

In vitro* first report of nutrients and silicon effect over the growth of *Phaeocryptopus gaeumannii* a pathogen of *Pseudotsuga menziesii

In vitro* primer reporte del efecto de nutrimentos y del silicio en el crecimiento de *Phaeocryptopus gaeumannii*, un patógeno de *Pseudotsuga menziesii

Juan Velázquez-Mendoza¹, Oscar Javier Salgado-Feregrino¹, María de Jesús Yáñez-Morales², Marcos Jiménez-Casas¹. Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, ¹Postgrados de Ciencias Forestales y ²Fitopatología, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo-Texcoco, Estado de México, México, CP 56230. Tel., Fax (595) 95-2-02-00, ext. 1610, 1663. *Autor para correspondencia: yanezmj@colpos.mx

Recibido: 04 de septiembre de 2016.

Aceptado: 12 de diciembre de 2016.

Velázquez-Mendoza J, Salgado-Feregrino OJ, Yáñez-Morales MJ, Jiménez-Casas M. 2017. *In vitro* first report of nutrients and silicon effect over the growth of *Phaeocryptopus gaeumannii* a pathogen of *Pseudotsuga menziesii*. Revista Mexicana de Fitopatología 35: 139-149.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1609-2](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1609-2)

Primera publicación DOI: 16 de Enero, 2017.

First DOI publication: January 16, 2017.

Resumen. El desarrollo de *Phaeocryptopus gaeumannii*, Ascomycota, causante del Tizón Suizo del follaje de Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*), es influenciado por la composición nutrimental de las acículas. El objetivo del estudio fue examinar el efecto de diferentes elementos esenciales, macronutrimentos y micronutrimentos, para las plantas y del silicio (Si), sobre el crecimiento *in vitro* de *P. gaeumannii*. Con diferentes nutrimentos y Si se establecieron dos experimentos completamente al

Abstract. The development of *Phaeocryptopus gaeumannii*, Ascomycota, the cause of Swiss needle cast on Douglas-fir foliage (*Pseudotsuga menziesii*), is influenced by the nutritional composition of the needles. The objective of the study was to examine the effect of different essential elements, macronutrients and micronutrients, for plants and silicon (Si), on the *in vitro* growth of *P. gaeumannii*. Two completely random experiments were established with different nutrients. The first was the culture of the fungus in 2 % Malt Extract Agar with 10 treatments, and the relative growth rate was calculated; and the second was in liquid medium of Potato Dextrose with 21 treatments, and the mass of the mycelium was measured. Macronutrients favored the growth of *P. gaeumannii*. In contrast, Cu, Mn and Zn micronutrients inhibited the development of the fungus in double doses. In general, Si inhibited the growth of the fungus. The complete nutrient solution of macronutrients

azar. El primero fue el cultivo del hongo en Extracto de Malta-Agar al 2 % con 10 tratamientos, y se calculó la Tasa de Crecimiento Relativo instantánea; y el segundo fue en medio líquido de Papa Dextrosa con 21 tratamientos, y se midió masa del micelio. Los macronutrientes favorecieron el crecimiento de *P. gaeumannii*. En contraste los micronutrientes Cu, Mn y Zn inhibieron el desarrollo del hongo en dosis doble. En general, el Si inhibió el crecimiento del hongo. La solución nutritiva completa de macronutrientes + micronutrientes más 250 y 1000 ppm de Si, indicaron que estas formulaciones pueden contribuir para eventual control de *P. gaeumannii*. Este ensayo preliminar *in vitro*, al parecer es el primer estudio.

Palabras clave: Árbol de navidad, coadyuvante, macronutrientes, micronutrientes, tizón suizo, México.

La producción de árbol de navidad Douglas-fir [*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco] en plantaciones forestales ubicadas en Valle de Bravo, estado de México, México, requiere anualmente una fertilización edáfica y foliar con un balance: 5N:1P:1K para favorecer el crecimiento de los brotes nuevos. Aunque éstos brotes y todas las acículas del follaje son susceptibles a *Phaeocryptopus gaeumannii* (Rhode) Petrak un Ascomycota (Shaw *et al.*, 2011) que crece intercelularmente en las acículas (Stone *et al.*, 2008), y forma pseudotecios globosos y negros que se alinean sobre los estomas en el envés (Dennis, 1978), e induce defoliación severa (Skilling, 1981). La fertilización se ha usado para controlar la enfermedad. El exceso de N incrementa la severidad del tizón suizo (El-Hajj *et al.*, 2004), y en balance con P no la incrementa (Mulvey *et al.*, 2013); y acículas sanas en proporción al N, tienen baja dosis de P (Mohren *et al.*, 1986). El silicio (Si)

+ micronutrientes with 250 and 1000 ppm of Si, indicated that these formulations may contribute to eventual control of *P. gaeumannii*. This preliminary *in vitro* trial appears to be the first study.

Key words: Christmas tree, adjuvant, macronutrients, micronutrients, swiss needle cast, Mexico.

The production of the Douglas-fir [*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco] Christmas tree in forest plantations located in Valle de Bravo, State of Mexico, Mexico, requires yearly edaphic and foliar fertilization with a balance: 5N:1P:1K to enhance the growth of the new sprouts. Although these sprouts and all the needles of the foliage are vulnerable to *Phaeocryptopus gaeumannii* (Rhode) Petrak. An Ascomycota (Shaw *et al.*, 2011) that grow intercellularly in the needles (Stone *et al.*, 2008), and forms black globose pseudothecia that align on the stomata on the underside (Dennis, 1978), and induces severe defoliation (Skilling, 1981). Fertilization has been used to control the disease. The excess N increases the severity of Swiss needle cast (El-Hajj *et al.*, 2004), and balanced with P, it does not increase it (Mulvey *et al.*, 2013); and healthy needles in proportion to N have low P doses (Mohren *et al.*, 1986). Silicon (Si) has not been used to control Swiss needle cast. In other conifers, it is thought to help reduce toxicity by aluminum (Hodson and Sangster, 1999). Si is not included in nutrient formulations since it is not considered essential. Plants accumulate it naturally in the intercellular spaces, in the cell wall, the cell lumen, epidermis, and cuticle; and it possible acts as an adverse factor in the adequate nutrition of fungi. This is based on the fact that in diverse crops it contributes to the reduction of diseases (Datnoff *et al.*, 2011). Based on the general concepts by

no ha sido empleado para el control del tizón suizo. En otras coníferas se considera puede ayudar a disminuir la toxicidad por Aluminio (Hodson y Sangster, 1999). El Si no se incluye en las formulaciones nutritivas por no ser esencial. En forma natural las plantas lo acumulan en los espacios intercelulares, en la pared celular, lumen de la célula, epidermis y cutícula; y actúa posiblemente como un factor adverso en la adecuada nutrición de hongos. Esto en base que en diversos cultivos agrícolas coadyuva a reducir sus enfermedades (Datnoff *et al.*, 2011). Con base en los conceptos generales de Griffin (1994) y Jennings (2007) sobre nutrición y crecimiento micelial de hongos, se puede extrapolar que, al adherirse el Si a la pared celular, las enzimas de las hifas no actúan eficientemente en desdoblar la celulosa a glucosa, y la nutrición del hongo es afectada negativamente por lo que la enfermedad se reduce (Datnoff *et al.*, 2011). En México esta enfermedad se ha detectado en 11 estados, en poblaciones silvestres de *P. menziesii* (Cibrián *et al.*, 2007; Cibrián *et al.*, 2014), y en 2005 en la región de estudio con severa defoliación y su control es solo químico (Stone *et al.*, 2007). El objetivo del estudio fue evaluar *in vitro* el efecto de diferentes macronutrientes y micronutrientes y el Si sobre el crecimiento *in vitro* de *P. gaeumannii*. Se hipotetizó que los macronutrientes y micronutrientes agregados al medio de cultivo afectan el crecimiento del hongo, que el Si le es tóxico, y en presencia del Si el hongo no puede absorber adecuadamente las fuentes de carbono del medio de cultivo reduciendo su tasa de crecimiento hifal.

El estudio se hizo con un aislamiento de *P. gaeumannii* (# JN204508, NCBI) de la Colección de Cultivos del Colegio de Postgraduados-Fitopatología (# CP-A032), aislado de árboles de navidad de *P. menziesii* en Valle de Bravo. La colonia se incrementó en medio de cultivo al 2 % de Extracto de Malta-Agar (MEA) (Crous *et al.*, 2009) (Oxoid

(1994) and Jennings (2007) on fungal nutrition and mycelial growth, we can extrapolate that, when Si adheres to the cell wall, the hyphal enzymes do not act efficiently when unfolding cellulose into glucose, and fungal nutrition is affected negatively, reducing the disease (Datnoff *et al.*, 2011). In Mexico this disease has been found in 11 states, in populations of wild *P. menziesii* (Cibrián *et al.*, 2007; Cibrián *et al.*, 2014), and in 2005, in the region studied, with severe defoliation, and its control is only chemical (Stone *et al.*, 2007). The aim of the study was to evaluate *in vitro* the effect of different macronutrientes and micronutrientes and the Si on the growth *in vitro* of *P. gaeumannii*. We hypothesized that the macronutrientes and micronutrientes added to the culture medium affect the fungal growth, that Si is toxic, and in the presence of Si the fungus cannot properly absorb the sources of carbon of the culture medium, reducing its hyphal growth rate.

The study was carried out with an isolation of *P. gaeumannii* (# JN204508, NCBI) from the Culture Collection of the Colegio de Postgraduados-Plant Pathology (# CP-A032), isolated from *P. menziesii* Christmas trees in Valle de Bravo. The culture was increased in a 2 % Malt Extract Agar (MEA) (Crous *et al.*, 2009) (Oxoid LTD, LM0059, England) at a constant temperature of 21 °C and complete darkness for 20 days. To compare the growth responses and as a double evaluation in time, two *in vitro* experiments were conducted. One, in a solid medium (2 % MEA), and the other, in a liquid Potato Dextrose (PD) medium.

First experiment. In a factorial experiment with a completely random design, five repetitions and a total of 50 experimental units, ten treatments were evaluated (Table 1). The macronutrient solution had the nutritional balance of 3N: 1P: 3K (100 mL⁻¹ per treatment), and sodium metasilicate (44 % Si;

LTD, LM0059, Inglaterra) a temperatura constante de 21 °C y oscuridad total durante 20 días. Para comparar las respuestas de crecimiento y como una doble evaluación en tiempo, se condujeron dos experimentos *in vitro*. Uno en medio sólido (2 % MEA) y otro en medio líquido de Papa Dextrosa (PD).

Primer experimento. En un experimento factorial con diseño completamente al azar, cinco repeticiones y 50 unidades experimentales en total, se evaluaron diez tratamientos (Cuadro 1). La solución nutritiva de macronutrientes tuvo el balance nutricional de 3N: 1P: 3K (100 mL⁻¹ por tratamiento), y metasilicato de sodio (44 % Si; Na₂SiO₃) como fuente de Si. Los micronutrientes se prepararon y aplicaron como lo describe Hewitt y Smith (1975). A las soluciones (Cuadro 1) se adicionó 2 % MEA, se esterilizaron a 120 °C por 20 min, se midió el pH y se ajustó a 5.5 con 0.01N H₂SO₄, y se vació el medio en cajas Petri de plástico estériles de 8.5 cm de diámetro (diám.). Por caja se sembraron fragmentos de 1 mm de diám. de la colonia de *P. gaeumannii* de 20 días edad de edad, e incubaron a temperatura constante de 21 °C y oscuridad total por 42 días. El crecimiento del diám. colonial (mm) se registró cada siete días y los datos se analizaron con la técnica de análisis de crecimiento de Fisher (1921). Los datos se convirtieron a logaritmo natural (Ln) y se hizo una regresión lineal (Hunt, 2003). La Tasa de Crecimiento Relativo instantáneo (R o TCRi) se obtuvo con el siguiente modelo: $\text{Ln } a = b + R$ (DDIE) [Dónde: a = variable evaluada, b = valor donde la recta cruza la ordenada, R = TCRi, y DDIE = Días Después de Iniciado el Experimento]. La TCRi del testigo se restó a cada tratamiento y los datos se muestran en Figura 1A. Los valores arriba (+) del eje de las “x” fueron las diferencias en que cada tratamiento superó la TCRi del testigo, y los valores abajo (-) del eje de las “x” fueron las

Na₂SiO₃) as a source of Si. The micronutrients were prepared and applied as described by Hewitt and Smith (1975). To the solutions (Table 1) were added 2 % MEA, sterilized them at 120 °C for 20 min, it was measured the pH and adjusted it to 5.5 with 0.01N H₂SO₄, and pour the medium into sterilized plastic Petri dishes with 8.5 cm in diameter (diam.). For each dish, 1 mm fragment of the 20 day old *P. gaeumannii* culture were plated and incubated at a constant temperature of 21 °C and total darkness for 42 days. The growth of the diam. of the culture (mm) was measured every seven days and the data were analyzed using Fisher’s growth analysis technique (1921). The data were converted into a natural logarithm (Ln) and a linear regression was carried out (Hunt, 2003). The Instant Relative Growth Rate (R or iRGR) was obtained with the following model: $\text{Ln } a = b + R$ (DDIE) [where: a = variable evaluated, b = value where the straight line crosses the ordinate, R = iRGR and DABE = Days After the Beginning of the Experiment]. The iRGR of the control was subtracted from each treatment and the data are shown in Figure 1A. The values above (+) the “x” axis were the differences in which each treatment surpassed the iRGR of the control, and the values below (-) the “x” axis were the differences in which each treatment fell below the iRGR of the control.

Second experiment. This was carried out in a completely random design with five repetitions, 21 treatments (11-31) (Table 1), and a total of 105 experimental units. The control (T31) was only the liquid medium of Potato Dextrose [PD; broth: 200 g white potato without the peel, cut into small pieces and boiled for 20 min in distilled water, and 14 g dextrose (J.T. Baker, 1916-01, Mexico) per liter of distilled water] plus the fungus. Into the medium was added the same nutrient solution mentioned above, some doses changed (Table 1),

Cuadro 1. Nutrientes y dosis de Silicio utilizados en dos experimentos *in vitro* en medio solido 2 % de MEA y liquido PD para determinar el crecimiento de la colonia (cm) y el peso seco (mg) del micelio de *Phaeocryptopus gaeumannii*.

Table 1. Nutrients and doses of silicon used in two *in vitro* experiments in a solid medium 2 % of MEA and liquid PD to determine the growth of the colony (cm) and the dry weight (mg) of the mycelium of *Phaeocryptopus gaeumannii*.

Medio y Tratamientos (T)		Nutrimento	Silicio (ppm)
Exp. 1: Solido 2%MEA ^v	Exp. 2: Liquido PD ^x		
Macronutrientes (macros; 3N: 1P: 3K) ^y			
T1	T11	N P K Ca Mg S	0
T2	T12	N P K Ca Mg S	250
T3	T13	N P K Ca Mg S	1000
	T14	N P K Ca Mg S, en dosis doble	0
	T15	N P K Ca Mg S, en dosis doble	250
Micronutrientes (micros) ^z			
	T16	Cu Mn Zn	0
	T17	Cu Mn Zn	250
	T18	Cu Mn Zn, en dosis doble	0
T4	T19	Fe Cu B Mo Zn Mn	0
T5	T20	Fe Cu B Mo Zn Mn	250
T6	T21	Fe Cu B Mo Zn Mn	1000
	T22	Fe Cu B Mo Zn Mn, en dosis doble	0
	T23	Fe Cu B Mo Zn Mn, en dosis doble	250
Completa (macros + micros)			
T7	T24	N P K Ca Mg S Fe Cu B Mo Zn Mn	0
T8	T25	N P K Ca Mg S Fe Cu B Mo Zn Mn	250
T9	T26	N P K Ca Mg S Fe Cu B Mo Zn Mn	1000
	T27	N P K Ca Mg S Fe Cu B Mo Zn Mn, dosis doble	0
	T28	N P K Ca Mg S Fe Cu B Mo Zn Mn, dosis doble	250
	T29	Medio liquido sin nutrientes	250
	T30	Medio liquido sin nutrientes	1000
T10	T31	Testigos (solo el medio de cultivo)	0

^vExtracto de Malta-Agar; ^xPapa Dextrosa; ^yFormulación en texto; ^zHewitt y Smith, 1975 / ^vMalt extract Agar; ^xPotato Dextrose; ^yFormulation in text; ^zHewitt and Smith, 1975.

diferencias en que cada tratamiento fue menor a la TCRi del testigo.

Segundo experimento. Este fue en un diseño completamente al azar con cinco repeticiones, 21 tratamientos (11-31) (Cuadro 1), y un total de 105 unidades experimentales. El testigo (T31) fue sólo el medio líquido [PD; caldo de 200 g de papa blanca libre de cascara, cortada en pequeñas piezas, y

and an incubation period for 35 days. The colony developed in each tube was extracted from the liquid medium, placed in sterilized aluminum foil, and the humidet weight was taken on an electronic scale with an approximation of 0.001 g (AP210- O, Ohaus, New Jersey, U.S.A.). The mycelium samples were transferred to crystal (Pyrex) 5.0 cm Petri dishes and dehydrated in an oven (Craft Instrumentos Cientificos, Mexico) at 35 °C for 48 h and the dry

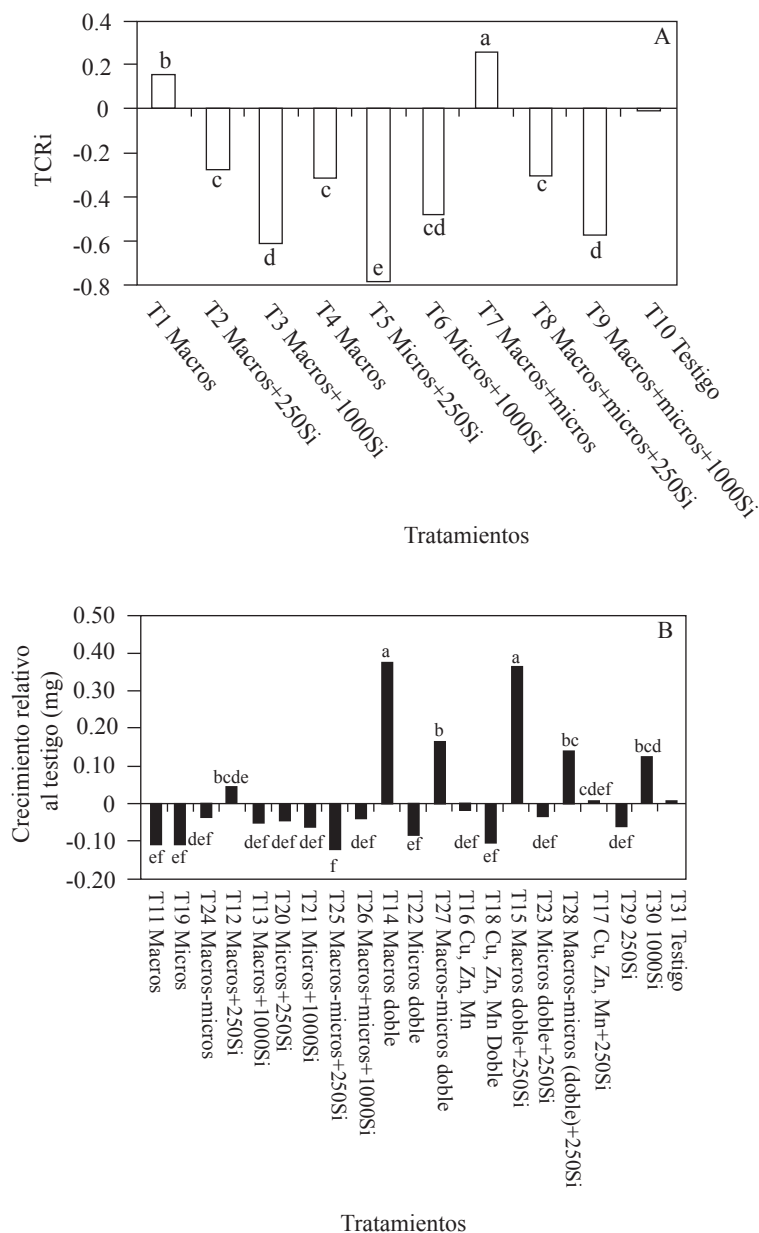


Figura 1. Crecimiento de *P. gaeumannii* en medios sólido y líquido suplementado con diferentes nutrientes y dosis de Silicio. A) Tasa de Crecimiento Relativo instantáneo (TCRi) en medio sólido de 2 % Extracto de Malta-Agar por 42 días, B) Crecimiento relativo (mg) en medio líquido de Papa Dextrosa determinado a los 35 días. Barras arriba del eje de las “x” (+) indicaron que la diferencia de crecimiento del tratamiento fue mayor en relación al testigo, y por debajo del eje (-), que fue menor con relación al testigo. Macros = macronutrientes, Micros = micronutrientes, Si = Silicio.

Figure 2. Growth of *P. gaeumannii* in solid and liquid media supplemented with different nutrients and doses of silicon. A) Relative Growth Rate (iRGR) in a solid medium of 2 % Malt Extract Agar for 42 days, B) Relative growth (mg) in liquid Potato Dextrose medium determined after 35 days. Bars above the “x” axis (+) indicated that the difference in growth of the treatment was higher in relation to the control, and below the axis (-), it was lower in relation to the control. Macros = macronutrients, Micros = micronutrients, Si = Silicon.

hervida por 20 min en agua destilada, y 14 g de dextrosa (J.T. Baker, 1916-01, México) por litro de agua destilada] más el hongo. Al medio se agregó la misma solución nutritiva arriba mencionada, algunas dosis cambiaron (Cuadro 1) e incubación por 35 días. La colonia desarrollada en cada tubo se extrajo del medio líquido, se colocó en papel aluminio estéril y se registró peso húmedo en una balanza electrónica con aproximación de 0.001 g (AP210-O, Ohaus, New Jersey, EE. UU.). Las muestras de micelio se transfirieron a cajas Petri (Pyrex) de cristal estériles de 5.0 cm, y se deshidrataron en estufa de cultivo (Craft Instrumentos Científicos, México) a 35 °C por 48 h y se registró el peso seco. A cada variable de peso húmedo y seco, se hizo un análisis de varianza y comparación de medias por Tukey ($\alpha=0.05$) con el paquete estadístico SAS (2009) versión 9.3 (SAS The Power to Know, USA). A cada media de peso seco de los tratamientos se les resto la media del testigo. Datos en Figura 1B.

Los resultados de los dos experimentos fueron estadísticamente significativos.

Primer experimento. En todos los tratamientos hubo crecimiento de la colonia de *P. gaeumannii* (Figura 1A). Los macronutrientes (T1) solos favorecieron la TCRi, no obstante, cuando se adicionaron los micronutrientes (T7) el estímulo de crecimiento se incrementó como se espera en una formulación balanceada. Por otro lado, cuando sólo hubo microelementos en el medio (T4) se redujo la TCRi. Con la presencia de macronutrientes (T1 y T7) el hongo dispuso de N y P, elementos básicos para la formación de sustancias proteínicas y metabolitos secundarios que contribuyeron al crecimiento del hongo. El efecto negativo de los microelementos (T4) se redujo debido a la presencia de macroelementos (T7) lo cual favoreció un balance nutritivo para la TCRi. Por el contrario, la adición

weight was taken. For each humid and dry weight variable, an analysis of variance was carried out and a Tukey comparison of averages ($\alpha =0.05$) using the statistical package SAS (2009) version 9.3 (SAS The Power to Know, USA). Each dry weight average for the treatments was subtracted the average of the control. Data in Figure 1B.

The results of both experiments were statistically significant.

First experiment. In all treatments there was growth of the *P. gaeumannii* colony (Figure 1A). The macronutrients (T1) alone favored the iRGR, although, when the micronutrients were added (T7) the growth stimulus increased, as expected in a balanced formulation. On the other hand, when there were only micronutrients in the medium (T4) iRGR decreased. In the presence of macronutrients (T1 and T7) the fungus obtained N and P, basic elements for the formation of protein substances and secondary metabolites that contribute to the growth of the fungus. The negative effect of the microelements (T4) was reduced in the presence of macroelements (T7) which promoted a nutritional balance for the iRGR. On the other hand, the addition of Si in the other treatments reduced the iRGR (Figure 1A). The greatest reduction in the growth of the colony was observed when the medium contained micronutrients (T5) and 250 ppm of Si (Figure 1A). The highest concentration of Si (1000 ppm) (T6), did not surpass the inhibitory effect due to the combination micronutrients - 250 ppm Si (T5). This leads to infer that the concentration of the microelements must be balanced with that of Si for an effective inhibition of fungal growth. The inhibitory effect of the Si was corroborated in the treatment in which macronutrients were added to the medium, along with micronutrients plus 1000 ppm of Si (T9). Since there are no reports in the

de Si en los otros tratamientos disminuyó la TCRi (Figura 1A). La mayor reducción en el crecimiento de la colonia se observó cuando el medio contenía micronutrientes (T5) y 250 ppm de Si (Figura 1A).

La concentración más alta de Si (1000 ppm) (T6), no superó el efecto inhibitorio debido a la combinación micronutrientes-250 ppm de Si (T5). Lo anterior lleva a inferir que la concentración de los microelementos debe estar balanceada con la del Si para una efectiva inhibición del crecimiento del hongo. El efecto inhibitorio del Si se corroboró en el tratamiento en el que se adicionaron al medio macronutrientes, micronutrientes más 1000 ppm de Si (T9). Dado que no hay reportes en la literatura sobre el efecto inhibitorio del Si en el crecimiento de hongos *in vitro*, se hipotetiza que ésta podría ser una respuesta de toxicidad. Además, al considerar que en la nutrición de las plantas (incluye a los árboles de navidad, *P. menziesii*) se requiere de una formulación balanceada entre macronutrientes y micronutrientes, el tratamiento T9 debería continuarse estudiando. Aunque el tratamiento T5 fue el mejor de todos, los micronutrientes por si solos no nutren a las plantas, no obstante indicó que la concentración de éstos fue clave para reducir la TCRi del hongo.

Segundo experimento. Los resultados se basaron en el peso seco (no hubo diferencias significativas con el peso húmedo). Los tratamientos que mejor estimularon el crecimiento micelial de *P. gaeumannii* fueron siete (barras arriba del eje de las "x"), y donde sobresalieron los tratamientos con doble concentración de macronutrientes sin o con Si (T14, T15) (Figura 1B). Esto, como ya se indicó pudo deberse al N y P que favorecieron un mayor crecimiento micelial. Aunque en dosis normal su efecto fue negativo (T11). Esto pudo atribuirse a que en medio sólido (T1) las hifas tuvieron mayor eficiencia de crecimiento por ser un hongo aeró-

bibliography on the inhibitory effect of Si on the growth of fungi *in vitro*, our hypothesis is that this could be a toxicity response. Also, if we consider that in plant nutrition (including *P. menziesii* Christmas trees) a balanced formula is required between macronutrients and micronutrients, studies on treatment T9 should continue. Although treatment T5 was the best of all, the micronutrients on their own do not nourish plants, yet it indicated that their concentration was key in the reduction of fungal iRGR.

Second experiment. Results were based on the dry weight (there were no significant differences with the humid weight). The treatments that best stimulated the mycelial growth of *P. gaeumannii* were seven (bars above the "x" axis), and where the treatments with double concentrations of macronutrients with or without Si (T14, T15) stood out (Figure 1B). This, as mentioned earlier, could have been due to the N and P that favored a greater mycelial growth, although in normal doses, its effect was negative (T11). This could be due to the fact that in a solid medium (T1) hyphae had a greater growth efficiency because it is an aerobic fungus (Griffin, 1994), and in the liquid medium, treatment T14 required twice as many macronutrients to favor the growth in an adverse condition. Treatment T30 with only high doses of Si also promoted fungal growth although in lower amounts. This is possibly due to the nutrients of the liquid medium such as starches (N) and traces of protein derived from the potato extract (PD). On the contrary, in low doses (T29), Si inhibited fungal growth. Both results must continue to be studied using a treatment with water and Si alone. It would also be recommendable to use other Si sources such as Silica Gel, NaSiO₃ (Griffin, 1994), etc. The other 14 treatments displayed an inhibitory effect in fungal growth (bars below the "x" axis) (-). In

bico (Griffin, 1994), y en medio líquido el tratamiento T14 requirió el doble de macros para favorecer el crecimiento en una condición adversa. El tratamiento T30 con solo dosis alta de Si también promovió el desarrollo del hongo aunque en baja cantidad. Posiblemente, esto pudo deberse a los nutrientes propios del medio líquido como almidones (N) y trazas de proteínas derivados del extracto de papa (PD). Por el contrario, en baja dosis (T29), el Si inhibió el crecimiento del hongo. Ambos resultados deben continuar estudiándose empleando un tratamiento solo con agua y Si. Además sería recomendable usar otras fuentes de Si como el Silica Gel, NaSiO_3 (Griffin, 1994), etc. Los otros 14 tratamientos mostraron un efecto inhibitorio en el crecimiento del hongo (barras abajo del eje de las "x") (-). En relación a los micronutrientes completos (Cuadro 1; seis elementos) en dosis normal y con o sin Si se comportaron como en el primer experimento, y también en dosis doble (T22, T23), y restringieron el crecimiento del hongo. Al reducir los micronutrientes a tres elementos (Cuadro 1; Cu, Mn, Zn), el tratamiento T18 se comportó igual a T19 (seis elementos). Lo que ayudo a inferir que estos tres micronutrientes pueden ser los que inhibieron el crecimiento micelial y en particular el Mn. Griffin (1994) señaló que el exceso de Mn como en tratamiento T18, actúa inhibiendo el crecimiento fungal. No obstante, al adicionar el Si el crecimiento del hongo no se afectó (T17; dosis normal) y el crecimiento fue similar al testigo. Habría que diseñar otros experimentos con dosis dobles de micronutrientes + Si. Los macronutrientes más micronutrientes en dosis doble, y sin o con Si, estimularon el crecimiento micelial (causas arriba expuestas); y en dosis normal la restringieron (Figura 1). El tratamiento que sobresalió fue el T25 con la mayor inhibición micelial. La formulación

relation to the complete micronutrients (Table 1; six elements) in normal doses and with or without Si they behaved as in the first experiment, and also in a double dose (T22, T23), and restricted fungal growth. When reducing micronutrients to three elements (Table 1; Cu, Mn, Zn), treatment T18 behaved the same as T19 (six elements), which led to infer that these three micronutrients could be the ones that inhibited mycelial growth, and Mn in particular. Griffin (1994) pointed out that the excess Mn, as in treatment T18, acts by inhibiting fungal growth. However, when adding Si, fungal growth was not affected (T17; normal dose) and growth was similar to the control. More experiments should be designed with double doses of micronutrients + Si. Macronutrients plus micronutrients in double doses, and with and without Si, stimulated mycelial growth (causes mentioned above); and in normal doses, they restricted it (Figure 1). The treatment that stood out was T25 with the highest mycelial inhibition. The balanced formulation of macroelements and microelements expected in the nutrition of plants, which also included Si as a coadjuvant, indicate that T25 is the best treatment in the liquid medium, which was also observed for treatment T9 in the solid medium. In this way, considering that Si may contribute to reduce the disease (Datnoff *et al.*, 2011), and in complementing an adequate fertilization formulation, it would help to balance the nutritional content of the plant (Mohren *et al.*, 1986), the possibilities of controlling Swiss needle cast could be feasible in future studies. In conclusion, this is the first study on the effect of Si and micronutrients Cu, Mn, Zn on the inhibition of the growth *in vitro* of the fungus *P. gaeumannii*, causal agent of *P. menziesii* in Christmas tree plantations.

balanceada de macroelementos y microelementos esperada en la nutrición de plantas, que incluyó además al Si como coadyuvante, indican que T25 es el mejor tratamiento en medio líquido lo cual también se observó en el tratamiento T9 en medio sólido. Así considerando que con la ayuda del Si se podría coadyuvar en reducir la enfermedad (Datnoff *et al.*, 2011), y en complemento a una adecuada formulación de fertilización se contribuiría a balancear el contenido nutrimental de la planta (Mohren *et al.*, 1986), por ello, las posibilidades del control del Tizón Suizo pueden ser factibles en futuros estudios. En conclusión, este es el primer estudio sobre el efecto del Si y los micronutrientes Cu, Mn, Zn, en la inhibición del crecimiento *in vitro* del hongo *P. gaeumanni*, agente causal de *P. menziesii* en plantaciones de árboles de Navidad.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a CONACyT por la beca al segundo autor, a la Dra. Raquel Alatorre Rosas, por uso del Laboratorio en Colegio de Postgraduados, y a la C. Julieta Martínez de la Universidad Autónoma Chapingo, por apoyar los experimentos.

LITERATURA CITADA

- Cibrián TD., Alvarado RD., y García-Díaz SE. 2007. Enfermedades forestales de México/ Forest Diseases in Mexico. Comisión Nacional Forestal, Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales y Comisión Forestal de América del Norte/Forest Service, United States Department of Agriculture, Canadian Forest Service and Forestry Commission North America. Universidad Autónoma Chapingo. México. 587p. Disponible en línea: <http://bibliotecasibe.ecosur.mx/sibe/book/000036646>
- Cibrián TD., Pérez-Vera OA., García-Díaz SE., Cibrián LVD., Cruz JJ., and Hernández AG. 2014. Tizón Suizo (*Phaeocryptopus gaeumanni* (Rhode) Petrak) en *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* (Beissn.) Mayr. Rev. Mex. Cien. For. 5:104-115. Disponible en línea: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11322014000200008
- Crous PW., Verkley GJM., Groenewald JZ., and Samson RA. (eds.). 2009. Fungal Biodiversity. CBS Laboratory

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks to CONACyT for the scholarship granted to the second author, Dr. Raquel Alatorre Rosas, for the use of the laboratory in the Colegio de Postgraduados, and to C. Julieta Martínez of the Universidad Autónoma Chapingo, for her support with the experiments.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

- Manual Series, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. Utrecht, The Netherlands. 269p. Disponible en línea: <http://www.cbs.knaw.nl/Biomaticsnews.aspx?Category=laboratory%20manual%20series>
- Datnoff LE, Snyder GH., and Korndörfer GH. (eds). 2011. Silicon in Agriculture. Studies in Plant Science, 8. Florida, USA. 403p. [http://dx.doi.org/10.1016/S0928-3420\(01\)80001-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0928-3420(01)80001-X)
- Dennis RWG. 1978. British Ascomycetes. J. Cramer. Vaduz, Alemania. 585p. Disponible en línea: <https://www.amazon.es/British-Ascomycetes-R-W-Dennis/dp/3768205525>
- El-Hajj Z., Kavanagh K., Rose C., and Kanaan-Atallah Z. 2004. Nitrogen and carbon dynamics of a foliar biotrophic fungal parasite in fertilized Douglas-fir. New Phytologist 163:139-147. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2004.01102.x
- Fisher RA. 1921. Some remarks on the methods formulated in a recent article on "The quantitative analysis of plant growth". Annals of Applied Biology 7:367-372. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1921.tb05524.x
- Griffin DH. 1994. Fungal Physiology. Wiley-Liss. New York, USA. 458p. Disponible en línea: <http://www.nature.com/subjects/fungal-physiology>
- Hewitt EJ., and Smith TA. 1975. Plant Mineral Nutrition. The English Universities Press. London, UK. 298p. Disponible en línea: <https://www.iberlibro.com/buscar-libro/titulo/plant-mineral-nutrition/autor/hewitt-e-j-smith-t-a/>
- Hodson MJ., and Sangster AG. 1999. Aluminium/silicon interactions in conifers. J. Inorganic Biochem. 76:89-98. [http://dx.doi.org/10.1016/S0162-0134\(99\)00119-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0162-0134(99)00119-1)
- Hunt R. 2003. Growth analysis, individual plants. Pp:579-588. In: Thomas B., Murphy DJ., and Murray D. (eds.). Encyclopedia of Applied Plant Sciences 588-596. Academic Press. London. 600p. Disponible en línea: [http://people.exeter.ac.uk/rh203/EAPS\\_article.pdf](http://people.exeter.ac.uk/rh203/EAPS_article.pdf)
- Jennings DH. 2007. The Physiology of Fungal Nutrition. Cambridge University Press. New York, USA. 622p. DOI: 10.1007/BF02908824
- Mohren GMJ., Den Burg J. van, and Burger FW. 1986. Phosphorus deficiency induced by nitrogen input in Douglas fir in the Netherlands. Plant and Soil 95:191-200. DOI: 10.1007/BF02375071
- Mulvey RL., Shaw DC., and Maguire DA. 2013. Fertilization impacts on Swiss needle cast disease severity in western

- Oregon. For. Ecol. and Management 287:147-158. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foreco.2012.08.050>
- Shaw DC., Filip GM., Kanaskie A., Maguire DA., and Littke WA. 2011. Managing an epidemic of Swiss needle cast in the Douglas-fir region Oregon: the role of the Swiss Needle Cast Cooperative. *Journal of Forestry* 109:109-119. Disponible en línea: <http://sncc.forestry.oregonstate.edu/sites/default/files/2011%20Shaw%20et%20al%20Managing%20SNC%20JoF.pdf>
- Skilling DD. 1981. Control of Swiss needle cast in Douglas-fir. *American Christmas Tree J.* 25:34-37. Disponible en línea: [https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1983Articles/PlantDisease67n07\\_790.PDF](https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1983Articles/PlantDisease67n07_790.PDF)
- Stone JK, Reeser PW., and Kanaskie A. 2007. Fungicidal suppression of Swiss Needle Cast and pathogen reinvasion in a 20-year-old Douglas-fir stand in Oregon. *West. J. Appl. For.* 22 (4), 248-252. Disponible en línea: [http://www.cof.orst.edu/coops/sncc/pdfs/pubs/Stone%20et%20al.\\_2007\\_fungicidal%20suppression.pdf](http://www.cof.orst.edu/coops/sncc/pdfs/pubs/Stone%20et%20al._2007_fungicidal%20suppression.pdf)
- Stone JK., Capitano BR., and Kerigan JL. 2008. The histopathology of *Phaeocryptopus gaeumannii* on Douglas-fir Needles. *Mycologia* 100:431-444. Doi: 10.3852/07-170R1