

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
PROGRAMA DOCENTE DE LA CARRERA DE
INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO



**Identificación y Control Biológico de los Hongos Presentes en Semillas de Pinus
culminicola Andresen & Beaman de dos sitios de Arteaga Coahuila.**

Por:

JESSICA NUÑEZ GARCIA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila de Zaragoza, México
Marzo 2026

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
PROGRAMA DOCENTE DE LA CARRERA DE
INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Identificación y Control Biológico de los Hongos Presentes en Semillas de Pinus
culminicola Andresen & Beaman de dos sitios de Arteaga Coahuila.

Por:

JESSICA NUÑEZ GARCIA

TESIS

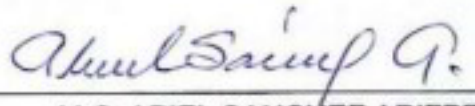
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

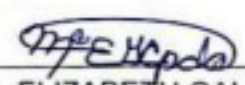
INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobada por el Comité Asesor:


DR. EPIFANIO CASTRO DEL ANGEL
Asesor Principal


MC. PATRICIA FERNANDEZ GUZMAN
Asesor Principal Externo


M.C. ABIEL SANCHEZ ARIZPE
Coasesor


DRA. MA. ELIZABETH GALINDO CEPEDA
Coasesor


DR ALBERTO SANDOVAL RANGEL
Coordinador de la División de Agronomía



Declaración de no plagio

El autor quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente. Así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por las autoridades correspondientes.

Por lo anterior, me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original.

Pasante



Jessica Núñez García

AGRADECIMIENTOS

A **DIOS** por darme la oportunidad de crecer en una familia cálida. Agradezco cada una de las bendiciones y lecciones que llegan a mi vida, las recibo con amor y plenitud.

A mi **ALMA MATER**, mi segundo hogar, el medio por el cual conocí personas maravillosas que se quedaron grabadas en mi corazón por siempre. Por cada momento que en ella viví y cada lugar de ella que tuve la dicha de recorrer.

Al Dr. Epifanio Castro por darme la oportunidad de trabajar con él, gracias Doc por ser un ejemplo de trabajo, dedicación y superación.

A la M. C. Paty Fernández por apoyarme durante el trayecto de este trabajo, con admiración por ser una mujer noble y trabajadora que siempre ayuda a los demás.

Al Dr. Celestino Flores del departamento de Forestal de la UAAAN, por el favor de proporcionarme las semillas de *P. culminicola*.

A quienes fueron mis profesores durante esta etapa universitaria, que de cada uno de ellos llevo buenos aprendizajes, gracias por su contribución en mi formación.

A la maestra Isa Acosta, de la cual nunca olvidare su amabilidad y dedicación para dar clases.

A quien me enseñó a apreciar el trabajo en laboratorio, la maestra Mariela Arredondo, gracias a ella también me entere de la existencia de esta maravillosa universidad, con mucho cariño y respeto.

A mis tías Angelica y Guadalupe por su cariño y buenos deseos.

A mis chicas UAAAN Dani Amaya, Meli Herrera, Ana Vázquez y Fati Palestino. Por cada risa y desvelo que compartimos, gracias por su apoyo, su amistad y comprensión, solo deseo que la vida nos lleve por un buen camino a todas.

A E. H. S. Gracias por el tiempo compartido, por haber sido mi compañero de vida durante este tiempo, deseo que cumplas todo lo que me contaste un día.

A Armando Dorantes, el primer amigo que hice en la Universidad y a quien aprecio de corazón.

A Ame Figueroa, por ser mi mejor amiga y verme en cada una de mis etapas, te llevo siempre en el corazón gracias inmensas por todo lo que has hecho por mí.

A Emi Gonzáles y Esther Rojas por ser mis amigas y apoyarme en todo.

A mi amigo Aarón Vaca, una de mis amistades más valiosas.

A Yose Sandoval y Naye Aniceto por los momentos tan bonitos que pasamos juntas, las llevo en el corazón.

A David Jaramillo, Elton Franco y Adal Rodríguez por ser mis amigos y compartir conmigo momentos de risas y felicidad.

A mi team LDF de CESAVEG, Silvia, Lupita, Edith, Eli y Toño por todas las risas y aprendizajes, por enseñarme que los ambientes laborales bonitos si existen. Llevo en mi corazón la sonrisa de cada uno de ustedes, gracias por hacer de esa etapa algo bonito para mí.

A Edith Gutiérrez una mujer trabajadora, ejemplo de superación, más allá de la admiración en el entorno profesional, admiro tu fuerza y la manera en la que das todo por tus hijos, espero que la vida te recompense muchísimo.

A mis amigas de semillas, Lili, Adri y May por compartir mesa y platicas divertidas durante la hora de comida, gracias por ser personas lindas y amigables.

Al señor Miguel y su familia, gracias por su ayuda durante mi estancia en el Copal, que Dios los bendiga siempre.

A mis perritos y Perikines, por alegrarme la vida y ser mis más fieles compañeros.

Y finalmente, a todo aquel que ha aportado un granito de arena a lo largo de mi vida.

DEDICATORIA

A mi madre Lilia García, por tu amor que no tiene fin, te amo, gracias por no cortarme las alas, por ser mi amiga y no juzgarme nunca, gracias por darme lo mejor de ti, por estar siempre para mí y nunca dejarme sola. Se que, si algo sale bien o mal en mi vida siempre puedo correr a tus brazos, espero ser algún día un poquito de la mujer que eres tú.

A mi padre Santiago Núñez, gracias por todo lo que haces por mí, por brindarme tu apoyo y amor incondicional. Nunca me ha faltado nada gracias a ti, a tu trabajo y esfuerzo. Eres un hombre de un corazón enorme, noble y bondadoso. Espero un día regresarte un poco de todo lo que me has dado. Sin importar la edad siempre seré tu niña papi, te amo.

A mis hermanos Aldo y Santiago, por compartir más que la sangre que nos une. Crecimos juntos y aunque cada uno ha tomado su camino no importa lo lejos que estemos yo siempre los llevo en mi corazón.

A mis cuñadas Mariela y Nancy, por buenas madres, esposas y amigas, en algún momento he necesitado de ustedes y han estado para mí, gracias por ser las hermanas que siempre quise tener.

A mis sobrinos Giovanni, Alonso, Gabriel y Andrés que, aunque no lo demuestre mucho los quiero con todo mi corazón y solo quiero lo mejor para ustedes, siempre podrán contar conmigo.

A mi Abuelita Ninfa, por creer en mí y darme su bendición, fue muy difícil no poder estar ahí cuando partiste, pero este logro va con amor para ti.

A mi abuelito Ramón por esa plática en aquel arbolito que jamás olvidare, cuando me dijiste que te gustaría que me preparara en la vida, aunque no pudiste verlo, lo hice y lo seguiré haciendo en tu nombre.

A mis abuelitos Esperanza y Miguel, hasta donde estén con mucho cariño y respeto.

A Yare Ramírez, por estar para mí en cada momento y brindarme su amistad sincera, gracias por tu cariño y nobleza. Te quiero con el corazón.

RESUMEN

Los pinos constituyen un recurso forestal estratégico en México; sin embargo, algunas especies presentan distribución restringida y alto riesgo de extinción por ejemplo *Pinus culminicola* es un pino arbustivo endémico del noreste de México, catalogado en la categoría de Protección especial y distribuido únicamente en tres localidades de los estados de Coahuila y Nuevo León. Debido a la limitada información sobre su sanidad y calidad fitosanitaria, el presente estudio tuvo como objetivo identificar los hongos asociados a las semillas y evaluar el efecto antagonista *in vitro* de agentes de control biológico.

Se analizaron 500 semillas para determinar el porcentaje de germinación, el cual fue de 28%. Los hongos asociados se aislaron mediante técnicas convencionales y la identificación morfológica fue corroborada molecularmente mediante la amplificación de la región ITS del ADN ribosomal. Se identificaron los siguientes patógenos con sus respectivos porcentajes de incidencia y similitud molecular: *Fusarium oxysporum* (39% de incidencia; 100% de similitud), *Alternaria alternata* (40.2%; 99.81%) y *Trichothecium roseum* (19.8 %; 99.76%).

El potencial antagonista contra los hongos asociados se evaluó mediante cultivos duales utilizando *Trichoderma harzianum* y *Bacillus amyloliquefaciens*, con diez repeticiones por tratamiento. Los porcentajes de inhibición se analizaron mediante ANOVA y comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). *T. harzianum* mostró porcentajes de inhibición de 53% frente a *F. oxysporum*, 58% contra *A. alternata* y 82% contra *T. roseum*. Por su parte, *B. amyloliquefaciens* registró 37%, 46% y 79% de inhibición, respectivamente.

Los resultados confirman la presencia de hongos fitopatógenos con alta incidencia en semillas de *P. culminicola* y evidencian el potencial de ambos agentes como alternativas de control biológico *in vitro*, destacando *T. harzianum* por su mayor eficacia antagonista. Este estudio aporta información fitosanitaria relevante para la conservación y manejo de esta especie forestal en riesgo.

INDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	vii
RESUMEN	ix
INDICE DE CUADROS	xiv
INDICE DE FIGURAS	xv
INTRODUCCIÓN	1
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos.....	4
Hipótesis.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA	5
Antecedentes y Distribución de <i>Pinus culminicola</i>	5
Clasificación Taxonómica	7
Descripción botánica de <i>Pinus culminicola</i>	7
Importancia de la especie.....	8
Importancia de las semillas	9
Hongos portados en semilla	11
Pruebas de detección.....	12
Métodos de control más usados.....	13
Control cultural.....	13
Control legal.....	14
Control químico.....	14
Control biológico	15

<i>Trichoderma harzianum</i>	15
Clasificación taxonómica	16
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	17
Clasificación taxonómica	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Desinfección y aislamiento de semillas	19
Aislamiento de hongos	20
Purificación de hongos	20
Montaje e identificación de hongos	20
Corroboración molecular de las cepas	21
Determinación de incidencia de patógenos en semillas.	21
Bioensayos con <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	22
Bioensayos con <i>Trichoderma harzianum</i>	22
Determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR)	23
Porcentaje de germinación de las semillas	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
Hongos encontrados en semillas de <i>Pinus culminicola</i>	25
<i>Fusarium oxysporum</i>	25
<i>Alternaria alternata</i>	27
<i>Trichothecium roseum</i>	28
Resultados de la corroboración molecular	31
Incidencia de patógenos en semillas	32
Resultados del porcentaje de germinación <i>in vitro</i>	34
Resultados de la inhibición <i>in vitro</i> de los hongos portados en semillas de <i>Pinus culminicola</i>	35

CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	40

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Corroboración molecular de los hongos portados en semillas de <i>Pinus culminicola</i>	31
Cuadro 2. Porcentaje de germinación <i>in vitro</i>	34
Cuadro 3. Antagonismo de <i>T. harzianum</i> y <i>B. amyloliquefacies</i> contra <i>F. oxysporum</i> , <i>A. alternata</i> y <i>T. roseum</i> en cultivos duales.	36

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imágenes representativas de <i>Fusarium oxysporum</i> , (A) crecimiento en placa, (B) microconidios, (C) macroconidios, (D) monofiálides.	26
Ilustración 2. Imágenes representativas de <i>Alternaria alternata</i> , (A) Crecimiento en placa (B) grupo de conidios, (C) conidióforos con conidios.	28
Figura 3. Imágenes representativas de <i>Trichothecium roseum</i> , (A) crecimiento en placa, (B) grupo de conidios, (C) conidios uniseptados.	30
Figura 4. Porcentaje de incidencia de <i>Trichothecium roseum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Alternaria alternata</i> en semillas de <i>Pinus culminicola</i>	33
Figura 5 . Imágenes de la inhibición, <i>Trichoderma harzianum</i> (izquierda); A (<i>F. oxysporum</i> , 53.050), B (<i>A. alternata</i> , 58.477), C (<i>T. roseum</i> , 82.241), <i>B. amyloliquefaciens</i> (derecha); D (<i>F. oxysporum</i> , 37.434), E (<i>A. alternata</i> , 46.235), F (<i>T. roseum</i> , 79.228).....	37

INTRODUCCIÓN

Los pinos constituyen uno de los componentes más representativos de la biodiversidad forestal de México, desempeñando un papel fundamental en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas templados. Estas especies participan activamente en procesos ecológicos esenciales como la regulación hídrica, la conservación del suelo y el mantenimiento de la diversidad biológica (Santillán, 2021). Dentro de este grupo, el género *Pinus* presenta una amplia diversidad en el territorio nacional, posicionando a México como uno de los principales centros de diversificación del género a nivel mundial.

Pinus culminicola Andresen & Beaman es una especie arbustiva de pino piñonero, endémica del noreste de México, considerada rara y de distribución restringida. Se caracteriza por su hábito achaparrado y crecimiento rastrero, formando comunidades densas en ambientes de alta montaña. Su distribución se limita a tres localidades principales: el Cerro del Potosí en Nuevo León, y el Cerro El Coahuilón y Sierra La Martha–El Morro en Coahuila, a altitudes superiores a los 3000 m s.n.m (Manzanilla, 2017).

Debido a la reducción de sus poblaciones y a su limitada distribución geográfica, la especie se encuentra catalogada como En Peligro (P) en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Entre los principales factores de riesgo se han señalado incendios forestales, perturbaciones antrópicas y cambios en el uso del suelo. Sin embargo, otras posibles causas de deterioro, como la incidencia de patógenos asociados

a semillas, han sido poco estudiadas, lo que representa un vacío importante en el conocimiento fitosanitario de la especie.

Las enfermedades de las plantas constituyen un factor determinante en la dinámica y composición de los ecosistemas, ya que pueden reducir drásticamente las poblaciones susceptibles dentro de una región determinada (Agrios, 2005). Un ejemplo histórico de gran impacto es la desaparición del castaño americano (*Castanea dentata*) a causa del tizón del castaño, provocado por *Cryphonectria parasitica*, evento que transformó profundamente los bosques del este de Norteamérica. Este antecedente evidencia el potencial devastador de los patógenos forestales cuando interactúan con hospedantes altamente susceptibles.

En las pináceas, la mayoría de las enfermedades son ocasionadas por hongos fitopatógenos, favorecidos por condiciones de humedad y temperatura características de los ecosistemas. Las semillas representan un importante reservorio y vía de dispersión de estos microorganismos, facilitando la transmisión vertical y horizontal de patógenos (Agarwal & Sinclair, 1997). Entre los géneros de mayor relevancia en coníferas destaca, particularmente *Fusarium circinatum*, agente causal del chancro resinoso del pino, enfermedad que puede provocar marchitez, deformaciones y mortalidad en diversas especies (Cibrián Tovar, 2008).

Tradicionalmente, el manejo de enfermedades forestales ha dependido del control químico, el cual ofrece resultados rápidos; sin embargo, su uso intensivo puede generar resistencia en los patógenos y efectos negativos sobre el suelo y la biota asociada (Cook & Baker, 1983). Ante esta problemática, el control biológico ha emergido como una alternativa sustentable basada en el uso de microorganismos benéficos capaces de

inhibir el desarrollo de patógenos mediante mecanismos como competencia, antibiosis y micoparasitismo. Entre los agentes más estudiados destacan especies del género *Trichoderma* y bacterias del género *Bacillus*, particularmente *Trichoderma harzianum* y *Bacillus amyloliquefaciens*, los cuales han demostrado eficacia en la supresión de diversos hongos fitopatógenos (Galindo, 2023).

En este contexto, resulta necesario generar información fitosanitaria que permita comprender el papel de los hongos asociados a semillas de *P. culminicola*, especialmente considerando su estatus de conservación y su distribución restringida en ecosistemas de alta montaña.

Objetivo general

Identificar los hongos portados en las semillas de *P. culminicola* y control *in vitro* con *T. harzinum* y *B. amyloliquefaciens*.

Objetivos específicos

1. Identificar los hongos presentes en las semillas de *Pinus culminicola* de Arteaga, Coahuila.
2. Evaluar la inhibición *in vitro* de *T. harzianum* y *B. amyloliquefaciens* contra los patógenos de las semillas de *P. culminicola*.

Hipótesis

Se espera encontrar a menos un hongo patógeno asociado a semillas de *P. culminicola* y que al menos una especie de antagonistas controle eficientemente los hongos asociados a las semillas de *P. culminicola* en condiciones de laboratorio.

REVISIÓN DE LITERATURA

Antecedentes y Distribución de *Pinus culminicola*

Pinus culminicola fue descrita en 1961 a partir del estudio de ejemplares localizados en el Cerro del Potosí, Nuevo León, una de las zonas montañosas más elevadas del noreste de México. Posteriormente, su presencia fue documentada en otras regiones, como la Sierra La Marta, en Coahuila, en 1972, y en San Antonio de las Alazanas, también en Coahuila, en 1975. En todos estos registros se observó que la especie no forma asociaciones puras, sino que aparece mezclada con otros componentes de la vegetación. En 1979, se recolectaron individuos en la Sierra La Viga, Coahuila, a una altitud aproximada de 3 300 metros sobre el nivel del mar; sin embargo, en ese momento no se registró información detallada sobre las condiciones ambientales del lugar. En ese entonces se consideraba que su distribución en esta sierra era restringida y se limitaba exclusivamente a la ladera sur del Cerro La Viga (Sánchez Silva *et al.*, 1990).

La forma de crecimiento de *P. culminicola* es parecida a la de otros pinos enanos de regiones montañosas del mundo, como *P. mugo* en Europa y *P. pumila* en el noreste de Asia, este hábito achaparrado es el resultado de su adaptación a condiciones ambientales extremas, caracterizadas por vientos intensos, temperaturas bajas, suelos poco desarrollados y una temporada de crecimiento muy corta. Los suelos donde se establece la especie son, en su mayoría rocosos y calcáreos. Aunque el conocimiento detallado del clima en estos espacios es poco debido a la ausencia de estaciones meteorológicas, se infiere que la precipitación es considerable y que una parte importante ocurre en forma de nieve. En el cerro del Potosí *P. culminicola* puede formar extensas

áreas dominadas por individuos muy próximos entre sí, acompañados a veces por ejemplares dispersos de *P. hartwegii*. Esta coexistencia sugiere que el límite climático para el desarrollo de árboles aún no se alcanza completamente en esta zona, incluso cerca de los 3 700 metros de altitud. En altitudes ligeramente menores, como en la sierra la Marta, la especie se integra en comunidades de matorral de montaña junto con encinos (*Quercus* spp.), *Arctostaphylos*, *Ceanothus*, *Agave* y diversas especies de pastos. En el cerro la Viga y la sierra de Arteaga, en Coahuila, se ha registrado una vegetación similar, aunque con la presencia adicional de géneros como *Abies* y *Pseudotsuga*, los cuales crecen de forma dispersa junto a *P. culminicola*. Finalmente, se ha documentado que la dispersión del polen en el Cerro del Potosí ocurre hacia finales de julio, a una altitud de aproximadamente 3 690 metros, lo que refleja una fertilización tardía y confirma la existencia de una temporada de crecimiento breve, propia de los ambientes de alta montaña (Farjón, 2019).

A lo largo de los últimos años, se ha registrado una disminución preocupante de la superficie ocupada por *P. culminicola*, este fenómeno se vincula a la intensificación de diversas actividades antrópicas. Entre los principales factores que han contribuido a esta reducción destacan las explotaciones forestales, que han modificado de manera significativa la estructura y composición del hábitat; la ganadería extensiva, la cual ha generado procesos de degradación del suelo y alteración de la cobertura vegetal; así como la apertura y construcción de caminos, que fragmentan el territorio y facilitan el acceso a zonas previamente conservada. A ello se le suma la instalación de infraestructura destinada a las telecomunicaciones, que implica en ello la remoción de la vegetación y cambios en el paisaje natural. En conjunto, estas acciones han ejercido una

presión constante sobre los ecosistemas donde se desarrolla *P. culminicola*, provocando una reducción notable de su área de distribución y representando un riesgo para su conservación a largo plazo (Manzanilla, 2017).

Clasificación Taxonómica

Reino: *Plantae*

División: *Spermatophyta*

Subdivisión: *Gymnospermae*

Orden: *Coniferales*

Familia: *Pinaceae*

Género: *Pinus*

Especie: *culminicola* Andresen y Beaman (Perry, 1991).

Descripción botánica de *Pinus culminicola*

Fuste: Arbustivo, de uno a cinco metros de alto, corteza; delgada, escamosa, con placas pequeñas e irregulares de color café-gris; Ramillas delgadas pero rígidas, con pequeñas, decurrentes y persistentes bases de las hojas (de los fascículos); fascículos extendidos a erectos que persisten por dos o tres años.

Acículas: En fascículos de cinco (muy raro de cuatro a seis), de tres a cinco centímetros de longitud, de entre 0.9 y 1.3 milímetros de ancho, márgenes casi enteros, estomas sólo

en las dos caras interiores, en franjas de color blanquecino; las escamas de la vaina de los fascículos retrayéndose antes de caer.

Conos: Solitarios o en pares, con pedúnculos cortos, deciduos, generalmente más anchos que largos cuando se abren de tres a cinco centímetros.

Escamas del cono: De 40 a 60, sólo de 10 a 20 son fértiles, irregulares, delgadas, flexibles, con profundas cavidades donde se encuentran las amplias semillas.

Rango de altitud: De 3 000 a 3 700 metros sobre el nivel del mar (Aguirre & Yerena, 2010).

Importancia de la especie

Pinus culminicola se encuentra en La Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-1994, la cual determina que las especies y subespecies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial, y establece especificaciones para su protección.

P. culminicola se encuentra posicionada de la siguiente manera:

Familia	Género	Especie	Categoría
Pinaceae	<i>Pinus</i>	<i>culminicola</i>	Pr *

Pr* = Sujetas a protección especial endémica.

Pinus culminicola es una conífera microendémica restringida principalmente al Cerro El Potosí, en la Sierra Madre Oriental (Nuevo León, México), donde forma matorrales subalpinos por encima de los 3,000 m. s.n.m. Debido a su distribución geográfica extremadamente limitada, tamaño poblacional reducido y alta susceptibilidad a perturbaciones como incendios forestales y efectos del cambio climático, plagas, la especie está clasificada como En Peligro (Endangered, EN) en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). A nivel nacional, se encuentra incluida en la **NOM-059-SEMARNAT-2010** bajo categoría de riesgo, lo que reconoce su vulnerabilidad y la necesidad de implementar medidas de conservación y manejo específicas para asegurar la viabilidad de sus poblaciones naturales. Su condición de microendemismo y especialización ecológica la convierten en un taxón prioritario para estrategias de conservación *in situ*, monitoreo poblacional y programas de restauración ecológica en ecosistemas de alta montaña del noreste de México.

Importancia de las semillas

Las semillas representan el componente más valioso en el ciclo de vida de los pinos, ya que en su interior resguardan la información genética que define a cada especie y que determina su capacidad para adaptarse a las condiciones ambientales en las que se desarrolla. A través de ellas se transmiten rasgos fundamentales que permiten a los individuos responder a variaciones climáticas, edáficas y ecológicas, lo que las convierte en un elemento clave para la conservación y regeneración de los ecosistemas forestales (CONAFOR, 2018). Sin embargo, las semillas no solo actúan como vehículos de propagación de las especies, sino que también pueden funcionar como importantes

medios de dispersión de patógenos dentro de los ecosistemas forestales. Diversos estudios han demostrado que pueden transportar microorganismos patógenos, como hongos, bacterias y virus, ya sea de manera externa, adheridos a la superficie de la semilla, o de forma interna, alojados en sus tejidos (Agarwal & Sinclair, 1997). Esta característica convierte a las semillas en un factor determinante en la introducción y propagación de enfermedades forestales, especialmente cuando se movilizan entre regiones o se utilizan en programas de reforestación.

La calidad sanitaria de las semillas influye de manera directa en la salud, el vigor y el desarrollo inicial de las plántulas. Un lote de semillas de buena calidad incrementa significativamente las probabilidades de germinación exitosa y de establecimiento de plantas fuertes, capaces de sobrevivir en sus primeras etapas de crecimiento. Por el contrario, la presencia de patógenos puede reducir la germinación, debilitar a las plántulas y afectar negativamente su crecimiento temprano, comprometiendo el éxito de los proyectos de restauración y manejo forestal. A pesar de que se conoce la presencia y distribución de muchos patógenos asociados a las semillas de árboles forestales, aún existe un conocimiento un poco escaso sobre el impacto real que estos organismos tienen en la producción, calidad y viabilidad de las semillas. Esta falta de información dificulta la evaluación precisa de los riesgos sanitarios y subraya la necesidad de estudios más detallados que permitan comprender la magnitud de sus efectos en los procesos de regeneración natural y artificial de los bosques (Vozzo, 2002).

En el caso de las especies forestales, la transmisión de patógenos por medio de la semilla puede afectar de manera importante la germinación, el vigor y el desarrollo inicial de las plántulas, estas son etapas críticas para el establecimiento exitoso de las plantas

en campo. La interacción entre la semilla, el patógeno y las condiciones ambientales determina en gran medida el grado de daño que puede ocasionarse en estas fases tempranas del crecimiento (Bashan & de-Bashan, 2010).

Cabe destacar que prácticamente todas las semillas albergan esporas de diversos hongos microscópicos, ya sea en su superficie o en el interior de sus tejidos. La presencia de esta microflora superficial es común y se debe, en gran medida, a la adhesión de esporas a la superficie irregular de la semilla. Aunque la cantidad de esporas puede variar considerablemente entre especies y lotes de semillas, en casos como el abeto noruego y el pino albar se han registrado concentraciones particularmente elevadas, que pueden oscilar entre 50 000 y 150 000 esporas por gramo de semilla, e incluso alcanzar varios cientos de miles en determinados lotes (Urosevic, 1961). Esta elevada carga microbiana resalta la importancia de evaluar la sanidad de las semillas antes de su uso, especialmente en programas de propagación y reforestación forestal.

Hongos portados en semilla

Los hongos que se pueden presentar en semillas dependen de ciertos factores como su ubicación, se pueden clasificar en dos grupos: portados externamente en la semilla y portados internamente por la semilla. En el primer grupo se encuentran especies de *Botryosphaeria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Mucor*, *Phialophora*, *Rhizopus* y *Trichothecium*. Los hongos bien portados internamente en la semilla incluyen especies de *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Botryodiplodia*, *Caloscypha*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Phoma*,

Schizophyllum y *Sirococcus*. Estos pueden causar deterioro de la calidad de la semilla y mortandad pre o post-emergencia de plántulas (Mathur & Singh, 1993).

Los síntomas de las enfermedades transmitidas por los hongos portados en semillas se dividen en enfermedad de los almácigos (Damping-Off) pre y post-emergencia. El primer grupo reduce la emergencia significativamente y descompone la radícula que recién emerge de la testa y el segundo grupo se subdivide en pudrición de la raíz, del cotiledón y del tallo basal después que las plántulas emergen del suelo. La reducción en la germinación de semillas, descomposición y pérdida de viabilidad de semillas durante almacenamiento y las enfermedades de plántulas son unos de los principales problemas causados por hongos patógenos (Vozzo, 2002).

Prisyazhnyk (1960) mencionó que cuanto mayor era la infección por hongos de las semillas, menor es el porcentaje de germinación de semillas de *Pinus sylvestris*, *Larix sibirica*, *Picea abies* y *Abies sibirica*. Rowan & DeBarr, (1974) observaron presencia de moho en tres lotes de semillas de pinos del incienso durante pruebas de germinación. Siguiendo los procedimientos de pruebas estándares, las semillas se rompieron individualmente y casi 90% de ellas se encontraron llenas, aunque la germinación fluctuó solo de 31 a 79%. Se obtuvo *Fusarium solani* de las semillas no germinadas.

Pruebas de detección

Las pruebas de detección de hongos en las semillas son de gran importancia y estas incluyen el aislamiento y estudio de hongos mediante la recolección de conos, extracción de la semilla, procesamiento, almacenamiento, germinación y el crecimiento de las

plántulas para observar sintomatologías. Diferente a los cultivos agrícolas, estos métodos de detección en la mayoría de las semillas de árboles forestales no han sido estandarizados, y las pruebas que se realizan es por medio de procedimientos normales (Vozzo, 2002). Los métodos que usualmente se utilizan son la prueba de papel filtro, la utilización de medios de cultivo y el método de disolución, los cuales permiten identificar hongos presentes en la superficie o en el interior de la semilla (ISTA, 2018).

Algunos métodos especiales como el plato de dilución, técnica de ultrasonido, patrones de isozima, excisión de tejido de semilla, seccionar la semilla, radiografía y técnica de ELISA también se han utilizado. Se siguen las recomendaciones de ISTA para pruebas de germinación, que, aunque están más disponibles para cultivos agrícolas son de gran ayuda para guiarse y tomar referencia. Un factor un poco limitante es el tamaño de la semilla y la inaccesibilidad en grandes cantidades (Vozzo, 2002).

Métodos de control para hongos

Control cultural

El control cultural se basa en las condiciones de manejo y almacenamiento de las semillas, con la finalidad de reducir las probabilidades de infección (Munkvold, 2009). Es decir, la aplicación de medidas preventivas que comienzan en la recolección de las semillas buscándolas en áreas sanas, así como de árboles que se encuentren en un momento adecuado, recomendado una recolección directa del árbol y no del suelo (Mathur & Singh, 1993).

Control legal

El control legal es importante ya que es necesario que se cumplan las normas a las que están sujetas las semillas, como las leyes y programas de certificación de semillas para la evaluación de su calidad y manejo, así como los estándares para recolección, extracción, almacenamiento y movimiento de semillas para evitar problemas que puedan surgir de ellas (Mathur & Singh, 1993).

Control físico

El control físico es un tipo de control que trata de proteger la vida de las semillas, se utiliza calor, ya que se sumergen las semillas en agua caliente, esto ha sido utilizado para erradicar distintas enfermedades. Aunque este sea un buen método presenta algunos inconvenientes de tipo práctico. Con él todas las semillas deben alcanzar la misma temperatura durante el mismo período de tiempo, entonces no se pueden tratar lotes grandes, solo lotes pequeños y esto limita su función (Ortega, 1991).

Control químico

Este tipo de control se basa en el uso de fungicidas que se aplican directamente sobre las semillas antes de la siembra para inhibir a las enfermedades fúngicas que disminuyen la viabilidad y el vigor de las plantas jóvenes, fungicidas como fludioxonil, carbendazim o thiram han mostrado eficacia contra los patógenos semilleros, y a pesar de sus beneficios su uso prolongado puede ser dañino a la ecología y al ser humano (Paulikiné & Dambrauskas, 2025).

Control biológico

El control biológico es un método de control ecológico en el cual intervienen distintos agentes que hacen la función de antagonistas naturales para combatir y reducir la actividad de diversos tipos de organismos fitopatógenos, esta es una alternativa sostenible y eficaz, se ha estudiado y con el paso del tiempo se ha fortalecido, su empleo ha dado buenos resultados y actualmente es uno de los tipos de control más utilizado (Galindo, 2023).

Trichoderma harzianum

En la naturaleza existen diferentes especies de hongos y bacterias que desempeñan un papel importante para el control de microorganismos fitopatógenos. Entre ellos, los hongos del género *Trichoderma*, los cuales han sido reconocidos por su eficacia. Este género tiene un buen efecto contra sus enemigos por la activación de sus diferentes mecanismos de acción, los cuales limitan el desarrollo de patógenos del suelo (Martínez-Padrón *et al.*, 2017).

Los mecanismos de control de *Trichoderma* son la producción de enzimas hidrolíticas, como lo son las quitinasas, glucanasas y proteasas, estas son capaces de degradar las paredes celulares de otros hongos. También presenta un comportamiento de micoparasitismo, medio por el cual invade y usa los nutrientes de los hongos fitopatógenos. Compite por espacio y nutrientes en la rizosfera, esto dificulta el establecimiento y proliferación de organismos patógenos. Además de ser un agente de control, *Trichoderma* también ha demostrado que tiene efectos positivos en el

crecimiento y el desarrollo vegetal, este estimula la elongación radicular, genera un aumento de altura en las plantas y la biomasa, haciendo a las plantas más fuertes y con una mayor capacidad de adaptación a condiciones adversas que pudieran presentar. Estas propiedades le dan características favorables para su implementación en la agricultura, especialmente por su rápido crecimiento y su alta capacidad de colonización, así como su notable adaptabilidad ambiental (Martínez-Padrón *et al.*, 2017). La estabilidad de *Trichoderma* le permite habitar y establecerse en una amplia variedad de tipos de suelo, bajo distintas condiciones climáticas y edáficas, lo que refuerza su potencial como herramienta biotecnológica. Por estas razones, diversos estudios han descrito a los mecanismos de acción de *Trichoderma*, así como el uso de los metabolitos secundarios que produce para el control de distintos organismos fitopatógenos que afectan a los cultivos agrícolas. Se ha registrado su eficacia en el control de hongos patógenos del suelo, como *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora* y *Fusarium*, los cuales representan una de las principales causas de pérdidas en la producción agrícola a nivel mundial (Howell, 2003).

Clasificación taxonómica

Reyno: Fungi

Filo: Ascomycota

Clase: *Sordariomycetes*

Orden: *Hypocreales*

Familia: *Hypocreales*

Género: *Trichoderma*

Especie: *Trichoderma harzianum*

(Kubicek *et al.*, 2011)

Bacillus amyloliquefaciens

En la década de 1980, bacteriólogos especializados en taxonomía establecieron a *Bacillus amyloliquefaciens* como una especie distinta de *Bacillus subtilis*, a pesar de que ambas comparten únicamente alrededor del 15 % de similitud morfológica (Priest, 1987). Desde entonces, *B. amyloliquefaciens* ha sido reconocida como una de las bacterias más viables y seguras para la promoción del crecimiento vegetal, ya que no presenta efectos secundarios perjudiciales para las plantas ni para el ambiente. Gracias a estas características, se ha posicionado como un excelente agente para su uso en biofertilizantes y estrategias de biocontrol en la agricultura (Priest, 1987).

Los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal (PGP) asociados a *B. amyloliquefaciens* han sido ampliamente estudiados, destacando su capacidad para mejorar la resistencia de las plantas frente al estrés biótico causado por patógenos del suelo. Esta bacteria actúa mediante la competencia por nichos ecológicos y nutrientes, limitando el establecimiento de microorganismos fitopatógenos. Además, produce una amplia variedad de compuestos bioactivos, como lipopéptidos cíclicos, policétidos y compuestos orgánicos volátiles (COV), los cuales permiten antagonizar directamente a los patógenos e inducir la resistencia sistémica en las (Luo *et al.*, 2022).

En el ámbito de la protección de especies forestales, *B. amyloliquefaciens* destaca como un aliado especialmente valioso en el tratamiento de semillas. Su principal ventaja radica en el equilibrio que presenta como agente biológico: es lo suficientemente suave para no causar daños a las semillas ni afectar negativamente su viabilidad, pero al mismo tiempo posee la fortaleza necesaria para persistir en el suelo y establecerse de manera natural. Esta capacidad le permite integrarse eficazmente en los ecosistemas forestales sin generar alteraciones o complicaciones adicionales, lo que refuerza su potencial como una herramienta sostenible para la sanidad forestal (Borriss, 2011).

Clasificación taxonómica

Dominio: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: *Bacilli*

Orden: *Bacillales*

Familia: *Bacillaceae*

Género: *Bacillus*

Especie: *Bacillus amyloliquefaciens* (Borriss, 2011).

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de semillas de *Pinus culminicola* fueron proporcionadas por el Dr. Celestino Flores López del departamento de Forestal de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

El conteo de semillas se llevó a cabo en el Laboratorio del Departamento de Forestal de la UAAAN.

Desinfección y establecimiento de semillas

Este trabajo se realizó en el Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Se extrajeron semillas de los conos y se resguardaron en bolsas de papel siendo etiquetadas con el nombre de la especie, la región y la fecha en la que se realizó el muestreo.

Se tomaron 500 semillas, se colocaron en un vaso de precipitado, se les realizó un lavado con hipoclorito al 2% y tres enjuagues con agua destilada. Junto al mechero con las pinzas se tomó la semilla y se colocó en papel secante estéril por 24 horas. Posteriormente en la campana de flujo laminar se colocaron 10 semillas por cada caja Petri, se sellaron y se llevaron a incubar hasta el crecimiento de los hongos $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta el crecimiento de los hongos.

Aislamiento de hongos

El procedimiento se llevó a cabo conforme fueron apareciendo los hongos en las semillas. Esto se realizó bajo un microscopio estereoscópico con el área de trabajo estéril. Se tomó micelio del hongo y se transfirió a medio de cultivo PDA, utilizando dos cajas por cepa.

Purificación de hongos

La purificación de hongos se realizó en la campana de flujo laminar por punta de hifa, tomándose una pequeña fracción de la cepa con una aguja fina y sembrándose en una placa de medio de cultivo PDA, llevándose a incubar para su crecimiento $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Montaje e identificación de hongos

Se realizaron montas de la siguiente manera; se tomaba una fracción de micelio con ayuda de una aguja fina y se colocaba en un portaobjetos con una gota de lactofenol, se cubría con un cubreobjetos y se observaba en el microscopio compuesto con el lente de 40 x.

La identificación se basó en las características morfológicas de los hongos, tomándose en cuenta la forma de las hifas, conidióforos, esporas y demás estructuras reproductivas utilizando principalmente la literatura ya establecida como lo fueron; (Barnett & Hunter, 1998), (Leslie & Sumerell, 2006), (Simons, 2007) y literatura especializada.

Corroboración molecular de las cepas

La identidad de *T. roseum*, *A. alternata* y *F. oxysporum* se corroboró molecularmente utilizando los oligos ITS1 e ITS4, realizados en IPICYT San Luis Potosí. Posteriormente se realizó la alineación y comparación de las secuencias en el GenBank para poder obtener sus porcentajes de identidad de acuerdo con la base de datos.

Determinación de incidencia de patógenos en semillas.

Para determinar la incidencia de los hongos se observó la presencia de cada uno en las 500 semillas que se tenían como referencia, guiándose con las características de su micelio y anotando en una bitácora la información.

Para calcular el porcentaje de incidencia se aplicó la siguiente formula:

$$I = \left(\frac{n}{N} \right) (100)$$

Donde:

- **I** = porcentaje de incidencia.
- **n** = número de semillas en las que se detectó la presencia.
- **N** = número total de semillas analizadas en la muestra.

Bioensayos con *Bacillus amyloliquefaciens*

Se realizó un diseño completamente al azar con 10 placas Petri, con ayuda de un asa bacteriológica se colocó el agente de control en los cuatro puntos cardinales. El patógeno se sembró en el centro de la caja mientras que para el testigo solo se sembró al centro.

Se revisaron día a día y con ayuda de una regla milimétrica se realizaron las medidas correspondientes tomando en cuenta los puntos norte, sur, este, oeste.

Los datos tomados se registraron en el programa Excel para posteriormente poder aplicar la fórmula de acento y obtener el porcentaje de inhibición de cada patógeno.

Bioensayos con *Trichoderma harzianum*

Para la evaluación *in vitro* del potencial antagonista de *Trichoderma harzianum*, se realizaron ensayos de confrontación dual en medio de cultivo PDA. Se colocó un explante micelial de 0.5 cm de diámetro del agente de control biológico en un extremo de la caja Petri y, en el extremo opuesto, un explante del hongo fitopatógeno de igual tamaño. Las placas se incubaron en condiciones controladas a $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ de temperatura y se monitorearon diariamente.

El crecimiento radial de ambas colonias se midió con una regla milimétrica, considerando los ejes norte, sur, este y oeste para obtener un promedio representativo del diámetro micelial. Las mediciones se realizaron a contraluz para delimitar con mayor precisión el borde de la colonia y reducir errores de lectura. Los datos obtenidos se registraron en hojas de cálculo de Excel y se compararon con el tratamiento testigo (patógeno sin confrontación) para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial.

Determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR)

El efecto antagonista de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus amyloliquefaciens* sobre el crecimiento micelial del hongo fitopatógeno se cuantificó mediante el cálculo del **porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR)**, de acuerdo con la fórmula:

$$(\%)PICR = \frac{R1 - R2}{R1}(100)$$

donde:

- **R1** = crecimiento radial promedio del patógeno en el tratamiento testigo (sin confrontación).
- **R2** = crecimiento radial promedio del patógeno en confrontación con *T. harzianum*.

Los valores de crecimiento radial se obtuvieron a partir del promedio de las mediciones realizadas en los ejes norte, sur, este y oeste de cada colonia. Los ensayos se establecieron bajo un diseño completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento.

Los datos fueron sometidos a análisis estadístico mediante un análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias significativas entre tratamientos. Cuando se detectaron diferencias ($p \leq 0.05$), se aplicó una prueba de comparación múltiple de medias (Tukey) para discriminar grupos homogéneos. El análisis estadístico se realizó utilizando el software SAS versión 9.0.

Porcentaje de germinación de las semillas

El porcentaje de germinación (PG) se determinó conforme a los criterios establecidos por la Association of Official Seed Analysts (AOSA, 1990), considerando como germinada aquella semilla que presentó emergencia visible de la radícula bajo condiciones *in vitro*. El cálculo se realizó dividiendo el número total de semillas germinadas entre el número total de semillas sembradas, multiplicado por 100, mediante la siguiente expresión:

$$PG = [(N^{\circ} \text{ de semillas germinadas}) / (N^{\circ} \text{ semillas sembradas})] \times 100$$

Las evaluaciones se efectuaron durante el periodo experimental establecido, registrando diariamente la emergencia de la radícula para asegurar precisión en el conteo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hongos encontrados en semillas de *Pinus culminicola*

Fusarium oxysporum

La identificación de *Fusarium oxysporum* se realizó con base en sus características macroscópicas y microscópicas. En cultivo, el micelio presentó un crecimiento rápido y abundante, con textura algodonosa; inicialmente de color blanco, que posteriormente cambio a tonalidades rosadas a violeta conforme avanzó el desarrollo de la colonia. (Fig. 1A). Microscópicamente, se observaron conidióforos simples con monofiálides cortas. (Fig.1D) Los macroconidios fueron hialinos, septados, de forma falcada de hoz, ligeramente curvos a casi rectos, con célula basal distintiva en forma de pie, (Fig.1C) característica diagnóstica del complejo *F. oxysporum*. Los microconidios fueron abundantes, unicelulares, hialinos, de forma oval, formados en falsas cabezas sobre monofiálides cortas. (Fig.1B).

Estas características coinciden con las descripciones taxonómicas reportadas por Leslie y Summerell (2006), lo que respalda la determinación morfológica del aislamiento como *F. oxysporum*.

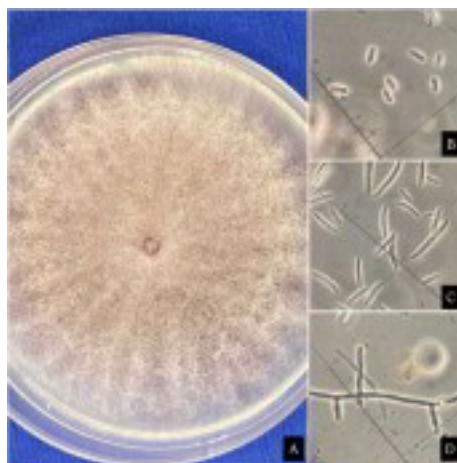


Figura 1. Imágenes representativas de *Fusarium oxysporum*, (A) crecimiento en placa, (B) microconidios, (C) macroconidios, (D) monofiálides.

Desde el punto de vista fitosanitario, especies del complejo *F. oxysporum* son reconocidas como patógenos de amplia distribución, capaces de colonizar tejidos tanto superficial como internamente, afectando la viabilidad y el vigor de las semillas (Nelson *et al.*, 1983) En coníferas, la infección puede ocasionar pudrición de semilla y damping-off en pre y postemergencia, reduciendo significativamente el establecimiento de plántulas en vivero (Mańka, 2005) Además, diversos estudios han señalado que especies del género *Fusarium* pueden transmitirse por semilla, facilitando su dispersión y permanencia en sistemas forestales (Wingfield, 2015).

La presencia de *F. oxysporum* en semillas de *Pinus culminicola* representa un riesgo sanitario relevante, particularmente considerando que se trata de una especie microendémica con poblaciones naturalmente restringidas. En este contexto, la infección fúngica puede impactar de manera desproporcionada los procesos de regeneración natural y los programas de conservación *ex situ*. Por ello, resulta indispensable implementar medidas de diagnóstico oportuno, desinfección de semillas y estrategias de

manejo integrado que incluyan alternativas de control biológico, a fin de garantizar la calidad fisiológica y sanitaria del germoplasma forestal.

Alternaria alternata

El aislamiento identificado como *Alternaria alternata* se determinó con base en sus características micro y macro morfológicas. Identifico inicialmente por su micelio grisáceo y filamentoso, en el microscopio se observaron sus conidios marrones en forma de raqueta y en cadena de varios. En cuanto a los conidióforos un poco declinados de un color marrón claro de donde emergen los conidios lo cual se respalda con Barnett & Hunter. En cultivo, las colonias mostraron crecimiento rápido, con textura felpuda a flocosa y coloración que varió de grisáceo a marrón oscuro, propio de especies (Fig. 2A) del género *Alternaria*. Microscópicamente, se observaron conidióforos pigmentados, septados, de color marrón claro que emergen directamente del micelio, y que producen conidios multicelulares organizados en cadenas acropetales, (Fig. 2C) lo cual es un rasgo diagnósticamente relevante para *A. alternata*.

Los conidios presentaron forma obclavada a obpiriforme, de color marrón a pardo, con múltiples septaciones transversales y, en algunos casos, septaciones longitudinales u oblicuas, y con un extremo apical que puede formar un pico corto característico (Fig. 2B), tal como se ha descrito en estudios morfológicos recientes del complejo *Alternaria*. Estas estructuras son consistentes con las claves taxonómicas actuales para la identificación de *A. alternata* en cultivos axénicos y reflejan el patrón típico de conidios que se observa en aislamientos provenientes de semillas y tejidos vegetales (Woudenberg *et al.*, 2023).

Desde una perspectiva fitosanitaria, la detección de *A. alternata* en semillas de coníferas tiene implicaciones importantes, ya que esta especie está ampliamente distribuida a nivel mundial, es comúnmente portada en semillas y puede actuar como patógeno oportunista en condiciones de estrés o heridas en tejidos, afectando la germinación y el vigor de plántulas.

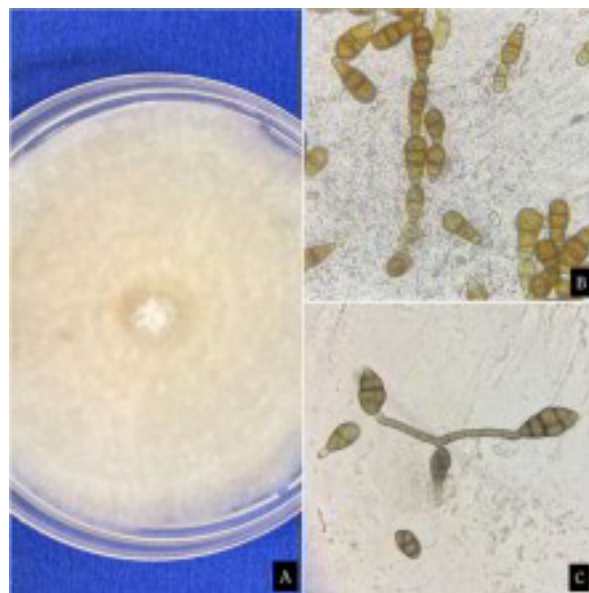


Ilustración 2. Imágenes representativas de *Alternaria alternata*, (A) Crecimiento en placa (B) grupo de conidios, (C) conidióforos con conidios.

Trichothecium roseum

La identificación del aislamiento como *Trichothecium roseum* se realizó con base en sus características, crecimiento en medio PDA, la colonia presentó crecimiento moderado con coloración rosado-salmón y textura aterciopelada a pulverulenta, (Fig 3, A), rasgo

distintivo de esta especie. Microscópicamente, se observaron conidióforos hialinos a ligeramente pigmentados, simples o poco ramificados, que producen conidios en disposición terminal.

Los conidios fueron hialinos, unicelulares a uniseptados en la madurez, de forma piriforme (en pera) a elipsoidal, ligeramente truncados en la base y dispuestos en agregados característicos (Fig. 3A y 3B). Estas estructuras concuerdan con las descripciones taxonómicas de Barnett y Hunter (1998) y con actualizaciones morfológicas recientes del género *Trichothecium*, donde se destaca la morfología piriforme y la pigmentación rosada de las colonias como caracteres diagnósticos (Hyde & Jeewon, 2020).

Desde el punto de vista fitosanitario, *T. roseum* es considerado un hongo saprófito con capacidad patogénica oportunista, frecuentemente asociado a semillas y frutos almacenados. Puede ocasionar deterioro del tejido seminal, reducción del vigor y pérdida de viabilidad, especialmente bajo condiciones de alta humedad relativa, lo que representa un riesgo en programas de conservación y propagación de germoplasma forestal.

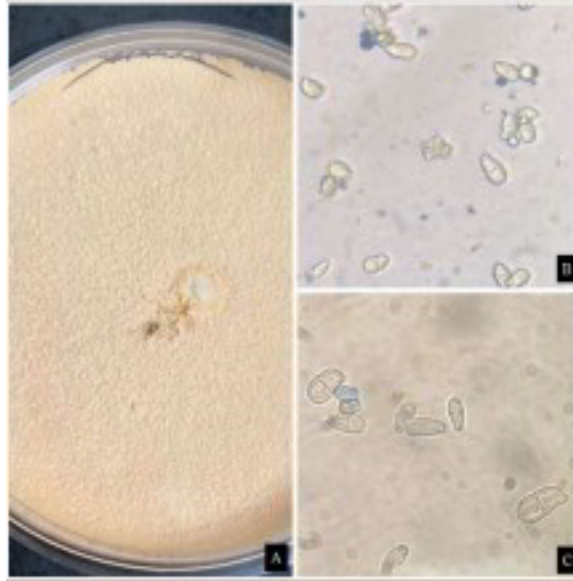


Figura 3. Imágenes representativas de *Trichothecium roseum*, (A) crecimiento en placa, (B) grupo de conidios, (C) conidios uniseptados.

En cuanto a las tres especies de hongos encontradas, integrado por *F. oxysporum*, *A. alternata* y *T. roseum* ha sido documentado previamente en diversas coníferas mexicanas. Autores como (Cibrián Tovar, 2017) señalan a *Fusarium* como el patógeno con mayor impacto en la viabilidad de semillas de *Pinus* spp. Por su parte, la presencia de *T. roseum* coincide con los hallazgos de (Dobra, 2021), el cual asocia este hongo con la degradación de las reservas energéticas de la semilla. En especies de distribución restringida como *P. culminicola*, estos ataques se ven potenciados por el deterioro fisiológico derivado del almacenamiento, similar a lo reportado por (Guerra-Santos, 2014) en otros pinos piñoneros.

La presencia de *A. alternata* se ha asociado con reducción de la viabilidad de las semillas,

Especie	Puntuación total	Similitud (%)
<i>Trichothecium roseum</i>	773	99.76
<i>Alternaria alternata</i>	963	99.81
<i>Fusarium oxysporum</i>	889	100

disminución del porcentaje de germinación y aparición de síntomas como pudrición de semillas, necrosis radicular y damping-off en viveros forestales (Neergaard, 1977).

Resultados de la corroboración molecular

La identidad taxonómica de *Trichothecium roseum*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum* se confirmó mediante análisis molecular. Los resultados mostraron altos valores de similitud con secuencias de referencia depositadas en GenBank, corroborando la identificación morfológica previamente realizada. (Cuadro 1).

Cuadro 1. Corroboración molecular de los hongos portados en semillas de *Pinus culminicola*.

En base a las similitudes moleculares de las cepas podemos decir que son porcentajes altamente confiables y concuerdan con la base de datos del Genbank (NCBI). En micología molecular se aceptan dichas similitudes en la región ITS las cuales son suficientes e incluso superan el umbral.

Incidencia de patógenos en semillas

La incidencia de los hongos encontrados se calculó tomando en cuenta las placas en las que se presentó cada uno y así dividirlos entre el número de cajas en total.

Los resultados obtenidos indican que el hongo fitopatógeno con mayor incidencia en las semillas analizadas fue *Alternaria alternata*, con un 40.2 %, seguido de *Fusarium oxysporum* con 39 %, mientras que *Trichothecium roseum* presentó la menor incidencia, con 19 %. (Fig. 4). Estos valores evidencian una alta frecuencia de colonización fúngica en el lote evaluado, lo que representa un riesgo fitosanitario significativo para la calidad fisiológica de las semillas.

La incidencia registrada para *Alternaria* (40.2 %) y *Fusarium* (39 %) supera los umbrales de tolerancia comúnmente aceptados en semillas forestales destinadas a propagación, donde niveles de infección superiores al 15 % pueden afectar de manera significativa la germinación, el vigor y el establecimiento *in vitro* de plántulas (Leifert & Cassells, 2001). En el caso de especies forestales con distribución restringida, como *Pinus culminicola*, estos niveles adquieren mayor relevancia, ya que una reducción en la viabilidad o en el establecimiento inicial puede impactar directamente los programas de conservación y restauración.

Por su parte, la incidencia de *Trichothecium roseum* (19.8 %) indica que aproximadamente una cuarta parte de las semillas evaluadas presentó colonización fúngica, ya sea superficial o interna. De acuerdo con estudios clásicos en patología de semillas, valores superiores al 20 % pueden considerarse de moderados a altos, particularmente en semillas forestales destinadas a vivero, donde la presencia de patógenos incrementa el riesgo de deterioro durante el almacenamiento y la germinación (Agarwal & Sinclair, 1997). En conjunto, estos resultados subrayan la necesidad de implementar protocolos de desinfección, diagnóstico y manejo sanitario previo a su propagación.

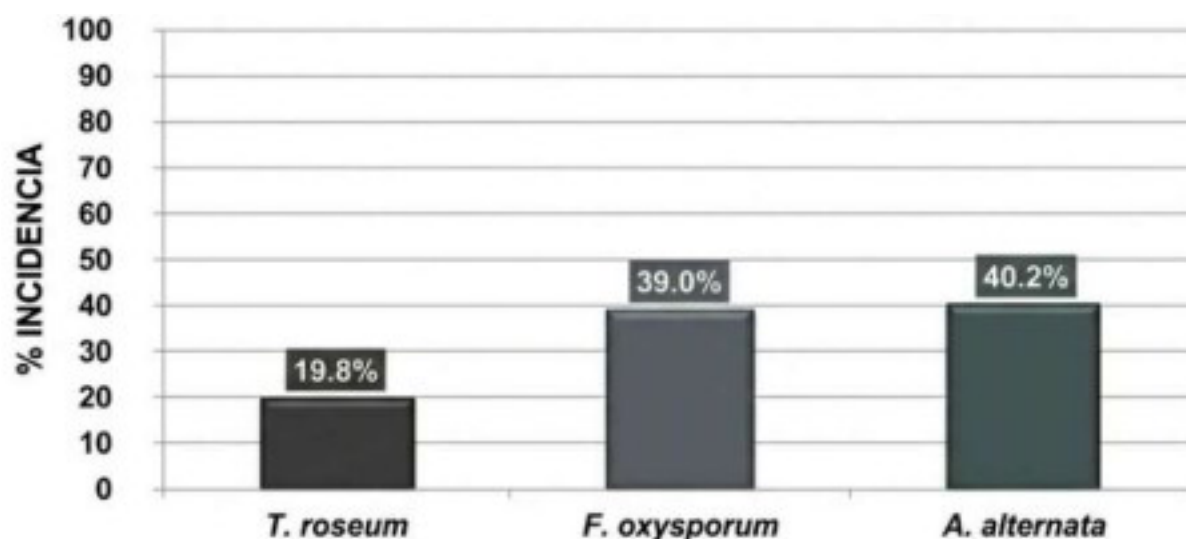


Figura 4. Porcentaje de incidencia de *Trichothecium roseum*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata* en semillas de *Pinus culminicola*.

Resultados del porcentaje de germinación *in vitro*

De las 500 semillas evaluadas, germinaron 140 lo que corresponde a un porcentaje de germinación relativamente bajo (cuadro 2) evidenciando una capacidad germinativa reducida. Estos resultados sugieren la presencia de factores limitantes tanto fisiológicos como fitosanitarios.

En conjunto, estos factores sugieren que la baja germinación observada no responde a una causa única, sino a la interacción entre deterioro fisiológico y presión fitopatogénica, lo cual reviste especial importancia en especies forestales microendémicas, donde la pérdida de viabilidad seminal impacta directamente los programas de conservación y propagación.

Cuadro 2. Porcentaje de germinación *in vitro*.

Semillas germinadas	Germinación (%)
140	28

La tabla anterior refleja el total de semillas de *Pinus culminicola* germinadas en medio de cultivo PDA, las cuales se mantuvieron en incubación y monitoreo.

La baja germinación responde a factores como un deterioro fisiológico durante el almacenamiento prolongado según Priestley (1986) el envejecimiento de las semillas de coníferas resulta en una pérdida de integridad de las membranas celulares, liberándose exudados ricos en solutos, esto debilita el vigor del embrión y favorece a la proliferación de hongos, sin embargo la baja germinación de semillas de *Pinus culminicola* se puede asociar además a los patógenos que se encontraron en sus semillas. Cibrián (2017) describe a *Fusarium oxysporum* como responsable del damping-off pre-emergente en pinos mexicanos. En el caso de *alternaria alternata* según la literatura Dhingra (2002) menciona que este hongo coloniza los tejidos que interfieren en con la división celular del embrión, que junto con *F. oxysporum* genera un complejo fúngico que imposibilita la ruptura del epispermo y emergencia de la radícula.

En cuanto a *Trichothecium roseum* según He *et al.* (2022) este es un hongo que secreta tricotecenos y roseotoxinas que interfieren en el metabolismo de la semilla, impiden que el embrión tenga energía para crecer y en caso de emerger causa daños, es decir una mala germinación.

Resultados de la inhibición *in vitro* de los hongos portados en semillas de *Pinus culminicola*.

Los resultados obtenidos en la siguiente tabla muestran que hay diferencias significativas teniendo el mayor porcentaje de inhibición el tratamiento tres (*T. harzianum* vs *T. roseum*).

Cuadro 3. Antagonismo de *T. harzianum* y *B. amyloliquefacies* contra *F. oxysporum*, *A. alternata* y *T. roseum* en cultivos duales.

Cultivo dual	Inhibición (%)
<i>T. harzianum</i> vs <i>F. oxysporum</i>	53.05 CB
<i>T. harzianum</i> vs <i>A. alternata</i>	58.47 B
<i>T. harzianum</i> vs <i>T. roseum</i>	82.24 A
<i>B. amyloliquefaciens</i> vs <i>F. oxysporum</i>	37.43 D
<i>B. amyloliquefaciens</i> vs <i>A. alternata</i>	46.25 CD
<i>B. amyloliquefaciens</i> vs <i>T. roseum</i>	79.23 A

Medias con letras iguales en columna no son estadísticamente diferentes, medias con letras diferentes muestran diferencias significativas (Tukey, $P < 0.0001$).

Con base a los resultados obtenidos mediante la prueba de Tukey se puede deducir que ambas cepas tuvieron porcentajes de inhibición favorables, sin embargo, la cepa de *Trichoderma harzianum* presentó porcentajes más altos contra los patógenos.

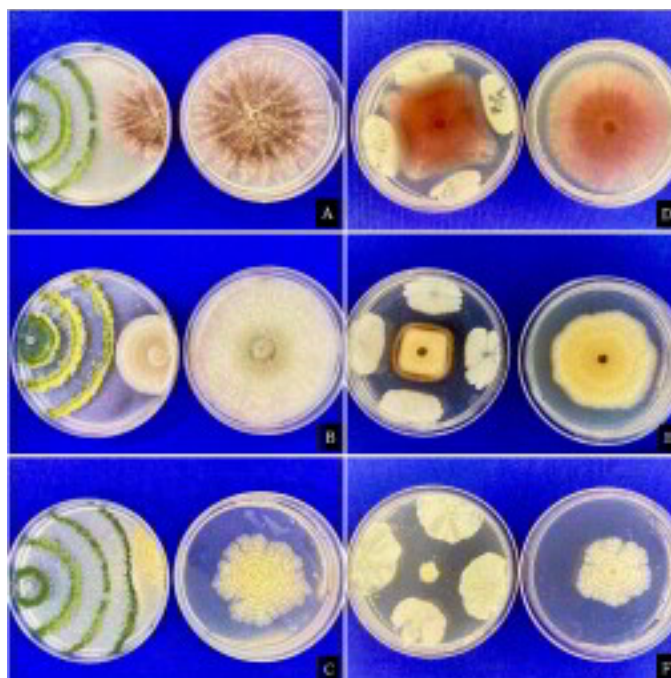


Figura 5 . Inhibición de *Trichoderma harzianum* (izquierda); A (*F. oxysporum*), B (*A. alternata*), C (*T. roseum*), B. *amyloliquefaciens* (derecha); D (*F. oxysporum*), E (*A. alternata*), F (*T. roseum*).

Se ha demostrado que ciertas cepas de *Trichoderma* como lo es *T. harzianum* poseen la capacidad bioquímica de metabolizar micotoxinas, reduciendo la fitotoxicidad en el microambiente de la semilla y permitiendo la reactivación del metabolismo embrionario al colonizar rápidamente el medio de cultivo o la testa de la semilla, *Trichoderma* agota los nutrientes (especialmente el nitrógeno y carbono soluble) antes de que *Fusarium* o *Alternaria* puedan establecerse. La viabilidad del control biológico en coníferas se basa en la exclusión competitiva; *Trichoderma* establece una barrera biológica en el epispermo que impide el acceso de patógenos oportunistas a los exudados de la semilla (Harman, 2006).

Correspondiente a *Bacillus amyloliquefaciens* como agente de biocontrol en hongos asociados a semillas de *P. culminicola* resultó en una estrategia viable, destacando su capacidad de inhibición frente a *Trichothecium roseum*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. Esta eficacia se atribuye a la síntesis de lipopéptidos como las iturinas, que poseen una potente actividad antifúngica mediante la disrupción de membranas celulares (Arrebola *et al.*, 2010). Además, mencionan la capacidad de esta bacteria para formar biofilms en el tejido de la semilla proporciona una protección prolongada, lo que mitiga el efecto de los tricotecenos y facilita un ambiente propicio para la germinación *in vitro*.

Para reforzar el experimento se podría llevar a cabo la implementación en invernadero y a su vez compararlo con fungicida químico para observar las diferencias de germinación en comparación a los agentes de control biológico.

CONCLUSIONES

1. Los hongos identificados morfológica y molecularmente en semillas de *Pinus culminicola* fueron *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* y *Trichothecium roseum*.
2. El hongo que presentó mayor incidencia fue *Alternaria alternata* con un 48%.
3. Los dos agentes de control biológico aplicados tuvieron porcentajes de efectividad inhibitoria, sin embargo, *Trichoderma harzianum* fue el que presentó porcentajes más altos de inhibición.

BIBLIOGRAFÍA

Agarwal, V. K., & Sinclair, J. B. (1997). *Principles of seed pathology* (5^a ed.). EE. UU. CRC Press. pp. 1–539.

Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology* (5th ed.). Elsevier Academic Press. pp. 1–922.

Aguirre, O., & Yerena, J. I. (2010). *Catálogo de contenido de carbono en especies forestales de tipo arbóreo del noreste de México*. CONAFOR. pp. 1–180.

Association of Official Seed Analysts (AOSA). (1990). Rules for testing seeds. *Journal of Seed Technology*, 12, 1–112.

Arrebola, E., Sivakumar, D., & Korsten, L. (2010). Effect of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Trichoderma harzianum* on *Penicillium digitatum* in dessert grapes. *Crop Protection*, 29(11), 1237–1241.

Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi* (4th ed.). APS Press. pp. 1–218.

Bashan, Y., & de-Bashan, L. E. (2010). How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—A critical assessment. *Advances in Agronomy*, 108, 77–136.

Borriss, R. (2011). Use of plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains as biofertilizers and biocontrol agents in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(5), 877–885.

Cibrián Tovar, D. (2008). *Manual de identificación y manejo de plagas y enfermedades en germoplasma y planta producida en viveros*. CONAFOR. pp. 1–240.

Cibrián Tovar, D. (2017). *Fundamentos de entomología forestal*. Universidad Autónoma Chapingo. pp. 1–460.

Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). (2018, February 6). De tal árbol, tal semilla. <https://www.gob.mx/conafor/articulos/de-tal-arbol-tal-semilla>

Cook, R. J., & Baker, K. F. (1983). *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. APS Press. pp. 1–539.

Dhingra, O. D. (2002). Freezing-induced water stress in the infection of dry edible bean by *Alternaria alternata*. *Fitopatologia Brasileira*, 27(3), 294–300.

Dobra, M. C. (2021). *Incidencia de patógenos fúngicos en semillas de coníferas y su impacto en la producción forestal*. Editorial Académica Española. pp. 1–120.

Farjon, A. (2019, November 4). *Pinus culminicola*. Royal Botanic Garden Edinburgh. Threatened Conifers of the World.

Galindo, E. (2023). Multidisciplina, componente fundamental de la innovación en el control biológico de fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*.

Guerra-Santos, J. H., Hernández-Guerrero, R., & Rodríguez, A. (2014). Deterioro de semillas: Mecanismos fisiológicos y bioquímicos. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 31(2), 108–119.

Harman, G. E. (2006). Myth and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease*, 90(4), 377–393.

- He, Y., et al. (2022). Effects of *Trichothecium roseum* and its metabolites on the seed germination and seedling growth of various vegetables. *Journal of Fungi*, 8(5), 456.
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases. *Plant Disease*, 87(1), 4–10.
- Hyde, K. D., & Jeewon, R. (2020). The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi. *Fungal Diversity*, 105, 1–136.
- International Seed Testing Association (ISTA). (2018). *International rules for seed testing*. ISTA. pp. 1–296.
- Kubicek, C. P., et al. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral lifestyle of *Trichoderma*. *Genome Biology*, 12(4), R40.
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing. pp. 1–388.
- Luo, L., et al. (2022). *Bacillus amyloliquefaciens* as an excellent agent for biofertilizer and biocontrol in agriculture: An overview of its mechanisms. *Microbiological Research*, 259, 126984.
- Machado, J. C. (2000). Patología de semillas: Significados y perspectivas. *Revista Brasileira de Sementes*, 22(2), 1–9.
- Mańka, M. (2005). The saprotrophic fungi community of the soil and its role in plant health. *Phytopathologia Polonica*, 35, 11–21.
- Manzanilla, U. (2017). *Pinus culminicola*: Un pino mexicano raro, en peligro de extinción y único en el mundo. *Desde el Herbario CICY*, 9–12.

- Martínez-Padrón, H. Y., Osorio-Hernández, E. O., Estrada-Drouaillet, B., López-Santillán, J. A., Varela-Fuentes, S. E., & Torres-Castillo, J. A. (2017). Control biológico de fitopatógenos mediante aislados de *Trichoderma* spp. *Agroproductividad*, 10(3), 9–14.
- Mathur, S. B., & Singh, K. (1993). *Seed pathology: Principles and practice*. Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. pp. 1–432.
- Munkvold, G. P. (2009). Seed pathology progress in academia and industry. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 285–311.
- Neergaard, P. (1977). *Seed pathology* (Vols. 1–2). Macmillan Press. pp. 1–1191.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., & Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium species: An illustrated manual for identification*. Pennsylvania State University Press. pp. 1–193.
- Ortega, R. G. (1991). Transmisión de enfermedades por las semillas de hortalizas: Su prevención. *Hojas Divulgadoras*, 3–6.
- Paulikienė, S., & Dambrauskas, B. (2025). Seed treatment: Importance, application, impact, and opportunities for increasing sustainability.
- Perry, J. P. (1991). *The pines of Mexico and Central America*. Timber Press. pp. 1–231.
- Priest, F. G. (1987). A numerical classification of the genus *Bacillus*. *Journal of General Microbiology*, 133, 1847–1882.
- Priestley, D. A. (1986). *Seed aging: Implications for seed storage and persistence in the soil*. Comstock Publishing Associates. pp. 1–304.
- Rowan, S. J., & DeBarr, G. L. (1974). Moldy seed and poor germination linked to seedbug damage in slash pine. *Tree Planters' Notes*, 25(1), 25–27.

Sánchez Silva, R., López García, J., & Espinoza Rodríguez, J. M. (1990). *Pinus culminicola* Andresen y Beaman y sus asociaciones en la ladera sur del Cerro La Viga, Coahuila. *Investigaciones Geográficas*, 1(21), 21–43.

Schoch, C. L., et al. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241–6246.

Simmons, E. G. (2007). *Alternaria: An Identification Manual*. CBS Biodiversity Series No. 6. CBS Fungal Biodiversity Centre.

Vozzo, J. A. (Ed.). (2002). *Tropical tree seed manual*. U.S. Department of Agriculture, Forest Service. Agriculture Handbook No. 721, 1–899 pp.

Wingfield, M. J. (2015). One fungus, one name: Promoting epithets, displacing names and nominating alternatives in American Phytopathological Society journals. *IMA Fungus*, 6(1), 257–271.

Woudenberg, J. H. C., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2023). *Alternaria* update: Species limits, evolution and classification. *Studies in Mycology*, 105, 1–105.