández-López, A. Cruz-Hernández. 2014. Morphological and molecular characterization of pathogenic isolates of *Fusarium* ssp. obtained from gladiolus corms and their sensitivity to *Jatropha curcas* L. Oil. African Journal of Microbiology 8: 133-724.
- Collins, C. M., and C. O. Cunningham. 2000. Characterization of the *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Platy-helminthes: Monogenea) ribosomal intergenic spacer (IGS) DNA. Parasitology 121: 555–563.

- Dick, M. A., and K. Dobbie. 2002. Species of *Fusarium* on *Pinus radiata* in New Zealand. *New Zealand Plant Protection* 55: 58-62.
- Don Juan, M. B. 2006. Efectividad biológica de *Trichoderma* spp. contra hongos causantes de damping-off en Viveros Forestales. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 67 p.
- El-Hamalawi, Z. A., and M. E. Stanghellini. 2005. Disease development on *Lisianthus* following aerial transmission of *Fusarium avenaceum* by adult shore flies, fungus gnats, and moth flies. *Plant Dis.* 89: 619-623.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Fourie, G., E.T. Steenkamp, R.C. Ploetz, T.R. Gordon, and A. Viljoen. 2011. Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae. *Infection, Genetics and Evolution* 11: 533–542.
- Fraedrich, S. W. and Cram M. M. 2012. Seed Fungi. *In: Forest Nursery Pests. Conifer and hardwood diseases.* USDA. Handbook No. 680 pp 132-134.
- Freeman, S., G. Otero-Colina, G. Rodríguez-Alvarado, S. Fernández-Pavía, M. Maymon, R.C. Ploetz, T. Aoki, and K. O'Donnell. 2014. First report of mango malformation disease caused by *Fusarium pseudocircinatum* in México. *Plant Disease Journal* 98: 1583.
- Gaio, A. de O., R. C. Rodríguez, C. do Nascimento, N. F. Secundino, F. J. Lemos, P. F. Pimenta, and N. Monesi. 2011. Use of the checkerboard DNA-DNA hybridization technique for bacteria detection in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.). *Parasites*

& Vectors 4: 237.

García D., S. E., D. Cibrián T., y D. Alvarado R. 2007. Damping –off y pudrición de raíz por *Fusarium*. *Fusarium oxysporum* Schltdl (Moniliales, Moniliaceae). In: Cibrián T. D; D. Alvarado R. y S. E. García D. (eds.). Enfermedades forestales en México/Forest diseases in México. Universidad Autónoma Chapingo; CONAFOR-SEMARNAT, México; USDA Forest Service, EUA; NRCAN Forest Service, Canadá y Comisión Forestal de América del Norte, COFAN, FAO. Chapingo, México. pp: 502-505.

González, B. C. Pintos, J.P. Mansilla, O. Agúin, y R. Pérez. 2008. Presencia de especies de *Fusarium* sobre semillas de *Pinus* spp., en Galicia. Cuad. Esp. Cienc. For. 26: 149-154.

Gordon, T. R., A. J. Storer, and D. Okamoto. 1998. Susceptibility of five landscape pines to pitch canker disease, caused by *Fusarium subglutinans* f. sp., *pini*. Hort. Science 33: 868-871.

Graham, J. H., and R.G. Linderman. 1983. Pathogenic seedborne *Fusarium oxysporum* from Douglas-fir. Plant Disease 67: 323-325.

Guerra-Santos J. J. y D. Cibrián-Tovar. 1998. El cancro resinoso causado por *Fusarium subglutinans* (Wollenw y Reink) Nelson, Tousson y Marasas, una nueva enfermedad de *Pinus* spp., en México. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 4(2): 279-284.

Hall, T. A, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucle. Acids. Symp. Ser. 41:95-96

- Herrera T. y M. Ulloa. 1990. El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. Universidad Nacional Autónoma de México-Fondo de Cultura Económica. México, D.F. 552 p.
- Herron, D. A., M. J. Wingfield, B.D. Wingfield, C.A. Rodas, S. Marinowitz and E.T. Steen-Kamp. 2015. Novel taxa in the *Fusarium fijikuroi* species complex from *Pinus* spp. Mycology 80: 131-150.
- Huelsenbeck, J. P., B. Larget, and M. E. Alfaro. 2004. Bayesian phylogenetic model selection using reversible jump Markov Chain Monte Carlo. Molecular Biology and Evolution 21: 1123-1133.
- James, R. L., R. K. Dumroese and D. L. Wenny. 1995. *Botrytis cinerea* Carried by adult fungus gnats (Diptera: Sciaridae) in container nurseries. Tree Planter's Notes 46: 48-53.
- James, R. L. 2012. *Fusarium* root and stem diseases. In: Forest Nursery Pests. Conifer and hardwood diseases. USDA. Handbook No. 680 pp 117-120.
- Kalb, D. W., and R. L. Millar. 1986. Dispersal of *Verticillium albo-atrum* by the fungus gnat (*Bradysia impatiens*). Plant Diseases 70: 752–753.
- Kilic, O., and G. J. Griffin. 1998. Effect of dsRNA-containing and dsRNA-free hypovirulent isolates of *Fusarium oxysporum* on severity of *Fusarium* seedling disease of soybean in naturally infested soil. Plant and Soil 201: 125-135.
- Komada, H. 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. Review of Plant Protection Research. 8: 114-125.

- Kvas, M., W. F. O. Marasas, B. D. Wingfield, M. J. Wingfield, and E. T. Steenkamp. 2009. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Diversity* 34: 1-21.
- Landeras E., P. García, Y. Fernández, M. Braña, O. Fernández-Alonso, S. Méndez-Lodos, A. Pérez-Sierra, M. León, P. Abad-Campos, M. Berbegal, R. Beltrán, J. García-Jiménez, and J. Armengol. 2005. Outbreak of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus* spp., in Northern Spain. *Plant Disease* 89: 1015.
- Landis, T. D., R.W. Tinus, S.E. McDonald, and J. P. Barnett. 1989. The biological component: Nursery pest and mycorrhizae. Vol. 5. The container tree nursery manual. Agric. Handbk. 674. U. S. Department of agriculture, Forest Service. Washington, DC: 159 p.
- Leong, S. K., Z. Latiffah, and S. Baharuddin. 2010. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp., *cubense* isolates from Malaysia. *African Journal of Microbiology Research*. 4(11):1026-1037.
- Leslie, J. F. and B. A. Summerell. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. First edition. Blackwell Publishing Professional 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA. 388 p.
- Maphosa, M. N., E. T. Steenkamp, and B.D. Wingfield. 2016. Genome-based selection and characterization of *Fusarium circinatum*. Specific Sequences. *Genes/Genomes/Genetics*. 6: 631-639.
- Marín-Cruz, V. H., D. Cibrián-Tovar, J. T. Méndez-Montiel, O. A. Pérez-Vera, J. A. Cadena-Meneses, H. Huerta, G. Rodríguez-Yam y J. A. Cruz-Rodríguez. 2015.

- Biología de *Lycoriella ingenua* y *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae) Madera y Bosques 2(1): 113-128.
- Melissa, C. R. S. 2014. Modelo de evaluación para resolver problemas de filogenia molecular en el género *Fusarium*, basado en los análisis de microsecuencias de ADN de multilocus conservados. Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN). Bogotá, Colombia. 157 p.
- Morales, R. I., M. J. Yañez, H. Silva. V. and S. García. 2007. Biodiversity of *Fusarium* species in Mexico. Mycopathologia 63(1): 31-9.
- Mukherjee, P. K., B. A. Horwitz, U.S. Singh, M. Mukherjee and M. Schmoll. 2013. *Trichoderma* biology and applications. CABI. USA. 327 p.
- Nelson, P. E. 1981. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. In M. E. Mace, A. A. Bell, and C. H. Beckman (eds.), Fungal Wilt Diseases of Plants. Academic Press, New York, USA. pp. 51-80
- Nelson, P. E., T. A. Toussoun, and W. F. O. Marasas. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press. 193 p.
- Nirenberg, H. I. and K. O'Donnell. 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycología. 90(3): 434-458.
- Ocamb, C., M. J. Juszwik, and F. B. Martin. 2002. *Fusarium* spp. and *Pinus strobus* seedlings: Root disease pathogens and taxa associated with seed. New Forests 24: 67-79.
- O'Donnell, K., E. Cigelnik, and H.I. Nirenberg. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia 90: 465-493.

- O' Donnell K., D. A. Sutton, A. Fothergill, D. McCarthy, M. G. Rinaldi, M.E. Brandt, N. Zhang, and D.M. Geiser. 2008. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *Journal of Clinical Microbiology* 46 (8): 2477-2490.
- O' Donnell K., D. A. Sutton, M. G. Rinaldi, B. A. Sarver, S. A. Balajee, H. J. Schroers, R. C. Summerbell, V. A. Robert, P.W. Crous, N. Zhang, T. Aoki, K. Jung, J. Park, Y. H. Lee, S. Kang, B. Park, and D. M. Geiser. 2010. Internet accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *J. Clin. Microbiol.* 48 (10): 3708-3718.
- O' Donnell K., R. A. Humber, D. M. Geiser, S. Kan, B. Park, W.A. Robert, P.W. Crous, P.R. Johnston, T. Aoki, and A. P. Rooney. 2012. Phylogenetic diversity of insecticolous fusaria inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular identification via *Fusarium-ID* and *Fusarium* MLST. *Mycologia* 104(2): 427-445.
- Pérez-Sierra A., E. Landeras, M. León, M. Berbegal, J. García-Jimenez, and J. Armengol. 2007. Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. in Northern Spain. *Mycological Research* 111: 832-839.
- Peterson, M. 2008. *Fusarium* species_a British Columbia perspective in forest seedling production. In: Dumroese R.K., Riley L.E. (tech. coord.). National Proceedings: Forest and Conservation Nursery Associations-2007. Fort Collins (CO): USDA Forest Service, Rocky Mountain Research Station. Proceedings RMRS-P_57:109-125. Available at: http://www.fs.fed.us/rm/pubs/rmrs_p057.html

- Quazi, S. A. J., S. Meon, H. Jaafar and Z. A. B. M. Ahmad. 2013. Characterization of *Fusarium proliferatum* through species specific primers and its virulence on rice seeds. *Int. J. Agric. Biol.*, 15: 649–656.
- Robles Y. L., Leyva M. S. G., Cruz G. A., Camacho T. M., Nieto A. D., Tovar P. J. M. 2016. *Fusarium oxysporum* Schltdl y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., causantes de la marchitez de plántulas de *Pinus* spp., en vivero. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 7 (36): 25-36.
- Ronquist, F., M. Teslenko, P. Van der-Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Hohna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard, and J. P. Huelsenbeck. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across large model space. *Systematic Biology* 61: 539-542.
- Sangalang, A. E.; B. A. Summerell, L. W. Burgess, and D. Backhouse. 1995. Taxonomy of *Fusarium*: characterization of *Fusarium avenaceum* subsp. *aywerte* and *Fusarium avenaceum* subsp. *nurragi*. *Mycological Research* 99: 287-290.
- Schweigkofler, W., K. O'Donnell, and M. Garbelotto. 2004. Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using a real-time PCR approach combined with a Simple. Spore trapping method. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 3512-3520.
- Shahnazi, S., S. Meon, G. Vadamalai, K. Ahmad, and N. Nejat. 2012. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with yellowing disease of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Malaysia. *Journal of General Plant Pathology* 78: 160-169.

- Steiner, G. W., and R.D. Watson. 1965. Use of surfactants in the soil dilution and plate count method. *Phytopathology* 55: 728-730.
- Storer, A. J., T.R. Gordon and L. Clark. 1998. Association of the pitch canker fungus, *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini*, with Monterey pine seeds and seedlings in California. *Plant Pathology* 47: 649–656.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.
- Van't Klooster, J. W., G. Van-den Berg-Velthuis, P. Van West, and F. Govers. 2000. Tef 1, a *Phytophthora infestans* gene encoding translation elongation factor 1 alpha. *Gene* 249 (1-2): 145-151.
- Viljoen, A., M. Wingfield and W. Marasas, 1994. First report of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* on pine seedlings in South Africa. *Plant Disease*. 78: 309-312.
- Viljoen, A., W. F. O Marasas, M. J. Wingfield, and C. D. Viljoen. 1997. Characterization of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* causing root disease of *Pinus patula* seedlings in South Africa. *Mycol. Res.* 101: 437- 445.
- Weising, K., R. G. Atkinson, and R. C. Gardner. 1995. Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. *PCR Methods Applications* 4: 249-255.

- White, J. T., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: M.A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White (eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, CA. pp: 315-322.
- Wingfield, M. J., A. Hammerbacher, R.J. Ganley, E.T. Steenkamp, T.R. Gordon, B.D. Wingfield, and T. Coutinho. 2008. Pitch canker caused by *Fusarium circinatum*, a growing threat to pine plantations and forests worldwide. *Australasian Plant Pathology* 37: 319-334.
- Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner, and W. Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7: 203-214.

CAPÍTULO II
EFFECTO DE *Fusarium* sp. EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLA Y
CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE *Pinus greggii* EN TRES SUSTRATOS

Silvia Edith García Díaz, DC.
Colegio de Postgraduados, 2017.

RESUMEN

En viveros forestales la enfermedad de la secadera afecta en pre-emergencia, post-emergencia y una vez desarrollada la planta. Los síntomas son constricción del tallo y pudrición de la raíz. Los objetivos de este estudio fueron identificar morfológica y molecularmente la especie de *Fusarium* que afecta a la producción de planta en el vivero de Atlangatepec, Tlaxcala, causante de la secadera y pudrición de raíz en *Pinus greggii* Engelm; evaluar el efecto de *Fusarium* sp; en la germinación de semillas en tres sustratos diferentes; y analizar la incidencia y patogenicidad de *Fusarium* sp; en plántulas en desarrollo. El hongo *Fusarium* sp. se aisló de plántulas enfermas, y se purificó e identificó por morfología y molecularmente. Los sustratos se evaluaron en proporciones de 60:20:20, y fueron turba de musgo, perlita y vermiculita (S1); aserrín, corteza y turba de musgo (S2), y corteza, aserrín y turba de musgo (S3), respectivamente. El diseño experimental fue completamente al azar, con seis tratamientos y cuatro repeticiones cada uno. El análisis estadístico del porcentaje de germinación se realizó con ANAVA y la comparación de medias con la prueba de Duncan ($p \leq 0.05$). La identificación morfo-molecular correspondió a *Fusarium circinatum* (Nirenberg & O'Donnell). El hongo redujo significativamente la germinación de semillas de *P. greggii*. El porcentaje de incidencia fue menor en los primeros dos meses en el S2 y la patogenicidad del hongo se comprobó con la inducción de síntomas y reaislamientos de *F. circinatum* en post-emergencia.

Palabras claves: Viveros, incidencia, turba de musgo, corteza de pino y aserrín.

CHAPTER II

EFFECT OF *Fusarium* sp. IN SEED GERMINATION AND SEEDLING GROWTH

OF *Pinus greggii* IN THREE SUBSTRATES

**Silvia Edith García Díaz, DC.
Colegio de Postgraduados, 2017.**

ABSTRACT

In forest nurseries, dry wilt disease affects in pre-emergence, post-emergence and once the plant is developed. The symptoms are stem constriction and root rot. The objectives of this study were to identify morphologically and molecularly the *Fusarium* species that affects plant production in the Atlangatepec nursery, Tlaxcala, which causes damping off and root rot in *Pinus greggii* Engelm; evaluate the effect of *Fusarium* sp; on seed germination in three different substrates; and to analyze the incidence and pathogenicity of *Fusarium* sp; in developing seedlings. *Fusarium* sp was isolated from diseased seedlings and was purified and identified morphology and molecularly. The substrates were evaluated at a ratio of 60:20:20 using peat moss, perlite and vermiculite (S1), sawdust with a ratio of 60, pine bark and peat moss (S2), and pine bark at a ratio of 60, sawdust and peat moss (S3). The experimental design was a completely randomized design with six treatments and four replicates each. Statistical analysis for germination percentage was performed using ANAVA and the mean comparison was performed using the Duncan test ($p \leq 0.05$). Morpho-molecular identification corresponded to *Fusarium circinatum* (Nirenberg & O'Donnell). The fungus significantly reduced the germination of *P. greggii* seeds. The incidence rate was lower in the first two months in S2 and the pathogenicity of the fungus was verified by the presence of the symptoms and re-inoculations of *F. circinatum* in post-emergence.

Key Words: Nurseries, incidence, peat moss, bark of pine and sawdust.

INTRODUCCIÓN

En México, el género *Pinus* incluye las especies más utilizadas para producción de planta en viveros forestales de clima templado para reforestación. Solano y Brenes (2012), señalaron que en los viveros se realiza una fase importante en el proceso de producción de plantas, ya que deben garantizar la calidad y sanidad de los árboles que se llevarán al sitio definitivo de plantación.

La Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) restaurará un millón de hectáreas, durante el periodo 2013 a 2018, con reforestación de 180 millones de plantas anuales, en los ecosistemas de clima templado-frío, tropical, y árido-semiárido (CONAFOR, 2015). El patógeno al que se enfrentan los responsables de viveros es *Fusarium* que causa la enfermedad conocida con varios nombres, como el complejo *Damping-off*, mal del semillero, secadera de la planta, mal del talluelo, ahogamiento, chupadera y pudrición de raíces. La enfermedad de la secadera es causada por un complejo de hongos del suelo, entre los que destacan: *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia* spp., *Botrytis* spp. y *Fusarium* spp. (Salas, 2002, Benítez *et al.*, 2004, y Ezziyyani *et al.*, 2004).

La causa principal de la enfermedad de la secadera en pino en los viveros de México es *Fusarium* sp; factor que disminuye la calidad de la planta y ocasiona pérdidas de hasta 40 % en la producción (Cibrián *et al.*, 2008). Se puede presentar en pre-emergencia, donde el hongo daña al embrión antes de germinar y hay necrosis del hipocótilo y los cotiledones. En post-emergencia, las plántulas son atacadas a nivel del tallo, causando un estrangulamiento y muerte. El daño tardío se manifiesta durante el desarrollo de la plántula, principalmente cuando el tallo aún no está lignificado, causa pudrición de raíz y

doblamiento del brote principal, se manifiesta en las acículas de color rojizo y en raíz presenta un color café (Peterson, 2008, Solano y Brenes, 2012).

En la mayoría de los viveros, la producción de planta se realiza en envases de plástico rígido, en donde se utiliza principalmente como medio de crecimiento la turba de musgo (peat moss), perlita y vermiculita, combinación conocida como mezcla estándar o mezcla base (Sánchez-Córdoba *et al.*, 2008). Una de las desventajas de esta mezcla, es su alto costo para la producción en plantas de vivero. Además, por su alto contenido de materia orgánica y humedad, es factible que se observen daños en la planta causados por *Fusarium* spp. Como alternativa, en la actualidad se están utilizando sustratos de aserrín y corteza de pino a un menor costo (Maldonado-Benitez *et al.*, 2011, Hernandez-Zarate *et al.*, 2014).

En los viveros forestales de nuestro país no siempre se desinfecta la semilla que se utiliza para la producción de plantas y existe el riesgo de la presencia de *Fusarium* spp. que puede afectar el proceso de germinación y el desarrollo posterior de las plantas. Con base en esta problemática, los objetivos de este estudio fueron identificar morfológica y molecularmente la especie de *Fusarium* sp. que causa la secadera y pudrición de raíz en *P. greggii*, evaluar el efecto de *Fusarium* sp. en la germinación de semillas en tres diferentes sustratos y evaluar la patogenicidad e incidencia de *Fusarium* sp. en plántulas en desarrollo. La hipótesis es que el sustrato que contiene mayor proporción de turba es el que presenta una mayor incidencia de *Fusarium* sp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolecta, manejo de material enfermo y área de estudio

La recolecta de material enfermo de *Pinus greggii* se realizó en el vivero Forestal Militar de Atlangatepec, Tlaxcala (19° 32' 27.6" N, 98 ° 10' 48" O y altitud de 2510 m). Del material recolectado se cortaron trozos de raíz de 1 cm, se lavaron tres veces con agua destilada estéril, se colocaron en hipoclorito de sodio al 2 % por 3 min y se lavaron nuevamente tres veces con agua destilada estéril. El material se secó con papel filtro estéril y la siembra se realizó como lo señalan Martínez-Álvarez *et al.* (2012) en medio papa dextrosa agar con antibiótico (PDA + A) (0.05 g de sulfato de estreptomicina por litro para prevenir el desarrollo de bacterias).

El efecto de *Fusarium* sp. se evaluó mediante el establecimiento de un experimento en un invernadero de la División de Ciencias Forestales (DiCiFo), Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Estado de México (19° 29' 34" N y 98° 53' 38" O).

Identificación morfológica

Microscopia convencional

Para la identificación morfológica de *Fusarium* spp., se observó el tipo de crecimiento, el aspecto del micelio, la coloración de la colonia, la formación de estructuras asexuales, la presencia de clamidosporas y la formación de esporodoquios. Se hicieron 100 preparaciones para medir conidióforos, clamidosporas, micro y macroconidios (Morales *et al.*, 2007; Pfenning *et al.*, 2014). Para su desarrollo, crecimiento y esporulación, se utilizaron medios de cultivo recomendados por Leslie y Summerell (2006), como papa dextrosa agar (PDA),

agua agar con hoja de clavel (AAC) y el medio específico para *Fusarium* conocido como Spezieller Nährsofarmer Agar (SNA).

Microscopia electrónica de barrido (MEB)

Se tomaron plántulas enfermas con micelio para observar los microconidios, fiálides y polifiálides; los macroconidios se cultivaron en agua agar con hoja de clavel (CMA) para estimular el desarrollo de esporodoquios. Trozos pequeños de tejido con estructuras de microconidios y macroconidios se colocaron en una solución fijadora de glutaraldehído, al 3 % por 24 h, posteriormente, se realizaron dos enjuagues con amortiguador de fosfato, durante 10 min cada uno; la deshidratación de las muestras se realizó con una serie de etanoles graduales (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 %) durante 40 min cada uno, y dos repeticiones con etanol al 100 %. Después, las muestras se secaron a punto crítico, con CO₂, en una secadora Sandri-780^a (TOUSIMIS Research Corporation, USA). Una vez secas las muestras, se montaron en portamuestras de latón, se fijaron con cinta adhesiva de cobre y se recubrieron con oro, durante 10 min, en una ionizadora de metales Fine Coat JFC-1100 (JEOL Ltd., Japón). Se observaron en el microscopio electrónico de barrido JSM-6390 (JEOL Ltd., Japón), operando a 20 kV, en la unidad de microscopía electrónica del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, en el Estado de México.

Identificación molecular

Para la identificación molecular se utilizó un cultivo monoconidial con la clave PGAT, obtenido de plántulas de *P. greggii* del vivero forestal de Atlangatepec, Tlaxcala. Se realizó la extracción de ADN con el kit comercial DNeasy Plant mini kit (Quick-StartProtocol. Cat.

Nos. 69104 and 69106, QIAGEN), se obtuvieron 100 μ L de ADN en suspensión, se amplificó con el gen factor de elongación (TEF), que codifica para el factor de elongación 1 α (O'Donnell *et al.*, 1998 y Pfenning *et al.*, 2014), con ATGGGTAAGGAGGACAAGAC (EF1) y GGAAGTACCAGTGATCATGTT (EF2) como iniciadores. Se utilizó un termociclador Multigene Gradient, con el siguiente programa: desnaturalización inicial 94 °C, por 2 min; 35 ciclos a 94 °C, 1 min; alineamiento 53 °C, por 1 min; extensión 72 °C, por 1 min; y extensión final 72 °C, por 5 min (Geiser *et al.*, 2005). El fragmento amplificado se verificó en un gel de agarosa al 1% y teñido con gel red (Biotium, USA); la banda se visualizó en un sistema de fotodocumentación (Gel Logic 200, Kodak). El producto de PCR se purificó con el kit Wizard SV (Promega). La secuenciación se envió a Macrogen donde se secuenció en un ABI Autosequencer (Applied Biosystems, USA). La secuencia se comparó con las reportadas en la base de datos del banco de genes del NCBI y se realizó la construcción de un árbol filogenético.

Análisis filogenético

Las secuencias de ambas hebras de DNA se ensamblaron y editaron usando BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999), con el cual se creó una secuencia consenso. Esta secuencia se compiló en un archivo Fasta y se alineó con el Profile mode del Clustal W 1.8.1. (Thompson *et al.*, 1994), incluido en el programa Mega 5.1 (Tamura *et al.*, 2011) y analizada con el método de Máxima Parsimonia. Para determinar los valores de confianza de los agrupamientos dentro del árbol resultante, se realizó un análisis de bootstrap con 1000 repeticiones (Felsestein, 1985).

Inoculación de semilla de *P. greggii* con *Fusarium* sp.

A la semilla se le dió un tratamiento previo con peróxido de hidrógeno al 30 % durante una hora. Para la inoculación con *Fusarium* sp. (F), se tomaron tres cajas con micelio puro, se molieron en la licuadora con 300 mL de agua destilada estéril y la semilla se impregnó por 24 h con esta mezcla, a una concentración de 7.9×10^4 esporas por mL. De las semillas no germinadas y de plántulas enfermas se hicieron sus reislamientos para comprobar los postulados de Koch.

Efecto de *Fusarium* sp. en semilla de *P. greggii* (pre-emergencia) en tres sustratos.

La semilla de *P. greggii* evaluada, provenía de la comunidad de Pueblo Nuevo, municipio de Chignahuapan, Puebla (19° 52'60" N y 98° 06' 36" O). En la siembra se utilizaron mesas portatubetes con 42 cavidades y tubetes individuales de 170 mL.

Se evaluaron tres sustratos: (S1) turba de musgo, perlita y vermiculita; (S2) aserrín de pino, corteza de pino y turba de musgo y (S3) corteza de pino, aserrín de pino y turba de musgo. En todos los casos se evaluó a una proporción de 60:20:20, respectivamente (Hernandez-Zarate *et al.*, 2014). La turba de musgo utilizada es importada de Canadá. El aserrín de pino, se obtuvo de un aserradero ubicado en Texcoco, Estado de México, (no mayor de 15 días de aserrado). La corteza compostada fue de *Pinus douglasiana* Martínez, de la región sur de Jalisco, y se obtuvo de la empresa MASVI. A las mezclas de sustrato se les agregó el fertilizante de liberación controlada Osmocote Plus[®] 8-9 M 15-9-12+ME (eveRRIS ILC Fertilizer Company, Dublin, OH, Estados Unidos), en dosis de 7 g L⁻¹ de sustrato (Aguilera-Rodríguez *et al.*, 2016).

La siembra se realizó en forma directa el 13 de febrero de 2015, se sembraron dos semillas por tubete con aplicaciones de riego ligero diario durante la germinación, posteriormente cada tercer día. En la evaluación de la germinación se consideraron 40 semillas por repetición (160 semillas por tratamiento, dando un total de 960 semillas). La evaluación final de incidencia por *Fusarium* sp. se realizó a los cinco meses de edad de la planta.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar, con arreglo factorial 3 x 2, tres sustratos, con y sin *Fusarium*, para obtener seis tratamientos. Se hicieron 4 repeticiones por tratamiento (Cuadro 7). Cada repetición estuvo formada por una mesa portatubetes de 42 cavidades. Se eliminó el efecto de orilla y se tomó como unidad experimental 20 plantas del centro por repetición (80 plántulas por tratamiento). El diseño experimental consideró un total de 480 plántulas. Se utilizó el procedimiento mixto de SAS, versión 9.0 (SAS Institute, 2002) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Duncan ($p \leq 0.05$).

Variables evaluadas

La germinación (emergencia) se evaluó durante el mes de febrero y marzo de 2015 y se registró por cuatro semanas en forma acumulada para evaluar el efecto de los tratamientos en pre-emergencia. El porcentaje de semillas germinadas se transformaron con la función arcoseno para su análisis.

Para la evaluación post-emergencia se realizó el registro semanal de plántulas enfermas y se tomó el porcentaje acumulado de plantas con síntomas de secadera por *Fusarium* sp., por diez semanas, durante los meses de marzo, abril y mayo.

Cuadro 7. Tratamientos utilizados en la producción de *Pinus greggii* Engelm., en tubetes individuales de 170 mL.

Sustrato	Mezcla	Proporciones	Tratamientos
S1	Turba de musgo	60	T1: Inoculado con <i>Fusarium</i> sp.
	Perlita	20	T2: Sin inocular
	Vermiculita	20	
S2	Aserrín de pino	60	T3: Inoculado con <i>Fusarium</i> sp.
	Corteza de pino	20	T4: Sin inocular
	Turba de musgo	20	
S3	Corteza de pino	60	T5: Inoculado con <i>Fusarium</i> sp.
	Aserrín de pino	20	T6: Sin inocular
	Turba de musgo	20	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación morfológica, molecular y filogenética

El hongo proveniente del vivero de Atlangatepec, Tlaxcala se identificó como *Fusarium circinatum*, miembro del complejo *Gibberella fujikuroi* (CGF). Este patógeno ataca sólo árboles de *Pinus* spp. y causa la enfermedad del cancro resinoso en plantaciones de pinos. Wingfield *et al.* (2008) y Gordon *et al.*, (2015), reportan que representa un problema fitosanitario de importancia y que amenaza a viveros y plantaciones a nivel mundial.

La colonia del hongo presentó micelio algodonoso, blanco y coloración con un pigmento violeta fuerte en medio de PDA (Figura 26 A y B); microconidios sin septos, que miden 8 x 3.5 μm y de forma oval (Figura 26 H); se agregan en falsas cabezas (Figura 26 E) que surgen de monofiálides y polifiálides (Figura 25 D y F). Esta especie de *F. circinatum*, puede diferenciarse de *F. pseudocircinatum* por la formación de los microconidios en cadenas cortas y no en falsas cabezas como lo señalan Nirenberg and O'Donnell (1998). La especie encontrada desarrolló circinas, que son hifas estériles tabicadas y curvadas (Figura 26 I) en medio SNA. Otras especies que forman estas estructuras son *F. pseudocircinatum* y *F. sterilihyphosum*. *Fusarium circinatum* no presenta clamidosporas, pero algunas cepas llegan a producir hifas hinchadas que pueden semejarse a clamidosporas o pseudoclamidosporas (Leslie and Summerell, 2006 y Nirenberg and O'Donnell, 1998). Nelson *et al.* (1983) y Pfenning *et al.*, 2014, reportan esporodoquios de color naranja pálido formados en agua agar con hoja de clavel.

Los macroconidios miden 35 x 4 μm , generalmente de tres septos (Figura 26 C y G) con células apicales curvadas y células basales poco desarrolladas.

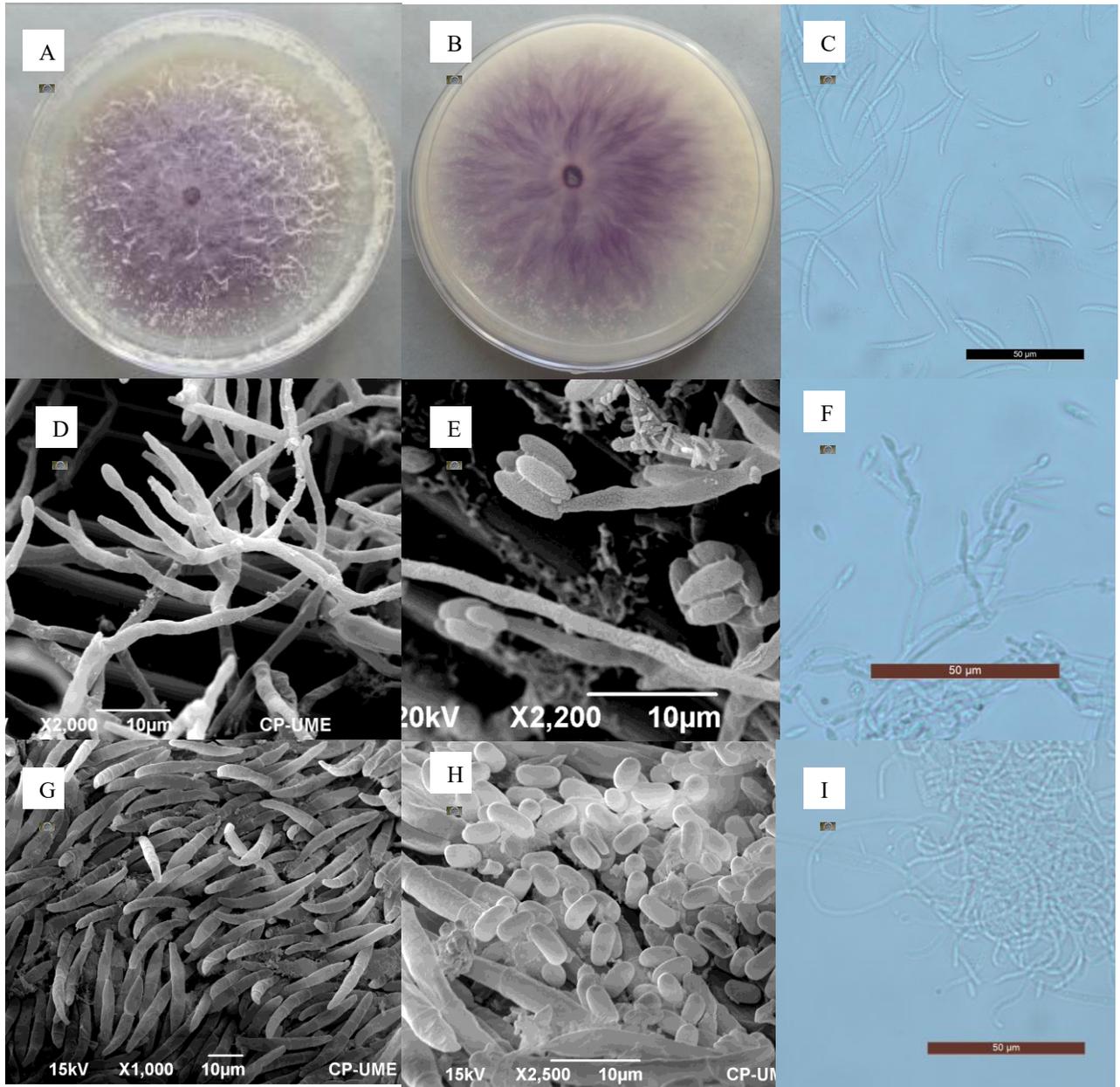


Figura 26. Características de *Fusarium circinatum*. **A)** Miceilio de color blanco a violeta. **B)** Pigmento violeta en el medio de cultivo. **C y G)** Macroconidios alantoides. **D y F)** Monofiálides y polifiálides de los microconidios. **E)** Microconidios en falsas cabezas. **H)** Microconidios de forma ovalada. **I)** Circinas en medio SNA.

La identificación molecular y filogenética de la cepa del hongo inoculado a *P. greggii* (PGAT), se alineó en el clado de *F. circinatum* (Figura 27). La secuencia consenso se depositó en el GenBank (MF075250). Otros hospedantes de pinos afectados por este hongo e identificados molecularmente con primers específicos se reportaron en *P. taeda* con los marcadores moleculares MAT1-1 y MAT1-2 (Pfenning *et al.*, 2014), *P. montezumae* y *P. patula* con β -tubulin, histona H3, entre otros (Kvas *et al.*, 2009) y *P. radiata* con CIRC1A Y CIRC4A (Martínez-Álvarez *et al.*, 2012).

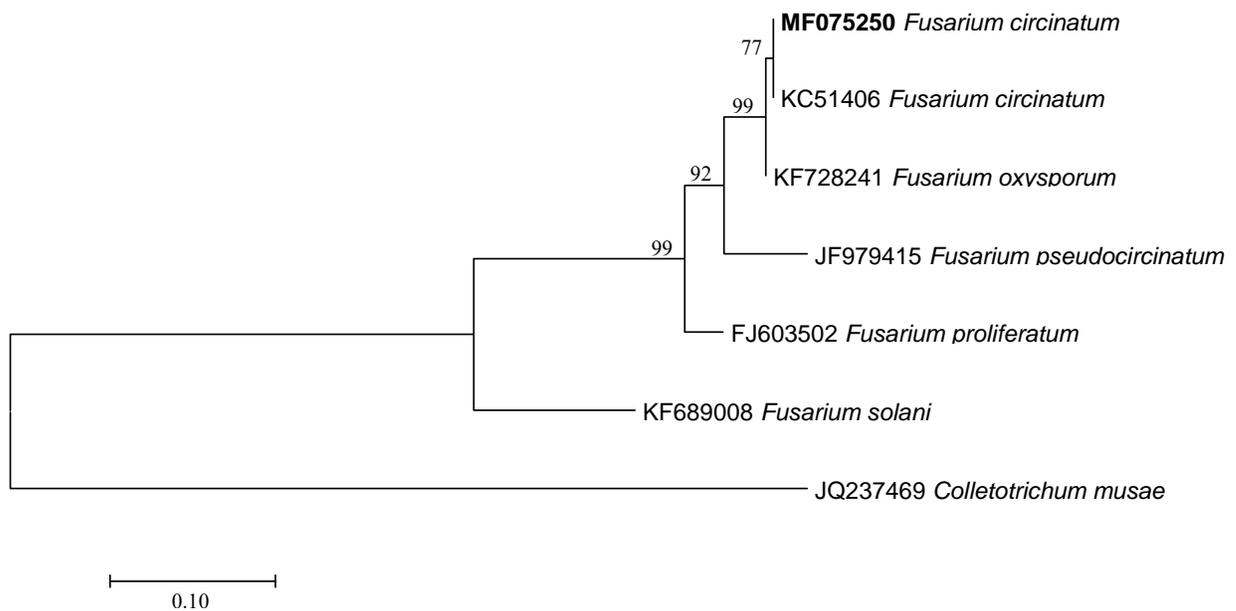


Figura 27. Árbol filogenético del aislado de *Fusarium circinatum*, amplificado por PCR-TEF y sus secuencias agrupadas con el software MEGA 5.1 y construido con el método de Máxima Parsimonia.

Efecto de *F. circinatum* en semilla de *P. greggii* (pre-emergencia)

Fusarium circinatum redujo en un 43 % ($p < 0.01$) la germinación de semillas de *P. greggii*. Esta reducción se vio reflejada en el porcentaje promedio de germinación, al pasar de un 83 % en ausencia del patógeno a un 48 % cuando la semilla se remojó con el tratamiento de *F. circinatum*. El valor menor de germinación (43 %) para los tratamientos inoculados con *F. circinatum* se presentó en el sustrato con mayor proporción de aserrín (S2), mientras que 56 % de las semillas germinaron en el sustrato con mayor proporción de corteza (S3). En un estudio realizado en maíz (*Zea mays*), Swett and Gordon (2015) caracterizaron la habilidad de *F. circinatum* (aislado de pino) de colonizar tejidos en semilla de maíz, encontrando hasta un 98 % de semilla infectada. En el presente estudio, en el caso de las semillas que no se inocularon con *F. circinatum* se encontraron porcentajes de germinación superiores al 80 % y no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tres sustratos (Cuadro 8).

Lo anterior coincide con Martínez-Álvarez *et al.* (2012), quienes encontraron que *F. circinatum* reduce la germinación en *Pinus radiata*. Además, Peterson (2008), señala que *Fusarium* sp. viene sobre la testa y en el interior de las semillas de coníferas. De este modo llega el hongo a los viveros forestales (Barrows-Broadus and Dwinell, 1985; Storer *et al.*, 1998) e infecta el embrión y lo necrosa (Pfenning *et al.*, 2014).

Cuadro 8. Germinación de semilla de *Pinus greggii* en tres sustratos con proporciones de materiales en la mezcla 60:20:20.

Tratamiento	Sustrato	<i>F. circinatum</i>	DS	% Promedio Germinación
T6	S3	Ausencia	± 6.57	86 a
T4	S2	Ausencia	± 3.75	82 a
T2	S1	Ausencia	± 4.27	81 a
T5	S3	Presencia	± 12.31	56 b
T1	S1	Presencia	± 7.7	46 bc
T3	S2	Presencia	± 7.36	43 c

Valores promedio en una columna con diferente letra son estadísticamente diferentes con la prueba de Duncan ($p \leq 0.05$). S: Sustrato; S1: turba de musgo, perlita y vermiculita; S2: aserrín, corteza y turba de musgo; S3: corteza, aserrín y turba de musgo. DS = Desviación estándar.

Las semillas colocadas en el sustrato S1 y S2, en presencia de *F. circinatum* tuvieron un porcentaje de germinación relativamente menor que en el S3 (Cuadro 7), así como lo señalan Hoitink *et al.* (1997), quienes mencionan que en presencia de una proporción elevada de turba de musgo se incrementa la probabilidad de enfermedades y pudriciones de raíz.

Efecto de *F. circinatum* en plántulas de *P. greggii* (post-emergencia)

En los tratamientos donde las semillas se inocularon con *F. circinatum*, la enfermedad se manifestó a las cinco semanas después de la inoculación en post-emergencia (Figura 28 A). La sintomatología observada durante el período de evaluación, correspondía a la que se manifestó en el vivero forestal militar de Atlangatepec (Figura 28 B). Se observó que en la etapa de plántula, hay un estrangulamiento en la punta de la plántula, de forma que se veía

chupada o seca de la parte superior; la plántula se doblaba y moría después de unos días (Figura 28 C).

Lo anterior coincide con lo que señalan Peterson (2008) y Wingfield *et al.* (2008), al mencionar que las especies de coníferas en post-emergencia, el patógeno se desarrolla en el tejido vascular, causa marchitamiento y muerte de la plántula. Una vez desarrollada la planta, con edad de 2-3 meses, presentó flacidez y doblamiento del brote principal y decoloración de acículas, de amarillo a color pardo rojiza intensa, con pudrición de la raíz primaria y algunas secundarias que adquieren un color café y desintegración de la misma (Figura 28 D). Los síntomas descritos por Herron *et al.* (2015) y Marín-Cruz *et al.* (2015), señalan que las plántulas durante su primer año de edad presentan marchitamiento, caída del brote terminal, decoloración y pérdida de acículas.

Solano y Brenes (2012), mencionan que los órganos aéreos presentan clorosis del follaje o marchitez de la parte superior del tallo; y los síntomas son producto de la pudrición del sistema radical (Vivas, *et al.* 2009). En ocasiones las plantas desarrollaron esporodoquios de color blanco a naranja pálido en la base y a lo largo del tallo. En post-emergencia y en la etapa de plántula de *P. greggii* existió marchitamiento y pudrición de raíz.

Recuperación del patógeno

En 249 semillas *P. greggii* no germinadas de los diferentes sustratos, se obtuvo el 100% de aislamientos de *F. circinatum* (Figura 27 E); en 169 plántulas enfermas se obtuvieron 156 reaislamientos que corresponde al 93% (Figura 27 F). Estos resultados son similares a los obtenidos por Martínez-Álvarez *et al.* (2012), en un estudio similar con *F. circinatum* en *Pinus radiata*, donde se muestreo solo el 10 % de plántulas y se obtuvieron un 100% de aislamientos.

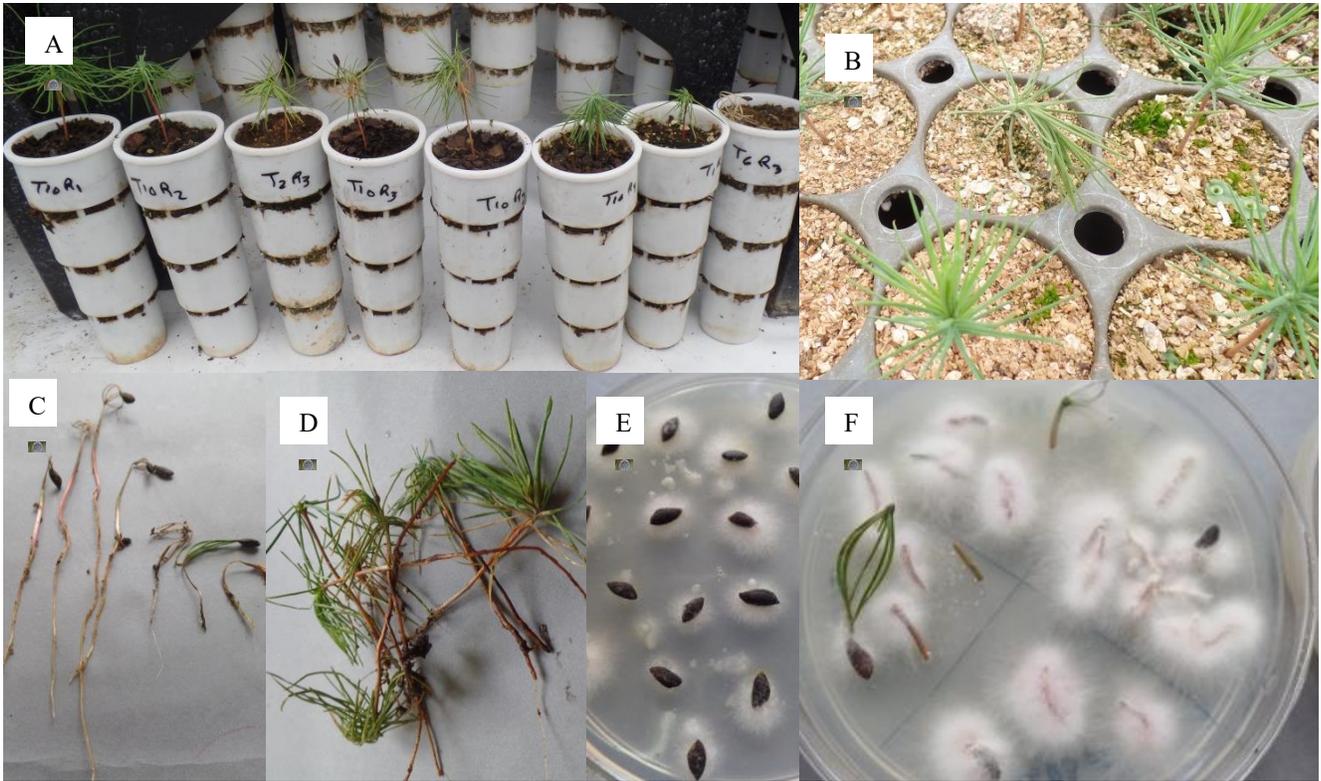


Figura 28. Síntomas de la secadera causada por *F. circinatum*. **A)** Plántulas enfermas con diferentes niveles de daño. **B)** Plántulas de tres meses de edad del vivero de Atlangatepec, Tlaxcala. **C)** Síntomas en etapa de plántula. **D)** Plantas enfermas con tres meses de edad. **E)** Colonias de *F. circinatum*, desarrolladas en PDA+Antibiótico. **F)** Reaislamientos de *F. circinatum* en plántulas de un mes.

Incidencia de *F. circinatum* en plántulas de *P. greggii* creciendo en tres sustratos

En la Figura 29 se muestra el porcentaje semanal de plántulas con síntomas causados por *F. circinatum* en los órganos aéreos durante el período de evaluación (10 semanas). En el análisis de los tres sustratos (S1: turba de musgo, perlita y vermiculita; S2: aserrín, corteza turba, de musgo y S3: corteza, aserrín y turba de musgo) con tratamientos donde se inoculó

F. circinatum, se observó una incidencia en *P. greggii*, que va en incremento desde la semana uno hasta la 10.

La incidencia de *F. circinatum*, en la semana uno donde las plantas estaban creciendo en el S1 fue del 22 %, en comparación con el S3 con un 8 % y en el S2 con un 0 %. El S2 presentó la incidencia más baja durante todo el período de evaluación. Se observó que en S2 hasta la cuarta semana alcanzó una cuarta parte de plantas enfermas (Figura 27), lo cual indica que en el primer mes de crecimiento en este sustrato reduce la incidencia de *Fusarium* en comparación con los otros dos.

La Figura 29 muestra que el S1, a base de turba de musgo, fue donde las plantas manifestaron desde la semana uno el mayor porcentaje de enfermedad y en la semana cuatro alcanzó un 56 %, lo cual demuestra que este sustrato es más propicio para el desarrollo de la enfermedad y es el sustrato más utilizado en los viveros forestales de México (Hernandez-Zarate *et al.*, 2014). En el sustrato S3, con mayor proporción de corteza de pino, las plantas mostraron un menor porcentaje de enfermedad en las primeras seis semanas, pero luego su comportamiento es similar al S1.

Las plántulas del sustrato S2, a base de aserrín, mostraron los porcentajes más bajos de incidencia de la enfermedad. Durante la semana uno no hubo plantas enfermas y en la semana cuatro solo alcanzó un 28 % de incidencia, en comparación con 56 % de plantas enfermas en S1. El S2 retardó la presencia de *F. circinatum* en *P. greggii*, pero a las 10 semanas tuvo el mismo efecto de alta incidencia que los otros dos sustratos (Figura 29).

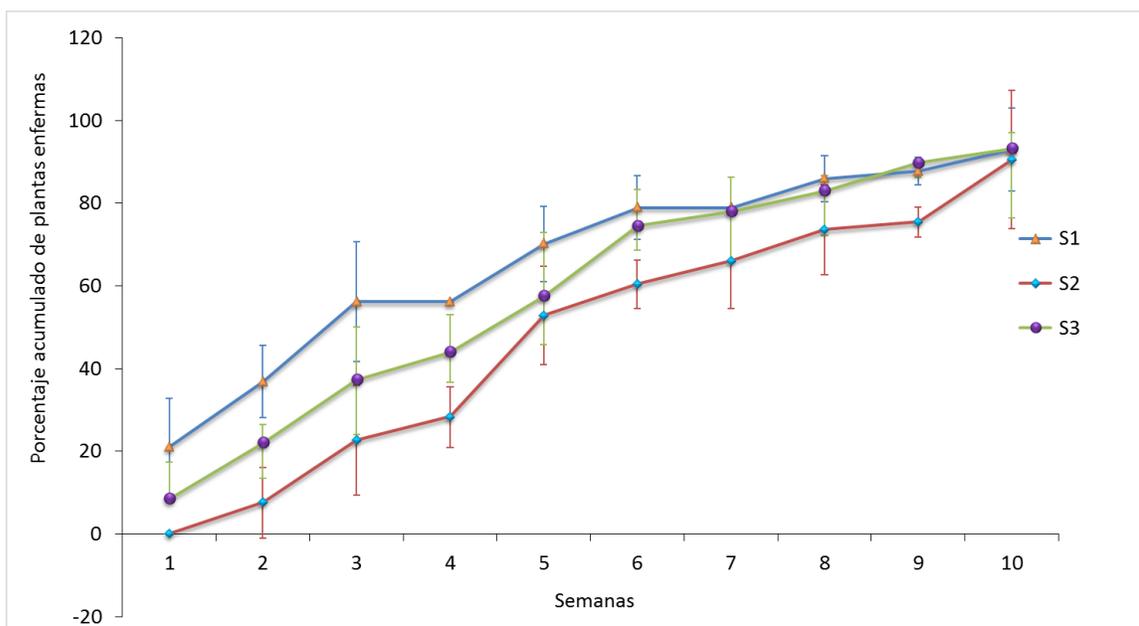


Figura 29. Incidencia semanal de *Fusarium circinatum* en plantas de *Pinus greggii* cultivadas en tres sustratos diferentes; S1: turba de musgo, perlita y vermiculita; S2: aserrín, corteza y turba de musgo; S3: corteza, aserrín y turba de musgo; con una proporción de materiales 60:20:20 en las tres mezclas.

CONCLUSIONES

El agente causal de la secadera y pudrición de raíz en *Pinus greggii* fue *F. circinatum*. Se reprodujeron los síntomas típicos de la secadera en pre y post emergencia. El patógeno afectó de manera significativa la germinación de las semillas y la supervivencia de plántulas. Las plántulas del sustrato a base de aserrín retardó la presencia de *F. circinatum* y disminuyó la incidencia de la secadera en las primeras etapas de desarrollo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Colegio de Postgraduados (COLPOS), gracias a la concesión de una beca de formación de doctorado por CONACyT y al otorgamiento del Fideicomiso 167304, en la modalidad 3, de financiamiento a Proyectos de Investigación 2013. Se agradece también a la Unidad de Microscopía Electrónica de Barrido del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo en el Estado de México.

LITERATURA CITADA

- Aguilera-Rodríguez, M., A. Aldrete, T. Martínez-Trinidad, y V.M. Ordáz-Chaparro. 2016. Producción de *Pinus montezumae* Lamb. con diferentes sustratos y fertilizantes de liberación controlada. *Agrociencia* 50:107-118.
- Barrows-Broadus, J. and L. D. Dwinell. 1985. Branch dieback and cone and seed infection caused by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* in a loblolly pine seed orchard in South Carolina. *Phytopathology* 75: 1104-1108.
- Benítez, T., A. M. Rincón, A. C. Limón, and C. Codón. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* Strains. *International Microbiology* 7:249-260.
www.im.microbios.org
- Cibrián T., D., D. S. E. García y M. B. Don Juan. 2008. Manual de identificación y manejo de plagas y enfermedades en germoplasma y planta producida en viveros. CONAFOR. México. 153 p.
- CONAFOR, 2015. La CONAFOR incrementa la calidad de la producción de planta. Boletín informativo 154.
www.conafor.gob.mx:8080/documentos/download.aspx?articulo=6426
- Ezziyyani, M., S. C. Pérez, A. A. Sid, M.E. Requena, y M. E. Candela, 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología* 26: 35-45.
- Felsestein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

- Geiser, D. M., M. L. L. Ivey, G. Hakiza, J. H. Juba, and S. A. Miller. 2005. *Gibberella xylarioides* (anamorph: *Fusarium xylarioides*), a causative agent of coffee wilt disease in Africa, is a previously unrecognized member of the *G. fujikuroi* species complex. *Mycologia*. 97:191–201. doi:10.3852/ mycologia.97.1.191
- Gordon, T. R., C. L. Sweet, and M. J. Wingfield 2015. Management of *Fusarium* diseases affecting conifers. *Crop Protection* 73: 28–39.
- Hall, T. A, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucle. Acids. Symp. Ser.* 41:95-96.
- Hernandez-Zarate, L., A. Aldrete, V. M. Ordaz-Chaparro, J. López-Upton y M. A. López-López. 2014. Crecimiento de *Pinus montezumae* Lamb. en vivero influenciado por diferentes mezclas de sustratos. *Agrociencia* 48:627-637.
- Herron, D. A., M. J. Wingfield, B. D. Wingfield, C. A. Rodas, S. Marincowitz and E. T. Steen Kamp. 2015. Novel taxa in the *Fusarium fujikuroi* species complex from *Pinus* spp. *Mycology* 80:131-150.
- Hoitink, H. A. J., A. G. Stone, and D. Y. Han. 1997. Supresión de enfermedades de plantas mediante compost. *Agron. Costarricense* 21: 25-35.
- Kvas, M., W. F. O. Marasas, B. D. Wingfield, M. J. Wingfield, and E. T. Steenkamp. 2009. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Diversity* 34:1-21.
- Leslie, J. F., and B. A. Summerell. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Ames, Iowa: Blackwell Publishing Asia. 388 p.

- Maldonado-Benitez, K. R., A. Aldrete, J. López, U., H. Vaquera H. y V.M. Cetina A. 2011. Producción de *Pinus greggii* Engelm. en mezclas de sustrato con hidrogel y riego, en vivero. *Agrociencia* 45: 389-398.
- Marín-Cruz, V.H., D. Cibrián-Tovar, J. T. Méndez-Montiel, O. A. Pérez-Vera, J. A. Cadena-Meneses, H. Huerta, G. Rodríguez-Yam y J. A. Cruz-Rodríguez. 2015. Biología de *Lycoriella ingenua* y *Bradysia impatiens* (Diptero:Sciaridae). *Madera y Bosques* 21:113-128.
- Martínez-Álvarez, P., F. M. Alves-Santos, and J. J. Diez. 2012. *In vitro* and *in vivo* interactions between *Trichoderma viride* and *Fusarium circinatum*. *Silva Fennica* 46: 303-316.
- Morales, R. I., M. J. Yañez, H. Silva. V. y S. García. 2007. Biodiversity of *Fusarium* species in Mexico. *Mycopathologia* 163(1):31-39.
- Nelson, P. E., T. A. Toussoun, and W. F. O Marasas. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. University Park (PA): Pennsylvania State University.
- O'Donnell, C. J., K. Lindpaintner, and M. G. Larson. 1998. Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. *Circulation* 97: 1766-1772. <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.97.18.1766>
- Peterson, M. 2008. *Fusarium* species. A British Columbia perspective in forest seedling production. *In*: Dumroese, R.K., Riley L. E. (technical coordinators). National Proceedings: Forest and Conservation Nursery Associations 2007. Fort Collins (CO): USDA Forest Service, Rocky Mountain Research Station. Proceedings RMRS-P-57:109-125. http://www.fs.fed.us/rm/pubs/rmrs_p057.html

- Pfenning, L. H., C. S. Da Silva, M. M. De Pereira, H. Costa, V. J. Aires, A. C. García and S. A. Dos Figueredo. 2014. First report and characterization of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 39(3):210-216.
- Sánchez-Córdoba, T., A. Aldrete, V. M. Cetina-Alcalá y J. López-Upton. 2008. Caracterización de medios de crecimiento compuestos por corteza de pino y aserrín. *Madera y Bosques* 14(2):41-49.
- Swett, C. L. and T. R. Gordon. 2015. Endophytic association of the pine pathogen *Fusarium circinatum* with corn (*Zea mays*). *Fungal Ecology* 13:120-129.
- SAS Intitute. 2002. The SAS system for windows. Release 9.0. SAS Institute. Cary, NC.
- Solano, B. M. y C. D. Brenes. 2012. Evaluación de métodos de curación de sustratos para la prevención del mal de talluelo. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú* 9(2): 63-65.
- Storer, A. J., T.R. Gordon and L. Clark. 1998. Association of the pitch canker fungus, *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini*, with Monterey pine seeds and seedlings in California. *Plant Pathology* 47: 649–656.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725-2729.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.

Vivas, M., M. Vrhovnik, y A. Solla. 2009. Fertilización de plántulas de *Pinus pinaster* y su efecto en la susceptibilidad de *Fusarium circinatum*. Montes y Sociedad. 5to. Congreso Forestal Español. 2-10.

Wingfield, M.J., Hammerbacher, A., Ganley, R.J., Steenkamp, E.T., Gordon, T.R., Wingfield, B.D. & Coutinho, T. A. 2008. Pitch canker caused by *Fusarium circinatum* a growing threat to pine plantations and forest worldwide. Aust Plant Path 37: 319-334.

CAPÍTULO III

BIOCONTROL CON *Trichoderma harzianum* Rifai SOBRE *Fusarium circinatum* (Nirenberg & O'Donnell) EN PLÁNTULAS DE *Pinus greggii* Engelm. EN TRES SUSTRATOS.

Silvia Edith García Díaz, DC.
Colegio de Postgraduados, 2017.

RESUMEN

El Damping-off, secadera o chupadera, es una enfermedad muy frecuente en los viveros forestales a nivel nacional e internacional y llega a ocasionar pérdidas económicas significativas. Los objetivos de esta investigación fueron evaluar la patogenicidad de *F. circinatum* y la incidencia de la enfermedad en plantas de *P. greggii*. También se evaluó el uso de *T. harzianum* como biocontrol en tres sustratos. La hipótesis planteada fue que *F. circinatum* afecta el crecimiento del pino y que la aplicación de *T. harzianum* disminuye la incidencia de la enfermedad. Se tomó una cepa (SF5), identificada morfológicamente y molecularmente como *F. circinatum* y se evaluó la patogenicidad e incidencia en plántulas de *P. greggii* sembradas en tres sustratos en proporciones de 60:20:20, respectivamente, con turba de musgo, perlita y vermiculita (S1); aserrín, corteza y turba de musgo (S2) y el de corteza, aserrín y turba de musgo (S3). Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 12 tratamientos y cuatro repeticiones cada uno. El análisis estadístico de las variables morfológicas se realizó con ANAVA y la comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). La patogenicidad fue comprobada con la inducción de síntomas y reaislamientos del hongo. La incidencia de la enfermedad fue alta en turba de musgo y corteza de pino y fue menor en el sustrato a base de aserrín. La aplicación de *T. harzianum* tuvo una respuesta de biocontrol al inhibir el desarrollo de *F. circinatum* en las primeras

cuatro semanas en los tres sustratos y no hubo diferencias significativas entre los estándares e índices morfológicos para medir la calidad de planta.

Palabras claves: Biocontrol, antagónico, vivero, turba, aserrín y corteza de pino.

CHAPTER III

BIOCONTROL AGENT *Trichoderma harzianum* Rifai, OVER *Fusarium circinatum* (Nirenberg & O'Donnell) EVALUATED ON *Pinus greggii* Engelm. SEEDLINGS IN THREE SUBSTRATES.

**Silvia Edith García Díaz, DC.
Colegio de Postgraduados, 2017.**

ABSTRACT

The disease known as Damping-off, dry wilt or drowning, is a very frequent disease in forest nurseries nationally and internationally speaking and leads to significant economic losses. The objectives of this study were to evaluate the incidence and pathogenicity of *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell, in *Pinus greggii* Engelm plants and to analyze the use of *Trichoderma harzianum* Rifai as a biocontrol agent in three substrates. The proposed hypothesis stated that *F. circinatum* affects the growth of pine plants and that by applying *T. harzianum*, the disease incidence would decrease. The strain (SF5), identified morphologically and molecularly as *F. circinatum*, was used to evaluate the incidence and pathogenicity in *Pinus greggii* seedlings grown on three substrates at a ratio of 60:20:20, respectively, with peat moss, perlite and vermiculite (S1); sawdust, pine bark and peat moss (S2) and pine bark, sawdust and moss peat (S3). A completely randomized experimental design was used, with 12 treatments and four replicates each. The statistical analysis of the percentage of morphological standards was performed using ANAVA and the mean comparison using Tukey test ($p \leq 0.05$) was performed. The pathogenicity was proven with the induced symptoms and re-isolated fungus. The *F. circinatum* incidence was

high in peat moss and pine bark and showed a lower incidence in the sawdust-based substrate. The pathogenicity was verified with the appearance of symptoms and the fungal reaction. *T. harzianum* showed a biocontrol response by inhibiting the development of *F. circinatum* during the first four weeks on all three substrates and no significant differences were showed between the standards and morphological indices for measure the quality of the plant.

Keywords: Biocontrol, antagonistic, nursery, peat moss, sawdust and pine bark.

INTRODUCCIÓN

En los viveros forestales de México se ha utilizado durante muchos años un sustrato llamado “mezcla base”, compuesto por turba de musgo, vermiculita y perlita en proporción de 3:1:1, o en proporciones similares a la misma. Esta mezcla ha sido muy utilizada por los viveristas por ser un sustrato con características físicas y químicas idóneas para producir planta. Sin embargo, los principales materiales se importan a altos costos, lo que impacta de manera directa en el costo de producción de planta. Actualmente existen sustratos alternativos compuestos a partir de materiales como corteza y aserrín de pino, y fibra de coco y cascarilla de arroz, que pueden sustituir la mezcla base en la producción de planta en los viveros forestales, y reduce el costo unitario de la planta (Aguilera *et al.*, 2016).

La calidad de planta está determinada por características genéticas, morfológicas, fisiológicas y sanitarias. Además está en función de la presencia de agentes patógenos que pueden tener un impacto económico (Villar-Salvador, 2003).

Fusarium circinatum Nirenberg & O'Donnell (teleomorfo = *Gibberella circinata*), se presenta en plantaciones de pino y es el agente causal del cancro resinoso; en los viveros, en plántulas de pino causa Damping-off, pudrición de raíz en pre y post emergencia, marchitamientos, pudrición del cuello de la raíz y pudriciones en tallo (Geiser *et al.* 2005, Steenkamp *et al.* 2012 y Herron *et al.* 2015).

El control de este patógeno ha sido complicado y costoso; al usarse tratamientos químicos, y por su rápida efectividad; además de poner en peligro el equilibrio natural y la salud humana (James, 2003, Cubillos *et al.* 2011 y Solano y Brenes, 2012). Reglinski y Dick (2005) y Romero *et al.* (2008), mencionan que el uso de los fungicidas para controlar

patógenos ha llegado a causar fitotoxicidad y resistencia, teniendo que incrementar las dosis y el número de aplicaciones en los viveros forestales.

Una alternativa para controlar este patógeno es el uso de agentes de control biológico, como es el caso del género *Trichoderma* (Chet y Hadar, 1997 y Okorski *et al.*, 2014). Las especies más destacadas en el biocontrol son *T. virens* Mater., *T. viride* Pers. y *T. harzianum* Rifai, siendo este último el hongo antagonista de mayor uso comercial, así como el más investigado para su aplicación en el control biológico (Harman *et al.* 2008, Benítez *et al.*, 2004). Un estudio en viveros y plantaciones en Nueva Zelanda realizado por Cummings y Hill (2016), para identificar las especies nativas de *Trichoderma* en suelo, sustratos y charolas para reconocer por morfología y análisis filogenético, reportó 16 especies que fueron: *T. atrobriuneum*, *T. austrokonigii*, *T. atriviridae*, *T. citrinoviridae*, *T. crassum*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. longipile*, *T. polysporum*, *T. spirale*, *T. tomentosum*, *T. trixiae*, y *T. virens*.

Los mecanismos de acción del antagonista sobre los hongos fitopatógenos, son principalmente competencia por nutrientes y producción de antibióticos como: trichodermina, suzukacilina, alameticina, dermadina, trichotecenos y trichorzianina; cuya función es inhibir la germinación de esporas (Infante *et al.*, 2009). En presencia del patógeno, el antagonista incrementa su velocidad de crecimiento cubriendo la superficie y evita el establecimiento del patógeno, por inducción de resistencia en las plantas (Desender *et al.*, 2007). La planta responde por medio de un inductor mediante una respuesta de defensa a la presencia de *Trichoderma* y micoparasitismo, es decir, el ataque directo de un hongo sobre otro (Mousseaux *et al.* 1998, Benítez *et al.*, 2004 y Dumroese *et al.*, 2012).

En los viveros forestales de nuestro país, es común la aplicación de *T. harzianum* como antagonista de *Fusarium*; sin embargo, se conoce poco sobre su efecto al incorporarse como tratamiento a la semilla o por riego, y la eficacia de su acción en diferentes sustratos. Debido a esto, los objetivos de este estudio fueron evaluar la patogenicidad e incidencia de *F. circinatum* en plántulas de *P. greggii*, sembradas en tres sustratos diferentes y el uso de *T. harzianum* como mecanismo de biocontrol contra *Fusarium*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El experimento se llevó a cabo en los invernaderos de la División de Ciencias Forestales (DiCiFo) de la Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México, localizada en las coordenadas geográficas 19° 29' 34" N y 98° 53' 38" O.

Sustratos, fertilizantes y semilla

Se evaluaron tres sustratos: (S1), compuesto por turba de musgo, agrolita y vermiculita; (S2), compuesto por aserrín, corteza de pino y turba de musgo; y (S3), compuesto por corteza de pino, aserrín y turba de musgo en una sola proporción de 60:20:20, respectivamente (Hernandez-Zarate *et al.*, 2014). El aserrín se obtuvo de un aserradero local con material fresco (no mayor de 15 días de aserrado). La corteza fue compostada y se obtuvo de *Pinus douglasiana* Martínez, de la región sur de Jalisco, de la empresa MASVI. A las mezclas de cada sustrato se les agregó fertilizante de liberación controlada Osmocote Plus® 15-9-12, con tiempo de liberación de 8 a 9 meses, en dosis de 7 g / L de sustrato.

Se utilizaron mesas portatubetes con 42 cavidades y tubetes de 170 mL; la semilla de *P. greggii*, se obtuvo de la comunidad de Pueblo Nuevo, municipio de Chignahuapan, Puebla (19° 52' 60" N y 98° 06' 36" O). Después de llenar los tubetes con cada tipo de sustrato, se sembraron las semillas en forma directa, colocando dos semillas por cavidad. Un mes después, se realizó un raleo para dejar únicamente una plántula por cavidad; y a finales de mayo, cuando las plantas tuvieron un mes y medio de edad (Figura 30 A), se realizó la inoculación con *F. circinatum* y la primera aplicación de *T. harzianum* al sustrato. La evaluación se realizó semanalmente durante 13 semanas desde junio hasta septiembre. El

riego se aplicó en forma superficial diariamente durante la germinación y emergencia de las plantas; posteriormente se aplicó cada tercer día.

Inoculación de las plantas con *Fusarium circinatum* (Fc)

Se inoculó la cepa SF5 aislada del Vivero Forestal Militar de Atlangatepec, Tlaxcala, misma que se identificó morfológica y molecularmente como *F. circinatum* con tres marcadores moleculares y sus números de accesoión fueron: ITS (KX276596), TEF (KZ337005) e IGS (KX306890). Para la inoculación se tomaron cepas puras de *F. circinatum* con desarrollo de micelio y esporulación del hongo hasta obtener una concentración de 7.9×10^4 ufc/ mL (Figura 30 B). Los tratamientos inoculados con solo *F. circinatum* fueron el T2-Fc, T6-Fc y T10-Fc en los tres sustratos (Cuadro 9).

Inoculación de las plantas con el hongo antagonista *Trichoderma harzianum* (Th)

Se utilizó la cepa comercial PHC[®] T22 de *T. harzianum* (Th), en su presentación de T-22 KRL-AG2. La inoculación fue al sustrato en dosis de 3.4 g/L de agua, con una dilución de 1×10^7 ufc/gramo de peso seco (Figura 30 C). La primera aplicación de Th se realizó al momento de establecer el experimento. Las otras dos aplicaciones fueron cada mes (la segunda el 25 de junio de 2015 y la tercera el 25 de julio de 2015). Los tratamientos inoculados con *T. harzianum* fueron T3-Th, T7-Th y T11-Th en los tres sustratos (Cuadro 9).

Inoculación de las plantas con *F. circinatum* más el hongo antagonista *T. harzianum* (Fc+Th).

Para este tratamiento se utilizaron las mismas concentraciones anteriores para *F. circinatum* y *T. harzianum* (Fc+Th), con mezcla de ambos hongos en la primera aplicación. Posteriormente, se realizaron otras dos aplicaciones cada mes con solo *T. harzianum* con la finalidad de ver la respuesta de la misma. Los tratamientos inoculados con la mezcla fueron T1-Fc+Th, T5-Fc+Th y T9-Fc+Th en los tres sustratos (Cuadro 9).

La inoculación se realizó a plántulas de mes y medio de edad (25 de mayo de 2015). Esta se realizó por inyección al sustrato (Figura 30 D), donde se aplicó 20 mL por tubete en cada tratamiento. En la mezcla de Fc+Th, se aplicó 10 mL de Fc y 10 mL de Th por cada tubete individual en los tres sustratos (S1, S2 y S3).

Tratamientos sin inocular (Te)

Donde no se aplicó hongo, se usó como testigo, que fueron los tratamientos T4-Te, T8-Te y T12-Te en los tres sustratos (Cuadro 9).

Cuadro 9. Tratamientos utilizados en la producción de *Pinus greggii* en tubetes individuales de 170 mL.

Sustrato	Mezcla	Proporciones	Tratamientos
S1	Turba de musgo	60	T1: Inoculado con <i>F. circinatum</i> (Fc) + <i>T. harzianum</i> (Th)
	Perlita	20	T2: Inoculado con <i>F. circinatum</i> (Fc)
	Vermiculita	20	T3: Inoculado con <i>T. harzianum</i> (Th)
			T4: Sin inocular (Te)
S2	Aserrín de pino	60	T5: Inoculado con <i>F. circinatum</i> (Fc) + <i>T. harzianum</i> (Th)
	Corteza de pino	20	T6: Inoculado con <i>F. circinatum</i> (Fc)
			T7: Inoculado con <i>T. harzianum</i> (Th)
			T8: Sin inocular (Te)
S3	Corteza de pino	60	T9: Inoculado con <i>F. circinatum</i> (Fc) + <i>T. harzianum</i> (Th)
	Aserrín de pino	20	T10: Inoculado con <i>F. circinatum</i> (Fc)
	Turba de musgo	20	T11: Inoculado con <i>T. harzianum</i> (Th)
			T12: Sin inocular (Te)

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial 3 x 2 x 2, tres sustratos, con y sin *Fusarium circinatum* (Fc), con y sin *Trichoderma harzianum* (Th), con 12 tratamientos y cuatro repeticiones. Cada repetición fue una mesa portatubetes de 42

cavidades y la unidad experimental estuvo constituida por las 20 plantas del centro (80 plántulas por tratamiento, dando un total de 480 plántulas evaluadas) y para la medición de estándares morfológicos fue de 15 plantas como unidad experimental (un total de 360 plantas). Para el ANAVA se utilizó el procedimiento mixto de SAS, versión 9.0 (SAS Institute, 2002) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Variables evaluadas

Patogenicidad e incidencia

La patogenicidad de *Fusarium circinatum*, se evaluó mediante su capacidad para causar enfermedad, con los síntomas típicos de la secadera y pudrición de raíz, para ello se realizó el registro de síntomas semanalmente de las plantas inoculadas y evaluar el efecto de los tratamientos con *F. circinatum*. Al final del experimento, tejidos de las plántulas enfermas se sembraron en medio de cultivo PDA con sulfato de estreptomicina (0.05 mg), para el reislamiento del patógeno y comprobar los postulados de Koch.

Para ver el efecto de los tratamientos en los tres sustratos, se evaluó semanalmente la incidencia de *F. circinatum* y se obtuvo el porcentaje acumulado de planta enferma.

La evaluación de incidencia y patogenicidad, se realizó desde mediados de junio hasta finales de septiembre de 2015.

Uso de *T. harzianum* como biocontrol de *F. circinatum*

El uso de *T. harzianum* como biocontrol en los tres sustratos (S1, S2 y S3), se evaluó con la mezcla de *F. circinatum* más *T. harzianum* (Fc + Th) para determinar el efecto del hongo antagonista sobre la incidencia y patogenicidad.

Estándares e índices morfológicos

Se utilizaron los tratamientos inoculados con *T. harzianum* (T3-Th, T7-Th y T11-Th) y sin inocular (T4-Te, T8-Te y T12-Te), como se muestra en la Figura 30 E y F. La evaluación de las plantas se realizó a finales de octubre de 2015, seis meses después de la siembra. De la mesa portatubetes de la parte central se seleccionaron 15 plantas donde se uniformizó la altura y el diámetro (Figura 30 F), obteniendo 60 plantas por tratamiento, dando un total de 360 plantas evaluadas. Las variables medidas fueron: diámetro del tallo (D), medido en la sección donde se diferencia la raíz principal (Figura 30 G y H); altura de la parte aérea (A), medida desde el punto donde se midió el diámetro del tallo hasta el ápice de la yema terminal (Figura I); peso seco de la raíz (PSR) y peso seco de la parte aérea (PSA). Con una balanza analítica (OHAUS, modelo Galaxy 200), previa deshidratación de las plantas en horno de secado (FELISA, FE-143) a 70 °C, durante 72 horas. También se evaluó la relación peso seco de la parte aérea sobre el peso seco de la raíz (PSA/PSR), (Thompson, 1985); índice de esbeltez (IE), (Thompson, 1985 y Toral, 1997) obtenido al dividir la altura de la planta en cm, entre el valor del diámetro en mm; índice de calidad de Dickson (ICD), obtenido con la ecuación: $PST/(A/D) + (PSA/PSR)$, (Dickson *et al.*, 1960).

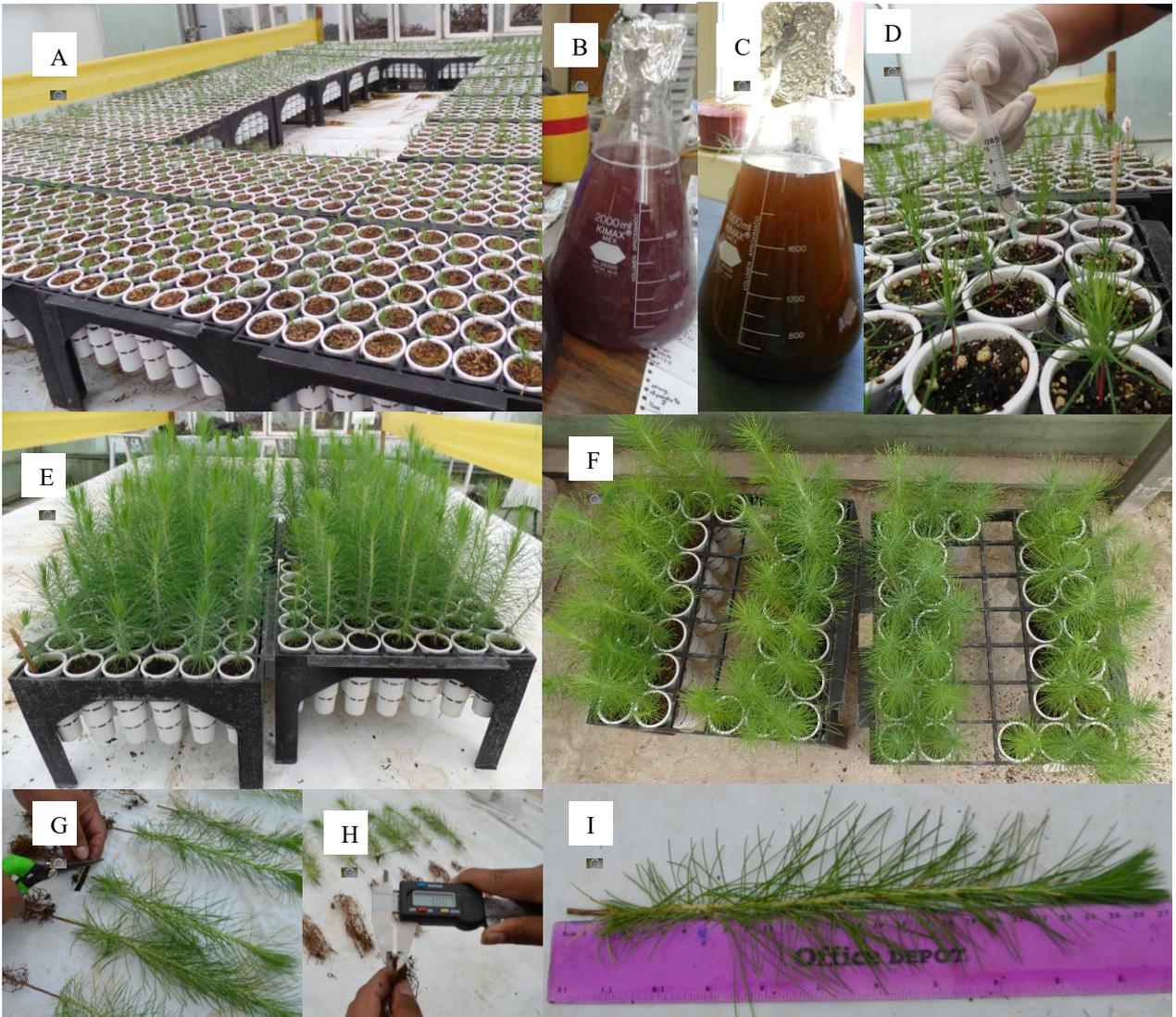


Figura 30. Efecto de tres sustratos con *F. circinatum* y *T. harzianum* como biocontrol en *P. greggii*. **A)** Experimento en invernadero con desarrollo de plántulas de un mes. **B)** Suspensión de conidios de *F. circinatum*. **C)** Suspensión de conidios de *T. harzianum*. **D)** Inoculación en inyección al sustrato al mes y medio de edad de la planta. **E** y **F)** Plantas seleccionadas para la evaluación. **G)** Corte de la parte aérea y raíz. **H)** Medición con vernier digital del diámetro del tallo. **E I)** Medición de altura de la parte aérea de la planta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Patogenicidad de *F. circinatum* en plántulas de *P. greggii*

La patogenicidad se midió con base en la capacidad de causar enfermedad, ocasionada por el hongo *F. circinatum* (Figura 31 A), la cual se manifestó a los 20 días después de la inoculación (ddi), ésto es similar a lo que señalan Robles *et al.* (2014), quienes inocularon plantas con heridas en raíces con *F. oxysporum* y mostraron síntomas a los 15 días, mientras que cuando inyectaron el inóculo al sustrato los síntomas tardaron hasta un mes en manifestarse. La primera manifestación de la enfermedad se presentó en las plántulas con el S3; sin embargo, no existieron diferencias en cuanto a sintomatología de las plántulas en los tres sustratos (S1, S2 y S3) durante la primera semana. En las plántulas se presentó un estrangulamiento del tallo y marchitamiento del brote principal de la plántula (Figura 31 B) y las acículas posteriormente se tornan amarillentas y de color rojizo. Ésto mismo lo manifiestan Soria *et al.* (2012), al mencionar que en plántulas, los síntomas aéreos no se manifiestan hasta que el patógeno alcanza la zona del cuello, lo que se traduce en marchitamiento, pérdida de color (enrojecimiento) y secado de las acículas hasta la muerte de la plántula. Al extraer la plántula enferma se encontró pudrición de raíz principal y secundarias, las raíces manifiestan un color café claro tal como lo comenta James (2003) para el género *Fusarium*.

Para la inoculación en *P. greggii* con *F. circinatum*, no se realizaron heridas en las raíces y aun así se presentó la enfermedad, ésto coincide con Peterson (2008), que señala que *Fusarium spp*; es capaz de infectar directamente en el tejido y difiere con Soria *et al.* (2012), quienes mencionan que la infección está asociada a lesiones o heridas en la corteza

u otros tejidos en los árboles debido a que este hongo es incapaz de penetrar directamente al tejido.

Cuando la planta tuvo de 4 a 6 meses de edad, los síntomas se hacen más evidentes (Figura 31 C), ya que la planta manifestó el doblamiento del brote principal, decaimiento, marchitamiento con cambios de color marrón paulatinamente hasta quedar completamente rojizos y es un síntoma de muerte de la plántula. Esto coincide con los síntomas descritos por Herrón (2015), donde señala que las plántulas de un año de edad presentan caída del brote terminal y decoloración de acículas.

La pudrición de raíces fue evidente, ya que estas fueron muy quebradizas en las plántulas y similar en los diferentes sustratos, esto se logró apreciar en el S1 (Figura 31 D) y S3 (Figura 31 E) cuando se extrajeron las plantas del tubete. Cuando la infección fue severa, se llegó a observar abundante micelio en el cuello de la raíz y tallo, y la formación de esporodoquios color blanco a naranja (Figura 31 F). De un total de 480 plantas inoculadas con *F. circinatum*, se reaislaron 424 (Figuras 31 G y H), dando un 88 % de reaislamientos del patógeno, con esto se comprobaron los postulados de Koch.

El efecto de *F. circinatum* en *Pinus greggii* mostró un alto porcentaje de mortalidad, coincidiendo con lo argumentado por Coutinho *et al.* (2007), al mencionar que *F. circinatum* es el patógeno más importante en plántulas de pino en diferentes partes del mundo. También Gordon *et al.* (2015), reportan especies de *Fusarium* causando daños significativos en plántulas de coníferas, entre ellas a *F. oxysporum* como el más importante causando pudrición del hipocótilo en plántulas del vivero.

Gordon *et al.* (2006) y (2015), señalaron al hongo como el agente causal del “Cancro resinoso” y es considerado de importancia en plantaciones comerciales de muchas especies

de pino, porque causa daños severos y la muerte de árboles en varios países, como Estados Unidos, México, Haití, Chile, Sudáfrica, Japón, España y Francia.

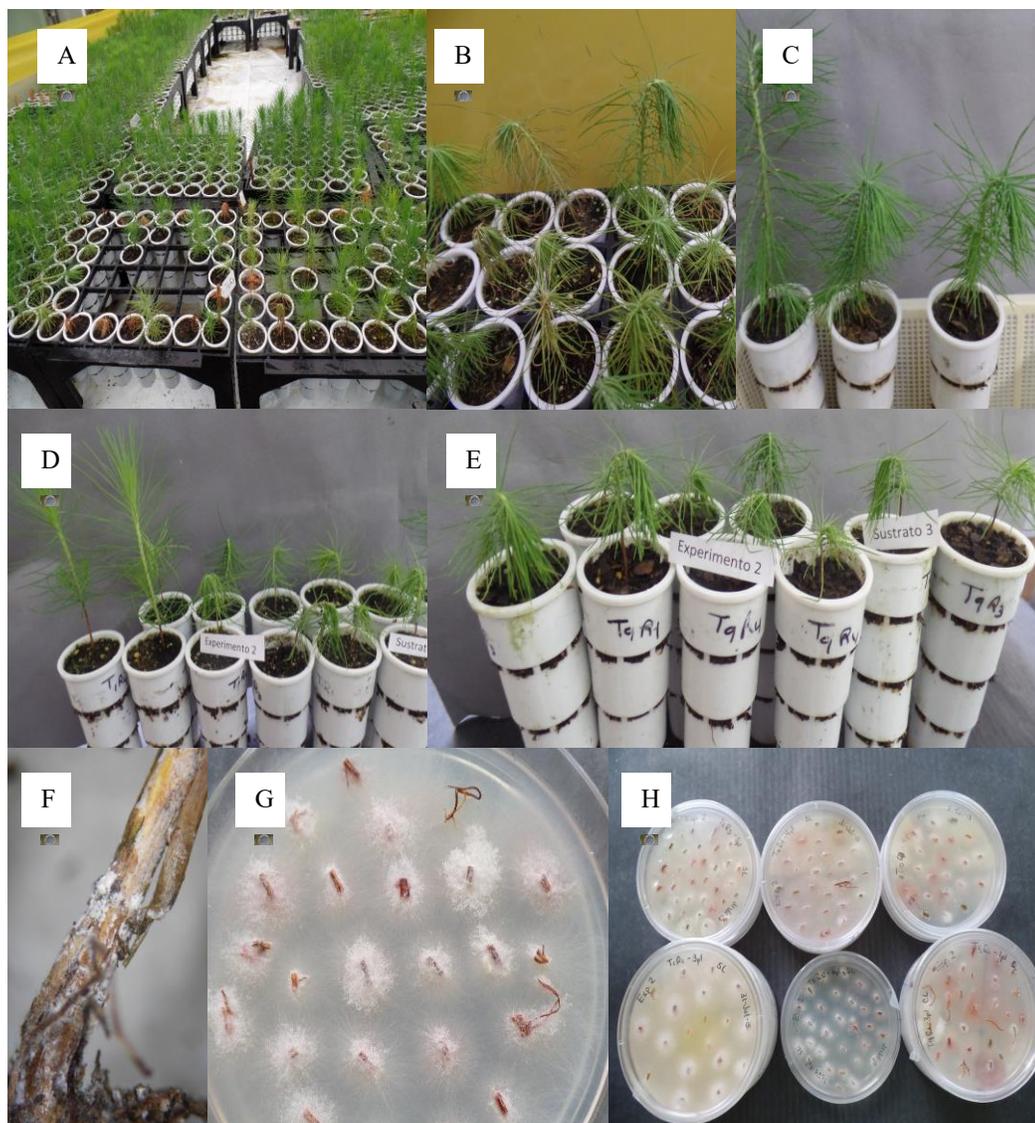


Figura 31. Patogenicidad de *F. circinatum* en plantas de *P. greggii*. **A)** Experimento en invernadero con desarrollo de plántulas de dos meses y medio de edad. **B)** Plántulas de tres meses y medio con marchitez. **C, D y E)** Plantas de tres y cinco meses de edad mostrando síntomas. **F)** Tallo de la planta con micelio. **G y H)** Cepas de los reaislamientos de *F. circinatum*.

Incidencia de *F. circinatum* (Fc) en plántulas de *P. greggii*

Los resultados de este ensayo indican que la mezcla y la proporción en la que se preparan los sustratos, tienen efecto en la incidencia de la enfermedad inducida por *F. circinatum*. Se muestra la importancia de este patógeno; al presentar un efecto directo con la mezcla del sustrato en las primeras cuatro semanas después de la inoculación a *P. greggii*, en el desarrollo de la enfermedad en vivero (Figura 32).

Se observó que las plántulas desarrolladas en el S2 a base de aserrín, presentaron menor incidencia por *F. circinatum*, que aquellas que se desarrollaron en los S1 y S3, sobre todo en las primeras cuatro semanas de crecimiento. En las siguientes nueve semanas, el porcentaje va en incremento siempre con mayor incidencia en el S3 con un 94 % y S1 con un 99%. Los resultados son similares a los reportados por Swett y Gordon (2015), al encontrar una incidencia del 97 %, al inocular *F. circinatum* aislado de pino inoculando plantas de maíz en el sustrato a base de turba de musgo.

El S2 en las siguientes nueve semanas alcanzó solamente el 78 %, esto indica que el sustrato a base de aserrín ayuda a mantener baja la infección por *F. circinatum* en la producción de planta en los viveros y pudiera ser una alternativa a futuro para reducir la incidencia de la enfermedad y adicionalmente reducir costos como lo señala Aguilera *et al.* (2016), al afirmar que los sustratos mezclados con aserrín y corteza de pino se usan con éxito desde 2003 en algunos viveros del Centro de México.

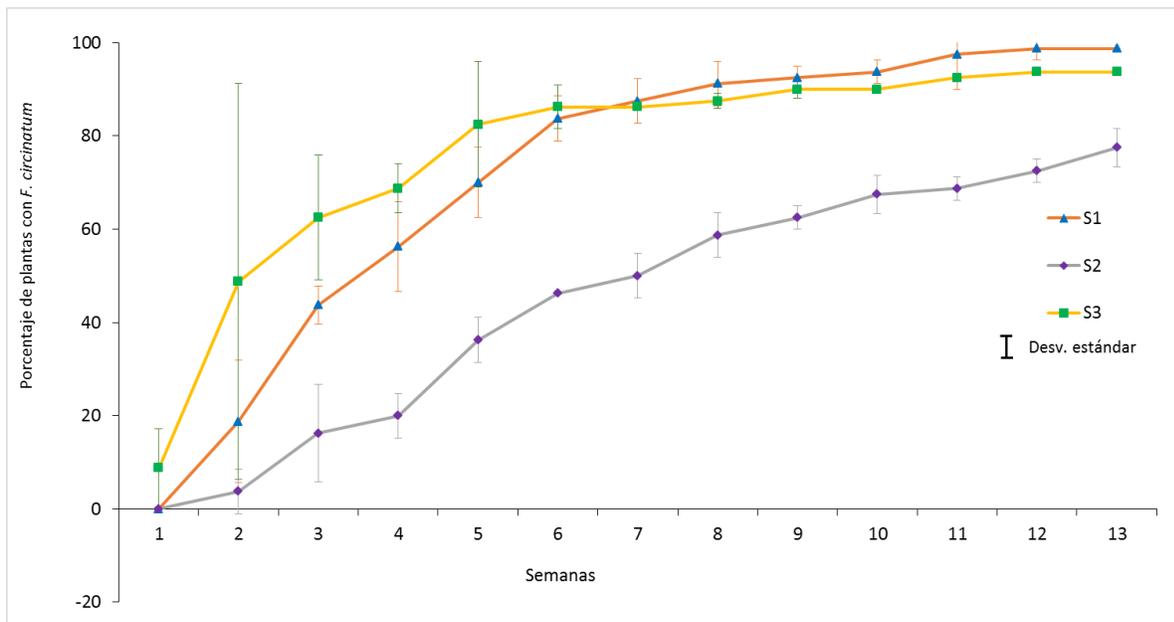


Figura 32. Incidencia semanal de *F. circinatum* en plantas de *P. greggii* creciendo en tres sustratos diferentes: S1 = T2-Fc: turba de musgo, perlita y vermiculita; S2 = T6-Fc: aserrín, corteza y turba de musgo; S3 = T10-Fc: corteza, aserrín y turba de musgo en proporción de 60:20:20.

Uso de *T. harzianum* como biocontrol de *F. circinatum*

Se encontraron bajos niveles de incidencia de plantas enfermas en los sustratos con *T. harzianum* y *F. circinatum* (T1-Fc+Th, T5-Fc+Th y T9-Fc+Th), en comparación con los tratamientos donde se aplicó solo *F. circinatum* (T2-Fc, T6-Fc y T10-Fc). Lo anterior puede deberse a los mecanismos de acción de *Trichoderma* spp., señalados por Mukherjee *et al.* (2013) y Okorski *et al.* (2014), que lo convierten en un agente de biocontrol para enfermedades en plantas. De los tratamientos inoculados con solo *F. circinatum*, el S2 tuvo incidencias más bajas a los 30, 60 y 90 ddi, en comparación con el S1 y el S3, como se

muestra en el Cuadro 10. Es importante probar si *T. harzianum* es capaz de sobrevivir y mantenerse viable para ejercer su antagonismo en este sustrato, tal como lo demuestran Romero *et al.* (2008), al estudiar el comportamiento de una cepa de *T. harzianum* en dos sustratos de uso comercial y encontrando que el sustrato a base de corteza compostada tuvo mayor ufc/ g de sustrato.

También es importante señalar que solo se realizaron tres aplicaciones de *T. harzianum*, se sugiere realizar mayor número de aplicaciones, tal como lo señalan, Mitchell *et al.* (2004), quienes mencionan que las aplicaciones con *T. harzianum* una vez que la plántula ya emergió, se deben continuar durante 180 días. El uso del S2 contribuye a reducir la incidencia de la enfermedad y los tratamientos con *T. harzianum* fueron reconocidos por sus características como biocontrolador de patógenos del suelo (Harman *et al.* 2008).

Cuadro 10. Efecto de *T. harzianum* como biocontrol sobre *F. circinatum* a los 30, 60 y 90 días después de la inoculación en plantas de *Pinus greggii* creciendo en tres sustratos diferentes.

Sustrato	Tratamiento	Incidencia de plantas enfermas (%)		
		30 ddi	60 ddi	90 ddi
S1	T1-Fc+Th	21 b	69 abc	86 abc
	T2-Fc	56 a	91 a	99 a
S2	T5-Fc+Th	15 b	43 c	66 c
	T6-Fc	20 b	61 bc	75 bc
S3	T9-Fc+Th	11 b	64 abc	86 abc
	T10-Fc	69 a	88 ab	93 ab

S1: turba de musgo, perlita y vermiculita; S2: aserrín, corteza y turba de musgo; S3: corteza, aserrín y turba de musgo; con una proporción de materiales 60:20:20 en las tres mezclas. Fc = *Fusarium circinatum* y Th = *Trichoderma harzianum*; ddi = días después de inoculada. Valores promedio en una columna con diferente letra son estadísticamente diferentes con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Es importante señalar que la presente investigación coincide con Cubillos (2011) y Cubillos *et al.* (2016), en sus trabajos con *F. solani* en el cultivo de Maracuyá, donde argumentan que cuando se aplica primero a *T. harzianum* existe una mejor respuesta de biocontrol, que preinfectando las plántulas con el patógeno, sin embargo; también encontró un efecto positivo cuando aplicó primero *F. solani*, esto apoya los resultados obtenidos en la presente investigación (Ezziyyani, *et al.* 2004).

Reglinski y Dick (2005), señalan que la supresión de la enfermedad del “damping-off” fue más eficaz cuando se añadió *Trichoderma* al medio de crecimiento cuatro días antes de la inoculación del patógeno y se hizo ineficaz cuando se añadió cuatro días después de la inoculación. Donoso *et al.* (2008), mencionan que al aplicar *T. harzianum* más compost en plántulas de *Pinus radiata*, el vigor de las plántulas se incrementó.

Mousseaux *et al.* (1998), probaron la patogenicidad con *F. oxysporum* y el uso de *T. harzianum* para control del patógeno, en plántulas de *Pseudotsuga menziesii*, donde obtuvieron mortalidades acumulativas de un 6 % para *T. harzianum*, 70 % para *F. oxysporum* y en la mezcla de ambos hongos un 80 % y en el testigo un 5%. Lo anterior difiere con la presente investigación, ya que en los tratamientos inoculados con *T. harzianum* y el testigo no presentaron mortalidad. Martínez-Álvarez *et al.* (2012), señalan que *T. harzianum* en diluciones de 10^7 , 10^6 , y 10^5 , tuvo un efecto significativo de control contra *F. circinatum* a nivel *in vitro*, pero en plántulas de *Pinus radiata* en vivero no obtuvieron resultados muy claros.

Estándares e índices morfológicos para evaluar plántulas de *P. greggii* con el uso de *T. harzianum* como biocontrol en tres sustratos.

Los valores mayores en diámetro en el cuello de la raíz de las plántulas se obtuvieron en el S1 con los tratamientos T3-Th y T4-Te y el S3 T11-Th y T12-Te (3.11 y 3.17 mm), por lo cual se considerarían plántulas de calidad media. Para obtener una calidad alta de planta el diámetro debió ser mayor a 4 mm (Sáenz *et al.*, 2010). En el S2 T7-Th y T8-Te (2.67 y 2.61 mm) se presentaron los valores más bajos en calidad de plántula (Cuadro 10).

Los tratamientos S1 T3-Th y el T4-Te (27.46 y 28.14 cm) fueron los que permitieron una mayor altura en plántulas, dentro del rango de 15-25 cm que maneja Sáenz *et al.* (2010), para ser considerada de alta calidad. Los S2 T7-Th y T8-Te (20.7 y 17.70 cm) y el S3 T11-Th y T12-Te (22.05 y 21.39 cm) fueron los que arrojaron valores más bajos en altura de plántulas (Cuadro 10). Los resultados coinciden con Castro (2016), para *P. greggii* var. *australis*, en altura y diámetro, donde encontró que el sustrato a base de turba de musgo mostro los mejores crecimientos.

Sin embargo, los valores obtenidos estuvieron por debajo de los mínimos establecidos en los criterios de la Norma Mexicana para la Certificación de la Operación de Viveros Forestales NMX-AA-170-SCFI-2016 (SE, 2016), para *P. greggii*, probablemente por el efecto sombra del invernadero y porque requerían más tiempo en el vivero.

Villar-Salvador (2003), menciona que la altura de la parte aérea y el diámetro en el cuello de la raíz, junto con las características cualitativas son atributos considerados en la calidad de planta, ya que refiere una altura entre 6 y 30 cm y diámetro de 2 mm. En cambio, Prieto y Sáenz (2011), manejan el diámetro del tallo de ≥ 4 mm y una altura de 15 a 25 cm para especies de pinos nativos de la Sierra Madre Occidental.

El peso seco aéreo en los tratamientos S1 T3-Th y T4-Te (1.35 y 1.42 g), presentaron los valores mayores y los S3 T11-Th y T12-Te (1.07 y 1.14 g) y S2 T7-Th y T8-Te (0.96 y 0.78 g), los más bajos. El mayor peso seco de la raíz se encontró en los tratamientos S3 T11-Th y T12-Te (0.42 y 0.43 g), S1 T3-Th y T4-Te (0.37 y 0.43 g) y el de menor peso fue el S2 T7-Th y T8-Te (0.42 y 0.34 g). La relación parte aérea/raíz, más alta se obtuvo con el S1 T3-Th y T4-Te (3.75 y 3-65 g). Los valores más bajos se obtuvieron en el S3 T11-Th y T12-Te (2.60 y 2.71 g) y S2 T7-Th y T8-Te (2.33 y 2.60 g) (Cuadro 10). La biomasa aérea fue mayor que la biomasa subterránea, la cuál debió ser igual para conservar la razón de 1.

El tratamiento S1 T3-Th y T4-Te (8.90 y 8.95 g), cumplió con el índice de esbeltez, pero los S2 T7-Th y T8-Te (7.84 y 6.48 g) y S3 T11-Th y T12-Te (7.37 y 7.11 g) no cumplieron, ya que no alcanzaron el valor ≤ 8 . El índice de calidad de Dickson debe ser de ≥ 0.5 y fue menor en todos los tratamientos al establecido por Dickson como se muestra en el Cuadro 11.

Para los estándares morfológicos podemos decir que no existieron diferencias significativas en los tratamientos donde se aplicó *T. harzianum*, con respecto a los tratamientos que no se les aplicó, lo cual coincide con Donoso *et al.* (2008), en su estudio para ver el efecto de *T. harzianum* y compost sobre el crecimiento de plántulas en *P. radiata* en vivero, tampoco encontró influencia en el crecimiento de las plantas y sólo señala efecto en el área radical, parámetro que no se estudió en la presente investigación.

Cuadro 11. Características morfológicas e índices de calidad de planta de *P. greggii*, a los seis meses de edad.

S	TTO.	D	A	PSA	PSR	RPA/R	IESB	ICD
		mm	cm	g	g			
S1	T3-Th	3.11a	27.46a	1.35a	0.37ab	3.75a	8.90a	0.13bc
S1	T4-Te	3.17a	28.14a	1.42a	0.43a	3.65a	8.95a	0.14ab
S2	T7-Th	2.67b	20.71b	0.96c	0.42a	2.35c	7.84b	0.13bc
S2	T8-Te	2.61b	17.70c	0.78d	0.34b	2.33c	6.84c	0.12c
S3	T11-Th	3.03a	22.05b	1.07bc	0.42a	2.60bc	7.37bc	0.15ab
S3	T12-Te	3.04a	21.39b	1.14b	0.43a	2.71bc	7.11c	0.16a

Valores promedio en una columna con diferente letra son estadísticamente diferentes con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). S = Sustrato, TTO. = Tratamiento, S1 = T3-Th, S1 = T4-Te, S2 = T7-Th, S2 = T8-Te, S3 = T11-Th, S3 = T12-Te. S1: turba de musgo, perlita y vermiculita; S2: aserrín, corteza y turba de musgo; S3: corteza, aserrín y turba de musgo; con una proporción de materiales 60:20:20. Th = inoculada con *T. harzianum*, Te = sin inocular, D = diámetro del tallo; A = altura de la planta; PSA = peso seco de la parte aérea; PSR = peso seco de la raíz; RPA/R = relación aérea/raíz (peso seco aéreo/peso seco radical); IESB=Índice de esbeltez; ICD = Índice de Calidad de Dikson.

En cambio, Romero *et al.* (2008), encontraron un efecto positivo con *T. harzianum* en niveles de un 12 % a un 50 % en altura, diámetro, peso radicular y de la parte aérea. Los resultados reflejan que es necesario realizar más investigación en nuestro país en el área forestal, ya que ha sido más estudiado en el área agrícola (Dumroese *et al.*, 2012). En un reporte de Almaraz-Sánchez *et al.* (2012), señalan seis especies de *Trichoderma* asociadas

al bosque de pino-encino en México y antagonistas a *Phytophthora cinnamomi*, a nivel *in vitro*, reportando a *T. hipocrealixil*, *T. strigosum*, *T. spirale*, *T. longibrachiatum*, *T. citroviridae* y *T. atroviridae* como aislamientos nativos. Sin embargo, Reglinski y Dick (2005), señalan que se debe hacer más investigación con agentes de control biológico y con elicitors de defensa del hospedante como alternativas para disminuir el control químico para enfermedades en sistemas de producción de planta y mencionan tres organismos bajo estudio *Trichoderma*, *Bacillus* y *Pseudomonas*.

CONCLUSIONES

F. circinatum mostró ser patogénico en plántulas de *P. greggii* en los tres sustratos. El sustrato a base de aserrín reduce la incidencia de *F. circinatum* en la producción de plántulas de *P. greggii* en vivero, pero solamente en las cuatro primeras semanas. La aplicación de *T. harzianum* permite reducir los porcentajes de incidencia de *F. circinatum* en la fase de plántulas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Colegio de Postgraduados (COLPOS), gracias a la concesión de una beca de formación de doctorado por CONACyT y al otorgamiento del Fideicomiso 167304, en la modalidad 3, de financiamiento a Proyectos de Investigación 2013.

LITERATURA CITADA

- Aguilera-Rodríguez, M., A. Aldrete, T. Martínez-Trinidad, y V. M. Ordaz-Chaparro. 2016. Producción de *Pinus montezumae* Lamb. con diferentes sustratos y fertilizantes de liberación controlada. *Agrociencia* 50:107-118.
- Almaraz-Sánchez, A. D. Alvarado-Rosales, B. Tlapal-Bolaños, y D. Espinoza-Victoria, 2012. Identificación de hongos antagonistas a *Phytophthora cinnamomi* Rands en bosques de encino del Arrayanal, Colima y Tecoaapa, Guerrero. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 18(3): 341-355.
- Benítez, T., A. M. Rincón, A. C. Limón, and C. Codón. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* Strains. *International Microbiology* 7: 249-260.
www.im.microbios.org
- Castro G., S. L. 2016. Crecimiento de *Pinus greggii* var. *australis* en vivero, con diferentes sustratos, formas de fertilización y tipo de envase. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. 173 p.
- Coutinho, T. A., E. T. Steenkamp, K. Mongwaketsi, M. Wilmot, and M. J. Wingfield. 2007. First outbreak of pitch canker in a South African pine plantation. *Australasian Plant Pathology* 36: 256-261.
- Cubillos J. A., A. Páez, y D. E. L. Mejía. 2011. Evaluación de la Capacidad Biocontroladora de *Trichoderma harzianum* Rifai contra *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Asociado al Complejo “Secadera” en Maracuyá. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín* 64 (1): 5821-5830.

- Cubillos J. A., A. Páez, N. Valero, L. Mejía y R. Gamez. 2016. Efecto biocontrolador de *Trichoderma harzianum* frente a *Fusarium oxysporum* causante de la secadera del maracuyá en la zona bananera del Magdalena, Colombia. *Fitopatología Colombiana* 32 (1): 19-23.
- Cummings, N., and R. Hill. 2016. Persistence of *Trichoderma* in nursery and forest plantations. Bio-protection Research Centre. 15 p.
- Chet, I., J. Inbar, and I. Hadar. 1997. Fungal antagonist and mycoparasites. In: D.T. Wicklow and B. Söderström (eds.). *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. pp. 165-184.
- Desender, S., D. Andrivon, and F. Val. 2007. Activation of defence reactions in Solanaceae: where is the specificity. *Cellular Microbiology* 9: 21-30.
- Dickson, A., A.L. Leaf, and J.F. Hosner. 1960. Quality appraisal of white spruce and white pine seedlings stock in nurseries. *For. Chron.* 36: 10-13.
- Donoso, E., G. A. Lobos, and N. Rojas. 2008. Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crecimiento de plántulas de *Pinus radiata* en vivero. *Bosque* 29 (1): 52-57.
- Dumroese, R. K., Kim Mee-Sook, and R. L. James. 2012. *Fusarium oxysporum* protects Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) seedlings from root disease caused by *Fusarium commune*. *Plant Pathology Journal.* 28 (3): 311-316.
- Ezziyyani M., S. C. Pérez, A. A. Sid, M. E. Requena y M. E. Candela. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). *Anales de Biología* 26: 35-45.
- Geiser, D. M., M. L. L. Ivey, G. Hakiza, J. H. Juba, and S. A. Miller. 2005. *Gibberella xylarioides* (anamorph: *Fusarium xylarioides*), a causative agent of coffee wilt

- disease in Africa, is a previously unrecognized member of the *G. fujikuroi* species complex. *Mycologia* 97: 191-201. Doi: 10.3852/mycologia.97.1.191
- Gordon, T. R., S. C. Kirkpatrick, B. J. Aegerter, D. L. Wood, and A. J. Storer. 2006. Susceptibility of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) to pitch canker, caused by *Giberella circinata* (anamorpho = *Fusarium circinatum*). *Plant Pathol.* 55: 231-237.
- Gordon, T. R., C. L. Swett, and M. J. Wingfield. 2015. Management of *Fusarium* diseases affecting conifer. *Crop Protection.* 73: 28-39.
- Harman, G. E., T. Björkman, K. Ondik, and M. Shores. 2008. *Trichoderma* spp. for biocontrol. Changing paradigms on the mode of action and uses of *Trichoderma* spp., for biocontrol. Research Information. Cornell University, USA. 6 p. doi: 10.1564/19feb00
- Herron, D. A., M. J. Wingfield, B. D. Wingfield, C. A. Rodas, S. Marinowitz and E. T. Steenkamp. 2015. Novel taxa in the *Fusarium fujikuroi* species complex from *Pinus* spp. *Studies in mycology* 80: 131-150.
- Hernandez-Zarate, L., A. Aldrete, V. M. Ordaz-Chaparro, J. López-Upton y M. A. LópezLópez. 2014. Crecimiento de *Pinus montezumae* Lamb. en vivero influenciado por diferentes mezclas de sustratos. *Arociencia* 48: 627-637.
- Infante D., B. Martínez, N. González y Y. Reyes. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos Fitopatógenos. *Rev. Protección Veg.* 24(1): 14-21. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002&lng=es.

- James, R. L. 2003. Comparing three methods of assaying soil *Fusarium* and *Trichoderma* populations for integrated pest management in forest nurseries. Forest: Health Protection. Report 03-3 Northern Region. USDA. Forest Service. 9 p.
- Martínez-Álvarez, P., F. M. Alves-Santos, and J. J. Diez. 2012. In vitro and in vivo interactions between *Trichoderma viride* and *Fusarium circinatum*. Silva Fennica 46: 303-316.
- Mitchell, R. G., J. B. Zwolinski, N. Jones, and T. Coutinho. 2004. The effect of applying prophylactic measures on the post-planting survival of *Pinus patula* in South Africa. Southern African Forestry Journal. 200: 51-58.
- Mousseaux, M.R., R. K. Dumroese, R. L. James, D. L. Wenny, and G. R. Knudsen. 1998. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biological control of *Fusarium oxysporum* in container-grow Douglas-fir seedlings. New Forests 15: 11-21.
- Mukherjee, P.K., B.A. Horwitz, U.S. Singh, M. Mukherjee, and M. Schmoll. 2013. *Trichoderma* Biology and Applications. CABI. USA. 237 p.
- Okorski, A., T. Oszako, J. A. Nowakowska, and Pszczółkowska. 2014. The possibilities of biologically protecting plants against diseases in nurseries, with special consideration of Oomycetes and *Fusarium* fungi. Forest Research Papers 75 (3): 301-321.
- Peterson, M. 2008. *Fusarium* species-a British Columbia perspective in forest seedling production. In: Dumroese, R.K., Riley L. E. (technical coordinators). National Proceedings: Forest and Conservation Nursery Associations 2007. Fort Collins (CO): USDA Forest Service. Rocky Mountain Research Station 57: 109-125.

- Prieto R., J.A., y J. T. Sáenz R. 2011. Indicadores de calidad de planta en viveros forestales de la Sierra Madre Occidental. Libro Técnico Campo Experimental Valle del Guadiana. Centro de Investigación Regional Norte Centro. INIFAP. Durango, Dgo., México. (3): 210 p.
- Reglinski, T., and M. Dick. 2005. Biocontrol of forest nursery pathogens. *New Zealand Journal of Forestry* 50: 14-21.
- Robles C. A., C. R. Gómez, R. F. Macas, R. A. Sánchez, y R. Torres-Gutiérrez. 2014. Estudio de la patogenicidad de aislados de *Fusarium* spp., asociados a la marchitez vascular del babaco en Loja-Ecuador. *Centro de Biotecnología* 3 (2): 61–71 p.
- Romero G., A. Crosara, y A. Braibar, 2008. *Trichoderma harzianum* un biocontrol y biopromotor en vivero de especies forestales. *Ciencia e Investigación Forestal* 14 (2): 335-345.
- Sáenz R.J.T., F.J. Villaseñor, R. H.J. Muñoz, F. A. Rueda, S. J. A. Prieto, R. 2010. Calidad de planta en viveros forestales de clima templado en Michoacán. Folleto técnico No. 17. SAGARPA-INIFAP-CIRPAC- Campo Experimental Uruapan. Uruapan, Michoacán. 48 p.
- SAS Intitute. 2002. The SAS system for windows. Release 9.0. SAS Institute. Cary, NC.
- Secretaría de Economía (SE). 2016. Norma Mexicana NMX-AA-170-SCFI-2016. Certificación de la operación de viveros forestales. Diario Oficial de la Federación. 07 de diciembre de 2016. Ciudad de México, México. 172 p.
- Soria, S., R. Alonso, and L. Bettucci. 2012. Endophytic bacteria from *Pinus taeda* L. as biocontrol agents of *Fusarium circinatum* Nirenberg y O'Donnell. *Chilean Journal of Agricultural Research* 72 (2): 281-284.

- Solano B. M., y C. D. Brenes. 2012. Evaluación de métodos de curación de sustratos para la prevención del mal de talluelo. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú* 9 (2): 63-65.
- Steenkamp, E. T., Rodas, C.A., Kvas, M. J. Wingfield. 2012. *Fusarium circinatum* and pitchcaner of *Pinus* in Colombia. *Australasian. Plant Pathology* 41: 483-491. doi:10.1007/S13313-012-0120-2.
- Swett, C. L., and Gordon, T. R. 2015. Endophytic association of the pine pathogen *Fusarium circinatum* with corn (*Zea mays*). *Fungal Ecology*. 13: 120-129.
- Thompson, B.E. 1985. Seedling morphological evaluation-what you can tell by looking. *In*: Duryea, M.L. (ed.). *Evaluating seedling quality: principles, procedures, and predictive abilities of major tests*. Proceedings of a workshop held. Forest Research Laboratory. Oregon State University. pp. 59-71.
- Toral I., M. 1997. Conceptos de calidad de plantas en viveros forestales. Documento Técnico 1. Ciclo Económico Forestal. Programa de Desarrollo Forestal Integral de Jalisco. Guadalajara, Jal. México. 28 p.
- Villar-Salvador, P. 2003. Importancia de la calidad de planta en los proyectos de revegetación. *In*: Restauración de ecosistemas mediterráneos. Rey-Benayas, J.M., Espigares-Pinilla, T., y Nicolau-Ibarra, J. M. (eds.). Universidad de Alcalá pp 65-86.

ANEXOS

ANEXO I. Medios de cultivo

Papa-dextrosa-agar (PDA)

Se lavan y pelan 250 g de papa natural, se cortan en cuadros y se ponen a hervir con agua destilada hasta el punto de cocción. El líquido se filtra en una gasa doble a un nuevo matraz; se agregan 20 g de dextrosa, 20 g de agar, y se afora con agua destilada a 1 L. El medio se esteriliza a 120 °C durante 20 minutos en una olla exprés o en autoclave. Se pueden adicionar 0.05 g de sulfato de estreptomicina para disminuir el riesgo de contaminación con bacterias.

Agar hoja de clavel (CLA; Singleton, Mihail y Rush, 1992)

Previamente, se cortan hojas frescas de clavel de diferentes tamaños según el diámetro de la caja. Los trozos de hoja se esterilizan a 120 °C y se secan en una estufa a 70 °C durante 3 horas. Para el medio sólido se utilizan 20 g de agar, se afora a 1 L y se esteriliza como se mencionó anteriormente. Una vez que el medio se vacía en cajas Petri, se colocan de 3 a 6 trozos de hoja de clavel.

Papa-dextrosa-agar + Tergitol-Sulfato de estreptomicina (PDA-TS)

Se prepara medio de cultivo PDA como se indicó al principio con el medio PDA. Se añaden 2 mL de Tergitol y 0.05 g de sulfato de estreptomicina antes de vaciar a las cajas petri cuando el medio está tibio para evitar que se inhiba el efecto de las sustancias.

Agua agar 2%

Este medio se emplea generalmente para la germinación de conidios de hongos. Se prepara agregando 20 g de agar y se afora a 1 L y se esteriliza a 120 °C.

Spezieller Nährsofamer Agar (SNA; Nirenberg y O`Donnell,1998)

KH₂ PO₄ 1.0 gr., KNO₃ 1.0 gr, MgSO₄ 7H₂O 0.5 gr., KCl 0.5 gr., glucosa 0.2 gr, sacarosa 0.2 gr., agar 23.0 gr y NaOH 1N 0.6 mL, agua destilada 1000 ml, poner en la olla exprés o en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Esperar enfriar y vaciar a las cajas petri.

Medio Komada (Su *et al.*, 1978)

D-Galactosa 10 g, L_asparagine 2 g, KH₂ PO₄ 1 g, KCl 0.5 g, MgSO₄.7H₂O 0.5 g, FeNa EDTA 10 mg, Agar 20 g y agua destilada 900 mL. Ajustar a pH de 3.8 con ácido fosfórico al 10 %, Adicionar 100 mL de solución esterilizada, sulfato de estreptomicina 0.3 g, Oxgal (0.5 g, Na₂B₄O₇ 75 % PH) 0.9 g.

ANEXO II. Comparación y búsqueda de secuencias consenso en el GenBank mediante la herramienta BLAST con el marcador molecular ITS.

No.	Clave del aislamiento	Secuencia más relacionada en GenBank	Cobertura	Máxima Identidad (%)
1	SF1	<i>Gibberella circinata</i>	100	100
		GenBank: FJ744110.1		
2	SF2	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	100
		GenBank: KR094464.1		
3	SF3	NA	NA	NA
4	SF4	<i>Gibberella circinata</i>	100	100
		GenBank: FJ744110.1		
5	SF5	<i>Gibberella circinata</i>	100	100
		GenBank: FJ744110.1		
6	SF6	<i>Fusarium temperatum</i>	99	100
		GenBank: KC179826.1		
7	SF7	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	100	99
		GenBank: EU552110.1		
8	SF8	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	100
		GenBank: KR094464.1		
9	SF9	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	100	100
		GenBank: KF576628.1		
10	SF10	NA	NA	NA
11	SF11	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	100
		GenBank: FN868470.1		
12	SF12	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	100
		GenBank: KR094464.1		
13	SF13	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	100
		GenBank: FN868470.1		
14	SF14	<i>Fusarium avenaceum</i>	100	100
		GenBank: KP265371.1		
15	SF15	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	100	100
		GenBank: KF576628.1		
16	SF16	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	100
		GenBank: KR094464.1		
17	SF17	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	100	100
		GenBank: KF576628.1		
18	SF18	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	100	100

		GenBank: KF576628.1		
19	SF19	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	100
		GenBank: FN868470.1		
20	SF20	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	100	100
		GenBank: KF576628.1		
21	SF21	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: KC464619.1		
22	SF22	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	100	99
		GenBank: KF576628.1		
23	SF23	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	100
		GenBank: FN868470.1		
24	SF24	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	100	100
		GenBank: KF576628.1		
25	SF25	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	100
		GenBank: FN868470.1		
26	SF26	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	100	100
		GenBank: KF576628.1		
27	SF27	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	100	100
		GenBank: KF576628.1		
28	SF28	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	100
		GenBank: FN868470.1		
29	SF29	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	100	100
		GenBank: KF576628.1		
30	SF30	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	100
		GenBank: FN868470.1		
31	SF31	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	100
		GenBank: KT794176.1		
32	SF32	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	100
		GenBank: KT794176.1		
33	SF33	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	100
		GenBank: KT828536.1		
34	SF34	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	100	100
		GenBank: KF576628.1		
35	SF35	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	99
		GenBank: FJ867936.1		
36	SF36	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: KC464619.1		
37	SF37	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: KC464619.1		
38	SF38	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	100
		GenBank: FN868470.1		

39	SF39	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	99
		GenBank: FJ867936.1		
40	SF40	<i>Fusarium sterilihyphosu</i>	100	100
		GenBank: KF576628.1		
41	SF41	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	100	100
		GenBank: KF576628.1		
42	SF42	<i>Fusarium succisae</i>	100	100
		GenBank: KC464634.1		
43	SF43	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	100
		GenBank: FN868470.1		
44	SF44	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	100
		GenBank: FN868470.1		
45	SF45	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	100	100
		GenBank: KF576628.1		
46	SF46	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	100	100
		GenBank: KF576628.1		
47	SF47	NA	NA	NA
48	SF48	<i>Fusarium succisae</i>	100	100
		GenBank: KC464634.1		
49	SF49	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	100	100
		GenBank: KF576628.1		
50	SF50	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	100	100
		GenBank: KF576628.1		

ANEXO III. Comparación y búsqueda de secuencias consenso en el GenBank mediante la herramienta BLAST con el marcador molecular TEF.

No.	Clave del aislamiento	Secuencia más relacionada en GenBank	Cobertura	Máxima Identidad (%)
1	SF1	<i>Fusarium succisae</i>	100	99
		GenBank: KU171732.1		
2	SF2	<i>Fusarium oxysporum</i>	98	99
		GenBank: KP009007.1		
3	SF3	NA	NA	NA
4	SF4	<i>Bionectriaceae sp.</i>	99	100
		GenBank: AB294853.1		
5	SF5	<i>Fusarium succisae</i>	100	99
		GenBank: KU171732.1		
6	SF6	<i>Fusarium succisae</i>	100	99
		GenBank: KU171732.1		
7	SF7	<i>Fusarium succisae</i>	100	99
		GenBank: KU171732.1		
8	SF8	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	99
		GenBank: KP009007.1		
9	SF9	<i>Fusarium succisae</i>	100	99
		GenBank: KU171732.1		
10	SF10	NA	NA	NA
11	SF11	<i>Fusarium succisae</i>	98	99
		GenBank: KU171732.1		
12	SF12	<i>Fusarium oxysporum</i>	98	99
		GenBank: KP009007.1		
13	SF13	<i>Fusarium succisae</i>	100	99
		GenBank: KU171732.1		
14	SF14	<i>Fusarium avenaceum</i>	100	99
		GenBank: KM189442.1		
15	SF15	<i>Fusarium succisae</i>	100	99
		GenBank: KU171732.1		
16	SF16	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	99
		GenBank: KP009007.1		
17	SF17	<i>Fusarium succisae</i>	100	99
		GenBank: KU171732.1		
18	SF18	<i>Fusarium succisae</i>	100	99

		GenBank: KU171732.1		
19	SF19	<i>Fusarium succisae</i> GenBank: KU171732.1	100	99
20	SF20	<i>Fusarium succisae</i> GenBank: KU171732.1	100	99
21	SF21	<i>Fusarium succisae</i> GenBank: KU171732.1	100	99
22	SF22	<i>Fusarium succisae</i> GenBank: KU171732.1	100	99
23	SF23	<i>Fusarium succisae</i> GenBank: KU171732.1	100	99
24	SF24	<i>Fusarium succisae</i> GenBank: KU171732.1	100	99
25	SF25	<i>Fusarium succisae</i> GenBank: KU171732.1	100	99
26	SF26	<i>Fusarium succisae</i> GenBank: KU171732.1	100	99
27	SF27	<i>Fusarium succisae</i> GenBank: KU171732.1	100	99
28	SF28	<i>Fusarium succisae</i> GenBank: KU171732.1	100	99
29	SF29	<i>Fusarium succisae</i> GenBank: KU171732.1	98	99
30	SF30	<i>Fusarium succisae</i> GenBank: KU171732.1	100	99
31	SF31	<i>Fusarium oxysporum</i> GenBank: KP009007.1	100	99
32	SF32	<i>Fusarium oxysporum</i> GenBank: KP009007.1	100	99
33	SF33	<i>Fusarium oxysporum</i> GenBank: KP009007.1	100	99
34	SF34	<i>Fusarium succisae</i> GenBank: KU171732.1	100	99
35	SF35	<i>Fusarium succisae</i> GenBank: KU171732.1	98	99
36	SF36	<i>Fusarium succisae</i> GenBank: KU171732.1	100	99
37	SF37	<i>Fusarium succisae</i> GenBank: KU171732.1	100	99
38	SF38	<i>Fusarium succisae</i> GenBank: KU171732.1	98	99

39	SF39	<i>Fusarium succisae</i>	98	99
		GenBank: KU171732.1		
40	SF40	<i>Fusarium succisae</i>	100	99
		GenBank: KU171732.1		
41	SF41	<i>Fusarium succisae</i>	100	99
		GenBank: KU171732.1		
42	SF42	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	99
		GenBank: KP009007.1		
43	SF43	<i>Fusarium succisae</i>	99	99
		GenBank: KU171732.1		
44	SF44	<i>Fusarium succisae</i>	100	99
		GenBank: KU171732.1		
45	SF45	<i>Fusarium succisae</i>	100	99
		GenBank: KU171732.1		
46	SF46	<i>Fusarium succisae</i>	97	99
		GenBank: KU171732.1		
47	SF47	NA	NA	NA
48	SF48	<i>Fusarium succisae</i>	100	99
		GenBank: KU171732.1		
49	SF49	<i>Fusarium succisae</i>	98	99
		GenBank: KU171732.1		
50	SF50	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	99
		GenBank: KP009007.1		

ANEXO IV. Comparación y búsqueda de secuencias consenso en el GenBank mediante la herramienta BLAST con el marcador molecular IGS.

No.	Clave del aislamiento	Secuencia más relacionada en GenBank	Cobertura	Máxima Identidad (%)
1	SF1	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: AY249403.1		
2	SF2	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	100
		GenBank: HM057270.1		
3	SF3	NA	NA	NA
4	SF4	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: AY249403.1		
5	SF5	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: AY249403.1		
6	SF6	<i>Fusarium subglutinans</i>	100	99
		GenBank: HQ165883.1		
7	SF7	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: AY249403.1		
8	SF8	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	98
		GenBank: KJ433941.1		
9	SF9	<i>Fusarium subglutinans</i>	100	99
		GenBank: KC894687.1		
10	SF10	NA	NA	NA
11	SF11	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: AY249403.1		
12	SF12	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	100
		GenBank: HM057270.1		
13	SF13	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: AY249403.1		
14	SF14	<i>Fusarium avenaceum</i>	80	96
		GenBank: HQ165901.1		
15	SF15	<i>Fusarium circinatum</i>	100	99
		GenBank: AY249403.1		
16	SF16	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	96
		GenBank: FJ883651.1		
17	SF17	<i>Fusarium circinatum</i>	100	99
		GenBank: AY249403.1		
18	SF18	<i>Fusarium circinatum</i>	100	99

		GenBank: AY249403.1		
19	SF19	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: AY249403.1		
20	SF20	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: AY249403.1		
21	SF21	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: AY249403.1		
22	SF22	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: AY249403.1		
23	SF23	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: AY249403.1		
24	SF24	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: AY249403.1		
25	SF25	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: AY249403.1		
26	SF26	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: AY249403.1		
27	SF27	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: AY249403.1		
28	SF28	<i>Fusarium circinatum</i>	100	99
		GenBank: AY249403.1		
29	SF29	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: AY249403.1		
30	SF30	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: AY249403.1		
31	SF31	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	99
		GenBank: KJ672101.1		
32	SF32	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	99
		GenBank: KJ672101.1		
33	SF33	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	99
		GenBank: KJ672101.1		
34	SF34	<i>Fusarium circinatum</i>	100	99
		GenBank: AY249403.1		
35	SF35	<i>Fusarium circinatum</i>	100	99
		GenBank: AY249403.1		
36	SF36	<i>Fusarium circinatum</i>	100	99
		GenBank: AY249403.1		
37	SF37	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: AY249403.1		
38	SF38	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: AY249403.1		

39	SF39	<i>Fusarium circinatum</i>	100	99
		GenBank: AY249403.1		
40	SF40	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: AY249403.1		
41	SF41	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: AY249403.1		
42	SF42	<i>Fusarium subglutinans</i>	100	99
		GenBank: KC894687.1		
43	SF43	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: AY249403.1		
44	SF44	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: AY249403.1		
45	SF45	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: AY249403.1		
46	SF46	<i>Fusarium circinatum</i>	100	100
		GenBank: AY249403.1		
47	SF47	NA	NA	NA
48	SF48	<i>Fusarium circinatum</i>	100	99
		GenBank: AY249403.1		
49	SF49	<i>Fusarium circinatum</i>	100	99
		GenBank: AY249403.1		
50	SF50	<i>Fusarium bulbicola</i>	100	100
		GenBank: AY249395.1		