

# MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA SEMILLA DE TRES ESPECIES DE PINO Y TÉCNICAS DE DESINFECCIÓN

Vázquez Collazo Ignacio \*

## RESUMEN

Los objetivos de este estudio fueron identificar los contaminantes externos e internos de la semilla al momento de la recolección, así como probar algunos desinfectantes y el uso de promotores de la germinación en tres especies de pino (*Pinus michoacana* Martínez., *P. pseudostrobus* Lindl. y *P. douglasiana* Martínez.). Las semillas fueron colectadas en el Campo Experimental Barranca de Cupatitzio, Michoacán, México. Para detectar los contaminantes de la semilla, se llevaron a cabo rutinas de laboratorio con la finalidad de obtener cultivos puros de los microorganismos y posteriormente identificarlos; también se realizaron varios experimentos, bajo un diseño completamente al azar, donde se aplicaron los desinfectantes Peróxido de Hidrógeno e Hipoclorito de Sodio y por último, se estableció un experimento con semilla de *Pinus pseudostrobus* para probar la eficiencia de diferentes tiempos de inmersión en Peróxido de Hidrógeno, como promotor de la germinación.

Los resultados mostraron la existencia de contaminantes epibióticos y endobióticos en la semilla de las tres especies de pino; *Pinus michoacana* fue la especie con más grado de contaminación y *P. douglasiana* la menos contaminada; los géneros de hongos identificados en la semilla fueron: *Botrytis*, *Pestalotia*, *Rhizopus*, *Penicillium* y *Aspergillus*; también se encontró una bacteria del género *Xanthomonas* como contaminante se la semilla de *Pinus michoacana* y *P. pseudostrobus*. El Peróxido de Hidrógeno no es un buen desinfectante de la semilla de pino, aunque a tiempos de exposición de 40 y 60 minutos, redujo la presencia de microorganismos epibióticos en 8 y 15 % respectivamente.

---

\* M.C., Investigador del Campo Experimental Uruapan, CIR-Pacífico Centro, INIFAP, SAGAR.

Con la inmersión de la semilla de las tres especies de pino en Hipoclorito de Sodio al 1 %, durante 4 y 6 minutos, se obtuvo un 100 % de control de los contaminantes epibióticos. Por último, la inmersión de la semilla de *P. pseudostrobus* en Peróxido de Hidrógeno durante 5, 10 y 20 minutos, incrementó el porcentaje de germinación en 18.6, 15.9 y 12.6 % respectivamente.

Palabras clave: Microorganismos, semillas forestales, técnicas de desinfección, germinación.

## ABSTRACT

The objectives of this study were the intern and extern contaminants identification on seed recollection, and test several promoters and disinfectants of germination on three pine species (*Pinus michoacana* Martínez., *P. pseudostrobus* Lindl. and *P. douglasiana* Martínez.). The seeds were collected at Barranca de Cupatitzio Experimental Station, located on Michoacan state, Mexico. For seed contaminant detection, there were carried out laboratory tests with the focus to obtain pure cultivations of microorganisms and identify them. Also were carried out several experiments, under a randomized desing, they were applied the disinfectants Hidrogen Peroxide and Sodium Hipoclorite. Finally a seed experiment with *Pinus pseudostrobus* was conducted to prove the efficiency on different inmersion times, using Hidrogen Peroxide as germination promoter.

The results showed the existence of endobiotic and epibiotic contaminants on the three pine species. *Pinus michoacana* was the specie with highest contamination and *P. douglasiana* was the less contaminated. The contaminant agents genus identified on the seeds were: *Botrytis*, *Pestalotia*, *Rhizopus*, *Penicillum* and *Aspergillus*: a bactory of *Xanthomas* genus was founded as contaminating material on *Pinus michoacana* and *P. pseudostrobus* seeds. It was comproved that Hidrogen Peroxide wasn't a good pine seed disinfectant, however with 40 and 60 minutes exposition times with Sodium Hipoclorite at 1 percent, reduced 8 and 15 percent microorganisms presence on the three pine species, respectively. The seed inmersion showed a 100 percent epibiotic contaminants control using Sodium Hipoclorite at 1 percent, applied with 4 and 6 minutes. The inmersion of *P. pseudostrobus* seed on Hidrogen Peroxide with 5, 10 and 20 minutes, increased the germination on 18.6, 15.9 and 12.6 percent, respectively.

Key words: Microorganisms, forest seeds, disinfection technics, germination.

## INTRODUCCIÓN

De acuerdo con el Inventario Nacional Forestal de gran visión realizado por la SARH (1991-1992)<sup>1</sup>, en la República Mexicana existe un total de 21.6 millones de Ha de áreas forestales perturbadas, lo que representa el 11% de la superficie total del país. La tasa anual de deforestación se calculó para el año de 1990, en 0.71%, que correspondió a una superficie de 365,000 Ha. Con base en esta proyección, se estima que para el año 2000, la tasa de deforestación sea del 0.55% que equivale a 283,000 Ha.

El estado de Michoacán, cuenta con una superficie perturbada de más de 1 millón de Ha, de las cuales 23,732 son consideradas como gravemente afectadas. Para abatir esta situación, es necesario llevar a cabo intensas campañas de reforestación, con planta de buena calidad genética, libre de plagas y enfermedades.

Uno de los principales problemas sanitarios que se presentan en la producción de planta, es la enfermedad conocida como mal de semilleros o *Damping off*, causada por un gran número de agentes infecciosos que pueden estar presentes sobre o dentro de la semilla desde el momento de la cosecha y que provoca pérdidas por arriba del 25%; a pesar de esto, no existen en el país estudios sobre la cantidad de semillas infectadas desde el momento de la recolección, géneros de patógenos epibióticos y endobióticos más frecuentes en la simiente así como de algunas formas o técnicas de desinfección y uso de promotores de la germinación. Con este propósito se desarrolló el presente trabajo, mediante el análisis de semilla recolectada de las siguientes especies de pino: *Pinus michoacana*, *P. douglasiana* y *P. pseudostrobus*.

## ANTECEDENTES

Los organismos que originan muchas de las enfermedades de las plantas pueden estar dentro o fuera de la semilla, por lo que la identificación de los mismos y la desinfección de la semilla es un proceso importante para reducir las enfermedades presentes durante la germinación y su estado de plántula. Los hongos y bacterias atacan generalmente a las partes florales y conos, aunque las semillas no son directamente infectadas (Patiño *et al.*, 1983)<sup>2</sup>; sin embargo, se han reportado algunos géneros de hongos (*Chaetomium*,

---

<sup>1</sup> SARH. 1991-1992. Inventario Nacional Forestal de gran visión.

<sup>2</sup> Patiño V., F.; P. De la Garza; Y. Villa G.; I. Talavera y F. Camacho. 1983. Guía para la recolección y manejo de semillas de especies forestales.

*Tricoderma*, *Botrydiplodia*, *Fusarium*) en la testa, que pueden invadir tejido vegetal y causar la muerte de la plántula a los pocos días de nacida (Parker y Rees, 1983)<sup>3</sup>.

Las semillas no sólo son víctimas de los microorganismos patógenos (hongos, bacterias y virus), sino que también actúan como vectores (agentes pasivos) de los mismos y que pueden ser peligrosos para otros vegetales; se reportan dos géneros de bacterias (*Xanthomonas* y *Pseudomonas*) como agentes patógenos de semillas y varios géneros de hongos: *Fusarium*, *Botrytis*, *Ciboriora*, *Sclerotinia*, *Phomopsis*, *Valsa*, *Gloeosporium*, *Schizophyllum*, *Mucor* y *Ustilago*.

Los patógenos de la semilla se pueden reducir mediante diversas prácticas tales como: establecer los huertos semilleros en áreas con bajo riesgo, remover los hospedantes alternantes de los mismos huertos, destruir árboles infectados, aplicación de fungicidas, usar buenos procedimientos de obtención de semilla, esterilizar la semilla con Peróxido de Hidrógeno, Hipoclorito de Sodio, etanol, aplicación de fungicidas a la semilla e inmersión en agua caliente (Bonner *et al.*, 1994)<sup>4</sup>.

Los trabajos realizados con *Pseudotsuga menziesii* Kentza. han demostrado que los conos colectados contienen gran cantidad de hongos comunes; de 4,564 conos examinados, se aislaron 7,293 hongos, de los cuales pocos fueron identificados. Uno de los géneros identificados fue *Fusarium*, pero se sugiere que la invasión a la semilla ocurre después de la cosecha de los conos y no mientras los mismos se desarrollan en el árbol (Nelson *et al.*, 1986)<sup>5</sup>.

La cantidad de semilla perdida debido a las plagas y enfermedades es considerable; por ejemplo, en *Abies* se estiman pérdidas entre el 9 y 75 %, y en *Picea* entre el 24 y 65 %. Se han identificado 26 especies de hongos pertenecientes a 13 géneros, tres de ellos (*Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus*) reducen la germinación en *Cedrus* (Bonner, 1986)<sup>6</sup>.

El tratamiento a la semilla con objeto de reducir la incidencia de enfermedades no es nuevo; se menciona que el primer tratamiento a la semilla para siembra fue intentado en el año 50 A. de C., por Julius Cellumela (Vélez, 1977)<sup>7</sup>.

---

<sup>3</sup> Parker, E. J. y Rees, A. A. 1983. Examen fitosanitario de semillas de especies forestales.

<sup>4</sup> Bonner, F. T.; J. A. Vozzo; W. W. Elam and S. B. Land. 1994. Tree Seed Technology Training Course.

<sup>5</sup> Nelson, E.E.; W.G. Thies and C.Y. Li. 1986. Are Seed and Cone Pathogens Causing Significant Losses in Pacific Northwest Seed Orchards.

<sup>6</sup> Bonner, F. T. 1986. Seeds of woody plants. pp. 81-112.

<sup>7</sup> Vélez L., E. 1977. Notas del curso de parasiticidas agrícolas.

Investigaciones recientes mencionan que con el tratamiento a la semilla con fungicidas sistémicos (Bayleton) se protege a la plántula de *Pinus elliottii* Engelm. de la roya (*Cronartium quercum*). En algunos viveros forestales del este de los Estados Unidos de América (EUA), la semilla de pino se trata con el fungicida Thiram en dosis de 1.5 a 2 onzas de producto por una libra de semilla (Yoder, 1992)<sup>8</sup>.

La semilla de *Pinus taeda* Linn. se ha expuesto a radiación electromagnética y se han evaluado sus efectos en la germinación de la misma, desarrollo de la plántula, resistencia a enfermedades y comportamiento de la plántula en el campo; los resultados no muestran una diferencia significativa con relación al testigo (Barnett y Krugman, 1989)<sup>9</sup>. El Oxido Cuproso, el Oxido de Zinc y el sulfato de zinc han demostrado ser valiosos protectores para cierto tipo de semilla (Charles, 1973)<sup>10</sup>; por otro lado, se ha demostrado que el tratamiento con fungicidas, principalmente el Benomyl, no tiene un efecto negativo en la germinación de la semilla de *Pinus palustris* Mill. aún después de 20 años (Barnett y Jones, 1993)<sup>11</sup>.

Algunas semillas de especies de áreas riparias (*Prunus virginiana* Linn.) han sido tratadas con blanqueador (Hipoclorito de Sodio) por períodos de 8 minutos, para reducir los patógenos de la superficie; posteriormente se aplica un lavado con agua fría por 48 horas y una estratificación de 90 a 120 días (Atthowe, 1992)<sup>12</sup>. Para eliminar algunos inhibidores de la cubierta de la semilla se ha empleado el ácido sulfúrico, nítrico o clorhídrico; también se utiliza el agua oxigenada, el alcohol y la acetona (García y Muñoz, 1993)<sup>13</sup>.

La esterilización química se logra con el empleo de sustancias químicas diversas; en muchos casos pueden considerarse como desinfectantes, que consiste en la remoción selectiva de organismos capaces de causar infección a partir de tejidos o materiales diversos.

---

<sup>8</sup> Yoder, B. 1992. Pre-sowing Seed Treatments Used at the George O. White State Forest Nursery-Missouri. pp. 42-44.

<sup>9</sup> Barnett, J. P. and S. L. Krugman. 1989. Electromagnetic Treatment of Loblolly Pine Seeds.

<sup>10</sup> Charles, W. J. 1973. Patología Vegetal. Ed. Omega. Barcelona, España. pp. 770-773.

<sup>11</sup> Barnett, J. P. and J. P. Jones. 1993. Response of Longleaf Pine Seeds to Storage Conditions and Pregermination Treatments. South J. Appl. For. 17 ( 4 ): 174- 179.

<sup>12</sup> Atthowe, H. 1992. Propagation of Riparian and Wetland Plants. pp. 78-82.

<sup>13</sup> García M., J. J. y F. H. Muñoz J. 1993. Guía para la producción de planta forestal en envases.

Existen diferentes tipos de sustancias para esterilizar o desinfectar: 1) agentes oxidantes (Permanganato de Potasio, Peróxido de Hidrógeno, Perborato de Sodio, entre otros); 2) halógenos (Cloro y Bromo); 3) ácidos inorgánicos y alcalis; 4) sales de metales pesados (Cloruro de Mercurio, Sulfato de Cobre, Nitrato de Plata); 5) compuestos fenólicos; 6) alcoholes (etílico e isopropílico ) y; 7) gases (Bromuro de Metilo, Vapam, Oxido de Propileno y Oxido de Etileno ), (López, 1981)<sup>14</sup>.

Las soluciones de Hipoclorito de Sodio (NaClO) a diferente concentración se emplean como desinfectantes de tejidos; se preparan mezclando cinco partes de agua destilada y una parte de Hipoclorito de Sodio al 5 %, también se pueden preparar mezclando cinco partes de agua destilada con una parte de blanqueador de ropa (Cloralex u otra marca comercial). Normalmente en la desinfección de tejidos se utiliza la concentración del 1% y el tiempo necesario para este proceso varía entre 30 y 90 segundos; material con mayor grado de contaminación requiere de 2 a 3 minutos de exposición (López, *op. cit.*). Este producto también se utiliza como desinfectante de semilla de varias especies de pino en concentración del 10% (Bonner *et al.*, *op. cit.*) y 5.25 % (García y Muñoz, *op. cit.*).

Existen otros compuestos que se emplean como promotores de germinación, entre los más utilizados se puede mencionar al Nitrato de Potasio, Thiourea, Etileno, Cinetina, Agua Oxigenada, Ácido Giberélico, Cloro e inmersión en agua; todas las sustancias se emplean a diferente concentración y los tiempos de remojo varían según la especie (García y Muñoz, *op. cit.*; Bonner *et al.*, *op. cit.*; USDA Y SFF, 1994<sup>15</sup>).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización de Sitios de Colecta

*Pinus michoacana* y *P. douglasiana*.- Estas especies fueron colectadas en el Campo Experimental Barranca de Cupatitzio, ubicado a 5 Km al oeste de la ciudad de Ururapan, Mich.; el arbolado se encuentra a una altitud promedio de 1,950 msnm, su posición geográfica corresponde a los 19° 28' de latitud norte y 102° 05' de longitud oeste.

---

<sup>14</sup> López A., G. F. 1981. Manejo de hongos fitopatógenos.

<sup>15</sup> USDA y SFF, 1994. Viveros y reforestación en México.

El clima es del tipo Cw2 ( W ), que se describe como el más húmedo de los subhúmedos, con régimen de lluvias en verano, con una oscilación térmica menor de 5°C y la temperatura del mes más caliente es antes de junio; la temperatura media anual es de 16.3°C y la precipitación media anual es de 1,335 mm (Prado, 1981, *cf.*: Ciencia Forestal N° 3)<sup>16</sup>.

***Pinus pseudostrobus.***- Esta especie se colectó en el paraje denominado Los Lobos, ubicado dentro del municipio de San Juan Nuevo, Mich., aproximadamente 15 Km al sur de esta población; a una altitud media de 2,100 msnm y la posición geográfica del paraje se ubica en los 19° 24' de latitud norte y los 102° 11' de longitud oeste, con clima templado y lluvias en verano (Cw) (Carta topográfica de INEGI número E13B39, 1987).

## **Obtención de la Semilla**

Los conos colectados de las 3 especies de pino, fueron procesados para su beneficio y obtención de la semilla, con la metodología descrita por Patiño y Marín (1993)<sup>17</sup>; la semilla, una vez homogeneizada, se almacenó y se tomó una muestra de 1 Kg de cada especie, para realizar las diversas pruebas de laboratorio.

## **Pruebas de Laboratorio**

**Pruebas de germinación.**- Una vez extraída la semilla se realizaron pruebas de germinación para cada especie; se utilizaron 400 semillas por especie (100 simientes por cada caja de Petri) y se colocaron a 28°C en estufa de germinación. Los datos de plántula germinada se tomaron a los 7, 14, 21 y 28 días, posteriores a la siembra.

---

<sup>16</sup> Prado O., A. 1981. Los campos experimentales forestales. Ciencia Forestal Núm. 3 (1): 39-49. 2a. edición.

<sup>17</sup> Patiño V., F. y C. J. Marín. 1993. Viveros Forestales. Planeación, establecimiento y producción de planta.

## Contaminantes de Campo

**Contaminantes epibióticos.-** Para determinar los microorganismos asociados de manera externa a la semilla de las 3 especies de pino, se llevó a cabo el siguiente procedimiento: se separaron 100 semillas de cada especie, se establecieron 4 bloques de 25 semillas cada uno, se colocaron en cajas de Petri con medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar), posteriormente se incubaron a 28°C en estufa de germinación. Una vez obtenidas las colonias de contaminantes, se procedió a resembrar los diferentes microorganismos con el propósito de obtener los cultivos puros esporulados e identificarlos con las claves de Barnett y Hunter (1972)<sup>18</sup>.

**Contaminantes endobióticos.-** La determinación de los organismos presentes en el interior de la semilla se realizó de la siguiente manera: se tomaron 50 semillas de cada especie y se eliminó la testa; después se colocaron las semillas desnudas en cajas de Petri con PDA (25 semillas por caja) y se incubaron a 28°C hasta la aparición de las colonias de microorganismos; posteriormente se resembraron para obtener los cultivos puros con células reproductivas y proceder a su identificación.

## Pruebas de Patogenicidad

De los organismos identificados y reportados como fitopatógenos, se realizó una prueba de patogenicidad para comprobar los postulados de Koch (Bauer, 1984<sup>19</sup> y Romero, 1988<sup>20</sup>); primero se obtuvieron cultivos puros de los géneros de hongos fitopatógenos: *Pestalotia* y *Botrytis*, se incrementó su población en PDA a 28°C durante 5 días, hasta obtener su esporulación. Posteriormente, se tomaron 600 semillas de cada especie y se desinfectaron con Hipoclorito de Sodio al 1 % por 4 minutos; después se sembraron en un sustrato (suelo franco y migajón arcillo arenoso 2:1) previamente esterilizado con bromuro de metilo (1 lb. por m<sup>3</sup> de suelo). Se utilizaron las tres especies de pino (*Pinus pseudostrobus*, *P. michoacana* y *P. douglasiana*), con los hongos fitopatógenos.

Una vez sembrada la semilla en el suelo esterilizado, se aplicó el inóculo en el agua de riego y se efectuaron dos evaluaciones (15 y 21 días) después de la inoculación.

---

<sup>18</sup> Barnett, H. L. and B. B. Hunter. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi.

<sup>19</sup> De la I de Bauer M., L. 1984. Fitopatología.

<sup>20</sup> Romero C., S. 1988. Hongos fitopatógenos.



## **Desinfección de la Semilla**

Con la finalidad de eliminar todos los microorganismos presentes en la testa de la semilla, se probaron dos productos desinfectantes; uno de ellos fue el agua oxigenada o Peróxido de Hidrógeno (10.5 volúmenes de oxígeno), para lo cual se estableció un experimento bajo un diseño completamente al azar con la especie *Pinus pseudostrobus*, evaluando 7 tratamientos (0, 5, 10, 20, 30, 40 y 60 minutos), con 4 repeticiones (25 semillas por caja de Petri), con un total de 100 semillas por tratamiento; una vez efectuado el tratamiento se lavaron las semillas con agua corriente, se eliminó el exceso de agua con papel secante y se sembraron en cajas de Petri con PDA, posteriormente se incubaron a 28°C hasta el desarrollo de las colonias; mismas que se contabilizaron y analizaron mediante un análisis de varianza (ANVA) con una probabilidad del 95 % .

Se realizó otro experimento con *P. pseudostrobus*, bajo un diseño completamente al azar, con 4 tratamientos que se efectuaron con diferentes tiempos de exposición de la semilla en Hipoclorito de Sodio (0, 2, 4 y 6 minutos), con 4 repeticiones (25 semillas por caja de Petri) y una parcela útil de 100 semillas por tratamiento. Una vez aplicado el tratamiento, la semilla se lavó con agua corriente de manera abundante, se eliminó el exceso de agua con papel secante, se sembró la semilla en las cajas de Petri y se incubaron a una temperatura de 28°C. Se cuantificó el número de colonias por caja de Petri y los datos se analizaron mediante un ANVA (95 % de probabilidad).

Con los resultados obtenidos en el experimento anterior, se llevó a cabo una evaluación del tratamiento con Hipoclorito de Sodio al 1% en las especies *Pinus michoacana* y *P. douglasiana*, se sumergieron las semillas por un tiempo de 4 minutos, con 100 semillas por especie así como 50 semillas de cada especie como testigo.

## **Promotores de la Germinación**

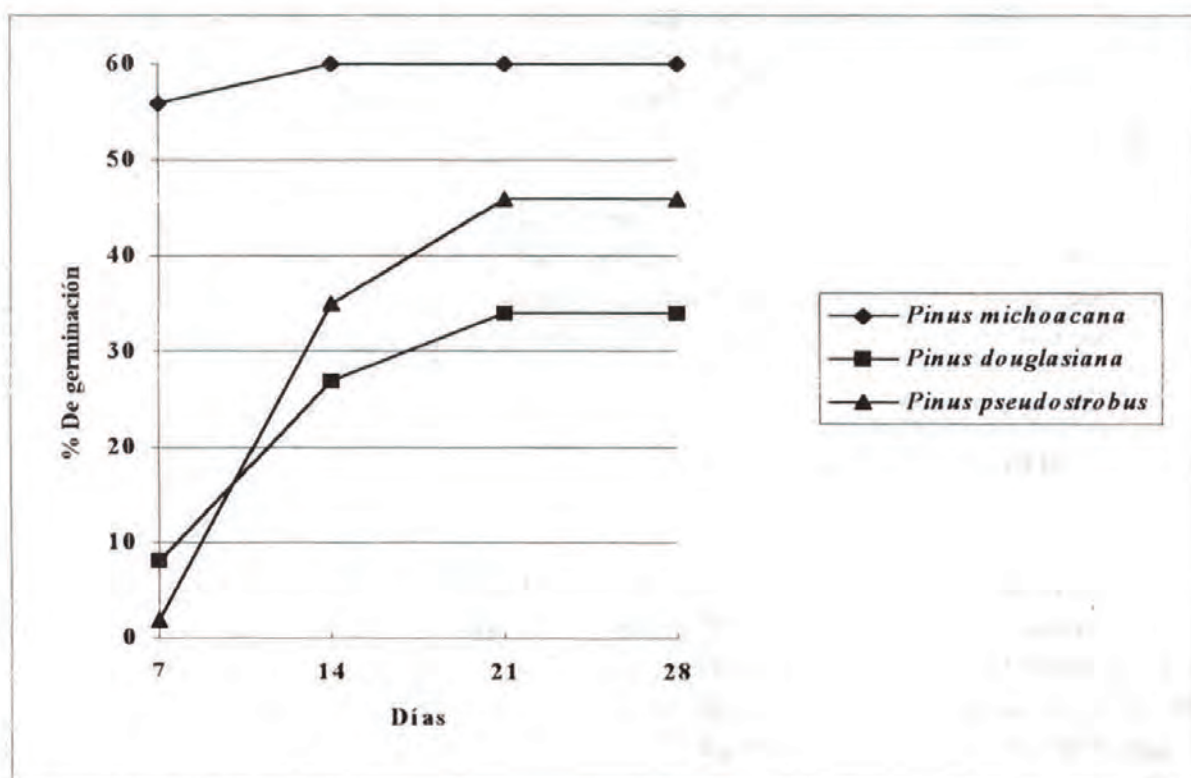
Con la finalidad de conocer el efecto que tiene el Peróxido de Hidrógeno como promotor de la germinación, se realizó un trabajo con *Pinus pseudostrobus*, bajo un diseño al azar, sumergiendo la semilla en 4 tratamientos (0, 5, 10 y 20 minutos), 4 repeticiones (100 semillas por caja). Antes de sumergir la semilla en el agua oxigenada, se desinfectó con Hipoclorito de Sodio al 1% durante 4 minutos; después del tratamiento, se eliminó el exceso de agua de la semilla con papel secante, se sembró en las cajas de Petri y se incubó a 28°C; los datos de semillas germinadas se tomaron a los 7, 14, 21 y 28 días del tratamiento. Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza por cada

fecha de observación (7, 14, 21 y 28 días) y la agrupación de medias se realizó de igual manera.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Pruebas de Germinación

Los resultados de las pruebas de germinación de las tres especies de pino señalaron que el mayor porcentaje de germinación se presentó a los 14 días para las especies *Pinus pseudostrobus* y *P. douglasiana*, mientras que para *P. michoacana* este valor se presentó a los 7 días; el porcentaje de germinación disminuyó hasta cero a los 28 días en las tres especies. La especie *Pinus douglasiana* fue la que tuvo el porcentaje de germinación más bajo (34%), *P. pseudostrobus* presentó una germinación intermedia (46%) y la especie *P. michoacana* alcanzó el valor de germinación más alto (60%) *vid., infra*, Figura N° 1.

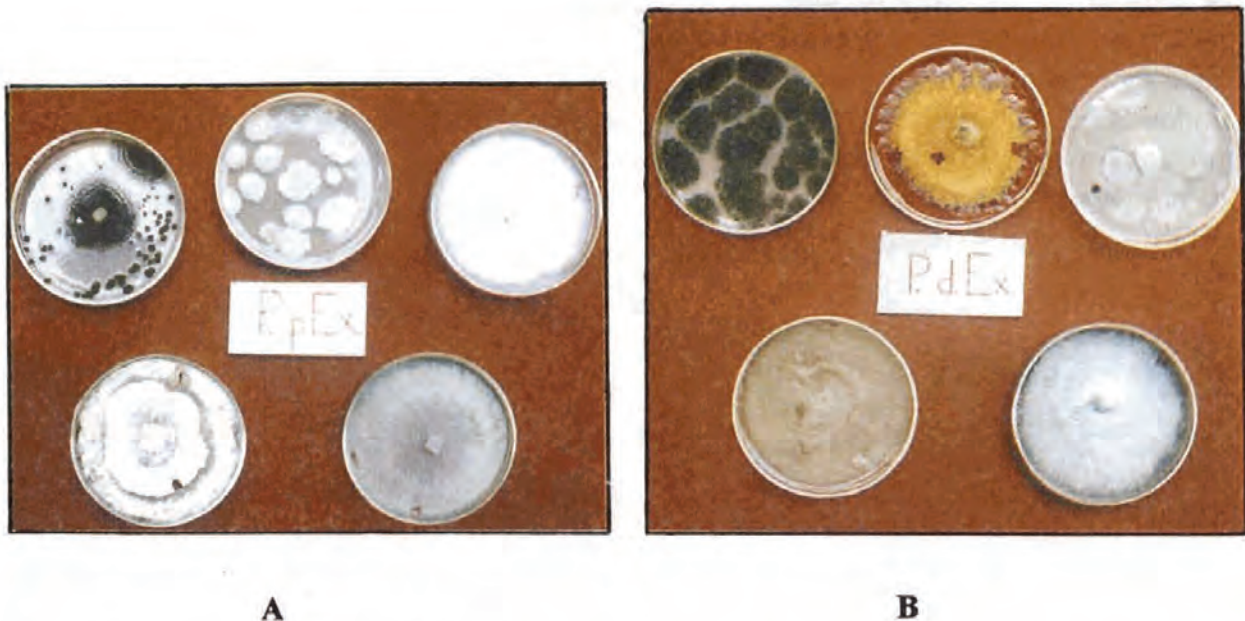


**Figura N° 1.** Prueba de germinación de las tres especies de pino.

## Contaminantes de Campo

**Contaminantes epibióticos.-** Como contaminantes externos se presentaron hongos y bacterias; en *Pinus michoacana* se identificaron los siguientes géneros: *Botrytis*, *Pestalotia*, *Rhizopus*, *Penicillium* y *Xanthomonas*; en *P. pseudostrobus* se presentaron los siguientes microorganismos: *Pestalotia*, *Rhizopus*, *Botrytis* y una bacteria Gram (+); por último, en *P. douglasiana* se identificaron a *Rhizopus*, *Penicillium* y una bacteria Gram (+).

Se pudo observar que la especie menos contaminada externamente es *P. douglasiana* y *P. michoacana* es la que mayor cantidad de contaminantes presentó; los microorganismos externos en la semilla de las tres especies de pino son similares, ya que se encontraron géneros que son comunes (*Rhizopus*) para todas las especies y géneros (*Botrytis*, *Penicillium* y *Pestalotia*) que estuvieron presentes en cuando menos dos especies. Por lo que se refiere a las bacterias, estas sólo se presentaron en dos especies de pino (*P. michoacana* y *P. pseudostrobus*) y es *P. douglasiana* la que no mostró este tipo de microorganismo de manera externa, *vid., infra*, Figura N° 2.



**Figura N° 2.** Microorganismos epibióticos en dos especies de pino: A) *Pinus pseudostrobus* (Pp) y B) *Pinus douglasiana* (Pd).

De los géneros de microorganismos identificados en la testa de la semilla, dos de ellos están reportados como fitopatógenos (*Botrytis* y *Pestalotia*), mientras que los demás (*Rhizopus* y *Penicillium*) se reportan como contaminantes de almacén (Alexopoulos, 1976<sup>21</sup>; Bauer, *op. cit.*; Webster, 1980<sup>22</sup>; Romero, *op. cit.*; Bonner *et al.*, *op. cit.*). El género *Botrytis* produce el ahogamiento de plántula en semilleros, donde la humedad es alta y la temperatura fresca, pero también se presenta en el campo si la semilla esta contaminada con esclerocios o se encuentra en el suelo con ellos o con micelio (Romero, *op. cit.*).

La literatura sobre este tema menciona varias especies del género *Pestalotia*, como causantes de manchas foliares o lesiones cancerosas en frutos de plantas tropicales; los hospedantes más dañados son la palma de coco, la planta del té, la guayaba y la azalea (Romero, *op. cit.*); sin embargo, se menciona a *Pinus funerea* como causante del *Damping off* en varias especies forestales (Boyce, 1961)<sup>23</sup>.

**Contaminantes endobióticos.-** Se identificaron contaminantes (hongos y bacterias) dentro de la semilla de las tres especies de pino; en las especies *Pinus michoacana* y *P. pseudostrobus* se encontraron los siguientes géneros de hongos: *Penicillium*, *Botrytis*, *Aspergillus* y *Pestalotia* (Figura N° 3); además, de las semillas de *P. pseudostrobus* se aisló una bacteria con las características generales del género *Xanthomonas*.

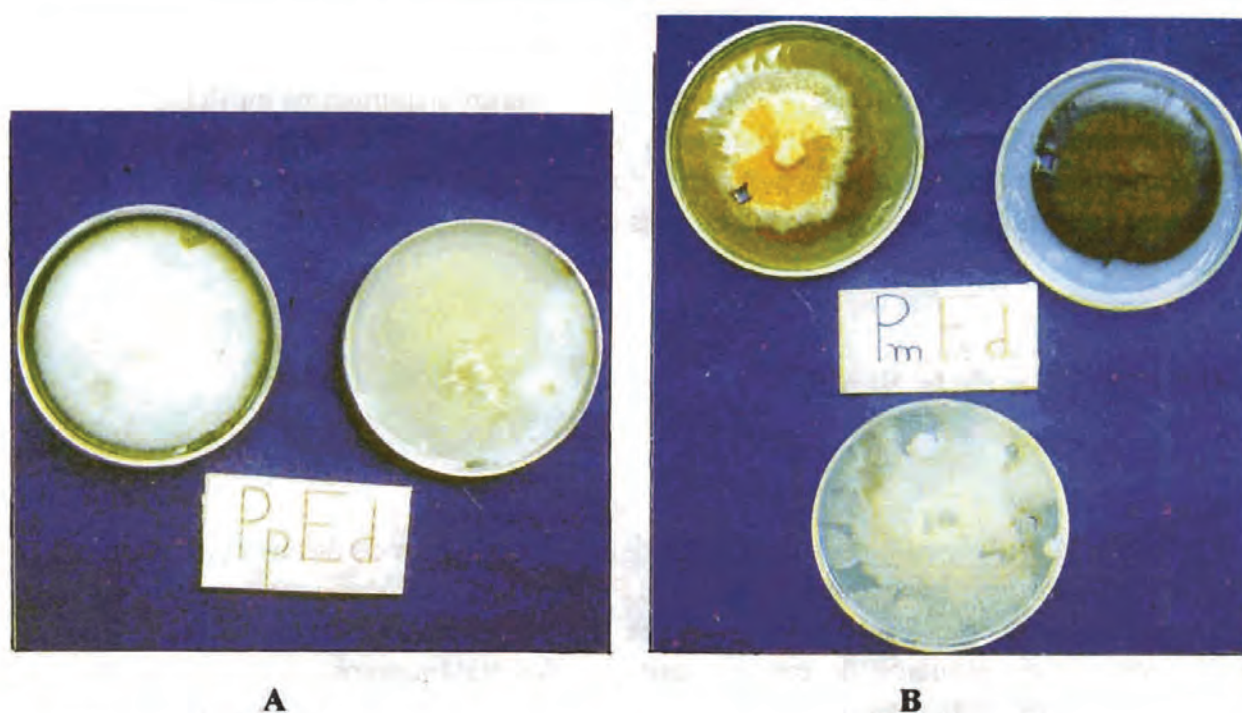
La especie menos contaminada fue *P. douglasiana*, ya que no se presentaron hongos en la semilla de esta especie y solamente se cultivó una bacteria Gram (+), pero no fue posible catalogarla por falta de equipo especializado para la identificación de microorganismos. Este es el primer intento en el país, por identificar los diversos microorganismos endobióticos que contaminan las semillas de pino, por lo que no existen experiencias previas con las que se puedan comparar y discutir los resultados; sin embargo, el género *Xanthomonas* y *Botrytis* se mencionan como causantes de problemas fitosanitarios en semillas forestales (Bonner *et al.*, *op. cit.*).

---

<sup>21</sup> Alexopoulos C., J. 1976. Introducción a la Micología.

<sup>22</sup> Webster, J. 1980. Introduction to Fungi.

<sup>23</sup> Boyce, J. S. 1961. Forest Pathology.



**Figura N° 3.** Contaminantes endobióticos de la semilla de dos especies de pino: A) *Pinus michoacana* y B) *Pinus pseudostrobus*.

### Pruebas de Patogenicidad

De las semillas inoculadas con los hongos de los géneros *Botrytis* y *Pestalotia*, se observó que el porcentaje de plantas con síntoma de *Damping off* es muy bajo en las tres especies; en las semillas inoculadas con el género *Pestalotia*, la especie *Pinus pseudostrobus* es la que presenta el número más alto de plantas con síntoma (seis) y *P. douglasiana* es la especie con menor número de plantas enfermas (solamente una); los resultados de las semillas inoculadas con *Botrytis*, muestran que solo *P. michoacana* presentó una plántula con síntomas de la enfermedad. Estos resultados discrepan de los reportados por Vázquez (1992)<sup>24</sup> quien en un trabajo realizado en cuatro viveros ubicados en el área de influencia del campo experimental Uruapan, encontró que la especie más susceptible a esta enfermedad es *P. michoacana* con un porcentaje de incidencia del 47.1, mientras que *P. pseudostrobus* solamente presentó una incidencia media del 12.2%; por otro lado, se identificaron como los únicos agentes fitopatógenos a *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* (Cuadro N° 1).

<sup>24</sup> Vázquez C., I. 1992. Identificación y evaluación del *Damping off* en cuatro viveros forestales del área de influencia de Uruapan.

De las plantas con síntoma de *Damping off* se hicieron aislamientos en PDA y se aisló nuevamente a *Botrytis* de *P. michoacana* y a *Pestalotia* de *P. pseudostrobus*, con lo cual se comprobaron los postulados de Koch y determinándose que estos organismos son los agentes causantes de la enfermedad en esas dos especies.

## Desinfección de la Semilla

**Peróxido de Hidrógeno.-** Los resultados de los tratamientos de desinfección de semilla en *Pinus pseudostrobus*, donde se utilizó el Peróxido de Hidrógeno mostraron que a bajo tiempo de inmersión (5 y 10 minutos) no existió diferencia en relación con el testigo; se observó una disminución de contaminantes en los tratamientos de 20, 30, 40 y 60 minutos, aunque esta disminución no fue importante, ya que representó solamente entre el 1, 4, 8 y 15% respectivamente.

Los resultados del análisis de varianza indicaron que existió una diferencia estadística entre los tratamientos y la separación de medias, se formaron dos grupos de tratamientos donde el de 60 minutos indicó una significancia mayor que los tratamientos de 5, 10, 20 y 30 minutos, asimismo los tratamientos de 40 y 60 minutos no resultaron significativamente diferentes; finalmente los tratamientos de 40, 30, 20, 10, 5 y el testigo, no fueron significativamente diferentes entre sí, *vid., infra*, Cuadros N° 2 y N° 3.

Cuando se analizaron las colonias de hongos desarrolladas en los diferentes tratamientos, se observó que en el tratamiento de 20 minutos no creció el género *Pestalotia*; en el tratamiento de 30 minutos se desarrolló principalmente el género *Rhizopus*; en el tratamiento de 40 minutos. Se desarrollaron los géneros *Penicillium* y *Pestalotia* y por último, en el tratamiento de 60 minutos se presentó *Rhizopus*, *Penicillium* y *Pestalotia*.

Se pudo observar que no existió una selectividad del producto hacia un género de hongo en particular, ya que se presentaron el total de los géneros en todos los tratamientos, aún en el de 60 minutos. Por otro lado, estos resultados se contraponen con lo mencionado por Bonner *et al. op. cit.* quien recomendó el uso del Peróxido de Hidrógeno al 30% por 20 minutos.

Hongo	Esp.*	Semillas germinadas	Semillas no germinadas	Total semillas	Plantas enfermas	% de daño
<i>Botrytis</i>	1	115	85	200	1	0.86
	2	125	75	200	0	0.00
	3	55	145	200	0	0.00
<i>Pestalotia</i>	1	109	91	200	4	3.66
	2	103	97	200	6	5.80
	3	61	139	200	1	1.60

\* Especie: 1= *Pinus michoacana*; 2= *P. pseudostrobus*, 3= *P. douglasiana*

**Cuadro N° 1.** Resultados de la prueba de patogenicidad en semillas de 3 especies de pino con los hongos *Botrytis* y *Pestalotia*.

Tratamiento	BLOQUES				Total	Media
	I	II	III	IV		
Testigo	25	25	25	25	100	25.00
5 minutos	25	25	25	25	100	25.00
10 minutos	25	25	25	25	100	25.00
20 minutos	25	24	25	25	99	24.75
30 minutos	24	23	25	24	96	24.00
40 minutos	22	24	24	23	92	23.00
60 minutos	23	18	23	21	85	21.25

**Cuadro N° 2.** Número de semillas de *Pinus pseudostrobus*, contaminadas con microorganismos, después del tratamiento con Peróxido de Hidrógeno.

Tratamiento	Media*	Agrupación
60 minutos	21.25	a
40 minutos	23.00	ab
30 minutos	24.00	b
20 minutos	24.75	b
10 minutos	25.00	b
5 minutos	25.00	b
Testigo	25.00	b

\* Colonias de microorganismos por caja de Petri.

**Cuadro N° 3.** Separación de medias por la prueba de rango múltiple de Tukey a un nivel de significancia del 95 %.

**Hipoclorito de Sodio.-** Los resultados de esta prueba muestran que el tratamiento de inmersión de la semilla por 2 minutos con respecto al testigo, tiene una reducción en el número de contaminantes del 29%; los tratamientos de 4 y 6 minutos de inmersión con Hipoclorito de Sodio tienen un efecto altamente desinfectante, ya que eliminan casi en su totalidad (Cuadro N° 4) los microorganismos epibióticos de la semilla de *P. pseudostrobis*.

Desde el punto de vista estadístico, se encontró diferencia altamente significativa entre los tratamientos (Cuadro N° 5) y con la separación de medias se formaron tres grupos, donde el tratamiento de 4 minutos fue significativamente mayor de los demás tratamientos; el tratamiento de 6 minutos resultó significativamente menor que el tratamiento de 4 minutos pero significativamente mayor que los otros dos tratamientos;



por último, los tratamientos de 2 minutos y el testigo fueron significativamente menores que los tratamientos de 4 y 6 minutos (Cuadro N° 6).

Tratamiento	REPETICIONES				Total	Media
	I	II	III	IV		
Testigo	25*	25	25	25	100	25.00
2 minutos	16	14	20	21	71	17.75
4 minutos	1	2	1	0	4	1.00
6 minutos	2	2	1	1	6	1.50

\* Número de semillas contaminadas por caja de Petri.

**Cuadro N° 4.** Número de colonias en las semilla se *Pinus pseudostrobus* tratadas con Hipoclorito de sodio.

F.C.	S.C. <sup>1</sup>	G.L. <sup>2</sup>	C.M. <sup>3</sup>	F calculada
Tratamiento	1725.69	3	575.23	193.0949
Error	35.75	12	2.98	
Total	1761.44	15		

C.V.= 15.2577 1= Suma de cuadrados 2= Grado de libertad 3= Cuadrado medio.

**Cuadro N° 5.** ANVA de los datos del experimento con Hipoclorito de sodio.

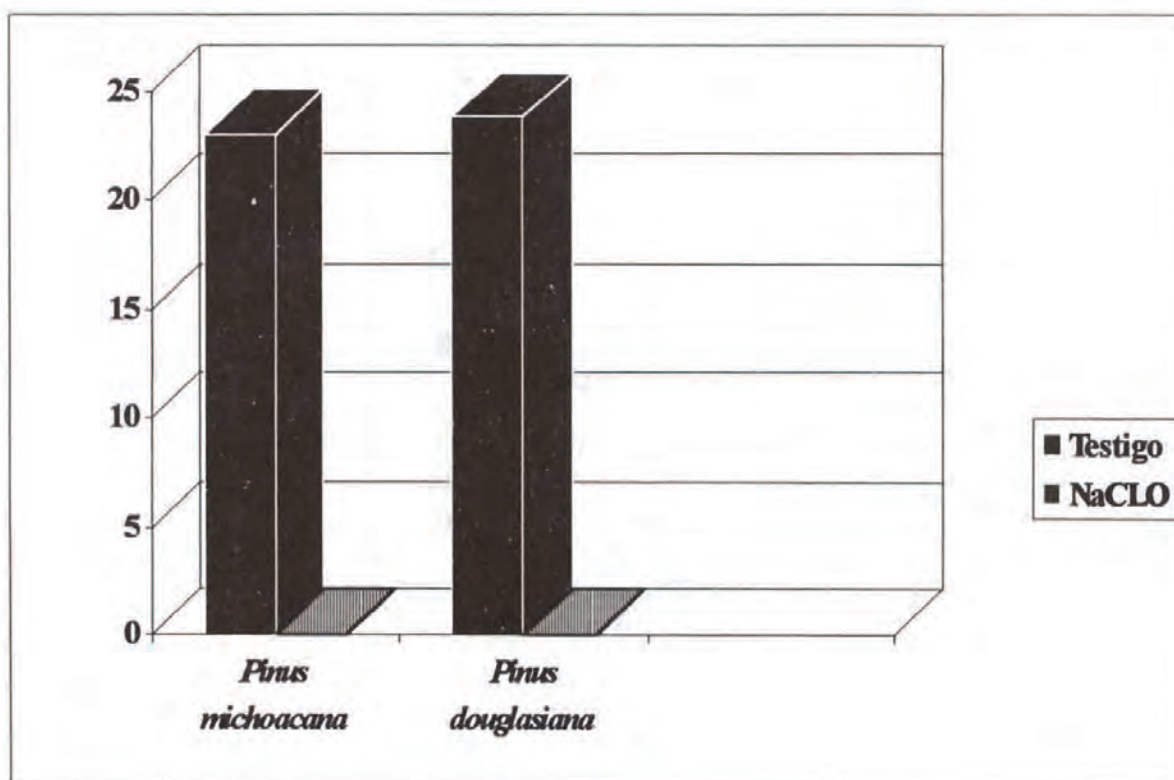
Tratamiento	Media	Grupo
4 minutos	1.0	a*
6 minutos	1.5	b
2 minutos	17.75	c
Testigo	25.00	c

\* Nivel de significancia al 1 %

**Cuadro N° 6.** Agrupación de los tratamientos mediante la prueba de Tukey.

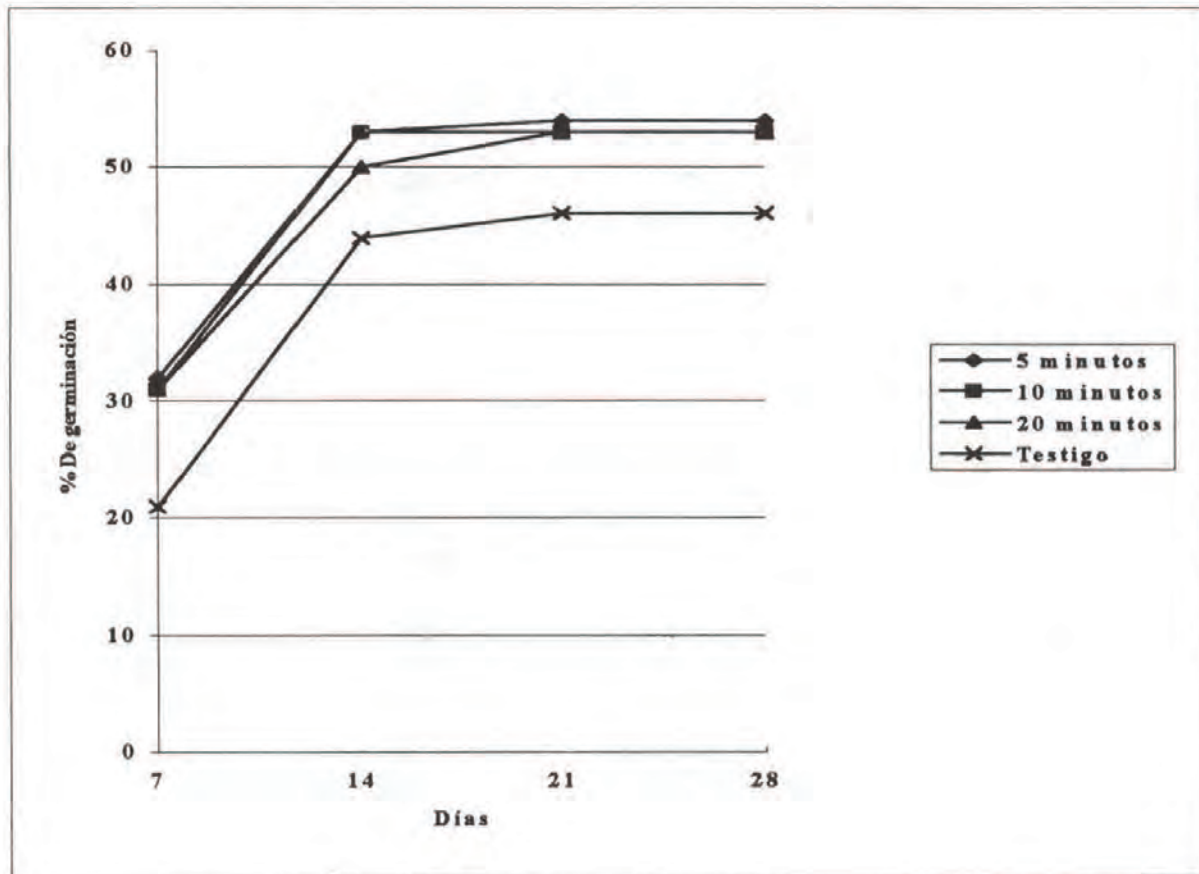
Estos resultados mostraron que el hipoclorito de sodio es un excelente desinfectante de la semilla de *Pinus pseudostròbus*, sin embargo, García y Muñoz, *op. cit.*, recomendaron la inmersión en este producto durante 5 minutos, tiempo superior al que se encontró en esta prueba como mejor tratamiento.

Los resultados después de aplicar el tratamiento con Hipoclorito de Sodio al 1 % por un período de 4 minutos en semilla de *Pinus michoacana* y *P. douglasiana*, fueron los siguientes: *P. michoacana* tuvo una excelente desinfección con el producto, ya que se eliminaron al 100% los contaminantes epibióticos de la semilla; resultados similares ocurrieron con *P. douglasiana*, donde sólo se desarrolló una colonia procedente de una semilla de esta especie, por lo que el control también fue cercano al 100%. En esta prueba no se llevó a cabo un análisis estadístico de los resultados, ya que los datos obtenidos mostraron claramente una alta diferencia del tratamiento de inmersión de la semilla en las dos especies, con lo cual se logró un 100% de control de los microorganismos epibióticos, (López, *op. cit.*), *vid., infra*, Figura N° 4.



**Figura N° 4.** Número de colonias desarrolladas en semilla de dos especies de pino, tratadas con Hipoclorito de Sodio.

**Promotor de la germinación.**- Los resultados de la prueba para promover la germinación de la semilla de *Pinus pseudostrobus*, en la cual se utilizó el Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ ) indicaron que existió una diferencia significativa entre tratamientos en todas las fechas de evaluación; en el resultado final se observó que los tratamientos de 5, 10 y 20 minutos superaron al testigo; con el tratamiento de 5 minutos se incrementó la germinación en un 18.6%; con el de 10 minutos aumentó en un 15.9% y con el tratamiento de 20 minutos alcanzó un 12.6%, esto significa que con el primer tratamiento se obtuvo el más alto porcentaje de incremento. Por otro lado, la semilla de esta especie tuvo su máxima germinación en los primeros 14 días y fue en la observación de los 7 días cuando se reflejó la diferencia entre los tratamientos, lo cual se mantuvo durante toda la prueba, *vid, infra*, Cuadro N° 7 y Figura N° 5.



**Figura N° 5.** Prueba de germinación de la semilla de *Pinus pseudostrobus* tratada con Peróxido de Hidrógeno.

Días Tratamiento	7				14				21			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Testigo	20	21	22	20	45	41	48	40	45	43	52	40
5 minutos	32	34	30	32	52	55	52	54	53	55	53	54
10 minutos	28	31	30	34	46	55	55	54	46	55	55	54
20 minutos	27	30	35	31	44	50	54	53	45	52	54	54

continua...

Días Tratamiento	28				Suma	Media
	I	II	III	IV		
Testigo	47	43	52	40	182	45.50
5 minutos	53	55	54	54	216	54.00
10 minutos	46	55	55	55	211	52.75
20 minutos	45	52	54	54	205	51.25

**Cuadro N° 7.** Número de plantas germinadas (acumuladas) por tratamiento en todas las fechas de evaluación.

El análisis de varianza nos indicó que en las evaluaciones de los 7, 14 y 21 días existió diferencia entre tratamientos, no así en la última evaluación (28 días) (Cuadros N° 8, 9, 10 y 11), donde no existió esta diferencia y mostró que todos los tratamientos son iguales estadísticamente y que para esta especie de pino (*Pinus pseudostrobus*) no es necesario realizar pruebas de germinación mayores de 21 días.

F.V.	G.L. <sup>1</sup>	S.C. <sup>2</sup>	C.M. <sup>3</sup>	F calculada	Probabilidad
Tratamientos	3	329.6875	109.90	21.18	0.000
Error	12	62.2500	5.19		
Total	15	391.9375			

C.V.= 7.97 % 1= Grado de libertad 2= Suma de cuadrados 3= Cuadrado medio.

**Cuadro N° 8.** ANVA de los resultados de 7 días.

F.V.	G.L. <sup>1</sup>	S.C. <sup>2</sup>	C.M. <sup>3</sup>	F calculada	Probabilidad
Tratamientos	3	236.2500	78.75	5.71	0.011
Error	12	165.5000	13.79		
Total	15	401.7500			

C.V.= 7.45 % 1= Grado de libertad 2= Suma de cuadrados 3= Cuadrado medio.

**Cuadro N° 9.** ANVA de los resultados los 14 días.

F.V.	G.L. <sup>1</sup>	S.C. <sup>2</sup>	C.M. <sup>3</sup>	F calculada	Probabilidad
Tratamientos	3	181.2500	60.42	3.77	0.40
Error	12	192.5000	16.04		
Total	15	373.7500			

C.V.= 7.91 % 1= Grado de libertad 2= Suma de cuadrados 3= Cuadrado medio.

**Cuadro N° 10.** ANVA de los resultados a los 21 días.

F.V.	G.L. <sup>1</sup>	S.C. <sup>2</sup>	C.M. <sup>3</sup>	F calculada	Probabilidad
Tratamientos	3	169.2500	56.42	3.41	0.053
Error	12	198.5000	16.54		
Total	15	367.7500			

C.V.= 7.99 %

**Cuadro N° 11.** ANVA de los resultados a los 28 días.

Cuando se realizó la agrupación de medias por fecha de evaluación (Cuadro N° 12), se pudo observar que a los 7 días se formaron dos grupos, donde se estableció que los tratamientos de inmersión de la semilla de *P. pseudostrobus* en Peróxido de Hidrógeno durante tiempos de 5, 10 y 20 minutos fueron significativamente superiores al testigo, pero iguales entre sí. La misma prueba en la evaluación de 14 días formó dos grupos que se interpretaron de la siguiente manera: los tratamientos de 5 y 10 minutos fueron significativamente mayores que el testigo, pero los tratamientos de 5, 10 y 20 minutos no fueron significativamente diferentes entre sí y el testigo fue significativamente menor que los demás tratamientos.

Por último, en la evaluación de 21 días se formaron dos grupos que indicaron que el tratamiento de 5 minutos fue significativamente mayor que el testigo; los tratamientos de 5, 10 y 20 minutos fueron iguales entre sí y el testigo se mostró significativamente menor que los otros tratamientos.

Tratamientos	Media 7 días	Media 14 días	Media 21 días
5 minutos	32.00 a	53.25 a	53.75 a
10 minutos	30.75 a	52.50 a	52.50 ab
20 minutos	30.75 a	50.25 ab	51.25 ab
Testigo	20.75 b	43.50 b	45.00 b

**Cuadro N° 12.** Orden arreglado y acumulado de las medias de las evaluaciones de 7, 14 y 21 días.

De los datos obtenidos en la prueba de medias, a los 7 días, cualquiera de los tratamientos con Peróxido de Hidrógeno, mostró mejores resultados en las pruebas de germinación con *Pinus pseudostrubus*; en la evaluación de 14 días se determinó que los tratamientos de 5 y 10 minutos fueron los mejores y por último, a los 21 días el tratamiento de 5 minutos fue el más eficiente, ya que fue el tratamiento que obtuvo el porcentaje de germinación más alto en todas las fechas, lo que significó la obtención de planta para transplante, en menor tiempo.

Aunque se obtuvieron buenos resultados con el Peróxido de Hidrógeno para promover la germinación, existen otros productos como el Etephon, ACC, Giberelinas (Kepczynski y Bialecka, 1994)<sup>25</sup>, Nitrato de Potasio, Thiourea, Etileno, Cinetina (García y Muñoz, *op. cit.*) y algunos extractos de plantas (Baxter y Vanstaden, 1994)<sup>26</sup> que estimulan o inhiben dependiendo de la concentración y la germinación de la semilla en diferentes especies de vegetales.

## CONCLUSIONES

Del presente trabajo se desprenden las siguientes conclusiones:

- Existieron contaminantes epibióticos y endobióticos en las semillas recién colectadas de tres especies de pino (*Pinus pseudostrubus*, *P. michoacana* y *P. douglasiana*).
- Los hongos contaminantes de la semilla de las tres especies de pino, correspondieron a los géneros *Pestalotia*, *Botrytis*, *Rhizopus*, *Penicillium* y *Aspergillus*.
- Los hongos de los géneros *Botrytis* y *Pestalotia* son agentes causantes del *Damping off* en *Pinus michoacana* y *P. pseudostrubus*.
- El Peróxido de Hidrógeno no es un buen desinfectante de la semilla de *Pinus pseudostrubus*; sin embargo, los tratamientos de 40 y 60 minutos, redujeron la presencia de microorganismos entre un 8 y 15% respectivamente.

---

<sup>25</sup> Kepczynski, J. and Bialecka, B. 1994. Stimulatory effect of ethephon, ACC, gibberellin A (3) and A (4+7) on germination of methylamonate inhibited *Amaranthus caudatus* L. seeds.

<sup>26</sup> Baxter, B. J. M. and J. Vanstaden. 1994. Plant-derived smoke: An effective seed pre-treatment. *Plant Growth Regulation* 14: 3.

- Con el tratamiento a la semilla de las tres especies de pino con Hipoclorito de Sodio al 1% durante 4 y 6 minutos, se obtuvieron un 100% de control de los microorganismos contaminantes epibióticos.
- La inmersión de la semilla de *Pinus pseudostrobus* en Peróxido de Hidrógeno durante 5, 10 y 20 minutos, incrementó el porcentaje de germinación en 18.6, 15.9 y 12.6% respectivamente.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alexopoulos C., J. 1976. Introducción a la Micología. Ed. Universitaria de Buenos Aires. 2a. Edición. Buenos Aires, Argentina. 615 p.
- Atthowe, H. 1992. Propagation of Riparian and Wetland Plants. USDA. FS. Report RM-221. Proc. Western Forest Nursery Assc. pp. 78-82.
- Barnett, H. L. and B. B. Hunter. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Pub. Co. Third edition. Minneapolis, MI. USA. 241 p.
- Barnett, J. P. and S. L. Krugman. 1989. Electromagnetic Treatment of Loblolly Pine Seeds. USDA. FS. Research Note SO-356. 7 p.
- Barnett, J. P. and J. P. Jones. Response of Longleaf Pine Seeds to Storage Conditions and Pregermination Treatments. South J. Appl. For. 17 ( 4 ): 174- 179.
- De la I de Bauer M., L. 1984. Fitopatología. Centro de Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 377 p.
- Baxter, B. J. M. and J. Vanstaden. 1994. Plant-derived smoke: An efective seed pre-treatment. Plant Growth Regulation 14: 3.
- Bonner, F. T. 1986. Seeds of woody plants. In: Advances in Research and Technology of seeds. Part II: pp. 81-112.
- Bonner, F. T.; J. A. Vozzo; W. W. Elam and S. B. Land. 1994. Tree Seed Technology Training Course. Instructors Manual. USDA, FS. General Tec. Rep. SO- 106.
- Boyce, J. S. 1961. Forest Pathology. Third Edition. McGraw-Hill Book Co. New York. USA. 572 p.



- Charles, W. J. 1973. *Patología Vegetal*. Ed. Omega. Barcelona, España. pp. 770-773.
- García M., J. J. y F. H. Muñoz J. 1993. Guía para la producción de planta forestal en envases. Guía técnica Núm.3. Centro de Investigación Pacífico Centro. INIFAP, SARH. México 47 p.
- Kepeczynski, J. and Bialecka, B. 1994. Stimulatory effect of ethephon, ACC, gibberellin A (3) and A (4+7) on germination of methyljamonate inhibited *Amaranthus caudatus* L. seeds. *Plant Growth Regulation* 14: 3.
- López A., G. F. 1981. Manejo de hongos fitopatógenos. UACH. Chapingo, México. 135 p.
- Nelson, E.E.; W.G. Thies and C.Y. Li. 1986. Are Seed and Cone Pathogens Causing Significant Losses in Pacific Northwest Seed Orchards. USDA. FS. Research note PNW. 436 p.
- Parker, E. J. y Rees, A. A. 1983. Examen fitosanitario de semillas de especies forestales. Reunión sobre problemas en semillas forestales tropicales. SARH. SFF. INIF. Tomo II. 105 p.
- Patiño V., F.; P. De la Garza; Y. Villa G.; I. Talavera y F. Camacho. 1983. Guía para la recolección y manejo de semillas de especies forestales. SARH. SFF. INIF. México. Bol. Divulgativo Núm. 63.
- Patiño V., F. y C. J. Marín. 1993. Viveros Forestales. Planeación, establecimiento y producción de planta. CIRS. INIFAP, SARH. México. 159 p.
- Prado O., A. 1981. Los campos experimentales forestales. INIF-SFF, SARH. *Ciencia Forestal* Núm. 3 (1): 39-49. 2a. edición. México.
- Romero C., S. 1988. Hongos fitopatógenos. UACH. Chapingo, México. 347 p.
- SARH. 1991-1992. Inventario Nacional Forestal de gran visión. Reporte principal. SARH. SFF. México. 53 p.
- USDA y SFF, 1994. Viveros y reforestación en México. Curso Internacional de entrenamiento. Centro para forestación de las Américas. Univ. Estatal de Nuevo México