

24 232

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO

DE BIOLOGA PRESENTA:

CARMEN VELAZQUEZ CRUZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE CUADROS

1.	INTRODUCCION	1
2.	ANTECEDENTES	
	2.1 Ciclo del cultivo	3
	2.2 Enfermedades del trigo	5
3.	MATERIALES Y METODOS	
3.1	DESCRIPCION DEL TRABAJO DE CAMPO	
	3.1.1 Características de las localidades y de los lotes experimentales	10
	3.1.2 Toma de las muestras de suelo	12
	3.1.3 Toma de las muestras de raíz	13
3.2	DESCRIPCION DEL TRABAJO DE LABORATORIO	
	3.2.1 Aislamiento de la micoflora del suelo	15
	3.2.2 Aislamiento de la micoflora de la raíz	16
	3.2.3 Purificación e identificación de cepas	17
	3.2.4 Prueba de patogenicidad	19
4.	RESULTADOS Y DISCUSION	
	4.1 Descripción de especies fitopatógenas	20
	4.2 Distribución de especies fitopatógenas	35
	4.3 Prueba de patogenicidad	41
5.	CONCLUSIONES	42
6.	BIBLIOGRAFIA	43
7.	APENDICE	
	7.1 Medios para aislamiento de suelo	48
	7.2 Medios para aislamiento de raíz	49
	7.3 Técnicas especiales de conservación	51
	7.4 Otras especies identificadas	53

LISTA DE FIGURAS

Fig.

1.	División regional del Estado de México	11
2.	Escala de Zadoks	14
3.	Cultivo puro de <u>Pythium torulosum</u> en V8	29
4.	Cultivo puro de <u>P. torulosum</u> en G14	29
5.	Zoosporangio de <u>P. torulosum</u>	29
6.	Oospora de <u>P. torulosum</u>	29
7.	Anteridio de <u>P. torulosum</u>	29
8.	Cultivo puro de <u>Gaeumannomyces graminis</u> en HMA	30
9.	Peritecio de <u>G. graminis</u>	30
10.	Asca de <u>G. graminis</u>	30
11.	Ascosporas de <u>G. graminis</u>	30
12.	Cultivo puro de <u>Rhizoctonia solani</u> en V8	30
13.	Micelio de <u>R. solani</u>	30
14.	Micelio de <u>R. solani</u>	30
15.	Células esclerosadas de <u>R. solani</u>	31
16.	Cultivo puro de <u>Bipolaris</u> sp en V8	31
17.	Conidios y conidióforo de <u>B. sorokiniana</u>	31
18.	Germinación de <u>B. sorokiniana</u>	31
19.	Conidios de <u>B. spiciferum</u>	31
20.	Conidióforo de <u>B. spiciferum</u>	31
21.	Conidios de <u>B. spiciferum</u>	32
22.	Germinación de <u>B. spiciferum</u>	32
23.	Cultivo puro de <u>Fusarium equiseti</u> en PDA	32

24.	Conidio de <u>F. equiseti</u>	32
25.	Conidios de <u>F. equiseti</u>	32
26.	Cultivo puro de <u>F. graminearum</u> en PDA	32
27.	Conidias de <u>F. graminearum</u>	33
28.	Pudrición ocasionada por <u>B. sorokiniana</u>	33
29.	Pudrición ocasionada por <u>G. graminis</u>	33
30.	Pudrición ocasionada por <u>Fusarium</u> spp.	33
31.	Prueba de patogenicidad	33
32.	Espigas blancas	34

LISTA DE CUADROS

1. Distribución espacio-temporal de hongos fitopatógenos aislados de suelo y de raíz de trigo durante el ciclo primavera verano 1988, en cuatro localidades del Estado de México. _____ 39
2. Otras especies identificadas de aislamientos de raíz y de suelo en cuatro localidades del Edo. de México. ___ 53

1. INTRODUCCION.

Los cereales constituyen una parte importante en la dieta humana, y el trigo (triticum aestivum L.), en particular, es uno de los cultivos importantes en todo el mundo. Año con año se ha observado inestabilidad en los rendimientos del trigo (Stubbs et al., 1986), causada por enfermedades. Estas enfermedades pueden ser ocasionadas por hongos, bacterias, virus, micoplasmas, artrópodos y nemátodos.

El suelo juega un papel importante como refugio de muchos patógenos que dañan al cultivo de trigo a nivel radical y aéreo, y algunos sobreviven en los residuos de materia orgánica formando estructuras de resistencia. Se han reportado numerosas especies de hongos fitopatógenos que sobreviven en el suelo y son diseminados por el agua de lluvia o el viento e invaden al cultivo.

El trigo constituye un elemento importante en la economía y en la dieta de México. La producción durante 1987 y 1988 fué de 4,189,972 y 3,452,414 toneladas respectivamente. Los datos estadísticos sobre las importaciones de este grano (INEGI, 1989) hacen concluir la necesidad de incorporar nuevas zonas para el cultivo de este cereal.

Algunos municipios del Estado de México poseen características climáticas adecuadas para la producción de trigo, con rendimientos estimados en 5-6 t/ha (Bell, 1988). Sin embargo, se ha observado en algunas localidades la

presencia de enfermedades que pueden limitar los rendimientos o las posibilidades de expansión del cultivo. Hasta ahora no se han realizado trabajos para identificar los agentes causales de esas enfermedades, de aquí el interés en el presente trabajo que tiene como objetivos:

conocer a través de muestras directas de raíces de trigo y suelo, la micoflora fitopatógena presente en cuatro localidades del Estado de México, así como el conocimiento de los medios de cultivo más adecuados para su aislamiento y purificación.

2. ANTECEDENTES

2.1 CICLO DEL CULTIVO

El desarrollo del trigo comprende varias etapas que se mencionan a continuación:

GERMINACION: En esta etapa la semilla absorbe de 30 a 40 por ciento de su peso en agua; además requiere de buena aereación y una temperatura óptima de 20 a 25⁰ C. El material y la energía necesarios para el crecimiento del embrión, provienen de las reservas acumuladas en el escutelo y el endospermo.

EMERGENCIA: El coleóptilo normalmente emerge siete días después de la siembra. El coleóptilo es un tubo translúcido, que protege la primera hoja al romper la superficie del suelo. A partir de este momento, se inicia la fotosíntesis, y la planta no depende más de las reservas existentes en el grano.

MACOLLAJE: Durante ésta etapa, se incrementa el número de tallos, hojas y raíces. Una vez emergidas las tres primeras hojas, con la cuarta hoja nace el primer macollo, y con la aparición de la quinta hoja viene el segundo macollo. Este proceso dura de treinta a cuarenta días (INTA, 1981). El

número de macollos es muy variable y depende de la variedad y de las condiciones ambientales durante este período.

ALARGAMIENTO DE TALLOS: A partir del macollamiento los tallos crecen muy rápido. Las necesidades de nutrientes, entre otros gas carbónico, agua, nitrógeno y fósforo se incrementan.

ESPIGAZON Y FLORACION: Al aparecer las espigas y alcanzar las plantas su altura máxima, el desarrollo vegetativo se ha completado y comienza la floración. Los productos del proceso de fotosíntesis de la planta se encausan hacia la espiga. Las reservas acumuladas en los tallos y hojas, sobre todo las ubicadas en las partes mas bajas, se movilizan también hacia la espiga. En esta fase de la floración, el trigo resulta mas susceptible a los factores limitantes del ambiente que actúan disminuyendo sobre todo el número de granos por espiga. Algunos de estos factores son temperaturas extremas, exceso o deficit de agua y deficiencia de minerales.

LLENADO Y MADUREZ DEL GRANO: La duración del período comprendido entre la floración y la madurez fisiológica del grano depende principalmente de la variedad. No obstante, puede acortarse o alargarse como respuesta a las condiciones ambientales. El nitrógeno, el fósforo y otros nutrientes necesarios para el crecimiento del grano son absorbidos en

su mayor parte durante ésta fase (INTA,1981). Durante el llenado de grano, las aristas de la espiga así como la hoja bandera juegan un papel importante, en la fotosíntesis y la transpiración. Se estima que un 12 por ciento del peso seco del grano proviene de la actividad asimiladora de las aristas (INTA,1981). La mayor exposición de la hoja bandera a la radiación solar determina que este órgano contribuya con un 25 por ciento del peso seco del grano.

2.2 ENFERMEDADES DE TRIGO

El trigo está expuesto durante su desarrollo a un sinnúmero de organismos que pueden afectar el funcionamiento y el desarrollo normal de la planta. Algunos de estos organismos son causantes de enfermedades que producen en última instancia pérdidas en el rendimiento de la cosecha (Stubbs ,et al.,1986).

Aunque todas las plantas cultivadas están sujetas al ataque de fitopatógenos, la gravedad del daño dependerá del estado de desarrollo del cultivo, de la abundancia y virulencia de los patógenos presentes, y de cuán favorable sea el ambiente.

El suelo es un elemento importante en la diseminación de muchos patógenos que atacan a las plantas a nivel aéreo y

radical; un ejemplo claro es el de Tilletia caries (D.C) Tul., en el norte de Estados Unidos, donde Purdy y Kendrick (1963), al estudiar los factores del ambiente que favorecen la persistencia del patógeno en el suelo, concluyeron que las plantas de trigo son susceptibles a la infección por T. caries a temperaturas de 15-20⁰ C y que las esporas pueden germinar en el suelo a estas temperaturas y alta humedad.

Otros hongos fitopatógenos que habitan en suelo son los pertenecientes al género Helminthosporium que incluye muchos patógenos importantes de los cereales distribuidos ampliamente en todo el mundo. Sus diferentes especies causan varios tipos de lesiones foliares, tales como tizones, rayados, manchas y decoloraciones. Algunos de ellos causan tizón o marchitez de plántulas, pudrición de la raíz, daño a nudos y tallos (Stubbs et al., 1986).

Andersen (1952) estudió el comportamiento de H. sativum Pamel, King & Bakke en trigo, y observó que la germinación de los conidios y el crecimiento óptimo del micelio tenía lugar a 28⁰ C; a esta temperatura y en condiciones de alta humedad, el proceso de infección se cumplió en unas 12 horas.

Henry, (in Tijerina 1963), buscó correlacionar la flora microbiana del suelo con el daño causado por H. sativum en

trigo, y demostró que la micoflora natural del suelo ejerce una acción marcada sobre el crecimiento de H. sativum en el suelo, de tal manera que el hongo puede esporular abundantemente en suelos estériles, y en menor grado en suelos no estériles.

Las diferentes especies de Fusarium provocan dos enfermedades comunes en trigo: la pudrición de la raíz y la roña o tizón de la espiga. La mayoría de estas especies habitan en el suelo. La roña es reconocida porque las espiguillas se necrosan prematuramente, y a medida que madura el cultivo se acumulan masas de conidios de color rosado pálido a naranja en la base de las espiguillas. Las espiguillas enfermas producen granos chupados y no viables (Jones y Clifford, 1983).

Cook (1968), observó pérdidas hasta del 50 por ciento de la población a causa de Fusarium en cultivos de trigo de primavera, ocurriendo también pérdidas en cebada y avena. Los síntomas incluyeron pudrición de la corona, rápida maduración de la parte alta de la planta y coloración rosada en la hoja envainante de la espiga. Más del 90 por ciento de los aislamientos correspondió a la especie F. graminearum Schwabe.

Cook (1980) analizó la problemática que existe en el control de los fitopatógenos de cereales que habitan en el

suelo, y concluyó que el control químico no es viable porque implica un gasto no redituable, por lo cual sugiere el uso de prácticas culturales, así como la selección de variedades resistentes.

Otro género importante de hongos fitopatógenos es Gaeumannomyces que causa pudriciones en raíces de trigo y otros cereales. Generalmente es más destructivo en cultivos de invierno, aunque también lo es en los de primavera. Puede presentarse desde la etapa de plántula en adelante, aunque los síntomas son observados con mayor frecuencia después de la emergencia de las espigas. Las plantas enfermas tienen pudriciones de color café oscuro a negros, en las raíces y partes basales de los tallos (Zillinsky, 1984).

Rhizoctonia causa también una marcada disminución del crecimiento de las plántulas de trigo. Las lesiones son elípticas, de color café claro con márgenes café oscuros en las vainas foliares inferiores (Stubbs et al., 1986).

Waller et al (1986) observaron que las infecciones por R. solani Kuhn resultaban en manchones de tamaños variados. Las plantas que crecieron en estos manchones estaban severamente dañadas a nivel de raíces seminales y presentaban coloraciones café en la corona. Al realizar pruebas de patogenicidad con aislamientos de R. solani en el

invernadero, observaron que las plantas no espigaron, característica que se observó también en los campos dañados.

Sterne y Jones (1978) observaron lesiones en los tallos de cultivos de trigo, causadas por R. solani en cinco localidades de Arkansas. Estos autores observaron que la penetración de la hifa se extendía intra y extracelularmente dentro del tejido epidermal y cortical del tallo.

3 MATERIALES Y METODOS

3.1.1 CARACTERISTICAS DE LAS LOCALIDADES Y DE LOS LOTES EXPERIMENTALES

El trabajo se realizó durante el ciclo primavera-verano de 1988 en cuatro localidades del Estado de México, pertenecientes a la región III Texcoco (Regionalización adoptada por INEGI, 1986)(Fig.1). Las localidades fueron elegidas por el equipo de producción del CIMMYT, para realizar ensayos comparativos de fertilización, de herbicidas, de producción y de variedades. Cada uno de estos ensayos contempló tres repeticiones con sus lotes testigos correspondientes.

La elección de estas localidades, se justificó debido a que la institución lleva a cabo un programa de investigación para conocer los requerimientos óptimos para el cultivo de trigo, tales como selección de variedades para obtener los más altos rendimientos por su mejor adaptación, aplicación de niveles de fertilización y herbicidas adecuados según los requerimientos de cada localidad. El presente trabajo formó parte de esta investigación para dectar los problemas sanitarios potenciales del cultivo.

Las localidades estudiadas pertenecen a los municipios de Juchitepec [Santa Rosa (=R) y Juchitepec (=J)], Ozumba (=O) y Temamatla (=T).

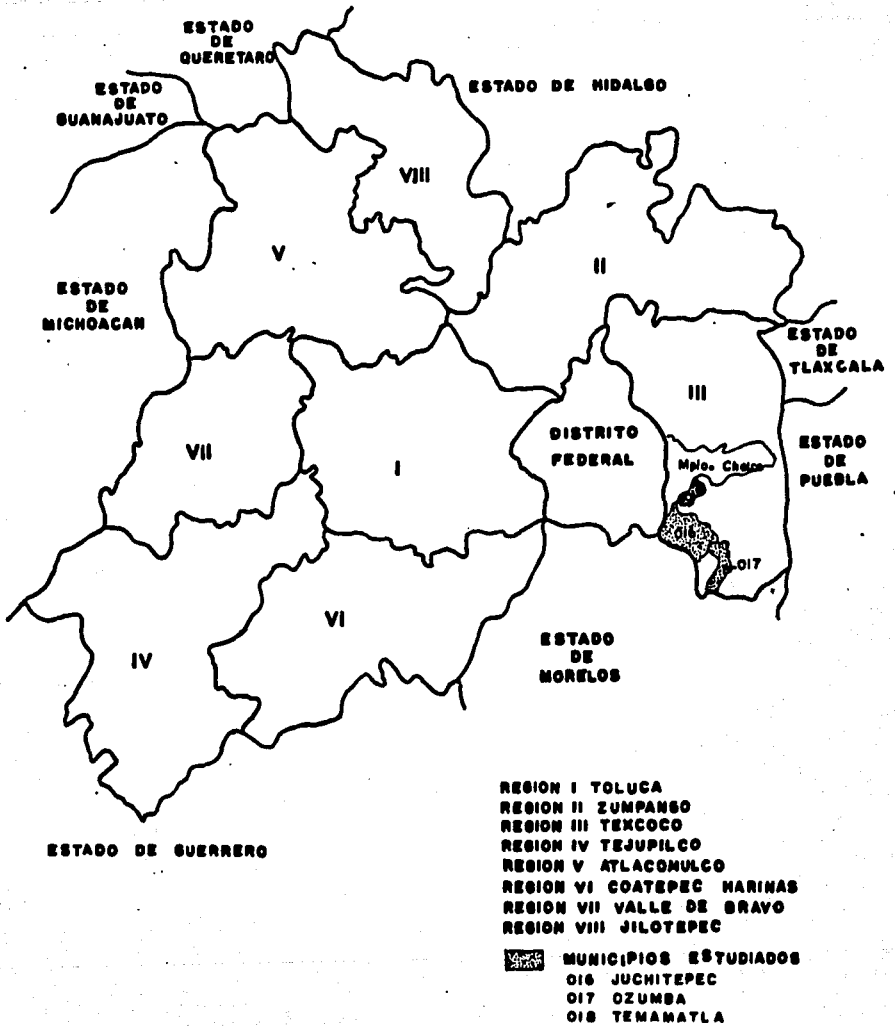


FIG.1. DIVISION REGIONAL DEL ESTADO DE MEXICO (INEGI 1986).

La localidad denominada Juchitepec está a una altura de 2540 msnm, los suelos tiene un pH de 5.8 y una textura arcillosa; la de Ozumba está a 2400 msnm, sus suelos tienen un pH de 6.2 y una textura arcillo-arenosa; la de Sta Rosa está a 2860 msnm, sus suelos tienen un pH de 5.8 y una textura limo-arcillosa; la de Temamatla está a 2280 msnm, los suelos tienen un pH de 6.8 y una textura arcillo-arenosa.

La siembra se llevó a cabo durante el mes de junio, cuando las condiciones de humedad fueron óptimas.

3.1.2 TOMA DE MUESTRAS DE SUELO

La superficie muestreada en cada localidad fué de 2,600 m². con excepción de Ozumba en donde se muestrearon 1,600m², la colectada del suelo se realizó durante el mes de mayo de 1988, antes de la preparación de los terrenos y de la siembra del trigo.

Para cada una de las localidades, se tomaron tres muestras correspondientes al perfil 0-15 cm. y otras tres correspondientes al perfil 15-30 cm. con un peso individual aproximado de 500 g. Esta toma se realizó dividiendo el terreno en tres porciones paralelas, de cada una de las cuales se tomó una muestra para cada uno de los perfiles. Cada muestra fué formada a partir de veinte submuestras

tomadas con una barrena de metal de 3 cm. de diámetro, cubriendo todo el terreno. Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno, las cuales se etiquetaron y guardaron a una temperatura de 4⁰ C hasta su procesamiento, siguiendo la técnica propuesta por Samaniego (1987).

3.1.3 TOMA DE MUESTRAS DE RAIZ

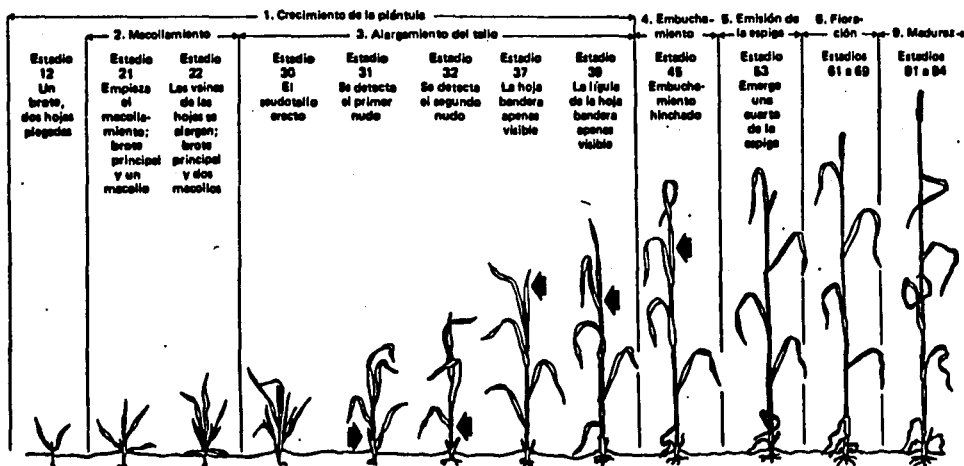
Las muestras se tomaron de los lotes testigo en cinco estadios del cultivo de los noventa propuestos por Zadoks (Fig.2), que se consideraron críticos para aislar patógenos e identificar síntomas de enfermedades.

La primera muestra se colectó cuando mas del 80 por ciento de la población había emergido (estado 12), tomándose al azar tres muestras, cada una formada por diez ejemplares. Las muestras se tomaron evitando dañar las raíces.

La segunda colecta se llevó a cabo cuando las plantas estaban en el estado de macollamiento (estado 21 al 31), de plantas aparentemente sanas o con algún síntoma de enfermedad, como por ejemplo menor tamaño respecto al resto de la población o amarillamiento foliar.

Fig. 2. Descripciones de los estadios principales y secundarios del crecimiento en la escala de Zadoks, de acuerdo con la modificación de Tottman y Makepeace (1979). (obtenida de Eyal et al. 1987)

Codifi- cación	Estadio	Codifi- cación	Estadio	Codifi- cación	Estadio
0	Germinación	28	Brote principal y ocho macollos	6	Fioración
00	Semilla seca	29	Brote principal y nueve macollos o más	61	Comienzo de la fioración
01	Empieza la imbibición			65	Mitad de la fioración completa
03	Imbibición completa	3	Alargamiento del tallo	69	Fioración completa
05	La radícula emerge de la semilla	30	Pseudotallo erecto (sólo cereales de invierno)	7	Estado lechoso
07	El coleoptilo emerge de la semilla	31	Se detecta el primer nudo	71	Madurez acuosa
09	Hoja justo en la punta del coleoptilo	32	Se detecta el segundo nudo	73	Estado lechoso temprano
1	Crecimiento de la plántula	33	Se detecta el tercer nudo	75	Estado lechoso medio
10	Primera hoja emerge del coleoptilo	34	Se detecta el cuarto nudo	77	Estado lechoso tardío
11	Primera hoja desplegada	35	Se detecta el quinto nudo		
12	Dos hojas desplegadas	36	Se detecta el sexto nudo	8	Estado masoso
13	Tres hojas desplegadas	37	Hoja bandera apenas visible	83	Comienzo del estado lechoso
14	Cuatro hojas desplegadas	39	Ligula de la hoja bandera apenas visible	85	Madurez masosa suave (la impresión de la uña no permanece)
15	Cinco hojas desplegadas			87	Madurez masosa dura (la impresión de la uña se mantiene; la testa pierde clorofila)
16	Seis hojas desplegadas	4	Embuchamiento		
17	Siete hojas desplegadas	41	La vaina de la hoja bandera se extiende	8	Maduras
18	Ocho hojas desplegadas	43	Embuchamiento apenas visible	91	Grano duro (difícil de dividir con la uña)
19	Nueve o más hojas desplegadas	45	Embuchamiento hinchado	92	Grano duro (no se puede marcar con la uña)
2	Macollamiento	47	La vaina de la hoja bandera se abre	93	Grano suelto durante el día
20	Sólo el brote principal	49	Las primeras barbas visibles	94	Sobremadurez; paja muerta
21	Brote principal y un macollo	5	Emisión de la espiga	95	Dormancia de la semilla
22	Brote principal y dos macollos	51	La primera espiguilla de la espiga apenas visible	96	Semilla viable germina un 50%o
23	Brote principal y tres macollos	53	Emerge una cuarta parte de la espiga	97	Semilla sin dormancia
24	Brote principal y cuatro macollos	55	Emerge la mitad de la espiga	98	Dormancia secundaria inducida
25	Brote principal y cinco macollos	57	Emergen tres cuartos de la espiga	99	Dormancia secundaria perdida
26	Brote principal y seis macollos	59	Emisión de la espiga completa		
27	Brote principal y siete macollos				



La tercera colecta se realizó cuando mas del 80 por ciento de la población alcanzó la etapa de espigamiento (estado 59 al 69), y las muestras fueron tomadas de plantas sanas o que presentaron síntomas indicativos de la presencia de patógenos.

La cuarta y quinta colectas se realizaron pasada la floración cuando el grano empezaba a formarse y madurar (estado 71 al 79). La realización de dos muestreos en esta etapa se justificó debido a que este período es más prolongado que los anteriores y el ataque por algunos fitopatógenos del suelo se manifiesta y puede ser apreciado con mayor claridad (Jones y Clifford,1983).

Las muestras fueron colectadas en bolsas de papel y guardadas a una temperatura de 4⁰ C hasta su procesamiento, que se llevó a cabo durante la misma semana en que se colectaron las muestras.

3.2 DESCRIPCION DEL TRABAJO DE LABORATORIO

3.2.1 AISLAMIENTO DE LA MICOFLORA DEL SUELO.

Para el aislamiento de la micoflora del suelo, se utilizaron tres medios de cultivo; Agar-Agua (AA)(López,1984), Agar-Glucosa-Rosa de Bengala-Estreptomycina (GRBS) (Echegaray,1966), y Agar jugo V8 (V8)(López,1984).

De cada muestra de suelo se tomaron 10 g y se suspendieron en 100 ml de agua destilada esteril. De esta suspensión se realizaron tres diluciones: 1/100, 1/5000 y 1/10000, bajo condiciones estériles (Echegaray,1966).Cada dilución se sembró en tres cajas de petri de 10 cm de diámetro para cada uno de los tres medios, colocando 1 ml de la dilución correspondiente, y agregando 10 ml de medio de cultivo previamente esterilizado y frío (40-45⁰ C). Las cajas se homogeneizaron con movimientos de rotación y los cultivos fueron incubados a una temperatura de 28⁰ C (Echegaray,1966).

3.2.2 AISLAMIENTO DE LA MICROFLORA DE RAIZ

Las raíces se lavaron con agua corriente durante cuatro horas o mas para quitar el exceso de suelo, y posteriormente se pasaron por una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al uno por ciento durante un minuto en condiciones estériles. Trozos de 5mm de longitud tomados de raíces lesionadas o aparentemente sanas, se sembraron en cajas de petri con medio de Papa-Dextrosa-Agar (PDA)(López, 1984), Glucosa-Asparagina-Agar (GAsp)(Weste, 1963), y Harina de Maíz-Agar (HMA) (Gilchrist, 1989)*; otras se colocaron en cámaras húmedas. Las muestras fueron incubadas a temperaturas de 28⁰ C, Las colonias fungosas que

aparecieron fueron aisladas en los medios en que fueron aislados.

* Gilchrist, L. 1989. CIMMYT. Comunicación personal.

3.2.3 PURIFICACION E IDENTIFICACION DE CEPAS.

La purificación se realizó a través de resiembras continuas en los medios en que habían aparecido, y cuando se presentaron contaminaciones por bacterias se empleó AA con estreptomycinina. Finalmente las cepas fueron transferidas a tubos con PDA o HMA inclinado. Los tubos fueron conservados a una temperatura de 4⁰ C hasta la determinación de los cultivos. La determinación se realizó con base en características tanto macroscópicas de la cepa como microscópicas. Las claves que ayudaron a este propósito fueron las de von Arx (1981), Barnett y Hunter (1972), Barron (1972), Booth (1971), Booth (1977), Domsh (1972), Gerlach y Nirenberg (1982) y Nelson et al. (1983). Una vez que los cultivos estaban determinados a nivel de género se transfirieron a medios de cultivo selectivos para determinar a especie, según se indica en seguida:

GENERO	MEDIO	AUTOR
<u>Bipolaris</u> -----	AA -----	López (1984)
	HMA -----	*Gilchrist (1989)
	PDA -----	López (1984)
	V8 -----	*Gilchrist (1989)
<u>Fusarium</u> -----	AA -----	López (1984)
	HMA -----	*Gilchrist (1989)
	PDA -----	Booth (1971)
<u>Pythium</u> -----	AA -----	Frezzi (1956)
	HMA -----	Frezzi (1956)
	G 1½ -----	Frezzi (1956)
	V8 -----	López (1984)
<u>Gaeumannomyces</u> -----	HMA -----	*Gilchrist (1989)
	Gasp -----	Weste y Thrower (1963)
	PDA -----	López (1984)
<u>Rhizoctonia</u> -----	AA -----	Domch (1972)
	PDA -----	Domch (1972)
	V8 -----	López (1984)

* Gilchrist, L. 1989. CIMMYT. Comunicación personal.

3.2.4 PRUEBA DE PATOGENICIDAD

Se procedió a realizar una prueba para observar la acción de los organismos aislados tanto en suelo como en la raíz y para los cuales existen antecedentes en la literatura de ser especies fitopatógenas de cereales. Se colocaron cuatro semillas de trigo de la variedad Opata-85 previamente desinfectadas en NaClO al cinco por ciento en cultivos jóvenes de los diferentes hongos. Los medios de cultivo y las temperaturas de incubación se seleccionaron según las preferencias de cada patógeno. Los lotes testigo se prepararon de la misma manera que los experimentales pero sin el patógeno correspondiente.

4 RESULTADOS Y DISCUSION

A partir de suelo se obtuvieron 200 aislamientos (Cuadro 1 y 2), de entre los cuales se confirmó la presencia de tres especies fitopatógenas distribuidas de diferente manera en tres de las cuatro localidades. Las especies fitopatógenas aisladas de suelo son: en Santa Rosa Fusarium equiseti y Bipolaris sorokiniana, en Ozumba B. sorokiniana y en Temamatla B. spiciferum

De la raíz se obtuvieron 150 aislamientos (Cuadro 1 y 2), confirmando la presencia de siete especies fitopatógenas: B. sorokiniana, B. spiciferum, F. equiseti, F. graminearum, Gaeumannomyces graminis, Pythium torulosum y Rhizoctonia solani, de las cuales seis se encuentran en Ozumba, seis en Santa Rosa, cuatro en Juchitepec y tres en Temamatla.

Las características que permitieron determinar a especie se muestran a continuación.

4.1 DESCRIPCION DE ESPECIES FITOPATOGENAS

Pythium torulosum Coker y Patterson.

MICELIO: Cenocítico, muy ramificado, de 2.3-4.2 μm de diámetro, ramificación uniforme; la hifa principal es más gruesa que las que se ramifican; apresorios presentes en

cultivos juvenes; el crecimiento en medios con agar es rápido.

En AA el micelio es más ramificado que en otros medios de cultivo, el crecimiento es postrado sin crecimiento aereo. En HMA el micelio es ramificado, postrado con escaso crecimiento aereo; hay formación de oogonios y al transferirse en agua se observan los esporangios. En V8 el micelio es abundante, las colonias tienen aspecto algodonoso (Fig.3), la formación de oogonios es abundante, y la formación de esporangios es escasa. En Glucosa al 1 por ciento (G 1%) el micelio es abundante, postrado, formandose sobre el medio de cultivo una capa gruesa con escaso micelio aereo (Fig.4), con gran cantidad de oogonios y sobre todo con esporangios.

ZOOSPORANGIOS: Lobulados, agregados de apariencia torulosa (Fig.5). Cuando la colonia ha crecido en HMA, V8 o G1% y si se transfiere al agua, se forman abundantes zoosporangios después de 12 hs. Los cultivos que crecen en AA al transferirse en agua forman escasos zoosporangios.

OOGONIOS: Esféricos, lisos, pleróticos y apleróticos, terminales y ocasionalmente intercalares, con diámetro de 12.9-16.38 μm . Oospora esférica, de color amarillo limón y va-cuolada a la madurez (Fig.6).

ANTERIDIOS: De uno a dos por oogonio, los hay monoclinos y diclinos; la célula anteridial es claviforme curvada (Fig.7).

Las características presentadas anteriormente son las descritas por Frezzi (1956). Las características mencionadas por Frezzi difieren levemente de las observadas en este estudio, según Frezzi: a) no hay formación de apresorios en ninguno de los medios de cultivo empleados, sin embargo ahora fueron observados en mayor o menor cantidad en los distintos medios utilizados; b) menciona que sólo hay formación de zoosporangios en medio de AA, sin embargo ahora se observó en todos los medios de cultivo utilizados; c) observó que las oosporas son pleróticas y que los anteridios son monoclinos, sin embargo también fueron observadas oosporas apleróticas con anteridios diclinos, lo que coincide con lo señalado por Hendrix y Papa (1974).

La especie fué aislada de Ozumba a partir de raíz, presentando una ligera coloración amarilla en corona y raíz. La localidad presentó una pendiente adecuada que impidió el estancamiento del agua, razón por la cual posiblemente la especie no causó daños mayores.

Gaeumannomyces graminis (Sacc) v. Arx & Olivier

MICELIO: Septado, de color hialino oliváceo cuando joven, oscureciéndose con la edad hasta llegar a negro. El crecimiento es lento en medio de cultivo con agar. A 20⁰ C en PDA se necesitan dos semanas para cubrir la caja de petri de 10 cm de diámetro y en HMA y GASP basta una semana. El

crecimiento es postrado con escaso crecimiento aereo (Fig.8).

PERITECIOS: La formación de peritecios se obtuvo solamente en HMA. Weste y Thrower (1963) reporta GAsp. como un medio adecuado para la formación de peritecios, sin embargo en este estudio unicamente se observó micelio. Los peritecios aparecieron en cultivos de cuatro semanas y maduraron dos semanas mas tarde. Se caracterizaron por ser café oscuros y redondos u ovoides (Fig.9).

ASCAS Y ASCOSPORAS: Las ascas son cilíndricas y elongadas, rectas o curvadas (Fig.10). Las ascosporas están arregladas en forma paralela, son hialinas, delgadas, curvas, con 3 a 5 septas (Fig.11) y miden de 47-96 x 3 μ m.

Las características observadas son las descritas por Asher y Shipton (1981) y Nilsson (1969) para la especie.

El aislamiento de la especie fué de raíz de las localidades de Juchitepec y Santa Rosa a partir del estado 59, inicialmente sin manifestación a nivel aereo y con una ligera coloración café a nivel radical, sin embargo en el estado 79 la apreciación fué a nivel aereo con la formación de espigas blancas y a nivel radical por el ennegrecimiento de estas (Fig. 29).

Rhizoctonia solani Kuhn.

MICELIO: En medio de cultivo V8 y PDA se forma una capa de micelio aéreo reticulada y flocosa (Fig.12), en AA el crecimiento es lento con escaso crecimiento aéreo, compuesta por hifas gruesas de 5-6 μ m de diámetro, al microscopio se observan células que se ramifican en ángulo recto (Fig.13 y 14). El micelio es hialino cuando joven, y al madurar se torna café oscuro y dá lugar a la formación de esclerocios.

ESCLEROCIOS: Los esclerocios son de forma y tamaño variables; están formados por un conjunto de células cortas de pared gruesa (Fig.15). La formación de esclerocios se observó en cultivos de dos semanas.

Las características presentadas anteriormente, coinciden con lo señalado por Domsch (1972) para esta especie.

La formación de esclerocios es abundante en V8 y AA. En V8 se forman sobre el medio de cultivo y en AA se forman inmersos en el medio; en PDA unicamente se observa micelio abundante.

Los aislamientos fueron de Ozumba y Santa Rosa a partir de raíz en el estado 59, presentó una ligera coloración de amarillo a café en la corona.

Bipolaris sorokiniana (Sacc.) Shoemaker.

=Helminthosporium sativum Pammel, King & Bakke.

MICELIO: septado, de color verde oliváceo a café, en HMA, FDA y V8 el crecimiento de las colonias es rápido, con abundante micelio aéreo, cuando joven el micelio es hialino y después de cuatro días se cambia de oliváceo a café negrusco (Fig.16). En AA el crecimiento es lento con escaso micelio aéreo.

CONIDIOPORO: se desarrollan individualmente, de rectos a flexuosos, largos y no ramificados y algunas veces geniculados.

CONIDIOS: van de rectos a ligeramente curvos, fusiformes a elipsoides; tienen paredes lisas y son de color café oliváceo (Fig.17). Los conidios miden de 43-80 μm ., tienen de 5 a 9 septos, y se desarrollan a partir de poros; al desprenderse dejan una cicatriz basal prominente. La formación de conidios es abundante en todos los medios de cultivo empleados.

La germinación de los conidios es a partir de células terminales (Fig.18), característica que lo coloca dentro del género Bipolaris Shoemaker.

Los aislamientos de suelo fueron de Ozumba y Santa Rosa y de raíz en todas las localidades. La apreciación clara en las raíces fué a partir del estado 21 por presentar lesiones de color café muy intenso en raíces y corona (Fig. 28).

Bipolaris spiciferum Shoemaker, Bainier & Nicot.

=Helminthosporium spiciferum (Bainier) Nicot.

MICELIO: septado, de color olivaceo a café oscuro en HMA, PDA Y V8 el cultivo es aterciopelada, su crecimiento es lento, y se necesitan diez días para cubrir una caja de petri de 10 cm de diámetro a 20⁰ C. En AA se presenta con escaso micelio y crecimiento lento

CONIDIOFORO: son solitarios y raramente forman grupos (Fig.19); son flexuosos, cortos, muy geniculados con cicatrices bien definidas (Fig.20), de color café amarillento a café oscuro.

CONIDIOS: son rectos, con extremos redondeados en su mayoría, miden de 21-38 x 7-11 μ m y son de color café dorado (Fig.21). La germinación de las conidias es a través de células terminales (Fig.22), característica que lo coloca en el género Bipolaris Shoemaker.

Las características anteriores coinciden con lo señalado por Ellis (1972) y Zillinsky (1984) para esta especie.

El medio de AA fue el mejor para apreciar la formación de conidios. En los medios de PDA y V8 se observó crecimiento abundante de micelio y la formación de conidias fue lenta después de dos semanas.

La especie se aisló de suelo de Temamatla y de raíz de Ozumba y Santa Rosa en los estados 71 y 79. Aún cuando

estuvo presente en suelo en la primera localidad no se apreció en raíz en ninguna etapa. En las dos últimas localidades se aisló de los dos últimos estados lo cual indica que penetró después de otras especies.

Fusarium equiseti (Corda) Sacc.

MICELIO: septado, de color hialino, la colonia se inicia blanca y flocosa, después de diez días cambia a color crema y finalmente adquiere una coloración rosada (Fig.23). En AA y CMA forma escaso micelio aereo, con gran cantidad de cinidios, en PDA el micelio es abundante de aspecto algodonoso y pocos conidios.

CONIDIOS: El cultivo produce macroconidios que se desarrollan esparcidas, primero en simples fialides y después en conidióforos. Presentan una célula basal y una célula apical atenuada y curva (Fig.24). Las conidios miden de 28-55 x 4 μm y tienen de 3-7 septas (Fig.25).

CLAMIDOSPORAS: Las clamidosporas son intercalares, terminales, solitarias o en cadena. Estas características concuerdan con lo señalado por Booth (1971 y 1977) para esta especie.

En Temamatla la especie fué aislada a partir de suelo y en raíz en casi todos los estados de desarrollo del cultivo. En las otras localidades la especie se aisló de raíz en los últimos estados de desarrollo del cultivo (Fig.30).

Fusarium graminearum Schwabe.

MICELIO: el micelio es septado, floccoso, abundante, de ligera coloración amarilla cuando joven, y con el tiempo adquiere una coloración rosada (Fig.26). En HMA y PDA se desarrollan rápidamente alcanzando un diámetro de 7-8 cm en cinco días a 28-30⁰ C. En AA el micelio es escaso con abundante formación de macroconidios.

CONIDIOS: sólo forma macroconidios que miden de 30-45 x 2.5-4 µm, son curvadas o rectas. (Fig. 27), y comúnmente tienen de 4-6 septas. Las características anteriores concuerdan con lo señalado por Booth (1971 y 1977) para esta especie.

Es recomendable sembrar Fusarium graminearum en HMA, para caracterizar la cepa, debido a la abundante formación de macroconidias; también el medio de AA es muy eficiente para caracterizar pues permite la formación abundante de macroconidias y clamidosporas.

La especie fué aislada de raíz de todas las etapas de desarrollo y todas las localidades, apreciando en las raíces y corona coloración rosada a partir del estado 69 (Fig. 30).

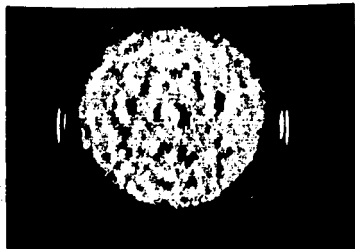


Fig. 3 Cultivo puro de Pythium torulosum en V8.

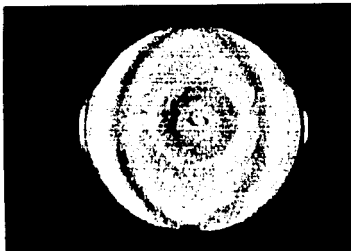


Fig. 4 Cultivo puro de P. torulosum en G 1%.

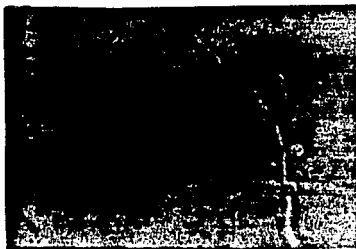


Fig. 5 Zoosporangios de torulosum.

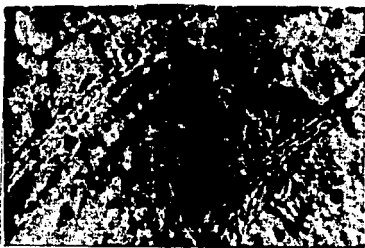


Fig. 6 Oospora de P. torulosum.



Fig. 7 Oogonio y Anteridio de P. torulosum.



Fig. 8 Cultivo puro de Gaeumannomyces graminis en HMA.



fig. 9 Peritecio de G.
graminis.



Fig. 10 Asca de G.
graminis.



Fig. 11 Ascosporas de G.
graminis.

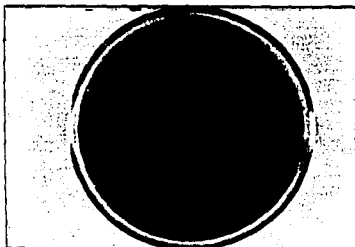


Fig. 12 Cultivo puro de
Rhizoctonia solani en V8.



Fig. 13 Micelio de R.
solani.



Fig. 14 Micelio de R.
solani.



Fig. 15 Células esclerosadas de R. solani.

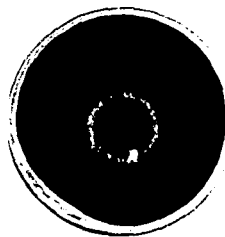


Fig. 16 Cultivo puro de Bipolaris en V8.



Fig. 17 Conidios y conidióforo de B. sorokiniana.

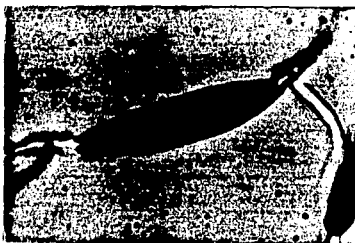


Fig. 18 Germinación de B. sorokiniana.



Fig. 19 Conidios y conidióforos de B. spiciferum.



Fig. 20 Conidióforo de B. spiciferum.



Fig. 21 Conidios de B. spiciferum.



Fig. 22 Germinación de B. spiciferum.

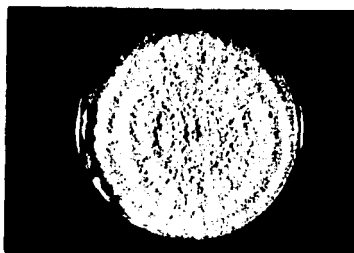


Fig. 23 Cultivo puro de Fusarium equiseti en PDA.

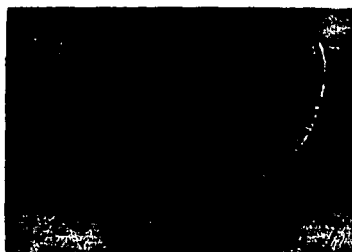


Fig. 24 Conidio de F. equiseti.

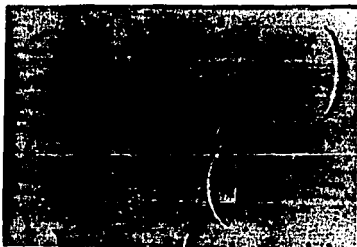


Fig. 25 Conidios de F. equiseti.

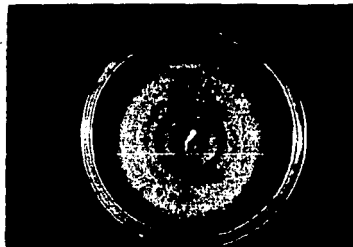


Fig. 26 Cultivo puro de F. graminearum en PDA.



Fig. 27 Conidios de F. graminearum.

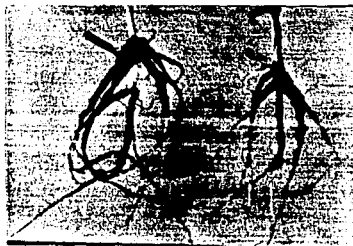


Fig 28 Pudrición ocasionada por B. sorokiniana.

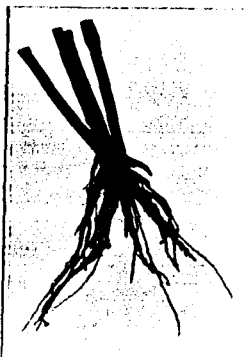


Fig. 29 Pudrición ocasionada por G. graminis.



Fig. 30 Pudrición ocasionada por Fusarium.

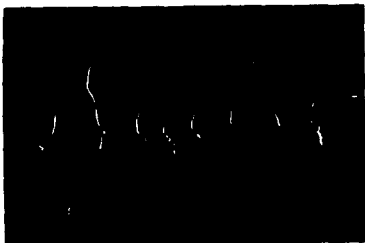


Fig. 31 Prueba de patogenicidad, de derecha a izquierda R. solani, G. graminis, B. sorokiniana, B. spiciferum, P. torulosum, F. graminearum, F. equiseti y testigo.

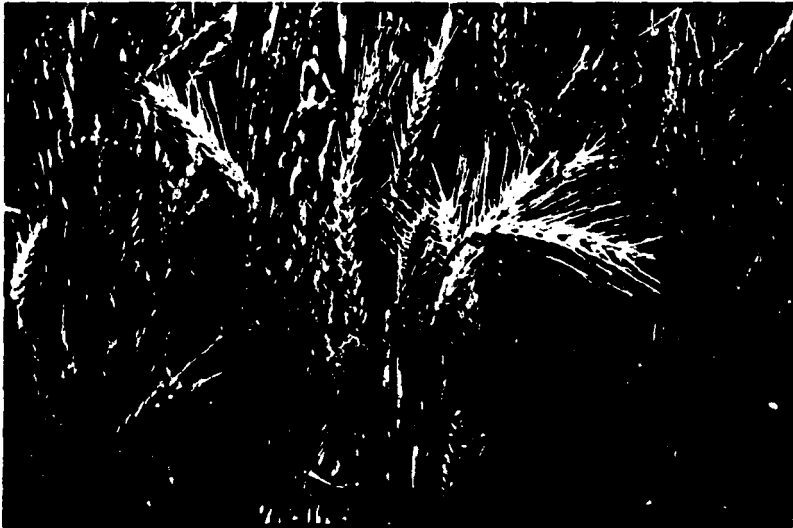


Fig. 32 Campo de cultivo de trigo
con formación de espigas blancas.

4.2 DISTRIBUCION DE ESPECIES FITOPATOGENAS.

Las especies fitopatógenas de más amplia distribución es B. sorikiniana, F. equiseti y F. graminearum, ya que la primera se aislaron a partir de suelo en Ozumba y Santa Rosa, y a partir de las raíces en todas las localidades, la segunda se aislo de suelo en Temamatla y de raíz en todas las localidades, y la tercera se aisló de raíz en todas las localidades. La especie con la distribución más estrecha es P. torulosum, pues sólo se aisló de las raíces en Ozumba, posiblemente por las características topográficas que presenta la localidas que no permite la retención del agua.

Los resultados también muestran que el número de especies fitopatógenas aisladas del suelo fué menor que el de las aisladas de raíz. Esto es debido probablemente a que las especies saprófitas habitantes del suelo crecen mas rápido en medio de cultivo que las patógenas, y las enmascaran. En el caso de aislamientos de raíz, las especies saprófitas son menos frecuentes, ya que solo han penetrado a los tejidos de la raíz aquellos organismos patógenos y es más fácil su desarrollo en medio de cultivo.

Las localidades Santa Rosa y Juchitepec, así como localidades vecinas, presentaron condiciones favorables para el crecimiento de todas las especies fitopatógenas encontradas en el estudio. Estas condiciones incluyen suelos

suelos y alcalinos, alta humedad, y temperaturas no mayores de 25⁰ C. La menor humedad y mayor temperatura de las localidades de Ozumba y Tenamatla, favorecen a F. graminearum y F. equiseti, aunque es posible la presencia de especies de Bipolaris.

G. graminis es exigente en nitrógeno para su mejor desarrollo. La expresión es más marcada de la etapa de espigamiento en adelante porque en este período el cultivo de trigo requiere de CO₂, agua, N y PO₄, y el daño a las raíces por el hongo interfiere con la absorción y transporte de estos nutrientes. La presencia de este patógeno pudo observarse fácilmente debido a la aparición de espigas blancas en el campo antes de la madurez del cultivo (Fig. 32); las raíces se encontraron ennegrecidas (Fig. 29), con formación de peritecios.

La formación de espigas blancas en las localidades de Juchitepec y Santa Rosa, no correspondió exclusivamente a la presencia de G. graminis, sino también de B. sorokiniana (Fig 28), F. graminearum y F. equiseti (Fig.30). Por lo tanto, la coloración blanca de las espigas indica el daño severo que tienen las raíces y es necesario la observación de estas para conocer el o los organismos causales.

Las especies fitopatógenas encontradas en la raíz fueron aisladas en distintos estadios de desarrollo de la planta, lo cual sugiere que hay ciertas características en la planta y en el ambiente que favorecen la penetración a la raíz. Estas características hacen que algunas especies

puedan aislarse en estado de plántula, de macollamiento o en estadios posteriores (Cuadro No 1)

P. torulosum un patógeno importante, porque generalmente ataca en estado de plántula bajo condiciones de temperaturas alrededor de 20 C y alta humedad, llegando a causar muerte de plántulas y aniquilar el cultivo. En la localidad Ozumba no se presentaron las condiciones que favorecieran su máximo desarrollo, estuvo presente y pudo aislarse pero no llegó a afectar al cultivo drásticamente.

De los tres medios de cultivo empleados para suelo, GRBS resulto ser el mejor para los aislamientos, ya que eliminó totalmente el crecimiento bacteriano y permitió el desarrollo axénico de las colonias fungosas. Este medio permitió aislar las especies fitopatógenas de F. equiseti, B. sorokiniana y B. spiciferum. y algunos hongos saprófitos. El medio de cultivo V8 por ser tan rico en nutrientes, permitió el crecimiento de bacterias (aún con la adición de estreptomycin), y de numerosas especies fungosas saprófitas, pero también permitió aislar las mismas especies fitopatógenas que el medio de GRBS. El medio AA no fué tan satisfactorio como los anteriores, debido a que el crecimiento de los cultivos fué excesivamente lento y no permitió un crecimiento adecuado para distinguir las diferentes especies.

Los medios más adecuados para el aislamiento de raíz fueron HMA y PDA pues permitieron aislar todas las especies

fitopatógenas. El medio de GAsp no resultó tan específico para aislar Gaeumannomyces como era de esperarse según las referencias bibliográficas. La cámara húmeda únicamente funcionó para aislar Bipolaris y Fusarium. Para suprimir la presencia de bacterias en los aislamiento de raíz fué necesario el uso de estreptomycinina o ácido láctico. AA fue útil para facilitar la purificación y esporulación de las cepas.

Los objetivos del presente estudio se han cumplido, dejando abierto nuevos trabajos de investigación relacionados con el manejo de los cultivos y de los hongos fitopatógenos encontrados, teniendo como alternativa el control biológico.

Cuadro 1 Distribución espacio-temporal de hongos fitopatógenos aislados de suelo y de raíz de trigo, durante el ciclo Primavera-Verano 1988 en cuatro localidades del Estado de Méx.

	Localidades	Suelo		Raíz Estadios				
				12	21-31	59-69	71	79

<u>F. graminearum</u>	Juchitepec			*	*	*	*	*
	Ozumba	*	*	*				
	Santa Rosa					*	*	
	Temamatla		*				*	

	Localidades	Suelo		Raíz Estadios				
				12	21-31	59-69	71	79

<u>F. equiseti</u>	Juchitepec					*	*	
	Ozumba					*	*	
	Santa Rosa					*	*	
	Temamatla	*	*	*	*		*	

	Localidades	Suelo		Raíz Estadios				
				12	21-31	59-69	71	79

<u>G. graminis</u>	Juchitepec					*	*	*
	Ozumba							
	Santa Rosa					*	*	*
	Temamatla							

Localidades	Suelo		Raíz Estadios		
	12	21-31	59-69	71	79
<u>B. sorokiniana</u>					
Juchitepec		*			
Ozumba	*	*		*	*
Santa Rosa	*	*	*	*	
Temamatla		*	*	*	*

Localidades	Suelo		Raíz Estadios		
	12	21-31	59-69	71	79
<u>B. spiciferum</u>					
Juchitepec					
Ozumba				*	*
Santa Rosa				*	
Temamatla	*				

Localidades	Suelo		Raíz Estadios		
	12	21-31	59-69	71	79
<u>P. torulosum</u>					
Juchitepec					
Ozumba			*		
Santa Rosa					
Temamatla					

Localidades	Suelo		Raíz Estadios		
	12	21-31	59-69	71	79
<u>R. solani</u>					
Juchitec					
Ozumba				*	*
Santa Rosa			*		
Tamamatla					

Ver Escala de Zadoks (Fig. 2)

4.3. PRUEBA DE PATOGENICIDAD

Las cajas inoculadas con B. sorokiniana y B. spiciferum. Después del quinto día se apreció en las plántulas una ligera coloración café en la corona y las raíces; después de 10 días las manchas se tornaron a café muy intenso y el patógeno invadió completamente la raíz (Fig 31) a todas las plantas. F. graminearum invadió más rápidamente la raíz que F. equiseti a los cinco días, y a los diez días las raíces tornaron de color rosa.

Bajo inoculación con P. torulosum la raíz tomó inicialmente una coloración ligeramente amarilla y después de siete días un amarillo muy intenso.

R. solani invadió la planta durante los primeros cinco días y después de ocho días se inició en la raíz la formación de esclerocios de color café.

La influencia de G. graminis indujo en la raíz una coloración de color café que después de diez días se tornó negrusca; a partir de este momento dió inicio a la formación de peritecios, no sólo a nivel radical, sino también en la corona y hojas envainantes inferiores.

5 CONCLUSIONES

1. Los resultados indican la presencia de siete especies fungosas fitopatógenas importantes en las localidades estudiadas. Es posible pensar que en un tiempo no muy lejano lleguen a causar pérdidas en los rendimientos de los cultivos de trigo, si no se estudian y aplican las medidas necesarias en el sistema de producción.
2. Los medios de cultivo recomendados para el aislamiento de hongos fitopatógenos presentes en el suelo son Agar-glucosa-rosa de bengala-estreptomina (GRBS) y Agar-jugo de verduras V8 (V8).
3. Para el aislamiento de la micoflora fitopatógena de raíz, se recomienda usar los medios de harina de maíz-agar (HMA) y papa-dextrosa-agar (PDA).
4. El medio de agar-agua (AA) permitió purificar e identificar satisfactoriamente la mayoría de las especies.
5. Es recomendable conservar las especies en medios específicos adecuados, para que el organismo no pierda viabilidad y patogenicidad.

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

- Andersen, A.L. 1952. Development of wheat Headblight incited by H. sativum. Phytopathology. 42: 453-456.
- von Arx, J. A. 1981. The Genera of Fungi Sporulating in pure Culture. J. Cramer. Germany. 424 pp.
- Asher, M.J. y Shipton, P.J. 1981. Biology and Control of Take-all. Academic Press. Londres. 535 pp.
- Barnett, H.L. y Hunter, B.B. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Company. 241pp.
- Barron, G.L. 1972. The Genera of Hyphomycetes from Soil. Robert E. Krieger Publishing Company Nueva York. 364 pp.
- Bell, M.A. 1988. Análisis Estadístico y Económico de la Investigación en Campos de Agricultores. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y trigo (CIMMYT). México. 75 pp.
- Booth, C. 1971. The Genus Fusarium. Commonwealth Mycological Institute (CAB). Kew, England. 237 pp

Booth, C. 1977. Fusarium. Commonwealth Mycological Institute (CAB). Kew, England. 58 pp.

Cook, J.R. 1968. Fusarium Root and Foot Rot of Cereals in the Pacific Northwest. Phytopathology. 58:127-131.

Cook, R.J. 1980. Fusarium Foot Rot of Wheat and its Control in the Pacific Northwest. Plant Disease. 64: 1061-1066.

Domsch, K.H. 1972. Fungi in Agricultural Soils. Longman. 290 pp.

Echegaray, A.A. 1966. Microbiología de Suelos. U.A.CH. México.

Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute (CAB). Kew, England. 608 pp.

Eyal, Z, A.L. Sharen, J.M. Prescott y M. van Ginkel. 1987. Enfermedades de trigo causadas por septoria. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). México. 46 pp.

Frezzi, M.J. 1956. Especies de Pythium Fitopatogenas. Revista de Investigaciones Agrícolas. 10 (2) Buenos Aires. Argentina. 241pp.

Gerlach, W. y Nirenberg, H. 1982. The Genus Fusarium a Pictorial Atlas. Biologische Bundesanstalt fur Land. Berlin 406 pp.

Hendrix, F.F. y Papa, K.E. 1974. Symposium on the Genus Pythium. Proceedings of the American Phytopathological Society . (1): 200-206.

INEGI. 1986. Anuario Estadístico del Estado de México. (I). México. 801 pp.

INEGI 1989. Boletín de Información Oportuna del Sector Alimentario. No. 37 . México D.F. 67 pp.

INTA. 1981. El Cultivo del Trigo. Argentina. 185pp.

Jones, G.D. y Clifford, C.B. 1983. Cereal Diseases Their Pathology and Control. 2 Edi. John Wiley and Sons. Nueva York.. 309 pp.

López, A.G.F. 1984. Manejo de Hongos Fitopatógenos. U.A.CH. México. 78-80 pp.

Nelson, P.E., T.A Toussoun y W.F.O Marasas. 1983. Fusarium Species. The Pennsylvania State University. Pennsylvania. 193 pp.

Nilsson, H.E. 1969. Studies foot rot diseases of cereals and grasses. Lantbrukshogskolans Annaler. 35: 275-807.

Purdy, L.H. y Kendrick, E.L. 1963. Influence of Environmental Factors on the Development of Wheat Bunt in the Pacific Northwest. IV. Effect of Soil Temperature and Soil Moisture on Infection by Soil-Borne spores. Phytopathology. 53 (4): 416-418.

Samaniego, G.J. 1987. Distribución y frecuencia de hongos del suelo de nogerales de Coahuila atacados por Phymatotrichum omnivorum. Tesis doctoral UNAM.

Sterne, R.E., y Jones, J.E. 1978. Sharp Eyespot of Wheat in Arkansas Caused by Rhizoctonia solani. Plant Disease Reportes. 62 (1): 56-60.

Stubbs, R.W., J.M. Prescott, E.E. Saari y H.J. Dubin. 1986. Manual de Metodología sobre las Enfermedades de los Cereales. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. México. 46 pp.

Tijerina, M.A. 1964. Estudio Preliminar Sobre la Pudrición Radicular del Maíz en México. Tesis Colegio de Posgraduados. México.

Waller, D.M., R.J. Cook, G. MacNish, E.N. Basset, R.L. Powelson y R.R. Peterson. 1986. Rhizoctonia Root Rot of Small Grains Favored by Reduced Tillage in The Pacific Northwest. Plant disease 70: 70-73.

Weste, G. y L.B. Thrower. 1963. Production of Perithecia and Microconidia in Culture by Ophiobolus graminis . Phytopathology. 53 (3) p 354.

Zillinsky, F.J. 1984. Guía para la Identificación de Enfermedades en Cereales de Grano Pequeño. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). México 46 pp.

7 A P E N D I C E

A continuación se describen los medios de cultivo empleados en el aislamiento, purificación y conservación de cepas, y se enumeran otras especies fungosas identificadas (sin antecedentes como patógenos de trigo).

7.1 MEDIOS PARA AISLAMIENTOS DE SUELO

Agar Agua (AA).

Se pesar 20 g de agar y se afora con agua destilada a un litro, posteriormente se esteriliza durante 20 minutos a 15 lb de presión.

Glucosa Rosa de Bengala Estreptomicona (GRBS).

Glucosa -----10 g
Peptona ----- 5 g
 KH_2PO_4 -----1 g
 $MgSO_4$ -----0.5 g
Agar -----20 g
Estreptomicona-----0.1 g
Rosa de Bengala --33 mg

Se mezclan los ingredientes excepto estreptomicona, se afora con agua destilada a un litro y se esteriliza a 15 lb de presión durante 20 minutos. Momentos antes de servir a

las cajas petri cuando el medio no esta a mas de 40⁰ C se agrega la estreptomycin en condiciones estériles.

Jugo V-8 Agar (V8).

Jugo V-8 -----300 ml

CaCO₃ -----4.5 g

Agar -----20 g

Se mezcla el CaCO₃ con el jugo V-8 y se afora a un litro con agua destilada, finalmente se esteriliza derante 20 minutos a 15 lb de presión.

7.2 MEDIOS PARA AISLAMIENTOS DE RAIZ.

Papa Dextrosa Agar (PDA) y

Harina de Maíz Agar (HMA).

Para la preparación de estos medios se usan presentaciones deshidratadas, producidas por la casa Merck y Difco Laboratories. En este caso se hidrata el compuesto según las indicaciones del fabricante

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Glucosa Asparagina (GAsp).

KH_2PO_4	-----	0.5 g
K_2HPO_4	-----	0.6 g
$MgSO_4$	-----	0.5 g
$NaCl_2$	-----	0.1 g
$CaCl_2$	-----	0.1 g
Asparagina	-----	2 g
Glucosa	-----	10 g
Agar	-----	20 g

Se mezclan las sustancias anteriores, se afora a un litro con agua destilada y se esteriliza a 15 lb durante 20 minutos.

Glucosa al 1% (G 1%)

Agar	-----	20 g
Papa	-----	250 g
Glucosa	-----	10 g

Se cuecen las papas en agua destilada durante 15 minutos. Posteriormente se filtra y se agrega la glucosa y el agar, para aforar a un litro. Homogeneizada la mezcla se esteriliza a 15 lb durante 20 minutos.

Después de esterilizados los medios de cultivo y con una temperatura no mayor de 40⁰ C, momentos antes de servirlos en las cajas petri se agrega el antibiótico.

Cámara Humeda (CH)

Se coloca papel filtro humedecido dentro de cajas de petri de 10 cm de diámetro. Se envuelven las cajas con papel aluminio y se esterilizan durante 20 minutos a 15 lb de presión.

7.3 TECNICAS ESPECIALES DE CONSERVACION

Los medios empleados para la conservación de las cepas, son aquellos donde su crecimiento es mejor, sin embargo la literatura señala otros para que la cepa no pierda viabilidad ni virulencia y a continuación se señalan:

1. En Grano

Granos de trigo remojados en agua durante 24 hs. se colocan en tubos de ensaye aproximadamente hasta la mitad de la capacidad del recipiente, los tubos tapados se esterilizan a 15 lb. de presión durante 2 hs. Una vez frios se inoculan los tubos con el patógeno y se incuban hasta cuando la cepa invade la mayor parte de los granos. Entonces se guardan a una temperatura de 5⁰ C (de esta manera se conservan todas las especies excepto Pythium)

2. En Agua

Se cortan hojas de plántulas de trigo en trozos de 2 cm. de largo y se secan al aire. En cada tubo de ensaye se colocan cinco trozos de hojas y se agregan 8 ml. de agua, los tubos se tapan y se esterilizan a 15 lb. de presión durante 20 minutos. Una vez frios se inoculan con Pythium y se incuban a 20⁰ C durante cuatro días; finalmente se conservan a 5⁰ C.

Dra. Gilchrist, L., Comunicación personal, CIMMYT, 1989)

7.4 OTRAS ESPECIES IDENTIFICADAS

Cuadro No 2. Otras especies identificadas de aislamientos de raíz y de suelo de cuatro localidades del Edo. de México.

ESPECIES	Suelo	Raíz
<u>Alternaria</u> sp Nees-----	O, J, T, R	
<u>Aspergillus</u> sp Link-----	O, J, T, R	
<u>Chaetophoma</u> sp Cooke-----		R
<u>Epicoccum nigrum</u> Link-----		J, R
<u>Fusarium moniliforme</u> Sheldom-----	J, T, R	
<u>F. oxysporum</u> Schlecht-----		J, T
<u>F. solani</u> (Mart.) Sacc.-----	O, J, T, R	J, T
<u>Geotrichum</u> sp. Link-----		T
<u>Gliocladium</u> sp Corda-----		T
<u>Gliomastix</u> sp Gueguen-----	J, T	
<u>Penicillium</u> sp Link-----	O, J, T, R	
<u>Periconia</u> sp Bon-----		R
<u>Siosporium</u> sp Bubak and Serebrianikov-----		T
<u>Stigmella</u> sp Lev-----		T
<u>Stemphylium</u> sp Wallr-----		T
<u>Trichoderma viride</u> Pers-----	O, J, T, R	
<u>Trichothecium roseum</u> Link-----		R
<u>Verticillium</u> sp Nees-----	J	

J= Juchitepec
 O= Ozumba
 R= Santa Rosa
 T= Temamatla