

# *Trichoderma harzianum* Rifai as a biocontrol of *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell in seedlings of *Pinus greggii* Engelm. ex Parl. in three substrates

## Biocontrol de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell en plántulas de *Pinus greggii* Engelm. ex Parl. en tres sustratos

Silvia E. García-Díaz<sup>1\*</sup>; Arnulfo Aldrete<sup>2</sup>; Dionicio Alvarado-Rosales<sup>3</sup>; David Cibrián-Tovar<sup>1</sup>; José T. Méndez-Montiel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales. km 38.5 carretera México- Texcoco. C. P. 56230. Texcoco, Estado de México, México.

<sup>2</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Postgrado en Ciencias Forestales. C. P. 56230. Montecillo, Texcoco, Estado de México.

<sup>3</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología. C. P. 56230. Montecillo, Texcoco, Estado de México.

\*Corresponding author: edithgar@correo.chapingo.mx, edith65@gmail.com, tel.: +52 (595) 952 1500 ext. 5542.

### Abstract

**Introduction:** Damping-off is a common disease in forest nurseries that causes significant economic losses worldwide.

**Objective:** To evaluate the pathogenicity and incidence of *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell in seedlings of *Pinus greggii* Engelm. ex Parl., and the use of *Trichoderma harzianum* Rifai as a biocontrol in three substrates.

**Materials and methods:** The phytopathogenic fungus *F. circinatum* (strain SF5) and the antagonist *T. harzianum* (commercial strain T-22 KRL-AG2) were inoculated into *P. greggii*. Three substrates based on peat moss, pine sawdust and pine bark were used. The incidence of the disease and the morphological indices of the plant (stem diameter, height, aerial dry weight/root dry weight ratio, slenderness index and Dickson quality index) were evaluated. The data were subjected to an analysis of variance (GLM procedure of SAS version 9.0) and Tukey's multiple comparison test ( $P \leq 0.05$ ).

**Results and discussion:** Pathogenicity was tested using Koch's postulates. The incidence of the disease was high (> 93 %) in substrates based on peat moss and pine bark, and was lower in the sawdust-based substrate (78 %). *Trichoderma harzianum* and the sawdust-based substrate reduced the incidence to 66 %. Plant quality, based on the morphological indices, was highest in the peat moss substrate.

**Conclusion:** *Fusarium circinatum* is pathogenic in *P. greggii*; the sawdust-based substrate and *T. harzianum* reduced the incidence of the disease in the seedlings.

### Resumen

**Introducción:** El *damping-off*, secadera o chupadera, es una enfermedad frecuente en los viveros forestales que ocasiona pérdidas económicas significativas a nivel mundial.

**Objetivo:** Evaluar la patogenicidad e incidencia de *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell en plántulas de *Pinus greggii* Engelm. ex Parl., y el uso de *Trichoderma harzianum* Rifai como biocontrol en tres sustratos.

**Materiales y métodos:** El hongo fitopatógeno *F. circinatum* (cepa SF5) y el antagonista *T. harzianum* (cepa comercial T-22 KRL-AG2) se inocularon en *P. greggii*. Se utilizaron tres sustratos a base de turba de musgo, aserrín y corteza de pino. Se evaluaron la incidencia de la enfermedad y los índices morfológicos de la planta (diámetro del tallo, altura, relación peso seco aéreo/peso seco radical, índice de esbeltez e índice de calidad de Dickson). Los datos se sometieron a un análisis de varianza (procedimiento GLM de SAS versión 9.0) y comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

**Resultados y discusión:** La patogenicidad se comprobó mediante los postulados de Koch. La incidencia de la enfermedad fue alta (> 93 %) en los sustratos a base de turba de musgo y corteza de pino, y fue menor en el sustrato a base de aserrín (78 %). *Trichoderma harzianum* y el sustrato a base de aserrín redujeron la incidencia a 66 %. La calidad de la planta, con base en los índices morfológicos, fue mayor en el sustrato de turba de musgo.

**Conclusión:** *Fusarium circinatum* es patógeno en *P. greggii*; el sustrato a base de aserrín y *T. harzianum* redujeron la incidencia de la enfermedad en las plántulas.

**Keywords:** Damping-off; antagonist; peat moss; sawdust; pine bark.

**Palabras clave:** *Damping-off*; secadera; antagonista; turba de musgo; aserrín; corteza de pino.

## Introduction

A substrate called “*mezcla base*” (base mixture) composed of peat moss, vermiculite and perlite at a 3:1:1 ratio has been used in Mexican forest nurseries. This mixture is widely used as a substrate with physical and chemical characteristics suitable for plant production; however, the main components are imported at high costs, which directly impacts the cost of production. Currently there are alternative substrates prepared from materials such as pine bark and sawdust, coconut fiber or rice husk that can replace the base mixture for plant production and reduce its unit cost in forest nurseries (Aguilera-Rodríguez, Aldrete, Martínez-Trinidad, & Ordaz-Chaparro, 2016).

Plant quality is determined by genetic, morphological, physiological and health characteristics; in the latter, phytopathogenic agents can have an economic impact (Villar, 2003). *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell (teleomorph = *Gibberella circinata*) occurs in pine plantations and is the causal agent of pitch canker. In nurseries, this fungus causes damping-off, root rot before and after emergence, wilting and rotting of the neck and stem in pine seedlings (García-Díaz et al., 2017; Herron et al., 2015). The control of this pathogen is complicated and costly since chemical treatments are mainly used that, besides endangering the natural balance and human health (Cubillos, Páez, & Mejía, 2011; Solano-Bonilla, & Brenes-Chacón, 2012), cause phytotoxicity and resistance, resulting in an increase in dose and number of applications (Reglinski & Dick, 2005; Romero, Crosara, & Baraibar, 2008).

An alternative for controlling *F. circinatum* is the use of biological control agents such as the fungus *Trichoderma* (Okorski, Oszako, Nowakowska, & Pszczółkowska, 2014). The species most used in biocontrol are *T. virens* Mater., *T. viride* Pers. and *T. harzianum* Rifai, the latter being the antagonist fungus with the greatest commercial use and the most researched for its application in biological control (Benítez, Rincón, Limón, & Codón, 2004; Harman, Björkman, Ondik, & Shores, 2008). In New Zealand, Cummings et al. (2016) conducted a study at nursery and plantation level in which they analyzed trays, substrates and soils; the researchers isolated and identified, by morphology and phylogenetic analysis, 16 native species of *Trichoderma* with the possibility of control for phytopathogens.

The mechanisms of action of *Trichoderma* on phytopathogenic fungi are mainly competition for nutrients and the production of antibiotics, such as trichodermin, suzukacillin, alamethycin, dermadin, trichothecenes and trichorzianin, whose function is to inhibit spore germination (Infante, Martínez, González, & Reyes, 2009). The antagonist increases

## Introducción

En los viveros forestales de México se ha utilizado un sustrato llamado “*mezcla base*” compuesto por turba de musgo, vermiculita y perlita en proporción 3:1:1. Esta mezcla es muy utilizada por ser un sustrato con características físicas y químicas idóneas para la producción de planta; sin embargo, los componentes principales se importan a costos altos, lo que impacta de manera directa en el costo de producción. Actualmente existen sustratos alternativos preparados a partir de materiales como corteza y aserrín de pino, fibra de coco o cascarilla de arroz que pueden sustituir la mezcla base para la producción de planta y reducir su costo unitario en los viveros forestales (Aguilera-Rodríguez, Aldrete, Martínez-Trinidad, & Ordaz-Chaparro, 2016).

La calidad de la planta está determinada por características genéticas, morfológicas, fisiológicas y sanitarias; en esta última, los agentes fitopatógenos pueden tener impacto económico (Villar, 2003). *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell (teleomorfo = *Gibberella circinata*) se presenta en plantaciones de pino y es el agente causal del cancro resinoso. En los viveros, este hongo causa *damping-off*, pudrición de raíz antes y después de la emergencia, marchitamientos y pudrición del cuello y tallo en plántulas de pino (García-Díaz et al., 2017; Herron et al., 2015). El control de este patógeno es complicado y costoso ya que se usan tratamientos químicos principalmente que, además de poner en peligro el equilibrio natural y la salud humana (Cubillos, Páez, & Mejía, 2011; Solano-Bonilla, & Brenes-Chacón, 2012), causan fitotoxicidad y resistencia, ocasionando el incremento de dosis y número de aplicaciones (Reglinski & Dick, 2005; Romero, Crosara, & Baraibar, 2008).

Una alternativa para controlar *F. circinatum* es el uso de agentes de control biológico como el hongo *Trichoderma* (Okorski, Oszako, Nowakowska, & Pszczółkowska, 2014). Las especies más empleadas en el biocontrol son *T. virens* Mater., *T. viride* Pers. y *T. harzianum* Rifai, siendo este último, el hongo antagonista de mayor uso comercial y el más investigado para su aplicación en el control biológico (Benítez, Rincón, Limón, & Codón, 2004; Harman, Björkman, Ondik, & Shores, 2008). En Nueva Zelanda, Cummings et al. (2016) realizaron un estudio a nivel de viveros y plantaciones en el cual analizaron charolas, sustratos y suelos; los investigadores aislaron e identificaron, por morfología y análisis filogenético, 16 especies nativas de *Trichoderma* con posibilidad de control para fitopatógenos.

Los mecanismos de acción de *Trichoderma* sobre los hongos fitopatógenos son, principalmente, la competencia por nutrientes y la producción de antibióticos, tales como trichodermina, suzukacilina, alameticina, dermadina,

its rate of development by covering the surface and preventing the establishment of the pathogen by inducing resistance in plants (Desender, Andrivon, & Val, 2007). In the interaction with the roots, *Trichoderma* spp. confers benefits such as the promotion of growth and the increase of systemic resistance, having effects on the development and productivity of the plant (Benítez, Rincón, Limón, & Codón, 2004; Dumroese, Kim, & James, 2012).

In Mexico, the application of *T. harzianum* as a *Fusarium* antagonist is common in forest nurseries; however, little is known about the effect and efficacy of the antagonist when incorporated into different substrates. Therefore, the objective of this study was to evaluate the pathogenicity and incidence of *F. circinatum* in *P. greggii* seedlings planted in three substrates and the use of *T. harzianum* as a biocontrol mechanism against the pathogen.

## Materials and methods

### Substrates and seed

The experiment was carried out in the greenhouses (19° 29' 34" N and 98° 53' 38" W, elevation of 2240 m) of the Division of Forest Sciences (DiCiFo) of the *Universidad Autónoma Chapingo* in Texcoco, Mexico.

The substrates evaluated were as follows: S1 = peat moss (PROMIX®), agrolite and vermiculite; S2 = pine sawdust, pine bark and peat moss; and S3 = pine bark, pine sawdust and peat moss, all at a 60:20:20 ratio (Hernández-Zarate, Aldrete, Ordaz-Chaparro, López-Upton, & López-López, 2014). The sawdust was obtained from a local sawmill with fresh material (no more than 15 sawing days) of *Pinus patula* Schltdl. & Cham. Composted *Pinus douglasiana* Martínez bark was obtained from the MASVI company in the southern region of Jalisco. Osmocote Plus® 15-9-12 controlled-release fertilizer was added to the mixtures of each substrate in doses of 7 g·L<sup>-1</sup>, with a release time of eight to nine months.

Deepot trays with 42 cavities and 170 mL cells were used. The *P. greggii* seed was obtained from a germplasm bank located in the community of Pueblo Nuevo, municipality of Chignahuapan, Puebla (19° 52' 60" N and 98° 06' 36" W and elevation of 2 450 m). After filling the cells with each type of substrate, sowing was done directly by placing two seeds per cavity. A month later, thinning was done to leave only one seedling per cavity and, at the end of May, when the plants were 45 days old (May 25, 2015), the inoculation with *F. circinatum* and the first application of *T. harzianum* to the substrate were carried out. Irrigation was applied daily to the surface during the germination and

trichotecenos y trichorzianina, cuya función es inhibir la germinación de esporas (Infante, Martínez, González, & Reyes, 2009). El antagonista incrementa su velocidad de desarrollo cubriendo la superficie y evitando el establecimiento del patógeno por inducción de resistencia en las plantas (Desender, Andrivon, & Val, 2007). En la interacción con las raíces, *Trichoderma* spp. confiere beneficios como la promoción del crecimiento y el aumento de la resistencia sistémica, teniendo efectos en el desarrollo y productividad de la planta (Benítez, Rincón, Limón, & Codón, 2004; Dumroese, Kim, & James, 2012).

En México, la aplicación de *T. harzianum* como antagonista de *Fusarium* es común en los viveros forestales; sin embargo, se conoce poco sobre el efecto y la eficacia del antagonista al incorporarse en diferentes sustratos. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la patogenicidad e incidencia de *F. circinatum* en plántulas de *P. greggii* sembradas en tres sustratos y el uso de *T. harzianum* como mecanismo de biocontrol contra el patógeno.

## Materiales y métodos

### Sustratos y semilla

El experimento se llevó a cabo en los invernaderos (19° 29' 34" N y 98° 53' 38" O, altitud de 2240 m) de la División de Ciencias Forestales (DiCiFo) de la Universidad Autónoma Chapingo en Texcoco, México.

Los sustratos evaluados fueron los siguientes: S1 = turba de musgo (PROMIX®), agrolita y vermiculita; S2 = aserrín de pino, corteza de pino y turba de musgo; y S3 = corteza de pino, aserrín de pino y turba de musgo; todos en proporción 60:20:20 (Hernández-Zarate, Aldrete, Ordaz-Chaparro, López-Upton, & López-López, 2014). El aserrín se obtuvo de un aserradero local con material fresco (no mayor de 15 días de aserrado) de *Pinus patula* Schltdl. & Cham. La corteza en compost de *Pinus douglasiana* Martínez se obtuvo de la empresa MASVI en la región sur de Jalisco. A las mezclas de cada sustrato se agregó fertilizante de liberación controlada Osmocote Plus® 15-9-12 en dosis de 7 g·L<sup>-1</sup>, con tiempo de liberación de ocho a nueve meses.

Se utilizaron mesas portatubetes con 42 cavidades y tubetes de 170 mL. La semilla de *P. greggii* se obtuvo de un banco de germoplasma localizado en la comunidad de Pueblo Nuevo, municipio de Chignahuapan, Puebla (19° 52' 60" N y 98° 06' 36" O y altitud de 2 450 m). Después de llenar los tubetes con cada tipo de sustrato, la siembra se hizo en forma directa colocando dos semillas por cavidad. Un mes después se hizo un raleo para dejar una sola plántula por cavidad y, a finales de mayo, cuando las plantas tenían 45 días de edad

emergence of the plants, then every other day. The experiment lasted 13 weeks (June to September).

#### ***Pinus greggii* plants inoculated with *Fusarium circinatum***

The *P. greggii* plants were inoculated with the SF5 strain isolated from the Military Forest Nursery of Atlangatepec, Tlaxcala, and obtained from the DiCiFo Forest Parasitology laboratory strain repository. The strain is identified, morphologically and with three molecular markers, as *F. circinatum*; its accession numbers deposited in the GenBank are ITS (KX276596), TEF (KZ337005) and IGS (KX306890). For the inoculation of *F. circinatum* (Fc), pure strains were taken with eight days of growth in PDA culture medium with development of mycelium and sporulation of the fungus. The phytopathogen was applied by injection of 20 mL of a suspension of  $7.9 \times 10^4$  spores·mL<sup>-1</sup> (García-Díaz et al., 2017) to the substrate (S) of each cell. The treatments inoculated with *F. circinatum* were T2 (S1+Fc), T6 (S2+Fc) and T10 (S3+Fc) (Table 1).

#### ***Pinus greggii* plants inoculated with *Trichoderma harzianum***

The PHC® *T. harzianum* (Th) commercial strain T-22 KRL-AG2 was used in doses of 3.4 g·L<sup>-1</sup> of water, with a dilution of 10<sup>7</sup> spores·g<sup>-1</sup> of dry weight. Inoculation was performed by applying 20 mL per cell, by injection to the substrate, in three applications. The first application of Th was made on May 25 at the time of setting up the experiment. The other two applications were made at monthly intervals (June 25 and July 25, 2015). The treatments inoculated with *T. harzianum* were T3 (S1+Th), T7 (S2+Th) and T11 (S3+Th) (Table 1).

#### ***Pinus greggii* plants inoculated with *Fusarium circinatum* and *Trichoderma harzianum***

In the first application, a mixture of 10 mL of *F. circinatum* and 10 mL of *T. harzianum* (Fc+Th) was used with the same concentrations and doses used in the individual treatments. Subsequently, two other applications were made (one each month) with only *T. harzianum*. The mixture was injected into the corresponding cells of each substrate. The treatments inoculated with the mixture were T1 (S1+Fc+Th), T5 (S2+Fc+Th) and T9 (S3+Fc+Th) (Table 1). In each substrate, treatment without application of fungi was used as a control: T4 (S1-C), T8 (S2-C) and T12 (S3-C) (Table 1).

### **Variables evaluated**

#### **Pathogenicity and incidence of *Fusarium circinatum***

The pathogenicity of the *F. circinatum* strain was determined by its ability to cause disease, by weekly

(25 de mayo de 2015), se realizó la inoculación con *F. circinatum* y la primera aplicación de *T. harzianum* al sustrato. El riego se aplicó diariamente en forma superficial durante la germinación y emergencia de las plantas; posteriormente, cada tercer día. El experimento tuvo una duración de 13 semanas (junio a septiembre).

#### **Plantas de *Pinus greggii* inoculadas con *Fusarium circinatum***

Las plantas de *P. greggii* se inocularon con la cepa SF5 aislada del Vivero Forestal Militar de Atlangatepec, Tlaxcala, y obtenida del cepario del laboratorio de Parasitología Forestal de la DiCiFo. La cepa está identificada, morfológicamente y con tres marcadores moleculares, como *F. circinatum*; sus números de accesión depositados en el banco de genes (GenBank) son ITS (KX276596), TEF (KZ337005) e IGS (KX306890). Para la inoculación de *F. circinatum* (Fc) se tomaron cepas puras con ocho días de crecimiento en medio de cultivo PDA con desarrollo de micelio y esporulación del hongo. El fitopatógeno se aplicó mediante inyección de 20 mL de una suspensión de  $7.9 \times 10^4$  esporas·mL<sup>-1</sup> (García-Díaz et al., 2017) al sustrato (S) de cada tubete. Los tratamientos inoculados con *F. circinatum* fueron T2 (S1+Fc), T6 (S2+Fc) y T10 (S3+Fc) (Cuadro 1).

#### **Plantas de *Pinus greggii* inoculadas con *Trichoderma harzianum***

Se utilizó la cepa comercial T-22 KRL-AG2 de *T. harzianum* (Th) de PHC® en dosis de 3.4 g·L<sup>-1</sup> de agua, con una dilución de 10<sup>7</sup> esporas·g<sup>-1</sup> de peso seco. La inoculación se realizó aplicando 20 mL por tubete, mediante inyección al sustrato, en tres aplicaciones. La primera aplicación de Th se realizó el 25 de mayo al momento de establecer el experimento. Las otras dos aplicaciones se realizaron con intervalo mensual (25 de junio y 25 de julio de 2015). Los tratamientos inoculados con *T. harzianum* fueron T3 (S1+Th), T7 (S2+Th) y T11 (S3+Th) (Cuadro 1).

#### **Plantas de *Pinus greggii* inoculadas con *Fusarium circinatum* y *Trichoderma harzianum***

En la primera aplicación, se utilizó una mezcla de 10 mL de *F. circinatum* y 10 mL de *T. harzianum* (Fc+Th) con las mismas concentraciones y dosis empleadas en los tratamientos individuales. Posteriormente, se realizaron otras dos aplicaciones (una cada mes) con solo *T. harzianum*. La mezcla se inyectó en los tubetes correspondientes de cada sustrato. Los tratamientos inoculados con la mezcla fueron T1 (S1+Fc+Th), T5 (S2+Fc+Th) y T9 (S3+Fc+Th) (Cuadro 1). En cada sustrato, el tratamiento sin aplicación de hongos se usó como testigo: T4 (S1-Te), T8 (S2-Te) y T12 (S3-Te) (Cuadro 1).

**Table 1. Treatments used in the production of *Pinus greggii* in individual 170 mL cells.****Cuadro 1. Tratamientos utilizados en la producción de *Pinus greggii* en tubetes individuales de 170 mL.**

Treatment number/ Número de tratamiento	Treatments /Tratamientos
T1	S1 + <i>Fusarium circinatum</i> (Fc) + <i>Trichoderma harzianum</i> (Th)
T2	S1 + Fc
T3	S1 + Th
T4	S1-C (uninoculated)/S1-Te (sin inocular)
T5	S2 + Fc + Th
T6	S2 + Fc
T7	S2 + Th
T8	S2-C
T9	S3 + Fc + Th
T10	S3 + Fc
T11	S3 + Th
T12	S3-C

S1: peat moss, perlite and vermiculite; S2: pine sawdust, pine bark and peat moss; S3: pine bark, pine sawdust and peat moss. The ratio of materials in the three mixtures was 60:20:20.

S1: turba de musgo, perlita y vermiculita; S2: aserrín, corteza de pino y turba de musgo; S3: corteza de pino, aserrín de pino y turba de musgo. La proporción de materiales en las tres mezclas fue 60:20:20.

recording of typical damping-off symptoms and root rot. At the end of the experiment, some root portions of the diseased seedlings were sown in PDA culture medium with streptomycin sulphate (0.05 mg·L<sup>-1</sup>), for the re-isolation of the pathogen and corroboration of Koch's postulates. The incidence of *F. circinatum* was evaluated weekly and the accumulated percentage of diseased plants was obtained. Incidence and pathogenicity were evaluated for 13 weeks from mid-June to late September 2015.

The effect of the antagonist fungus on incidence and pathogenicity was evaluated with the mixture of *F. circinatum* plus *T. harzianum* (Fc+Th) in the three substrates.

### Morphological indices

Morphological indices were evaluated in treatments inoculated with *T. harzianum* (T3: S1+Th, T7: S2+Th and T11: S3+Th) and uninoculated (T4: S1-C, T8: S2-C and T12: S3-C). The evaluation was carried out at the end of October 2015, six months after sowing. The study variables were: stem diameter (D), measured in the section where it differs from the main root; height of the aerial part (H), obtained from the point where the diameter of the stem was measured up to the apex of the terminal bud; root dry weight (RDW) and dry weight of the aerial part (ADW), determined with an analytical balance (OHAUS, model Galaxy 200), after dehydration of the plants in a drying oven (FELISA,

### Variables evaluadas

#### Patogenicidad e incidencia de *Fusarium circinatum*

La patogenicidad de la cepa *F. circinatum* se determinó por su capacidad para causar enfermedad, mediante el registro semanal de los síntomas típicos de la secadera y pudrición de la raíz. Al final del experimento, algunas porciones de raíz de las plántulas enfermas se sembraron en medio de cultivo PDA con sulfato de estreptomycin (0.05 mg·L<sup>-1</sup>), para el reislamiento del patógeno y corroboración de los postulados de Koch. La incidencia de *F. circinatum* se evaluó semanalmente y se obtuvo el porcentaje acumulado de plantas enfermas. La incidencia y patogenicidad se evaluaron durante 13 semanas desde mediados de junio hasta finales de septiembre de 2015.

El efecto del hongo antagonista sobre la incidencia y patogenicidad se evaluó con la mezcla de *F. circinatum* más *T. harzianum* (Fc+Th) en los tres sustratos.

#### Índices morfológicos

Los índices morfológicos se evaluaron en los tratamientos inoculados con *T. harzianum* (T3: S1+Th, T7: S2+Th y T11: S3+Th) y sin inocular (T4: S1-Te, T8: S2-Te y T12: S3-Te). La evaluación se realizó a finales de octubre de 2015, seis meses después de la siembra. Las variables de estudio fueron: diámetro del tallo (D), medido en la sección donde se diferencia de la raíz

FE-143) at 70 °C for 72 h. The ratio comparing the aerial dry weight to the root dry weight (ADW/RDW) was also evaluated, along with the slenderness index (SI), obtained by dividing the plant height (cm) by the diameter value (mm), and the Dickson quality index (DQI), obtained with the equation  $TDW/(H/D) + (ADW/RDW)$  where TDW is the total dry weight of the plant (Dickson, Leaf, & Hosner, 1960).

### Experimental design and statistical analysis

The experimental design was completely random, which was represented by the following model:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

where,

$Y_{ij}$  = variable response in the  $j$ -th repetition of the  $i$ -th treatment

$\mu$  = total effect of the mean

$T_i$  = effect attributed to the  $i$ -th treatment

$e_{ij}$  = random component error.

Three substrates (S1, S2 and S3) were used with and without *F. circinatum* (Fc), and with and without *T. harzianum* (Th), for a total of 12 treatments with four replications (Table 1). Each replication was a 42-cavity deepot tray; the experimental unit consisted of the 20 central plants (80 *P. greggii* seedlings per treatment, giving a total of 960 seedlings evaluated). Morphological standards were measured in plants with and without Th in the three substrates; the experimental unit was made up of 15 plants randomly selected from the central part of each deepot tray (60 *P. greggii* seedlings for each of the six treatments = 360 plants). The data were subjected to an analysis of variance using the SAS GLM procedure, version 9.0 (Statistical Analysis System [SAS Institute], 2002) and Tukey's multiple comparison test ( $P \leq 0.05$ ).

## Results and discussion

### Pathogenicity of *Fusarium circinatum* in *Pinus greggii* seedlings

Pathogenicity was determined based on the ability of the fungus *F. circinatum* strain SF5 to cause disease, which appeared 20 days after inoculation (dai). Robles, Gómez, Macas, Sánchez, and Torres-Gutiérrez (2014) inoculated babaco (*Vasconcellea × heilbornii* [V. M. Badillo] V. M. Badillo) plants with *F. oxysporum* Schltdl. through root wounds and observed symptoms at 15 days, while when they injected the inoculum into the substrate, symptoms took up to a month to appear.

The first manifestation of symptoms of the disease in *P. greggii* seedlings was recorded in the substrate

principal; altura de la parte aérea (A), obtenida desde el punto donde se midió el diámetro del tallo hasta el ápice de la yema terminal; peso seco de la raíz (PSR) y peso seco de la parte aérea (PSA), determinados con una balanza analítica (OHAUS, modelo Galaxy 200), después de la deshidratación de las plantas en horno de secado (FELISA, FE-143) a 70 °C durante 72 h. También se evaluó la relación peso seco de la parte aérea sobre el peso seco de la raíz (PSA/PSR); índice de esbeltez (IE), obtenido al dividir la altura de la planta (cm) entre el valor del diámetro (mm); e índice de calidad de Dickson (ICD) obtenido con la ecuación  $ICD = PST/(A/D) + (PSA/PSR)$ , donde PST es el peso seco total de la planta (Dickson, Leaf, & Hosner, 1960).

### Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar, el cual fue representado por el modelo siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

donde,

$Y_{ij}$  = variable respuesta en la  $j$ -ésima repetición del  $i$ -ésimo tratamiento

$\mu$  = efecto total de la media

$T_i$  = efecto atribuido al  $i$ -ésimo tratamiento

$e_{ij}$  = error del componente aleatorio.

Se utilizaron tres sustratos (S1, S2 y S3) con y sin *F. circinatum* (Fc), con y sin *T. harzianum* (Th), para un total de 12 tratamientos con cuatro repeticiones (Cuadro 1). Cada repetición fue una mesa portatubetes de 42 cavidades; la unidad experimental estuvo constituida por las 20 plantas del centro (80 plántulas de *P. greggii* por tratamiento, dando un total de 960 plántulas evaluadas). Los estándares morfológicos se midieron en las plantas con y sin Th en los tres sustratos; la unidad experimental se conformó de 15 plantas al azar de la parte central de cada mesa portatubetes (60 plántulas de *P. greggii* por seis tratamientos = 360 plantas). Los datos se sometieron a un análisis de varianza mediante el procedimiento GLM de SAS, versión 9.0 (Statistical Analysis System [SAS Institute], 2002) y comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

## Resultados y discusión

### Patogenicidad de *Fusarium circinatum* en plántulas de *Pinus greggii*

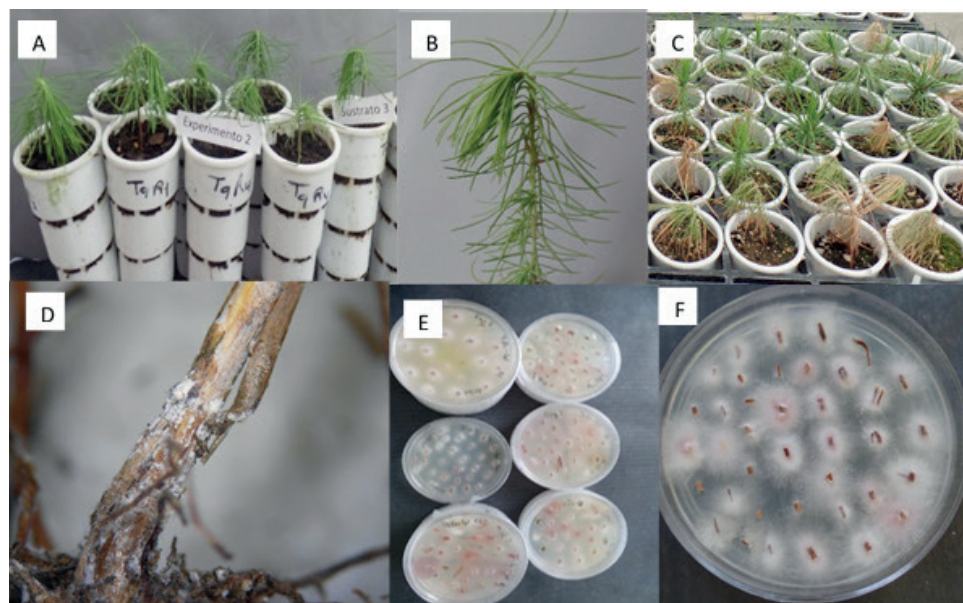
La patogenicidad se determinó con base en la capacidad del hongo *F. circinatum* cepa SF5 para causar enfermedad, la cual se manifestó a los 20 días después de la inoculación (ddi). Robles, Gómez, Macas, Sánchez, y Torres-Gutiérrez (2014) inocularon plantas de babaco (*Vasconcellea × heilbornii* [V. M. Badillo] V. M. Badillo) con

made from pine bark (S3) (Figure 1A); however, it was similarly observed in all three substrates during the first week. The seedlings showed strangulation of the stem and wilting of the main shoot (Figure 1B); later, the needles turned yellowish and reddish. Likewise, Soria, Alonso, and Bettucci (2012) report that aerial symptoms in *Pinus taeda* L. seedlings do not appear until the pathogen reaches the neck area, resulting in wilting, loss of color (redness), needle drying and finally death. When extracting diseased seedlings, rotting of the main and secondary roots was observed; the roots had a light brown color. Wounds were not made in the *P. greggii* roots inoculated with *F. circinatum* and yet the disease occurred; this coincides with Peterson (2008), who points out that *Fusarium* spp. is capable of directly infecting the tissue, but differs with Soria et al. (2012), who state that the infection is associated with lesions or wounds in the bark or other tissues in the trees, because this fungus is unable to penetrate directly into the tissue.

Symptoms were most evident when the plant was four to six months old, as it showed folding of the main shoot, decay, and wilting with gradual brown changes until it became completely reddish, which is considered a symptom of death (Figure 1C). This coincides with the symptoms described by Herron et al. (2015), who point

*F. oxysporum* Schlttdl. mediante heridas en las raíces y observaron síntomas a los 15 días, mientras que cuando inyectaron el inóculo al sustrato, los síntomas tardaron hasta un mes en manifestarse.

La primera manifestación de síntomas de la enfermedad en las plántulas de *P. greggii* se registró en el sustrato hecho a base de corteza de pino (S3) (Figura 1A); sin embargo, se apreció de manera similar en los tres sustratos durante la primera semana. Las plántulas mostraron estrangulamiento del tallo y marchitamiento del brote principal (Figura 1B); posteriormente, las acículas se tornaron amarillentas y de color rojizo. Esto mismo lo manifiestan Soria, Alonso, y Bettucci (2012), al mencionar que, los síntomas aéreos en las plántulas de *Pinus taeda* L. no se manifiestan hasta que el patógeno alcanza la zona del cuello, lo que se traduce en marchitamiento, pérdida de color (enrojecimiento) y secado de las acículas hasta la muerte. Al extraer plántulas enfermas se observó pudrición de la raíz principal y secundarias; las raíces manifestaron color café claro. En las raíces de *P. greggii* inoculadas con *F. circinatum* no se realizaron heridas y aun así se presentó la enfermedad; esto coincide con Peterson (2008), quien señala que *Fusarium* spp. es capaz de infectar directamente en el tejido, pero difiere con Soria et al. (2012), quienes mencionan que la infección



**Figure 1.** Pathogenicity and effect of *Fusarium circinatum* in *Pinus greggii* seedlings planted in three substrates. A) Three- and five-month-old seedlings with substrate of pine bark, pine sawdust and peat moss (S3) at a 60:20:20 ratio. B) Symptoms with folding of the main shoot and decay. C) Seedlings with yellowish and reddish needles. D) Plant stem with mycelium and sporodochia of *F. circinatum*. E and F) Strains of the *F. circinatum* re-isolations.

**Figura 1.** Patogenicidad y efecto de *Fusarium circinatum* en plántulas de *Pinus greggii* sembradas en tres sustratos. A) Plántulas de tres y cinco meses de edad con el sustrato de corteza de pino, aserrín de pino y turba de musgo (S3) en proporción 60:20:20. B) Síntomas con doblamiento del brote principal y decaimiento. C) Plántulas con acículas amarillentas y de color rojizo. D) Tallo de la planta con micelio y esporodocios de *F. circinatum*. E y F) Cepas de los reaislamientos de *F. circinatum*.

out that one-year-old seedlings show terminal bud fall and needle discoloration.

On the other hand, root rot was evident, as they were very brittle; this was seen in the inoculated plants of S1 and S3 when they were extracted from the cell. When the infection was severe, abundant mycelium was observed in the neck of the root and stem, and formation of white to orange sporodochia (Figure 1D). Out of a total of 480 plants inoculated with *F. circinatum*, 424 isolations of the associated fungi were made, giving 88 % positive re-isolations of the pathogen (Figures 1E and 1F); Koch's postulates were verified with this identification.

The effect of *F. circinatum* on *P. greggii* showed a high mortality rate, coinciding with what was argued by García-Díaz et al. (2017) and Coutinho, Steenkamp, Mongwaketsi, Wilmont, and Wingfield (2007) when stating that *F. circinatum* is the most important pathogen in pine seedlings in different parts of the world. Also, Gordon, Swett, and Wingfield (2015) report that *Fusarium* species cause significant damage to coniferous seedlings and point to *F. oxysporum* as the most important agent causing hypocotyl rot in nursery seedlings.

#### **Incidence of *Fusarium circinatum* in *Pinus greggii* seedlings**

The results of this bioassay indicate that the mixture and the ratio at which the substrates were prepared had an effect on the incidence of disease caused by *F. circinatum*. The importance of this pathogen is shown in Figure 2, where it is observed that there was a direct effect on *P. greggii* seedlings in the first four weeks after inoculation of the substrate in the nursery.

Seedlings developed in sawdust-based S2 had a lower incidence of *F. circinatum* than those developed in S1 (based on peat moss) and S3 (based on pine bark), especially in the first four weeks of growth. In the following nine weeks, the percentage increased gradually until reaching an incidence of 94 % in S3 and 99 % in S1, while in S2 it was 78 %. The results in S1 are similar to those reported by Swett and Gordon (2015), who recorded an incidence of 97 % by inoculating *F. circinatum*, isolated from pine, in corn plants with substrate based on peat moss.

S2 reached an incidence of 78 %; this indicates that sawdust-based substrate may be an alternative to mitigate the incidence of *F. circinatum* disease in plant production nurseries. Additionally, costs could be reduced as indicated by Aguilera et al. (2016), who state that substrates mixed with pine sawdust and bark have been used successfully since 2003 in some nurseries in central Mexico.

está asociada a lesiones o heridas en la corteza u otros tejidos en los árboles, debido a que este hongo es incapaz de penetrar directamente en el tejido.

Los síntomas fueron más evidentes cuando la planta tenía de cuatro a seis meses de edad, ya que manifestó doblamiento del brote principal, decaimiento, marchitamiento con cambios paulatinos de color marrón hasta quedar completamente rojizos, lo cual se considera un síntoma de muerte (Figura 1C). Esto coincide con los síntomas descritos por Herron et al. (2015), quienes señalan que las plántulas de un año presentan caída del brote terminal y decoloración de acículas.

Por otra parte, la pudrición de raíces fue evidente, ya que fueron muy quebradizas; esto se apreció en las plantas inoculadas del S1 y S3 cuando se extrajeron del tubete. Cuando la infección fue severa, se observó micelio abundante en el cuello de la raíz y tallo, y formación de esporodocios color blanco a naranja (Figura 1D). De un total de 480 plantas inoculadas con *F. circinatum*, se realizaron 424 aislamientos de los hongos asociados, dando 88 % de reaislamientos positivos del patógeno (Figuras 1E y 1F); con esta identificación se comprobaron los postulados de Koch.

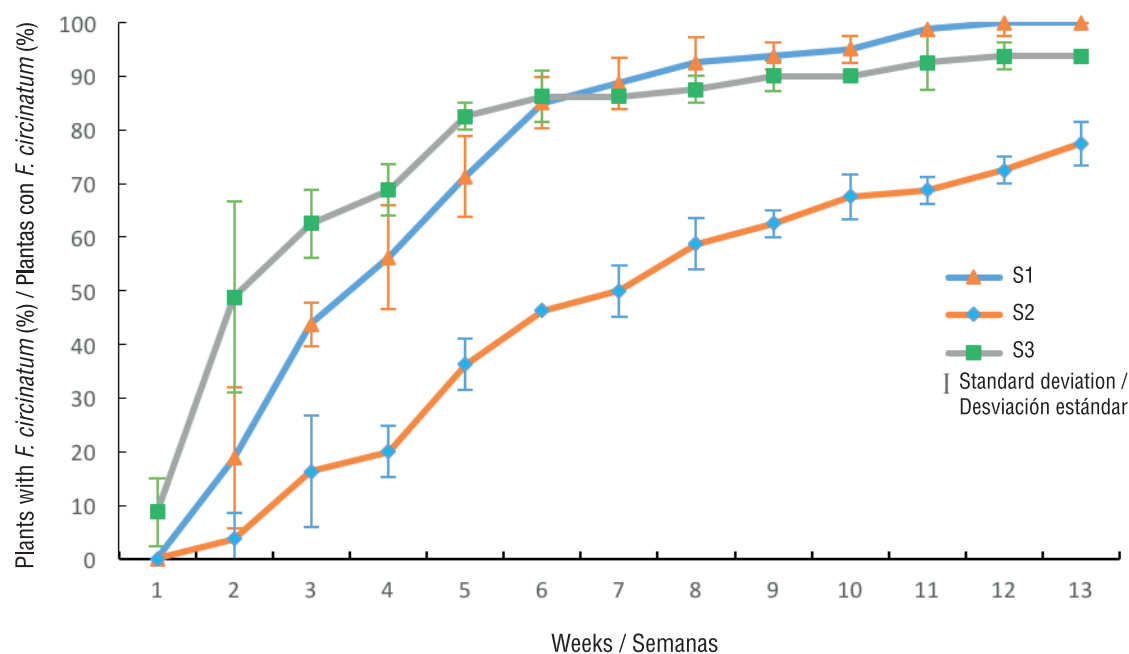
El efecto de *F. circinatum* en *P. greggii* mostró un porcentaje alto de mortalidad, coincidiendo con lo argumentado por García-Díaz et al. (2017) y Coutinho, Steenkamp, Mongwaketsi, Wilmont, y Wingfield (2007) al mencionar que *F. circinatum* es el patógeno más importante en plántulas de pino en diferentes partes del mundo. También Gordon, Swett, y Wingfield (2015) reportan especies de *Fusarium* causando daños significativos en plántulas de coníferas y señalan a *F. oxysporum* como la más importante causando pudrición del hipocótilo en plántulas de vivero.

#### **Incidencia de *Fusarium circinatum* en plántulas de *Pinus greggii***

Los resultados de este bioensayo indican que la mezcla y la proporción en la que se prepararon los sustratos tuvieron efecto en la incidencia de la enfermedad ocasionada por *F. circinatum*. La importancia de este patógeno se muestra en la Figura 2, donde se observa que hubo un efecto directo en las plántulas de *P. greggii* en las primeras cuatro semanas después de la inoculación del sustrato en vivero.

Las plántulas desarrolladas en el S2 a base de aserrín presentaron menor incidencia de *F. circinatum* que las desarrolladas en los S1 (a base de turba de musgo) y S3 (a base de corteza de pino), sobre todo en las primeras cuatro semanas de crecimiento. En las siguientes nueve semanas, el porcentaje incrementó en forma paulatina hasta alcanzar una incidencia de 94 % en el S3 y 99 % en el S1, mientras que en el S2 fue de 78 %. Los resultados





**Figure 2. Accumulated incidence of *Fusarium circinatum* inoculated in *Pinus greggii* plants growing in three substrates: S1 = peat moss, perlite and vermiculite; S2 = pine sawdust, pine bark and peat moss; S3 = pine bark, pine sawdust and peat moss. All substrates were formulated at a 60:20:20 ratio.**

**Figura 2. Incidencia acumulada de *Fusarium circinatum* inoculado en plantas de *Pinus greggii* creciendo en tres sustratos: S1 = turba de musgo, perlita y vermiculita; S2 = aserrín, corteza de pino y turba de musgo; S3 = corteza de pino, aserrín y turba de musgo. Todos los sustratos se formularon en proporción 60:20:20**

#### *Trichoderma harzianum* as a biocontrol of *Fusarium circinatum*

Table 2 shows the results of the effect of *T. harzianum* on *F. circinatum* in *P. greggii* plants. Overall, in each substrate, treatments containing *T. harzianum* (T1, T5 and T9) were found to have lower incidence levels of diseased plants compared to treatments where only *F. circinatum* was applied (T2, T6 and T10); however, statistically, the incidence was significantly similar ( $P > 0.05$ ). According to Table 2, of all treatments, T5 (S2+Fc+Th), sawdust-based and inoculated with *T. harzianum*, obtained the lowest incidence (66 %), while T2 (S1+Fc) without *T. harzianum* recorded the highest incidence of the disease (99 %). It appears that the use of S2 contributed to a reduction in the incidence of the disease.

It should be noted that only three applications of *T. harzianum* were made, so it is suggested to increase the number as recommended by Mitchell, Zwolinski, Jones, and Coutinho (2004), who state that applications with *T. harzianum* should continue for 180 days once the seedling emerges. It would also be important to determine whether *T. harzianum* is able to survive and remain viable in substrates to exert its antagonism; in this sense, Romero et al. (2008) studied the behavior of a strain of *T. harzianum* in two commercial-use substrates and found that composted bark-based substrate had a higher number of spores per gram of substrate.

en el S1 son similares a los reportados por Swett y Gordon (2015), quienes registraron una incidencia del 97 %, al inocular *F. circinatum*, aislado de pino, en plantas de maíz con sustrato a base de turba de musgo. El S2 alcanzó una incidencia de 78 %; esto indica que el sustrato a base de aserrín puede ser una alternativa para atenuar la incidencia de la enfermedad por *F. circinatum* en la producción de planta en los viveros. Adicionalmente, se podrían reducir costos tal como lo señalan Aguilera et al. (2016), quienes afirman que los sustratos mezclados con aserrín y corteza de pino se usan con éxito desde 2003 en algunos viveros del centro de México.

#### *Trichoderma harzianum* como biocontrol de *Fusarium circinatum*

El Cuadro 2 muestra los resultados del efecto de *T. harzianum* sobre *F. circinatum* en plantas de *P. greggii*. En general, en cada sustrato, se encontró que los tratamientos que contenían *T. harzianum* (T1, T5 y T9) tuvieron niveles menores de incidencia de plantas enfermas en comparación con los tratamientos donde solo se aplicó *F. circinatum* (T2, T6 y T10); sin embargo, a nivel estadístico, la incidencia fue significativamente similar ( $P > 0.05$ ). De acuerdo con el Cuadro 2, de todos los tratamientos, el T5 (S2+Fc+Th) a base de aserrín e inoculado con *T. harzianum* obtuvo la incidencia más baja (66 %), mientras que en el T2 (S1+Fc) sin *T. harzianum* se

**Table 2. Effect of *Trichoderma harzianum* (Th) as a biocontrol of *Fusarium circinatum* (Fc) at 30, 60 and 90 days after inoculation (dai) in *Pinus greggii* plants growing in three substrates.**

**Cuadro 2. Efecto de *Trichoderma harzianum* (Th) como biocontrol de *Fusarium circinatum* (Fc) a los 30, 60 y 90 días después de la inoculación (ddi) en plantas de *Pinus greggii* creciendo en tres sustratos.**

No. of treatment/ Núm. de tratamiento	Treatment/ Tratamiento	Incidence of diseased plants (%) / Incidencia de plantas enfermas (%)		
		30 dai / 30 ddi	60 dai / 60 ddi	90 dai / 90 ddi
T1	S1+Fc+Th	21 ab	69 ab	86 a
T2	S1+Fc	56 bc	88 ab	99 a
T5	S2+Fc+Th	15 a	43 a	66 a
T6	S2+Fc	20 ab	61 ab	75 a
T9	S3+Fc+Th	11 a	64 a	86 a
T10	S3+Fc	69 c	91 b	93 a

S1: peat moss, perlite and vermiculite; S2: pine sawdust, pine bark and peat moss; S3: pine bark, pine sawdust and peat moss; the ratio of materials in the three mixtures was 60:20:20. Average values with a different letter in a column are statistically different according to Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ). Treatments T3, T4, T7, T8, T11 and T12 are not shown in the table because they were not inoculated with *F. circinatum* and did not show incidence.

S1: turba de musgo, perlita y vermiculita; S2: aserrín de pino, corteza de pino y turba de musgo; S3: corteza de pino, aserrín de pino y turba de musgo; la proporción de materiales en las tres mezclas fue 60:20:20. Valores promedio con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Los tratamientos T3, T4, T7, T8, T11 y T12 no se muestran en el cuadro, debido a que no fueron inoculadas con *F. circinatum* y no mostraron incidencia.

Cubillos et al. (2011) evaluated six strains of the fungus *F. solani* (Mart.) Sacc. in the cultivation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* fo. *flavicarpa* O. Deg.) and pointed out that when *T. harzianum* is first applied there is a better biocontrol response (86 to 100 % of healthy plants) than by pre-infecting the seedlings with the pathogen; however, they also indicated a positive effect when *F. solani* was first applied (13 to 80 %).

Reglinski and Dick (2005) point out that suppression of damping-off disease was more effective when *Trichoderma* was added to the growth medium four days before inoculation of the pathogen and was ineffective when added four days after inoculation.

Mousseaux, Dumroese, James, Wenny, and Knudsen (1998) tested the use of *T. harzianum* for control of the pathogen *F. oxysporum* in seedlings of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco and obtained cumulative mortalities of 6 % in treatments with *T. harzianum*, 70 % with *F. oxysporum*, 80 % in the mixture of both fungi and 5 % in the control. This differs from the present study, as the treatments inoculated with *T. harzianum* and the control did not show mortality. On the other hand, Martínez-Álvarez, Alves-Santos, and Diez (2012) pointed out that *T. harzianum*, in dilutions of  $10^7$ ,  $10^6$  and  $10^5$ , had a significant control effect against *F. circinatum* at the *in vitro* level, but in the *P. radiata* seedlings in the nursery they did not obtain satisfactory results.

registró la mayor incidencia de la enfermedad (99 %). Al parecer el uso del S2 contribuyó a reducir la incidencia de la enfermedad.

Cabe señalar que solo se realizaron tres aplicaciones de *T. harzianum*, por lo que se sugiere aumentar el número tal como lo recomiendan Mitchell, Zwolinski, Jones, y Coutinho (2004), quienes mencionan que las aplicaciones con *T. harzianum* deben continuar durante 180 días una vez que la plántula emerge. También sería importante determinar si *T. harzianum* es capaz de sobrevivir y mantenerse viable en los sustratos para ejercer su antagonismo; en este sentido, Romero et al. (2008) estudiaron el comportamiento de una cepa de *T. harzianum* en dos sustratos de uso comercial y encontraron que el sustrato a base de corteza en compost presentó mayor número de esporas por gramo de sustrato.

Cubillos et al. (2011) evaluaron seis cepas del hongo *F. solani* (Mart.) Sacc. en el cultivo de maracuyá (*Passiflora edulis* fo. *flavicarpa* O. Deg.) y señalaron que cuando primero se aplica *T. harzianum* existe mejor respuesta de biocontrol (86 a 100 % de plantas sanas) que preinfectando las plántulas con el patógeno; sin embargo, también indicaron un efecto positivo cuando aplicaron primero *F. solani* (13 a 80 %).

Reglinski y Dick (2005) señalan que la supresión de la enfermedad del *damping-off* fue más eficaz cuando se añadió *Trichoderma* al medio de crecimiento cuatro días

### Morphological indices of *Pinus greggii* seedlings inoculated with *Trichoderma harzianum* in three substrates

Table 3 presents the morphological characteristics and plant quality indices of *P. greggii* at six months of age. According to the information, the seedlings with the largest root neck diameter were obtained in the treatments with S1 and S3 (T3, T4, T11 and T12) with values from 3.03 mm to 3.17 mm, for which they would be considered medium-quality seedlings; to obtain a high quality, the diameter of the plant had to be greater than 4.00 mm (Prieto & Sáenz, 2011). The lowest values in diameter quality ( $P \leq 0.05$ ) were presented in T7 (S2+Th = 2.67 mm) and T8 (S2-C = 2.61 mm) containing substrate based on pine sawdust.

Treatments with S1 (T3 = 27.46 cm and T4 = 28.14 cm), based on peat moss, promoted greater height in the seedlings; in fact, the height was greater than the 15 to 25 cm range reported by Sáenz, Villaseñor, Muñoz, Rueda, and Prieto (2010) to be considered as a high-quality plant. T8, corresponding to the substrate based on uninoculated pine sawdust (S2-Te), produced the lowest height value (17.70 cm). The results coincide with those of Castro-Garibay, Aldrete, López-Upton, and Ordaz-Chaparro (2018), who found that the peat moss substrate showed the best height and diameter

antes de la inoculación del patógeno y que fue ineficaz cuando se añadió cuatro días después de la inoculación. Mousseaux, Dumroese, James, Wenny, y Knudsen (1998) probaron el uso de *T. harzianum* para control del patógeno *F. oxysporum* en plántulas de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco y obtuvieron mortalidades acumuladas de 6 % en los tratamientos con *T. harzianum*, 70 % con *F. oxysporum*, 80 % en la mezcla de ambos hongos y 5 % en el testigo. Lo anterior difiere con la presente investigación, ya que los tratamientos inoculados con *T. harzianum* y el testigo no presentaron mortalidad. Por otra parte, Martínez-Álvarez, Alves-Santos, y Diez (2012) señalan que *T. harzianum*, en diluciones de  $10^7$ ,  $10^6$  y  $10^5$ , tuvo efecto significativo de control contra *F. circinatum* a nivel *in vitro*, pero en las plántulas de *P. radiata* en vivero no obtuvieron resultados satisfactorios.

### Índices morfológicos de plántulas de *Pinus greggii* inoculadas con *Trichoderma harzianum* en tres sustratos

El Cuadro 3 presenta las características morfológicas e índices de calidad de planta de *P. greggii* a los seis meses de edad. De acuerdo con la información, las plántulas con mayor diámetro en el cuello de la raíz se obtuvieron en los tratamientos con S1 y S3 (T3, T4, T11 y T12) con valores de 3.03 mm a 3.17 mm, por lo cual se considerarían plántulas de calidad media;

**Table 3. Morphological characteristics and plant quality indices of *Pinus greggii* at six months of age, planted in three substrates (S) inoculated with *Trichoderma harzianum* (Th).**

**Cuadro 3. Características morfológicas e índices de calidad de planta de *Pinus greggii* a los seis meses de edad, sembradas en tres sustratos (S) inoculados con *Trichoderma harzianum* (Th).**

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

Average values in a column with a different letter are statistically different according to Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ). S1: peat moss, perlite and vermiculite; S2: pine sawdust, pine bark and peat moss; S3: pine bark, pine sawdust and peat moss; the ratio of materials was 60:20:20. C = uninoculated, D = stem diameter; H = plant height; ADW = dry weight of the aerial part; RDW = root dry weight; AP/RR = aerial/root ratio (aerial dry weight/dry root weight); SI = slenderness index; DQI = Dickson quality index. Treatments T1, T2, T5, T6, T9, and T10 are not shown due to plant mortality by the pathogen.

Valores promedio en una columna con diferente letra son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). S1: turba de musgo, perlita y vermiculita; S2: aserrín de pino, corteza de pino y turba de musgo; S3: corteza de pino, aserrín de pino y turba de musgo; la proporción de materiales fue 60:20:20. Te = sin inocular, D = diámetro del tallo; A = altura de la planta; PSA = peso seco de la parte aérea; PSR = peso seco de la raíz; RPA/R = relación aérea/raíz (peso seco aéreo/peso seco radical); IESB = índice de esbeltez; ICD = índice de calidad de Dickson. Los tratamientos T1, T2, T5, T6, T9, y T10 no se muestran debido a la mortandad de la planta por el patógeno.

growth in *P. greggii* var. *australis* Donahue, Jeffrey K. & López, A. R.

The values of height (except those obtained with S1) and diameter were below the established minimums (height of 25 to 30 cm and diameter  $\geq 4$  mm) in the criteria of the Mexican Standard for the Certification of Forest Nursery Operations NMX-AA-170-SCFI-2016 (Secretaría de Economía [SE], 2016) for *P. greggii*, probably due to the shadow effect of the greenhouse and the longer time required by the seedlings in the nursery. Villar (2003) states that the height of the aerial part and the diameter of the root neck, together with qualitative characteristics, are attributes considered in plant quality. Prieto and Sáenz (2011) report a stem diameter  $\geq 4$  mm and a height of 15 to 25 cm for pine species native to the Sierra Madre Occidental.

The aerial dry weight was also statistically higher ( $P \leq 0.05$ ) in S1 treatments ( $T3 = 1.35$  g and  $T4 = 1.42$  g), while the lowest was recorded in seedlings planted in S2 without inoculation ( $T8 = 0.78$  g). In this same treatment (T8), the lowest root dry weight (0.34 g) was also recorded. The highest aerial part/root ratio was obtained in treatments with S1 ( $T3 = 3.75$  g and  $T4 = 3.65$  g). Aerial biomass was greater than underground biomass, which commonly occurs in several forest species.

S1 treatments showed higher slenderness indices ( $T3 = 8.90$  and  $T4 = 8.95$ ) than the rest of the treatments, which is not desirable, as they represent an imbalance in the plants. This influenced the Dickson quality index, which was less than 0.2 in all treatments as shown in Table 3.

In general, morphological standards did not differ significantly ( $P > 0.05$ ) in the treatments where *T. harzianum* was applied with respect to the treatments where it was not applied, which coincides with the findings of Donoso et al. (2008). In contrast, Romero et al. (2008) found a positive effect on height, diameter, and root and aerial part weight when inoculated with *T. harzianum*. As for the substrates, the mixture based on peat moss as the main component (S1) had the best values for all evaluated variables, except for the slenderness index (Table 3). This coincides with what was found by Castro-Garibay et al. (2018) for the same species. The results show that more research is needed in our country in the forest area, since the effect of this antagonist has been more studied in the agricultural area (Dumroese et al., 2012).

## Conclusions

*Fusarium circinatum* proved to be pathogenic in *Pinus greggii* seedlings in the three substrates evaluated. The sawdust-based substrate reduced the incidence of

para obtener una calidad alta, el diámetro de la planta debió ser mayor de 4.00 mm (Prieto & Sáenz, 2011). Los valores más bajos en calidad de diámetro ( $P \leq 0.05$ ) se presentaron en el T7 ( $S2+Th = 2.67$  mm) y T8 ( $S2-Te = 2.61$  mm) que contenían sustrato a base de aserrín de pino.

Los tratamientos con el S1 ( $T3 = 27.46$  cm y  $T4 = 28.14$  cm), a base de turba de musgo, permitieron mayor altura en las plántulas; de hecho, la altura fue mayor que el intervalo de 15 a 25 cm manejado por Sáenz, Villaseñor, Muñoz, Rueda, y Prieto (2010), para considerar a una planta de alta calidad. El T8 que corresponde al sustrato a base de aserrín de pino sin inocular ( $S2-Te$ ) produjo el valor más bajo en altura (17.70 cm). Los resultados coinciden con Castro-Garibay, Aldrete, López-Upton, y Ordaz-Chaparro (2018), quienes encontraron que el sustrato a base de turba de musgo mostró los mejores crecimientos en altura y diámetro de *P. greggii* var. *australis* Donahue, Jeffrey K. & López, A. R.

Los valores de altura (a excepción de los obtenidos con el S1) y diámetro estuvieron por debajo de los mínimos establecidos (altura de 25 a 30 cm y diámetro  $\geq 4$  mm) en los criterios de la Norma Mexicana para la Certificación de la Operación de Viveros Forestales NMX-AA-170-SCFI-2016 (Secretaría de Economía [SE], 2016) para *P. greggii*, probablemente debido al efecto sombra del invernadero y a que las plántulas requerían más tiempo en el vivero. Villar (2003) menciona que la altura de la parte aérea y el diámetro en el cuello de la raíz, junto con las características cualitativas, son atributos considerados en la calidad de planta. Prieto y Sáenz (2011) manejan el diámetro del tallo  $\geq 4$  mm y una altura de 15 a 25 cm para especies de pinos nativos de la Sierra Madre Occidental.

El peso seco aéreo también fue estadísticamente mayor ( $P \leq 0.05$ ) en los tratamientos del S1 ( $T3 = 1.35$  g y  $T4 = 1.42$  g), mientras que el más bajo se registró en las plántulas sembradas en el S2 sin inocular ( $T8 = 0.78$  g). En este mismo tratamiento (T8) también se registró el menor peso seco de la raíz (0.34 g). La relación parte aérea/raíz más alta se obtuvo en los tratamientos con el S1 ( $T3 = 3.75$  g y  $T4 = 3.65$  g). La biomasa aérea fue mayor que la biomasa subterránea, lo que ocurre comúnmente en varias especies forestales.

Los tratamientos del S1 presentaron índices de esbeltez más altos ( $T3 = 8.90$  y  $T4 = 8.95$ ) que el resto de los tratamientos, lo cual no es deseable, ya que representan un desbalance en las plantas. Lo anterior influyó en el índice de calidad de Dickson que fue menor de 0.2 en todos los tratamientos tal como se muestra en el Cuadro 3.

En general, los estándares morfológicos no tuvieron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en los tratamientos

*F. circinatum* in the production of *P. greggii* seedlings in the nursery, mainly in the first four weeks after inoculation, unlike the substrate based on moss peat and pine bark that showed high incidence in this period. After 13 weeks, the application of *T. harzianum* and the sawdust-based substrate reduced the incidence rates of *F. circinatum* to 66 %; however, the incidence was similar when the antagonist was not inoculated. *Fusarium circinatum* is an economically important pathogen in forest nurseries and the combination of sawdust substrate and preventive application of the antagonist fungus *T. harzianum* is shown to be an option for its management.

## Acknowledgments

This work was carried out at the *Colegio de Postgraduados*, thanks to the granting of a doctoral training scholarship by CONACyT and Fideicomiso 167304, modality 3, for funding 2013 Research Projects.

## End of English version

## References / Referencias

- Aguilera-Rodríguez, M., Aldrete, A., Martínez-Trinidad, T., & Ordaz-Chaparro, V. M. (2016). Producción de *Pinus montezumae* Lamb. con diferentes sustratos y fertilizantes de liberación controlada. *Agrociencia*, 50(1), 107–118. Retrieved from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952016000100107&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952016000100107&lng=es&tlng=es)
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7(4), 249–260. Retrieved from <http://revistes.iec.cat/index.php/IM/article/viewFile/9480/9476>
- Castro-Garibay, S. L., Aldrete, A., López-Upton, J., Ordaz-Chaparro, V. M. (2018). Efecto del envase, sustrato y fertilización en el crecimiento de *Pinus greggii* var. *australis* en vivero. *Agrociencia*, 52(1), 115–127. Retrieved from <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2018/ene-feb/art-9.pdf>
- Coutinho, T. A., Steenkamp, E. T., Mongwaketsi, K., Wilmont, M., & Wingfield, M. J. (2007). First outbreak of pitch canker in a South African pine plantation. *Australasian Plant Pathology*, 36(3), 256–261. doi: 10.1071/AP07017
- Cubillos, H. J. G., Páez, R. A., & Mejía, D. L. (2011). Evaluación de la capacidad biocontroladora de *Trichoderma harzianum* Rifai contra *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. asociado al complejo “Secadera” en maracuyá, bajo condiciones de invernadero. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 64(1), 5821–5830. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v64n1/a08v64n01.pdf>

donde se aplicó *T. harzianum* con respecto a los tratamientos donde no se aplicó, lo cual coincide con Donoso et al. (2008). En cambio, Romero et al. (2008) encontraron un efecto positivo en altura, diámetro, peso radicular y de la parte aérea cuando inocularon con *T. harzianum*. En cuanto a los sustratos, la mezcla a base de turba de musgo como componente principal (S1) presentó los mejores valores para todas las variables evaluadas, excepto para el índice de esbeltez (Cuadro 3). Lo anterior coincide con lo encontrado por Castro-Garibay et al. (2018) para la misma especie. Los resultados reflejan que es necesario realizar más investigación en nuestro país en el área forestal, ya que el efecto de este antagonista ha sido más estudiado en el área agrícola (Dumroese et al., 2012).

## Conclusiones

*Fusarium circinatum* mostró ser patogénico en plántulas de *Pinus greggii* en los tres sustratos evaluados. El sustrato a base de aserrín redujo la incidencia de *F. circinatum* en la producción de plántulas de *P. greggii* en vivero, principalmente en las cuatro primeras semanas después de la inoculación, a diferencia del sustrato a base de turba de musgo y corteza de pino que mostraron incidencia alta en este periodo. Después de 13 semanas, la aplicación de *T. harzianum* y el sustrato a base de aserrín permitieron reducir los porcentajes de incidencia de *F. circinatum* a 66 %; sin embargo, la incidencia fue similar cuando el antagonista no se inoculó. *Fusarium circinatum* es un patógeno de importancia económica en viveros forestales y la combinación del sustrato de aserrín y la aplicación preventiva del hongo antagonista *T. harzianum* resulta ser una opción para su manejo.

## Agradecimientos

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

Fin de la versión en español

- Cummings, N. J., Ambrose, A., Braithwaite, M., Bissett, J., Roslan, H. A., Abdullah, J., ...Hill, R. A. (2016). Diversity of root-endophytic *Trichoderma* from Malaysian Borneo. *Mycological Progress*, 15(5), 50. doi: 10.1007/s11557-016-1192-x
- Desender, S., Andrivon, D., & Val, F. (2007). Activation of defense reactions in Solanaceae: where is the specificity. *Cellular Microbiology*, 9(1), 21–30. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00831.x
- Dickson, A., Leaf, A. L., & Hosner, J. F. (1960). Quality appraisal of white spruce and white pine seedlings stock in nurseries. *The Forestry Chronicle*, 36(1), 10–13. doi: 10.5558/tfc36010-1
- Donoso, E., Lobos, G. A., & Rojas, N. (2008). Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crecimiento de plántulas de *Pinus radiata* en vivero. *Bosque (Valdivia)*, 29(1), 52–57. doi: 10.4067/S0717-92002008000100006
- Dumroese, R. K., Kim, M. S., & James, R. L. (2012). *Fusarium oxysporum* protects Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) seedlings from root disease caused by *Fusarium commune*. *Plant Pathology Journal*, 28(3), 311–316. doi: 10.5423/PPJ.NT.08.2011.0155
- García-Díaz, S. E., Aldrete, A., Alvarado-Rosales, D., Cibrián-Tovar, D., Méndez-Montiel, J. T., Valdovinos-Ponce, G., & Equihua-Martínez, A. (2017). Efecto de *Fusarium circinatum* en la germinación y crecimiento de plántulas de *Pinus greggii* en tres sustratos. *Agrociencia*, 51(8), 895–908. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v51n8/1405-3195-agro-51-08-895-en.pdf>
- Gordon, T. R., Swett, C. L., & Wingfield, M. J. (2015). Management of *Fusarium* diseases affecting conifer. *Crop Protection*, 73, 28–39. doi: 10.1016/j.cropro.2015.02.018
- Harman, G. E., Björkman, T., Ondik, K., & Shores, M. (2008). Changing paradigms on the mode of action and uses of *Trichoderma* spp. for biocontrol. *Outlooks on pest management*, 19(1), 24–29. doi: 10.1564/19feb08
- Hernández-Zarate, L., Aldrete, A., Ordaz-Chaparro, V. M., López-Upton, J., & López-López, M. A. (2014). Crecimiento de *Pinus montezumae* Lamb. en vivero influenciado por diferentes mezclas de sustratos. *Agrociencia*, 48(6), 627–637. Retrieved from <https://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2014/ago-sep/art-5.pdf>
- Herron, D. A., Wingfield, M. J., Wingfield, B. D., Rodas, C. A., Marincowitz, S., & Steenkamp, E. T. (2015). Novel taxa in the *Fusarium fujikuroi* species complex from *Pinus* spp. *Studies in Mycology*, 80, 131–150. doi: 10.1016/j.simyco.2014.12.001
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14–21. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522009000100002&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002&lng=es&tlng=es)
- Martínez-Álvarez, P., Alves-Santos, F. M., & Diez, J. J. (2012). In vitro and in vivo interactions between *Trichoderma viride* and *Fusarium circinatum*. *Silva Fennica*, 46(3), 303–316. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/258875067>
- Mitchell, R. G., Zwolinski, J., Jones, N., & Coutinho, T. (2004). The effect of applying prophylactic measures on the post-planting survival of *Pinus patula* in South Africa. *The Southern African Forestry Journal*, 200(1), 51–58. doi: 10.1080/20702620.2004.10431760
- Mousseaux, M. R., Dumroese, R. K., James, R. L., Wenny, D. L., & Knudsen, G. R. (1998). Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biological control of *Fusarium oxysporum* in container-grown Douglas-fir seedlings. *New Forests*, 15(1), 11–21. doi: 10.1023/A:1006512519895
- Okorski, A., Oszako, T., Nowakowska, J. A., & Psczcólkowska, A. (2014). The possibilities of biologically protecting plants against diseases in nurseries, with special consideration of Oomycetes and *Fusarium* fungi. *Forest Research Papers*, 75(3), 301–321. doi: 10.2478/frp-2014-0029
- Peterson, M. (2008). *Fusarium* species-a British Columbia perspective in forest seedling production. Retrieved from [https://www.fs.fed.us/rm/pubs/rmrs\\_p057/rmrs\\_p057\\_109\\_125.pdf](https://www.fs.fed.us/rm/pubs/rmrs_p057/rmrs_p057_109_125.pdf)
- Prieto, R. J. A., & Sáenz, J. T. (2011). *Indicadores de calidad de planta en viveros forestales de la Sierra Madre Occidental*. Durango, México: INIFAP.
- Reglinski, T., & Dick, M. (2005). Biocontrol of forest nursery pathogens. *New Zealand Journal of Forestry*, 50(3), 19–26. Retrieved from [http://www.nzjf.org.nz/free\\_issues/NZJF50\\_3\\_2005/CD6F47DA-12F9-4F5A-9914-BEABE49C0054.pdf](http://www.nzjf.org.nz/free_issues/NZJF50_3_2005/CD6F47DA-12F9-4F5A-9914-BEABE49C0054.pdf)
- Robles, C. A., Gómez, C. R., Macas, R. F., Sánchez, R. A., & Torres-Gutiérrez, R. (2014). Estudio de la patogenicidad de aislados de *Fusarium* spp., asociados a la marchitez vascular del babaco en Loja-Ecuador. *Centro de Biotecnología*, 3(2), 61–71. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/279941150>
- Romero, G., Crossara, A., & Baraibar, A. (2008). *Trichoderma harzianum* un biocontrol y biopromotor en vivero de especies forestales. *Ciencia e Investigación Forestal*, 14(2), 335–345. Retrieved from <http://biblioteca.infor.cl/DataFiles/26538.pdf>
- Sáenz, R. J. T., Villaseñor, R. F. J., Muñoz, F. H. J., Rueda, S. A., & Prieto, R. J. A. (2010). *Calidad de planta en viveros forestales de clima templado en Michoacán*. Uruapan, Michoacán, México: SAGARPA-INIFAP-CIRPAC-Campo Experimental Uruapan. Retrieved from <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/1289>
- Secretaría de Economía. (2016). Norma Mexicana NMX-AA-170-SCFI-2016. Certificación de la operación de viveros forestales. México: Diario Oficial de la Federación. Retrieved from [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5464460&fecha=07/12/2016](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5464460&fecha=07/12/2016)
- Soria, S., Alonzo, R., & Bettucci, L. (2012). Endophytic bacteria from *Pinus taeda* L. as biocontrol agents of *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 72(2), 281–284. Retrieved from <http://www.bioline.org.br/pdf/cj12044>
- Solano-Bonilla, M., & Brenes-Chacón, D. (2012). Evaluación de métodos de curación de sustratos para la prevención del mal de talluelo. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 9(2), 63–65. doi: 10.18845/rfmk.v9i2.365

- Statistical Analysis System (SAS Institute). (2002). The SAS system for windows. Release 9.0. Cary NC, USA: Author.
- Swett, C. L., & Gordon, T. R. (2015). Endophytic association of the pine pathogen *Fusarium circinatum* with corn (*Zea mays*). *Fungal Ecology*, 13, 120–129. doi: 10.1016/j.funeco.2014.09.003
- Villar, P. S. (2003). Importancia de la calidad de planta en los proyectos de revegetación. In J. M. Rey-Benayas, T. Espigares, & J. M. Nicolau (Eds.), *Restauración de ecosistemas mediterráneos* (pp. 65–86). España: Universidad de Alcalá-Asociación Española de Ecología Terrestre. Retrieved from <http://www3.uah.es/pedrovillar/PDF/Texto%20publicado.pdf>