



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

HONGOS ANTAGONISTAS PARA EL CONTROL DE
MUÉRDAGO ENANO (*Arceuthobium vaginatum*) EN
DOS ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS DEL EJE
NEOVOLCÁNICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

MIGUEL ANGEL CORTEZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

BIÓL. J. FRANCISCO RESÉNDIZ MARTÍNEZ

Los Reyes Iztacala, 2013





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El cuento es muy sencillo
usted nace
contempla atribulado
el rojo azul del cielo
el pájaro que emigra
el torpe escarabajo
que su zapato aplastará
valiente

usted sufre
reclama por comida
y por costumbre
por obligación
llora limpio de culpas
extenuado
hasta que el sueño lo descalifica

usted ama
se transfigura y ama
por una eternidad tan provisoria
que hasta el orgullo se le vuelve tierno
y el corazón profético
se convierte en escombros

usted aprende
y usa lo aprendido
para volverse lentamente sabio
para saber que al fin el mundo es esto
en su mejor momento una nostalgia
en su peor momento un desamparo
y siempre siempre
un lío

entonces
usted muere.

Curriculum – Mario Benedetti



¿sabrán los cedros del líbano
y los caobos de corinto
que sus voraces enemigos
no son la palma de camagüey
ni el eucalipto de tasmania
sino el hacha tenaz del leñador
la sierra de las grandes madereras
el rayo como látigo en la noche?

De árbol a árbol - Mario Benedetti

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a todas las personas con las que he compartido una parte de mi vida y que a su vez me han dado la oportunidad de ser parte de la suyas, aun siendo de manera fugaz, pues su presencia ha dejado huella. Ya que sin sus enseñanzas no podría ser la persona que soy en este momento.

Ha esas personas que han creído en mí y me han apoyado a lo largo de mi camino como estudiante y como persona. Pero también lo dedico a aquellas que no lo hicieron, pues me dieron el coraje para lograrlo.

A mi asesor, el Biólogo José Francisco Reséndiz Martínez, pues además de guiarme y apoyarme como investigador en el área forestal, también me ha guiado y apoyado como amigo a lo largo de este tiempo. Profe, muchas gracias por sus consejos.

Y por supuesto a mí querida madre, pues ha sido el pilar de mi vida. Gracias por confiar en mí y apoyarme incondicionalmente en cada una de mis locuras. Te quiero madre.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, el Biol. J. Francisco Reséndiz Martínez, por apoyarme en todo momento en la realización de este trabajo. Gracias por invitarme a formar parte de este proyecto, he aprendido mucho.

A mis sinodales, Dra. Silvia Romero Rangel, M. en C. Ezequiel Carlos Rojas Zenteno, M. en C. Ana Lilia Muñoz Viveros y a la M. en C. María Elena Huidobro Salas, por las revisiones y sugerencias para buen término de este trabajo.

A los investigadores del área de Sanidad Forestal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agropecuarias y Pecuarias, por su apoyo y paciencia a lo largo de este tiempo, especialmente al Dr. Víctor Arriola Padilla, por incluirme en este proyecto; al Dr. Víctor López Gómez por apoyarme y explicarme las pruebas estadísticas, siempre de una forma muy cordial; a la Dra. Adriana Gijón Hernández por su apoyo en la realización del PCR; y al Dr. Alejandro Ponce por ofrecerse a apoyarme aun con todas sus cargas de trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio; los Ingenieros Agrónomos Viviana García Valderrama y Canek Mendoza; a las biólogas Cindy López y Lidia Ramírez Huerta; y en especial mi buen amigo el Biól. Mauricio Pérez Silva, ya que gracias a su apoyo constante se pudo culminar este trabajo, me divertí mucho en su compañía, gracias por hacer tan ameno esos días de trabajo.

A mis amigos del grupo 54: Aline, Arely, Saúl y Jonatán, pues con ustedes empecé la carrera y aún seguimos con esta bonita amistad. A la mayoría del grupo 52, pues entre ustedes he conocido personas muy valiosas espero sigamos teniendo contacto y nos apoyemos. A mis amigas Jesica B. Arriaga Osnaya y Ana Martínez, por todas la buenas vibras que me han dado desde que las conozco.

Y sobre todo a la banda ñoña (Cristina, David, Edgar, Natalia, Mauricio y Sergio) por ser mis amigos durante estos últimos años, y enseñarme que la dedicación y la constancia son partes fundamentales del éxito.

A mi querida Kris, por enseñarme a conocer y amar la biología, así como el maravilloso mundo de los árboles y su importancia. Gracias por ayudarme a recordar mi objetivo y reconocer mi vocación. Siempre estarás en mis pensamientos, mi bióloga favorita.

A mis amigos que son más bien mis hermanos: Juan Carlos Bárcenas y Víctor Guerrero López (y a su hermosa familia), por apoyarme durante todo este tiempo y considerarme parte de su familia.

Nuevamente a mi madre, porque sin ella apoyándome, no lo hubiera logrado. Gracias por todo.

Agradezco al Fondo CONACYT – CONAFOR, por financiar esta investigación como parte del proyecto “Alternativas para el Manejo de Plagas y Enfermedades Forestales en Áreas Naturales Protegidas del Eje Neovolcánico Transversal” con clave de registro CONAFOR-2010-C01-136785.

Igualmente, a las autoridades y a los encargados de las Áreas Naturales Protegidas por el apoyo para realizar los trabajos en campo, en especial al Biól. R. Omar Maldonado del Parque Nacional Izta-Popo.

Por último, pero no por eso menos importante a la UNAM, especialmente a la FES- Iztacala porque en sus instalaciones he vivido los mejores años de mi vida, conociendo las personas más sorprendentes y admirables.

INDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	3
III.	MARCO TEÓRICO.....	4
III.1	Descripción del pino	4
III.2	Descripción del muérdago enano (<i>Arceuthobium vaginatum</i> Will.)	6
IV.	ANTECEDENTES	9
V.	JUSTIFICACIÓN	15
VI.	OBJETIVOS	16
VII.	CARACTERIZACIÓN DE LAS ZONAS DE ESTUDIO	17
VII.1	Parque Nacional Iztaccihuatl - Popocatepetl – Zoquiapan	18
VII.2	Parque Nacional Malinche	25
VIII.	MATERIALES Y MÉTODOS	30
VIII.1	Actividades de campo	30
VIII.2	Actividades de laboratorio	34
VIII.2.1	Obtención de cultivo monospórico.....	36
VIII.2.2	Identificación de los hongos antagonistas	37
VIII.2.3	Pruebas de patogenicidad <i>in vitro</i>	43
VIII.2.4	Conteo de conidios	44
VIII.2.5	Propagación e incremento de conidios de los hongos antagonistas.....	44
VIII.2.6	Preparación de tratamientos para la inoculación	45
VIII.2.7	Prueba de viabilidad.....	45
VIII.3	Actividades de campo	47
VIII.3.1	Diseño experimental	47
VIII.3.2	Tomas de datos de campo.....	50
VIII.3.3	Procesamiento de datos	51
VIII.3.4	Análisis estadístico.....	51
VIII.3.5	Prueba de fitotoxicidad	52
IX.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
IX.1	Sintomatología	53
IX.2	Identificación de Aislamientos	55

IX.3	Patogenicidad <i>in vitro</i> del muérdago enano.....	61
IX.4	Aumento del número de conidios.....	63
IX.5	Pruebas de viabilidad.....	66
IX.6	Inoculación de hongos antagonistas en campo.....	67
XI.	CONCLUSIONES.....	77
XII.	RECOMENDACIONES.....	78
XIII.	ANEXOS.....	79
XIV.	GLOSARIO.....	84
XV.	REFERENCIAS CONSULTADA.....	87
XVI.	APÉNDICE.....	94

I. RESUMEN

Las plagas y enfermedades son los principales factores que afectan la salud de los bosques. Los árboles ubicados en las Áreas Naturales Protegidas no son inmunes a estos problemas. Durante el año 2008 en México se evaluaron por la Comisión Nacional Forestal 737 041 hectáreas, de estas, 67 639 estuvieron dañadas: y 27 183 hectáreas causadas por plantas parásitas. La vegetación localizada en el eje Neovolcánico Transversal está conformada principalmente por coníferas y sus principales problemas fitosanitarios responden a la presencia de plantas parasitas entre estas se encuentra el muérdago enano (*Arceuthobium vaginatum*). A pesar del daño que ocasiona el “muérdago enano”, son pocos los estudios que han realizado sobre su control y/o erradicación. Debido a la poca efectividad de los métodos utilizados y al riesgo de contaminación que representa el uso de herbicidas químicos para el control de estas plantas parasitas, se optó por buscar opciones de manejo más “amables” con la naturaleza, por lo cual se consideró utilizar hongos antagonistas como control biológico.

Se trabajó en dos Áreas Naturales del Eje Neovolcánico Transversal: Parque Nacional Iztaccihuatl – Popocatepetl (PNIP) y Parque Nacional La Malinche (PNLM). Donde se obtuvieron muestras de *A. vaginatum*, las cuales fueron llevadas al laboratorio de CENID/COMEF – INIFAP, donde se aislaron hongos potencialmente antagonistas del muérdago. Estos hongos fueron identificados de manera morfológica y molecular, para escoger los mejores hongos antagonistas de acuerdo a la bibliografía, los cuales fueron: *Alternaria alternata*, *Fusarium proliferatum* y *Cladosporium cladosporioides*. Para evaluar la patogenicidad de estos micromicetos se hicieron pruebas *in vitro*. Después se realizaron conteo, propagación e incremento de conidios hasta alcanzar el número de conidios necesarios para la aspersión en campo (concentración 1×10^6 conidios por ml).

Se realizó la aspersión en tres zonas: Huilapa y Tres Cruces, ubicadas en PNIP y; camino 58-59 en el PNLM. Cada zona con 40 árboles, 10 árboles por tratamiento (*A. alternata*, *C. cladosporioides*, *F. proliferatum* y un control (agua)). Las evaluaciones fueron una antes de la aplicación y tres más después de está (30, 60 y 90 días). De acuerdo a al análisis estadístico, solo dos síntomas tuvieron diferencia significativa en el cambio de coloración y marchitez. De los cuales solo dos hongos antagonistas tuvieron efecto; *A. alternata* para el síntoma de coloración y *F. proliferatum* para el síntoma de coloración. *A. alternata* tuvo un efecto mayor en la primera evaluación después de la inoculación, *F. proliferatum* tuvo efecto hasta la tercera evaluación y *C. cladosporioides* no tuvo diferencia significativa en comparación con las anteriores.

De esta manera aunque no hubo una respuesta satisfactoria con los hongos antagonistas seleccionados, se abre pasó a nuevas investigaciones con otros micromicetos utilizando y adaptando este protocolo de manejo para hongos antagonistas.

Esta tesis se deriva del proyecto “Alternativas de control para el manejo de plagas y enfermedades forestales en Áreas Naturales Protegidas del Eje Neovolcánico Transversal” con financiamiento del Fondo Sectorial CONACYT-CONAFOR.

II. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza existe un equilibrio regulador de los niveles de población de cada especie, pero cuando se rompe el balance, este orden cambia, se altera o desaparece. La intervención antrópica en el ambiente ha provocado la pérdida del equilibrio de los ecosistemas. Un ejemplo es el aumento desproporcionado en la tasa de crecimiento del muérdago enano (*Arceuthobium vaginatum*) que ocasiona pérdidas significativas en los ecosistemas forestales de nuestro país, especialmente en los bosques de *Pinus*, aunque también ataca los géneros *Abies* y *Pseudotsuga*, aunque no con la misma importancia. (Valderrama – Medina. 2002).

En el Eje Neo volcánico transversal, donde se encuentran las coníferas de los parques nacionales Iztaccihuatl-Popocatepetl-Zoquiapan y La Malinche, la distribución de esta planta parasita es muy amplia y afecta el crecimiento en diámetro y altura, así como el vigor de los árboles hasta causarles la muerte (Cibrián *et al.* 2007). A pesar del daño que ocasiona el “muérdago enano”, son pocos los estudios que han realizado sobre su control y/o erradicación. Los métodos de control pueden clasificarse como reguladores, culturales, biológicos, físicos y químicos, dependiendo de la naturaleza de los agentes que se utilicen para el manejo de las enfermedades. Las medidas reguladoras ayudan a eliminar los patógenos de sus hospedantes. La mayoría de las prácticas culturales y métodos de control evitan que las plantas entren en contacto con el patógeno y permiten erradicar o reducir la abundancia de este último en las plantas, en un campo o un área geográfica. Los métodos de control biológico y algunos métodos culturales ayudan a mejorar la resistencia del hospedante o favorecen el crecimiento de microorganismos que son antagonistas del patógeno, Agrios (1991).

La utilización de hongos como agente contenedor de crecimiento del muérdago enano es debido a que ciertos organismos son en gran medida específicos a ciertas especies y se mantienen activos durante periodos de tiempo de acuerdo a su fenología y del ambiente que los contiene.

Debido a la versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación de los hongos, se ha permitido su uso en como control biológico (Fernández-Larrea, 2001). Resulta importante en este sentido, utilizarlos como alternativa para control de muérdago enano. Muchos de los microorganismos antagónicos existen naturalmente en los suelos de los campos de cultivo y ejercen cierto grado de control biológico sobre uno o muchos fitopatógenos, a pesar de las actividades humanas. Sin embargo, el hombre ha hecho intentos por aumentar la efectividad de los microorganismos antagónicos, introduciendo poblaciones nuevas y más prolíficas (Agrios, 1991).

III. MARCO TEÓRICO

III.1 Descripción del pino

División	<i>Pinophyta</i>
Clase	<i>Pinopsida</i>
Orden	<i>Pinales</i>
Familia	<i>Pinaceae</i>
Género	<i>Pinus</i>
Epíteto específico	<i>hartwegii</i>
Nombre Científico	<i>Pinus hartwegii</i> L.
Autor del nombre	John Lindley

Árbol monoico con altura de 20 a 30 m y más de 100 cm de diámetro; copa redondeada con ramas horizontales a ligeramente ascendente. La corteza en arboles maduros es de color café rojizo, gruesa y dividida por estrechas fisuras horizontales y placas grandes y escamosas. Hojas con fascículos de tres agujas, ocasionalmente de cuatro y cinco; gruesas, erguidas, rígidas, 8 a 16 cm de largo, dispuesta en grupos o racimos al final de las ramitas: márgenes finamente aserrados, estomas presentes en las superficies dorsal y ventral; canales resiníferos de tres a 12, más comúnmente seis o siete, medios, en ocasiones con uno o dos internos. Las vainas de los fascículos de 10 a 15 mm largos persistentes de color café (Perry, 1991).

Los conillos son oblongos-ovoides, de color morado oscuro crecen en grupos de dos a seis pedúnculos fuertes y escamosos. Los frutos son conos largamente ovoides, casi simétricos, ligeramente curvados, de 8 a 10 cm de largo, fuertes, ocultos a menudo por las escamas basales del cono. La madera es dura y pesada, resinosa. La albura es de color blanco amarillento y el duramen café claro (Eguiluz, 1982).

La floración de la mayoría de las coníferas mexicanas ocurre generalmente de enero a abril. Los conos maduran de noviembre y diciembre. La dispersión de la semilla es mediante corrientes de aire (anemócorica). La semilla es casi negra de 5 mm de largo, con un ala articulada de color café pálido, de 10 a 11 mm de largo (Eguiluz, 1982; Farjon, 1996) (Fig. 1).

P. hartwegii se localiza en Guatemala y México. En este último país se presenta en 17 estados (Nuevo León, Tamaulipas, Hidalgo, Distrito Federal, Morelos, Colima, Michoacán, Jalisco, Oaxaca, Chiapas, Puebla, Veracruz, Tlaxcala, Estado de México, Coahuila, Nayarit y Guerrero), en altitudes de 2,200 a más de 4,000 msnm (Rzedowski 1978, 1981, Perry 1991). El *P. hartwegii* se encuentra principalmente en sitios con clima semifrío, con temperaturas medias anuales de entre 5 a 12°C, con precipitaciones medias anuales del orden de 967 a 1,200 mm, régimen de lluvias de verano y con menos de 5% de la precipitación en invierno (Mendoza 1977, Benítez 1988, García 1981). Los suelos en que habita son andosoles, podzoles o cafés forestales (Aguirre y Rey 1980, Benítez 1988).

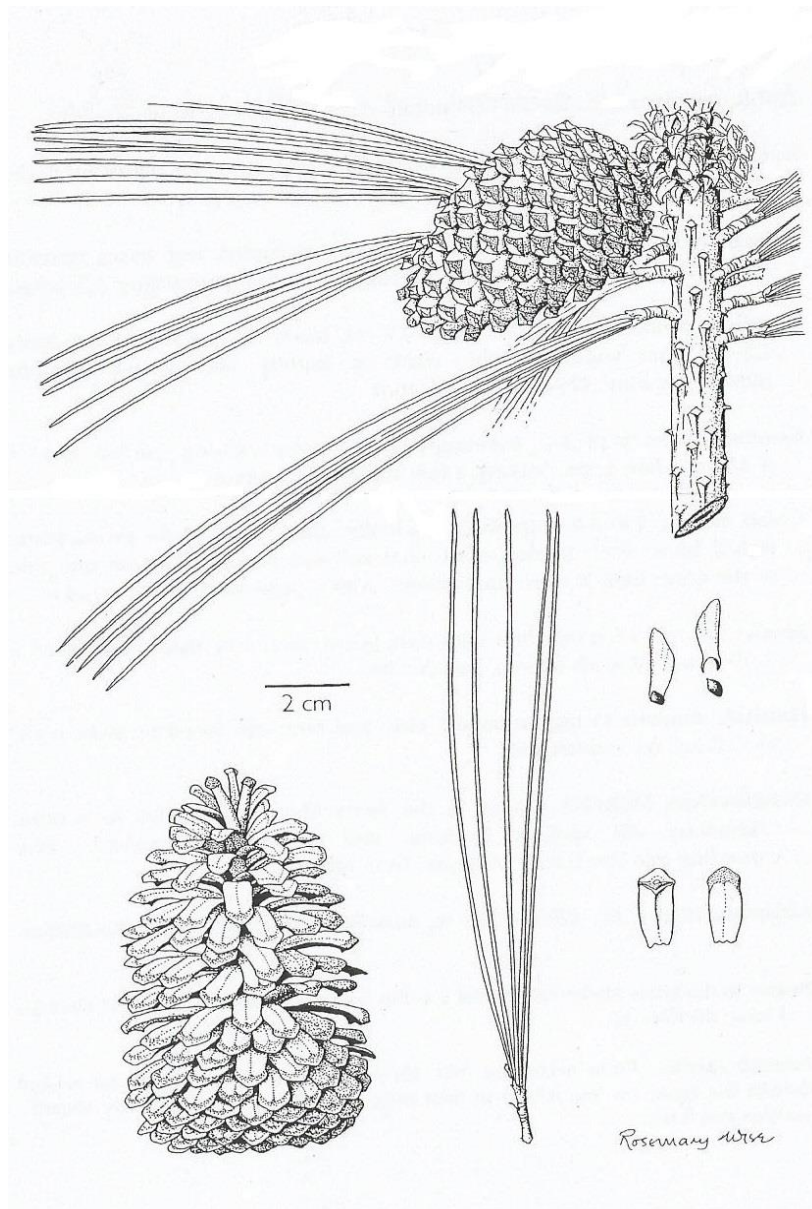


Figura 1. Morfología de *Pinus hartwegii*. Fuente: (Perry, 1991)

III.2 Descripción del muérdago enano (*Arceuthobium vaginatum* Will.)

División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Santalales</i>
Familia	<i>Loranthaceae</i>
Género	<i>Arceuthobium</i>
Epíteto específico	<i>vaginatum</i>
Nombre Científico	<i>Arceuthobium vaginatum</i> (Willd.) Presl.
Autor del nombre	Carl Ludwig Willdenow y Jan Svatopluk Presl

La altura media de las matas es de 20 a 30 (máximo 55 o mayor) cm, de color naranja a marrón oscuro, rojizo o negro, por lo general densamente ramificada y erecta, pero las plantas más longevas en ocasiones se vuelven colgantes; ramas en forma de abanico (flabeladas), diámetro basal de los brotes dominantes de 1 a 3 cm de largo, 0,2 a 0,4 cm de ancho. Flores estaminadas más de 3,5 mm de largo y 3,5 mm de ancho, principalmente tetrámeros, segmentos de más de 2,0 mm de largo y 1,5 mm de ancho, ápice agudo a obtuso. Flor pistilada de 2,5 mm de largo, a 1,5 mm de ancho. Frutas de 4 a 6 mm de largo y de 2 a 3 mm de ancho, elípticas a obovadas (Hawksworth *et. al.* 2002).

Cuenta con el rango más amplio de hospedantes conocidos que cualquier especie del género. Se ha colectado en 13 especies de pinos mexicanos y, sin duda se presenta en otras especies. Los principales hospedantes son: *Pinus arizonica* vars. *arizonicavar. stormiae*, *P. cooperi*, *P. durangensis*, *P. engelmannii*, *P. hartwegii*, *P. herrerae*, *P. lawsonii*, *P. montezumae*, *P. patula*, *P. rudis*, mientras que *Pinus teocote* es un hospedante secundario, ya que es parasitada sólo cuando un hospedante principal es infectado. Cuando *Pinus rudis* está presente rara vez infecta a *Pinus culminicola*. Esta infestación ocurre en el Cerro Potosí, Nuevo León. (Hawksworth *et. al.* 2002)

Su distribución en México comprende: Chihuahua, Coahuila, Distrito Federal, Durango, Hidalgo, Jalisco, México, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Sinaloa, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas). Este es el muérdago enano más ampliamente distribuido, extendiéndose desde la Sierra Madre Occidental en el oeste de Chihuahua hacia el sur por Durango, Jalisco, en la Cordillera Central de México y Puebla. También se presenta en la Sierra Madre Oriental desde Coahuila y Nuevo León hasta Oaxaca. (Hawksworth *et. al.* 2002)

Ciclo biológico

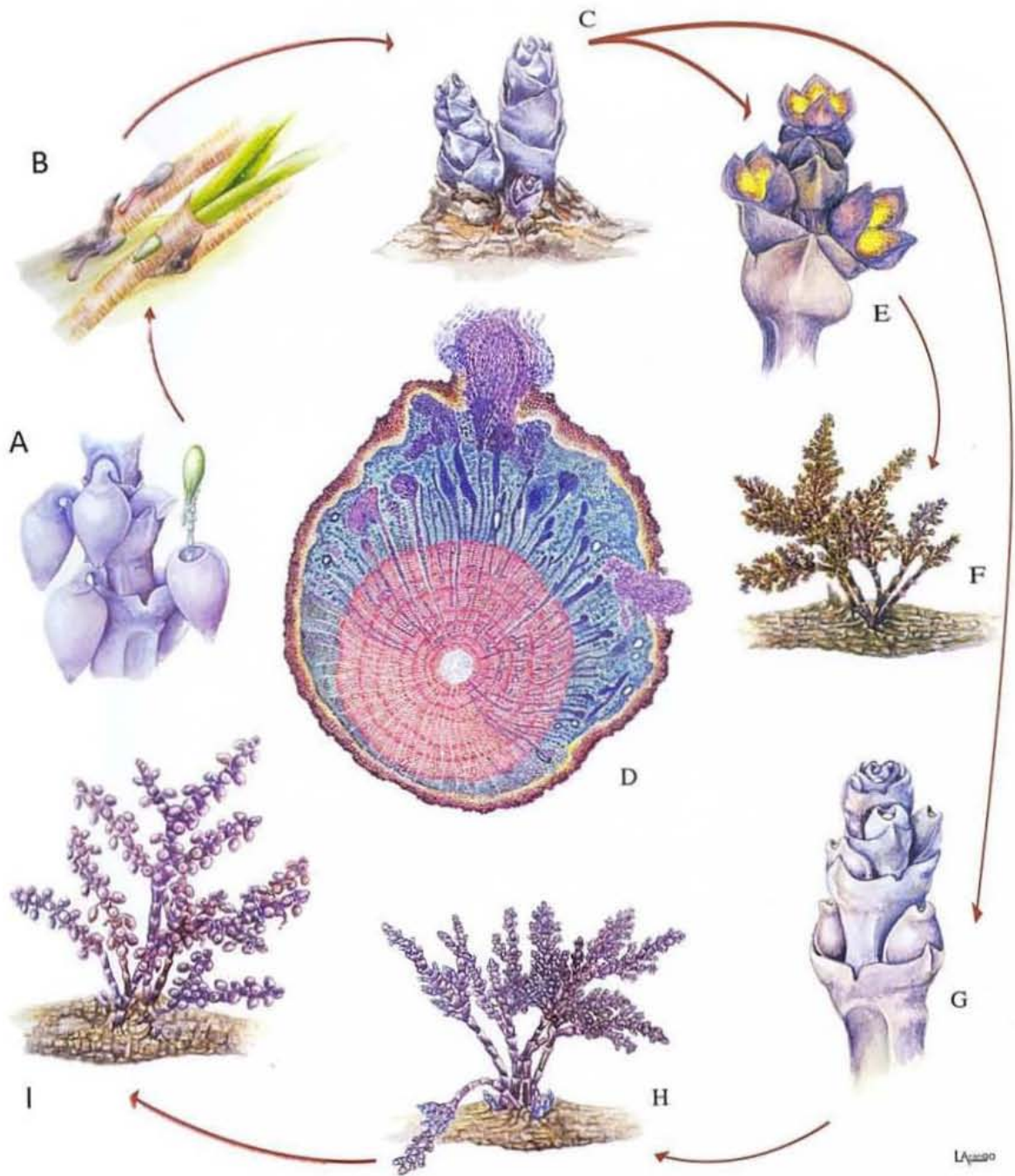


Figura 2. Ciclo biológico de *Arceuthobium vaginatum*. Fuente: (Cibrián et al. 2007)

El ciclo biológico de *Arceuthobium vaginatum* en base la descripción de Hawksworth *et al.*2002 (Fig. 2).

- A.** Los frutos maduros liberan su semilla en los meses de agosto y septiembre.
- B.** Durante septiembre y octubre, las semillas que caen sobre acículas o brotes tiernos germinan y sus radículas forman un callo de penetración que se introduce en el floema y en el cambium del hospedante.
- C.** Un año después, por el sitio de penetración, surgen los primeros brotes aéreos.
- D.** El sistema endofítico se desarrolla a partir del cambium: en el floema existe abundante tejido del muérdago (haustorios); en el xilema cada año los nuevos anillos de madera rodean a los haustorios.
- E.** Las plantas masculinas formaran sus primeras flores hasta dos años después de su nacimiento.
- F.** Planta masculina.
- G.** Las plantas femeninas requieren de dos años para formar sus primeras flores; la polinización ocurre en los meses de marzo a mayo.
- H.** Planta femenina.
- I.** El desarrollo de los frutos requiere de más de un año.

Con base al estudio realizado por Vilchis (1994) el ciclo biológico de la planta parasita depende y pueden alterarse por los siguientes factores:

1. La dispersión se relacionó con un aumento en la humedad del ambiente
2. Los cambios ocurridos en el desarrollo de las plantas parasitas están relacionados con las variaciones de las condiciones ambientales locales.
3. Las condiciones de sombra retrasan la fenofases. Estas ocurren primero en sitios donde hay abundante radiación solar.

IV. ANTECEDENTES

Problemática del muérdago enano

Gutiérrez- Rodríguez (1968) realizó un estudio del efecto del parasitismo por muérdago enano (*Arceuthobium spp.*) en *Pinus montezumae* y *P. hartwegii* en dos localidades en el cerro “Telapón”, Estado de México, lo que actualmente es parte del Parque Nacional Iztaccihuatl – Popocatepetl - Zoquiapan, los resultados mostraron que el parasitismo de muérdago afecta el desarrollo en grosor del diámetro de los troncos en las dos especies de pinos; reduce el crecimiento general del muérdago. Además se encontró ramas muertas más allá del punto de implantación del muérdago, cuestionando así las suposiciones de que el muérdago rara vez mata completamente a su hospedante; con frecuencia observo áreas necróticas y malformaciones y sospecha que el vigor del árbol se reduce, quedando expuesto al ataque de otros agentes patógenos.

Rodríguez (1985), trabajo en el Parque Nacional Zoquiapan con *Pinus hartwegii* infestados por *Arceuthobium vaginatum* (Willd.) presl. spp. *vaginatum*, concluye que hay un efecto del parasitismo del muérdago, en el renuevo de *Pinus hartwegii* de alturas entre 0.26 y 2.25 m, donde los individuos parasitados presentan 1 o 2 verticilos más, fuera del patrón “normal” que pudiera tenerse de los individuos aparentemente libres de parásitos; los pinos infestados, con un promedio de 12 verticilos, sufren una disminución de su crecimiento en altura; hay asimismo, reducción del crecimiento en diámetro (en 0.01 m) en arboles de 8, 11 y 12 verticilos, respecto a los pinos libres de muérdago.

Valderrama – Medina (2002) reporta que la problemática del “muérdago enano” (género *Arceuthobium spp.*), radica en el hecho de ser uno de los principales agentes causales de enfermedad en los bosques de coníferas mexicanos. Además, tiene una amplia distribución a nivel nacional, sobre todo en los climas templado-frío, infecta grandes superficies arboladas debilitando de una manera substancial a los individuos afectados. Sin duda, el principal hospedante es el género *Pinus*, pero también ataca los géneros *Abies* y *Pseudotsuga*, aunque no con la misma intensidad.

Hernández – Benítez *et al.* (2005) indican que en una zona cercana al cerro del Papayo en el Parque Nacional Zoquiapan, 76% de los pinos están parasitados por *A. globosum grandicaule* (Hawksw. & Wiens), pero no se menciona la presencia de *A. vaginatum* en el estudio. Por lo que Queijeiro (2007), plantea la hipótesis de que esta especie es de reciente aparición.

Romero (2006) menciona que la presencia de muérdago enano del género *Arceuthobium* tuvo un efecto en la densidad básica de la madera de *Pinus rudis*. La presencia de la planta parásita influyó en el ancho de los anillos en *Pino montezumae*.

Queijeiro (2007) realizó el estudio de la interacción entre las dos especies de muérdago enano en el Parque Nacional Zoquiapan, donde *Arceuthobium vaginatum* es la especie de muérdago con más extensión dentro del área explorada del Parque Nacional Zoquiapan, ya que fue encontrada en 23 parcelas de estudio. *A. globosum*, por su parte, tuvo una distribución más restringida a solo 10 parcelas de 24 estudiadas.

Flores (2008), realizó un estudio de los efectos del muérdago enano (*Arceuthobium vaginatum*) sobre el desarrollo de *Pinus cooperi* (C.E. Blanco) donde reporta que los efectos negativos sobre el crecimiento del hospedante son más severos en términos de volumen que de altura; en cuanto a volumen se estiman mermas de hasta casi 60%, mientras que las alturas llegan al 17%.

Campos *et al.* (2012), investigaron la tasa de germinación de semillas de dos especies de muérdago enano con la finalidad de conocer las condiciones favorables y desfavorables para el desarrollo germinativo de *Arceuthobium vaginatum* y *Arceuthobium globosum*. Encontraron que las semillas de ambas especies, tienen la capacidad de germinar en cualquier época del año en la zona templada del centro de México, o bien, en una zona que cumpla con características similares a las controladas en el experimento. Estos resultados son preocupantes ya que refleja la alta capacidad de adaptación que poseen estas plantas parásitas para germinar, infectando a los árboles; es decir, tienen un amplio rango de condiciones favorables para desarrollarse, lo que sugiere su fácil propagación en grandes zonas forestales.

Métodos para el control de muérdago enano

Control cultural

Para este control se deben de evaluar los árboles infectados por muérdago enano mediante el sistema de evaluación de 6 clases de Hawksworth. De esta forma se realizarán podas en árboles que presenten nivel de infección de 1, 2 y 3 con alturas de 10 metros o menos. Podando como máximo el 50 % o menos del total de la copa y remoción de los árboles que presentan un nivel de infección de 5 y 6 en los rodales infectados. También se deben podar las ramas con infecciones latentes, donde el muérdago aún no ha brotado (CONAFOR, 2006).

Control químico

El desarrollo de un herbicida selectivo para controlar muérdagos enanos ha sido un objetivo primario, pero difícil de alcanzar durante décadas. El reto fundamental es encontrar una sustancia química que sea fácil de aplicar y que elimine al muérdago sin efectos tóxicos para el hospedante u otras especies cercanas. Si el muérdago no muere, una segunda estrategia consiste en la poda de los brotes para reducir y retrasar la propagación e intensidad del muérdago (Geils *et al.* 2002)

Uno de los inhibidores es el ácido 2 (cloroetil) fosfónico o comercialmente llamado Ethrel o Ethephon, que es un regulador de crecimiento y de muy baja toxicidad para animales de sangre caliente; este producto es absorbido por el muérdago, donde se descompone y libera acetileno, que tiene como función regular el crecimiento natural de las plantas y acelera la maduración. Esta propiedad ocasiona que después de 15 días de la aplicación, la parte aérea del muérdago se cae. Con las dosis de 2500 ppm se obtienen excelentes resultados (100% decaída del muérdago); sin embargo no se elimina la parte interna de la planta parásita, por lo que pasado 6 meses (varía según la especie de muérdago) vuelve a brotar por lo que es necesario realizar otra aplicación (CONAFOR. 2006)

Control biológico

Varios hongos e insectos son considerados como patógenos de los muérdagos enanos. Sin embargo, han sido poco estudiados como para desarrollar una metodología para uso operacional como agentes de control biológico. Algunos hongos patógenos e insectos particularmente larvas de lepidópteros son altamente destructivos de los muérdagos enanos en algunas áreas y épocas. Los factores que inducen o regulan estos brotes son resultado de complejas y frecuentes interacciones biológicas (Geils *et al.* 2002).

Patógenos y herbívoros del muérdago enano son organismos nativos que han coevolucionado con sus hospedantes por lo que no son fáciles de controlar. Sin embargo, dado el número potencial de los agentes y las ventajas de este enfoque, el desarrollo del control biológico como una opción de manejo parece prometedor para un futuro próximo (Geils *et al.* 2002).

Quintana (2008) realizó tratamientos con Muérdago Killer (diatomeas) a dosis de 7.5, 10 y 15%, y con Ethephon en dosis de 2500 ppm. Basándose en la escala de Hawksworth (1977), encontró que a los 45 días después de la aplicación, el grado de infección del muérdago enano (*Arceuthobium globosum*) se redujo a cero en la regeneración natural de *Pinus pseudostrabus*. Por lo que

recomendó hacer aplicaciones periódicas (cada tres o cuatro meses), ya que estos productos no eliminan el sistema endofítico del muérdago.

Hongos Antagonistas como control biológico

Shamoun y Kamp en (2003), trabajaron con dos hongos como posible candidatos para el control de muérdago enano (*Arceuthobium tsugense* (Rosendahl) Jones). Uno de ellos fue *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., considerado como patógeno de los brotes y frutos de muérdago enano, y *Neonectria neomacrospora* (Booth & Samuels) Mantiri & Samuels, que es un patógeno del muérdago, infecta la corteza y posiblemente el sistema endofítico. Estos hongos fueron seleccionados y probados por su eficacia en un ensayo de campo en Spider Lake, cerca de Parksville. Los conidios fueron producidos a finales de agosto en una solución de sacarosa-gelatina. Se registraron como brotes del muérdago, sus frutos y tumoraciones, antes del tratamiento y posterior a este a los 15 días, 1, 2, 3, 4 y 5 meses después del tratamiento. *C. gloeosporioides* redujo la producción de semilla en más del 50% sin ninguna diferencia entre las formulaciones. Mientras que *N. neomacrospora* produjo más esporodoquios en las heridas de la corteza del muérdago donde se inoculó en comparación con los tratamientos de control. También causó una significativa reducción en el número de muérdago enano sano; sin embargo, observaron que este muérdago se propagó cinco meses después de aplicado el tratamiento.

Plascencia *et al.* (2008), trabajaron *in vitro* con *Pestalotiopsis sp.* y *Colletotrichum sp.*, como medio de control de muérdago enano (*Arceuthobium sp.*) en tres sitios del Estado de Michoacán, donde *Colletotrichum sp.* afectó a las muestras hasta el 50% después de seis días y en 12 días infestó la totalidad; por su parte *Pestalotiopsis sp.* alcanzó el 93% en seis días y la totalidad en 12 días.

Un grupo importante de hongos y bacterias presentan efectos antagónicos con otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales. En el mundo biológico existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen a que en la mayoría de los casos no se desarrolle la enfermedad (Fernández-Larrea, 2001).

En general, los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de estos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico. Si el antagonista posee varios modos de acción reduce los riesgos de desarrollo de resistencia en el patógeno. Este riesgo también se reduce mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferente modo de acción (Fernández-Larrea, 2001).

Aunque el concepto de usar patógenos para controlar plagas forestales no es nuevo, el desarrollo de los biopesticidas es relativamente nuevo (Evans, 1995 citado por Mae, 2004). El control biológico involucra patógenos naturales de vegetales, de manera que se reduce el vigor de las plagas indeseadas. El objetivo de una estrategia de control biológico eficiente no es la completa erradicación de la plaga, la cual puede alterar el ecosistema, sino más bien el manejo efectivo de la plaga reduciendo el inóculo (Shamoun, 1997 citado por Mae, 2004).

La mayoría de los hongos fitopatógenos pasan parte de su ciclo de vida en sus hospedantes, y la otra en el suelo o en los residuos vegetales depositados en este sustrato. Mientras que otros pasan todo su ciclo de vida sobre la planta y sólo sus esporas se depositan en el suelo, donde permanecen en reposo hasta que son llevadas a un hospedante en el que germinarán y reproducirán. Otros más, viven como patógenos, pero continúan viviendo, desarrollándose y reproduciéndose sobre los tejidos muertos de esos hospedantes una vez que han muerto, y pueden abandonar esos tejidos y depositarse en el suelo u otros órganos vegetales en proceso de descomposición, en los que se desarrollan y reproducen como saprófitos estrictos (Agrios, 1991).

Durante su forma de vida patógena, los hongos asumen varias posiciones con respecto a las células y tejidos vegetales. Algunos se desarrollan fuera de la superficie de la planta a la que infectan, pero envían sus órganos de alimentación (haustorios) hacia el interior de las células epidérmicas de esa planta. Otros sólo se desarrollan entre la cutícula y las células epidérmicas. Algunos más entre las células de su hospedante y pueden o no enviar sus haustorios en el interior de ellas. Otros hongos se desarrollan indistintamente entre las células de su hospedante y a través de ellas (Agrios, 1991).

Control biológico para el muérdago enano

A pesar de que muchos organismos son patógenos o depredadores del muérdago enano, ninguno se ha estudiado lo suficiente para considerarlos como control biológico (Hawksworth y Wiens, 1972). Los insectos y algunos hongos son a menudo altamente destructivos de muérdagos enanos en algunas áreas y en ciertos años. Sin embargo, sus efectos sobre las poblaciones son probablemente insignificantes. La probabilidad de desarrollar insectos u hongos como agentes prácticos del control parece lejana (Hawksworth y Wiens, 1996).

Micoherbicidas

Los hongos fitopatógenos para muérdago representan un reto, debido a que la muerte de la planta no se logra con la destrucción de los brotes aéreos. El sistema endofítico dentro del hospedante sobrevive incluso cuando los tallos se mueren y puede persistir por un siglo (Gill et al., 1961 citado

por Shamoun y DeWald, 2002). Para que un hongo sea un agente biológico efectivo, debe tener las siguientes características (Shamoun y DeWald, 2002):

- Que parasite únicamente al muérdago y no a otro hospedante u otra vegetación.
- Su actividad debe interferir con el ciclo de vida del muérdago
- Debe producir abundante inoculo e infestaciones significativas en el muérdago
- Debe tener suficiente amplitud ecológica para resistir el rango del muérdago
- Su distribución debe coincidir con la del muérdago
- Debe mostrar alta patogenicidad
- Debe tener un modo eficiente de acción para interrumpir el desarrollo del muérdago

Hongos antagonistas del muérdago

Los hongos parásitos del muérdago enano se dividen en dos grupos: aquéllos que atacan los brotes aéreos y los que atacan el sistema endofítico (hongos formadores de canchales). Dentro del primer grupo tenemos a *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz), a *Cylindrocarpon gillii* (D.E. Ellis) J.A. Muir y a *Caliciopsis* (Peck). Estos tres hongos son comunes en el Oeste de América del Norte (Shamoun y DeWald, 2002).

Otros hongos antagonistas asociados con los tallos aéreos de muérdago enano son: *Alternaria alternata*(Fr.) Keissl., *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud, *Coniothyrium sp*, *Metasphaeria wheeleri* (Linder), *Pestalotia maculiformans* (Guba et Zeller), *Pestalotia heteroercornis* (Gilbert) y *Phoma sp.* (Saccardo) (Gilbert 1984, Hawksworth *et al.* 1977b, Hawksworth y Wiens 1996, Kope y Shamoun 2000, Shamoun 1998).

Muchas enfermedades fungosas son imposibles de identificar a simple vista, ya que el patógeno se encuentra mezclado con uno o más contaminantes, porque aún no ha producido sus cuerpos fructíferos característicos y esporas, debido a que una misma enfermedad puede deberse ya sea a uno o a varios patógenos morfológicamente semejantes o tal vez a algún factor del ambiente, o bien a que la enfermedad es causada por un nuevo patógeno hasta ese momento desconocido (Agrios, 1991). Los hongos asociados al muérdago y que dañan el sistema endofítico, tienen efectos inmediatos, pronunciados y pueden matar al muérdago (Shamoun y DeWald, 2002). Debido a que el árbol hospedante puede dañarse también, se requiere de un estudio adicional de laboratorio antes de inocular en campo.

V. JUSTIFICACIÓN

Aunque el muérdago enano (*A. vaginatum*) es la segunda causa de daños de los bosques de pino en México y que tiene una amplia distribución, además afecta el crecimiento en diámetro y altura, así como el vigor de los árboles hasta causarles la muerte (Cibrián et al. 2007), son pocos los estudios que se han realizado sobre su control y/o erradicación (Agrios, 1991).

Por lo tanto, en este trabajo se consideró el uso de hongos antagonistas del muérdago enano, debido a que presentan versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación, lo cual ha permitido su uso en el control biológico (Fernández-Larrea, 2001).

En general, los organismos antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de estos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico. Si el antagonista posee varios modos de acción reduce los riesgos de desarrollo de resistencia del patógeno. Los hongos antagonistas afectan a las poblaciones de patógenos o plantas parásitas mediante alguno de los siguientes mecanismos: 1) parasitismo directo y muerte del patógeno, 2) competencia con el patógeno por alimento, 3) efectos tóxicos directos sobre el patógeno por medio de sustancias antibióticas liberadas por el antagonista y 4) efectos tóxicos indirectos sobre el patógeno por sustancias volátiles, como el etileno, liberadas por las actividades metabólicas del organismo antagonista.

Este trabajo tuvo como objetivos: aislar, identificar morfológica y molecularmente a los hongos asociados del muérdago enano, así como determinar el sustrato o medio óptimo para la producción de conidios para inocular a la planta parásita. Para reintroducirlos a su entorno natural, en zonas donde las plantas parásitas no presentaron síntomas de daño por micromicetos (esto con el fin de no introducir componentes ajenos como agentes químicos u otro tipo de organismos exóticos que puedan afectar a largo o corto plazo). De esta manera este trabajo contribuye al conocimiento de hongos antagonistas del muérdago *A. vaginatum* así como nuevos métodos de control biológico que podrán utilizarse para futuras investigaciones.

VI. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la efectividad biológica de hongos antagonistas para el control del muérdago enano (*Arceuthobium vaginatum*) en dos áreas naturales protegidas del eje neovolcánico: Parque Nacional Iztaccihuatl – Popocatépetl - Zoquiapan y Parque Nacional La Malinche.

Objetivos particulares

- Analizar y describir las sintomatologías de los daños del muérdago enano
- Aislar y obtener cultivos puros de los hongos antagonistas del muérdago enano.
- Identificar los hongos patógenos encontrados
- Establecer la metodología para el manejo de hongos antagonistas en laboratorio
- Establecer la metodología para el manejo de hongos antagonistas en campo
- Evaluar el efecto de los hongos antagonistas Inoculados en campo, para comprobar que el agente inoculado es el que causa los daños y síntomas del hospedante.

VII. CARACTERIZACIÓN DE LAS ZONAS DE ESTUDIO

Las Áreas Naturales Protegidas son porciones terrestres o acuáticas del territorio nacional representativas de los diversos ecosistemas, en donde el ambiente original no ha sido esencialmente alterado y que producen beneficios ecológicos cada vez más reconocidos y valorados. Se crearon mediante un decreto presidencial. Están sujetas a regímenes especiales de protección, conservación, restauración y desarrollo, según categorías establecidas en la ley. (CONANP, 2010)

Una de las categorías de área protegida es el de Parque Nacional, que se define como un área con uno o más ecosistemas que tienen por valor la belleza escénica, su valor científico, educativo, recreativo, histórico o por la existencia de su flora y fauna silvestre.

Los Parques Nacionales tienen áreas muy bastas y casi vírgenes en su flora y fauna, este estatus se le da a un área protegida, a través del cual se protege y conserva la riqueza de su flora y su fauna; se caracteriza por ser un área representativa de una región también protegida. En México se tienen registradas 1, 482, 489 hectáreas (CONANP. 2010).

Un ejemplo de ello es el Parque Nacional Iztaccíhuatl - Popocatepetl, que es una de las áreas protegidas más antiguas de nuestro país. Cuenta con un alto porcentaje de la biodiversidad endémica del Eje Volcánico Transmexicano, cuya variedad y riqueza de especies son características de la provincia que delimita la zona de transición entre la flora y la fauna Neártica y Neotropical (CONANP, 2009).

El territorio mexicano se encuentra dividido por tres principales placas tectónicas: Cocos, Norteamérica y Caribe que en su constante desplazamiento han conformado, a lo largo de millones de años, grandes cadenas montañosas. Una de ellas es el Eje Volcánico Transversal, también llamado Sistema Volcánico Transversal, Eje Neovolcánico, Faja Volcánica Transmexicana o Cinturón Volcánico Transmexicano justamente ahí se concentran los principales volcanes del país. Este Eje es una de las provincias morfotectónicas más importantes de México ya que constituye la transición de las dos grandes regiones biogeográficas en las que se encuentra nuestro país: la neártica y la neotropical (Sanchez-Gonzalez, 2003).

El Eje Volcánico Transversal es un sistema montañoso no del todo continuo, situado aproximadamente a lo largo de los paralelos 19° y 20° N, que marca el extremo meridional de la Altiplanicie Mexicana y la separa de la Depresión del Balsas. Incluye las elevaciones topográficas más altas de México, formadas por volcanes, como el Pico de Orizaba (5 650 m), el Popocatepetl (5

450 m), el Iztaccíhuatl (5 280 m), el Nevado de Toluca (4 560 m), la Malinche (4 460 m), el Nevado de Colima (4 340 m), el Tancítaro (4 160m), el Tláloc (4 150 m), el Cofre de Perote (4 090 m), etc. La mayor parte de los amplios valles que se intercalan entre estas montañas se sitúan a altitudes cercanas a 2 000 m (Rzedowski, 2006).

El Parque Nacional Iztaccíhuatl - Popocatepetl incluye las montañas más altas de México y su marcado gradiente altitudinal constituye una combinación que da origen a la gran diversidad y desarrollo de diferentes estratos de vegetación, entre los que sobresalen por su mayor número de especies son las asociaciones de coníferas (pino, oyamel, y cedro) y encino. Por la abundancia de sus especies endémicas, destaca además la vegetación alpina y por su ubicación en las partes más bajas de las serranías, así como por la intensidad de su aprovechamiento, sobresalen las asociaciones aisladas del bosque mesófilo de montaña (Blanco et al., 1981).

Se establecen asociaciones vegetales de transición entre *Pinus* y *Abies*, lo que implica que son zonas de amplia diversidad florística y ecológica conformando rodales mixtos de *Pinus ayacahuite* con *Abies religiosa*. En esta zona de ecotono también es frecuente la asociación de *Pinus montezumae* con *Pinus hartwegii*. En estos bosques el dosel no es muy cerrado, lo que permite el establecimiento y desarrollo de diversas especies arbóreas, arbustivas y herbáceas. Entre los géneros mejor representados pueden citarse: *Pinus*, *Senecio*, *Ribes*, *Muhlenbergia*, *Agrostis*, *Lupinus* y *Festuca* (CONANP. 2010).

VII.1 Parque Nacional Iztaccíhuatl - Popocatepetl – Zoquiapan

Localización geográfica

El Parque Nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl se encuentra en la parte centro-oriental del Eje Volcánico Transversal, ocupando una parte sustancial de la Sierra Nevada. Se localiza entre las coordenadas extremas 18°59'00.43" y 19°28'09.44" de Latitud Norte y 98°34'55.88" y 98°46'40.95" de Longitud Oeste. Abarca una superficie de 39,819.086 hectáreas dividida entre el Estado de México, con 28,307.487112 hectáreas (71.09%); Puebla con 11,072.918088 hectáreas (27.81%); y Morelos con 438.6808 hectáreas (1.10%). Forma parte de los municipios de Texcoco, Ixtapaluca, Chalco, Tlalmanalco, Amecameca, Atlautla y Ecatzingo, en el Estado de México; Santa Rita Tlahuapan, San Salvador el Verde, Huejotzingo, San Nicolas de los Ranchos y Tochimilco, en Puebla; y Tetela del Volcán, en Morelos.

Aspectos físicos

Geomorfología

La Sierra Nevada, que forma parte del Eje Volcánico Transversal, es un macizo montañoso de alrededor de 100 km que va de norte a sur separando las cuencas de México y Puebla; sobre ella se encuentra la tercera cumbre más alta del país: la Iztaccihuatl (5,220 msnm). Muy cerca, a 14 kilómetros hacia el sur, se erige el simétrico cono del volcán Popocatepetl, la segunda cumbre más alta de México. El cráter del Popocatepetl no ocupa el punto más alto por ser de forma elíptica; su eje mayor mide 850 metros y su eje menor 750 metros. Tiene una profundidad de 500 metros y se encuentra taponado por los derrumbes de sus casi verticales paredes. La parte alta se llama Pico Mayor y la inferior Espinazo del Diablo

En esta serranía se encuentran las otras cimas del parque: el Tláloc a 4,120 msnm, el Telapón a 4,060 msnm y el Papayo a 3,600 msnm. El Tláloc y el Telapón se formaron en un proceso que se extiende desde el Mioceno tardío (cinco millones de años) hasta principios del Pleistoceno hace dos millones de años; mientras que el Papayo, que se erige solo entre la Iztaccihuatl y el Telapón, es un volcán basáltico que surgió mucho tiempo después. Otras elevaciones notables del parque son el Yoloxóchitl (3,900 msnm), los Potreros (3,600 msnm) y el Tejolote (3,020 msnm). Destaca en el extremo sureste el denominado talud de la Iztaccihuatl que se caracteriza por contener varias estructuras cerriles de altitud considerable, como el Tlacachelo (3,780 msnm), el Caluca (3,780 msnm), las Animas (3,740 msnm), los Coletos (3,700 msnm), la Cruz de Carabaca (3,700 msnm) y León (3,520 msnm).

El accidentado relieve del parque está constituido por cañadas de fuerte inclinación que van de 25° a 50°; y laderas con pendientes suaves de entre 2° a 10°, las cuales dieron origen a la conformación de lomeríos intermontaños. En el extremo occidental del parque se ubican los denominados abanicos aluviales que forman lomeríos de topografía llana. Estos abanicos constituyen el sector de transición entre las montañas del parque y la planicie baja de la Cuenca de México. En todo el parque existen también valles intermontaños, que son áreas de acumulación de materiales acarreados fluvialmente (Fig. 3).

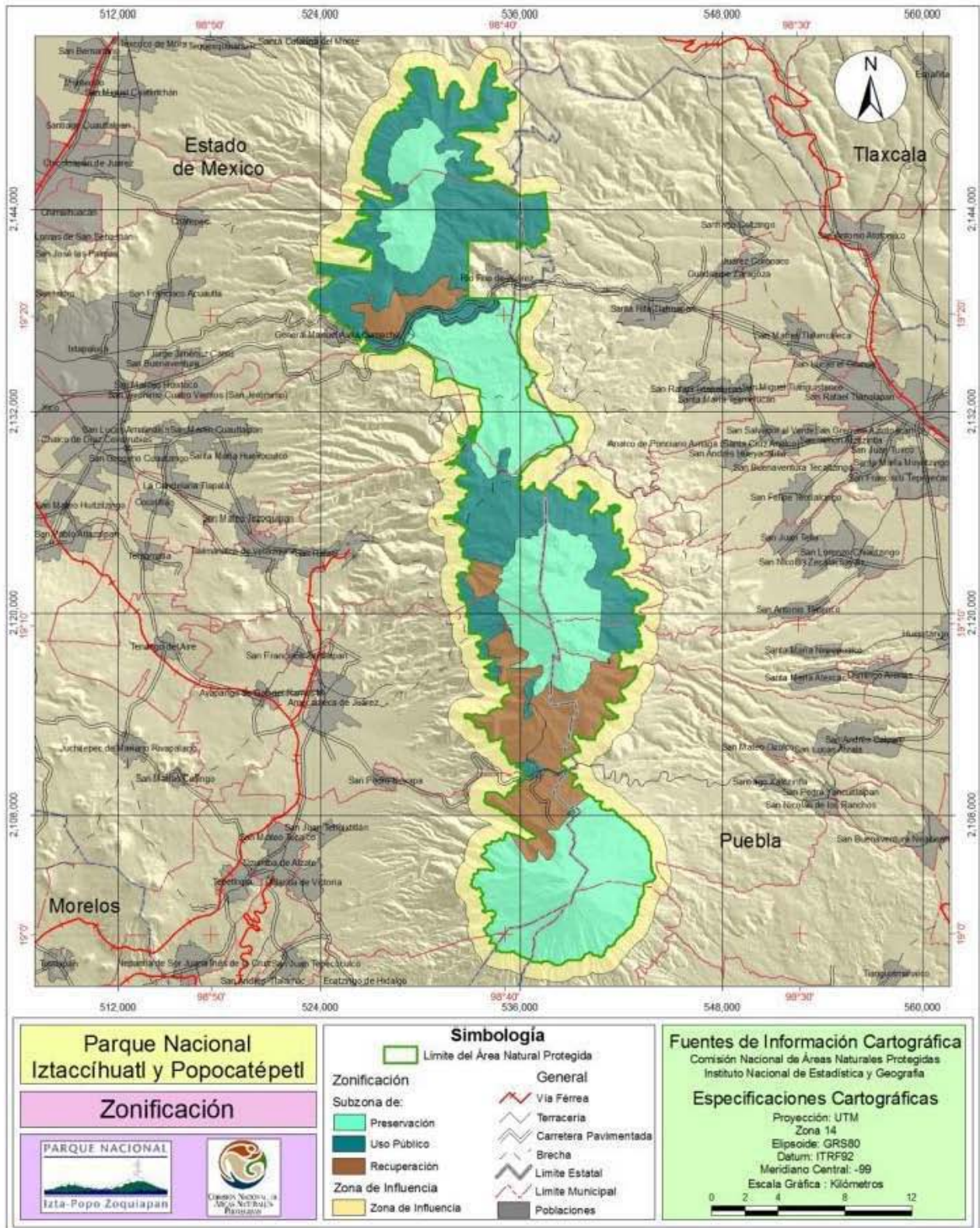


Figura 3. Mapa de zonificación del Parque Nacional Iztaccíhuatl - Popocatepetl. Fuente: CONANP, 2010.

Suelos

En la región adyacente a las grandes elevaciones, dispuestas de sur a norte, Popocatepetl, Iztaccihuatl, Telapón y Tláloc, debido a la continua actividad volcánica con la consecuente presencia de derrames y emisión de cenizas, el material parental de los suelos está compuesto por rocas ígneas extrusivas de pómez, por la acumulación de cenizas volcánicas de diferentes etapas de actividad volcánica y por sedimentos de origen volcánico. Son suelos de gran potencial para la producción, pues tienen alta capacidad de retención de humedad, son ligeramente ácidos y con buen contenido de materia orgánica. Otro tipo de suelos que se localizan en áreas escarpadas y hondonadas y que presentan una estructura débil o moderadamente desarrollada, son de buena profundidad, de textura media y coloración de café pardusca a negra, con alto porcentaje de arena, pero también con alto potencial productivo por su capacidad de retención de humedad, pH y alto contenido de materia orgánica.

Los suelos presentes en todo el parque están siempre asociados con su origen volcánico, sin importar la zona donde uno se encuentre, solo variando el grado de desarrollo.

Clima

Por la latitud de esta región se ve afectada en la época fría del año por sistemas de tiempo propios de las latitudes medias, como los frentes fríos y la invasión de masas de aire polar continental; en el verano influyen los sistemas meteorológicos propios de la zona tropical como los huracanes y ondas tropicales.

Debido a su topografía y ubicación, el parque tiene una variedad de climas que van del templado húmedo a los climas frío y muy frío; la temperatura disminuye con la altura a razón de 0.68° C por cada 100 m.

Existe una red de estaciones meteorológicas dentro y fuera del parque, sin embargo no se cuenta con estaciones a una altura mayor a los 4,000 msnm, por lo que no se tienen registros de las zonas más frías donde están los glaciares.

Por su latitud el parque se ubica en la región de los vientos alisios, en una zona donde predominan las circulaciones de tipo convectivo local, lo cual hace posible una gran estabilidad meteorológica durante la mayor parte del año.

Hidrología

De acuerdo al Ordenamiento Ecológico del Volcán Popocatepetl, la Sierra Nevada se divide en cuatro subcuencas, estas son: en el flanco occidental de la Sierra Nevada, la subcuenca denominada Chalco-Texcoco, por ser los sitios de los antiguos lagos que llevan los mismos nombres, donde fluyen las aguas provenientes de los volcanes Popocatepetl, Iztaccihuatl, Telapón y Tláloc, y que son en realidad propiamente dos subcuencas de la cuenca endorreica de la antigua Tenochtitlan.

Del lado oeste y sur-oeste se encuentran dos subcuencas, la subcuenca de Cuautla-Yautepec, ambas tributarias de la cuenca del río Balsas. En la parte oriental tenemos dos subcuencas, ambas también pertenecientes a la gran cuenca del río Balsas. Al norte, la subcuenca del río Atoyac; al sur de este flanco oriental, la subcuenca del río Nexapa.

Aspectos biológicos

La situación geográfica y el intrincado relieve de esta región favorecen su alta diversidad ecosistémica y gran riqueza biológica que se distribuye en un gradiente altitudinal. La confluencia de las zonas biogeográficas neártica y neotropical le proporciona mezclas únicas de flora, fauna y hongos. La mayor diversidad se encuentra entre los 2,400 y 3,500 msnm.

En la Sierra Nevada se han registrado 471 especies; de las cuales 18 son endémicas y 36 se encuentran bajo alguna categoría en riesgo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. “*Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio–Lista de especies en riesgo*”. De las 36 especies en riesgo, 15 están sujetas a protección especial; 18 amenazadas; dos en peligro de extinción, una están probablemente extintas en el medio silvestre y 18 de ellas, son endémicas.

La Sierra Nevada destaca como centro de origen y diversificación natural sobre todo para vertebrados. Tiene un alto valor por la presencia de endemismos para vertebrados y hongos, y medio para plantas vasculares. También, un alto valor como corredor biológico, tal vez el más importante desde el punto de vista transicional, según la CONABIO (Arriaga, 2000).

Vegetación

El Parque Nacional es el remanente más importante de bosques de coníferas y praderas de alta montaña en el centro del país. Su importancia radica no solo en la extensión de bosques en buen

estado de conservación (más de 21,000 hectáreas de bosque conservado que representan 52.33% de la superficie total del parque), sino en la diversidad de su flora y fauna. La permanencia de estos ecosistemas permite la continuidad de los procesos naturales y garantiza la calidad de los servicios ecosistémicos que son fundamentales para los millones de mexicanos que habitan en los valles centrales de México, Puebla y Morelos, la macroregión más poblada del país (CONANP, 2010).

En el Parque Nacional, la distribución de la vegetación considera a la altitud, de modo que pueden distinguirse tres pisos fundamentales de vegetación que incluyen zonas de transición o ecotonos donde se llevan a cabo complejas relaciones ecológicas entre las comunidades, dificultando su interpretación y límite altitudinal preciso. A pesar de ello, se ha clasificado la vegetación en tres categorías básicas, según la clasificación de Rzedowski (1978) (Tabla 1).

Tabla 1. Comunidades vegetales y especies dominantes correspondientes con el gradiente altitudinal en el Parque Nacional Iztaccíhuatl Popocatepetl

COMUNIDADES VEGETALES		
Bosque de coníferas		Pastizal
Pino - Abetos 3,000 - 3,700 msnm	Pino 3,400 - 4,000 msnm	Zacatonal y pastizal alpino y subalpino 3,500 - 4,350 msnm
<i>Pinus ayacahuite</i>	<i>Pinus hartwegii</i>	<i>Festuca spp.</i>
<i>P. montezumae</i>	<i>Ribes ciliatum</i>	<i>Calamagrostis tolucensis</i>
<i>P. hartwegii</i>	<i>Lupinus montanus</i>	<i>Muhlenbergia</i>
<i>Abies religiosa</i>	<i>Festuca spp.</i>	<i>quadridentata</i>
<i>Eupatorium</i>	<i>Calamagrostis</i>	<i>Agrostis tolucensis</i>
<i>pazcuarensis</i>	<i>spp.</i>	<i>Juniperus monticola</i>
<i>Senecio platanifolius</i>	<i>Acaena elongata</i>	

Los bosques de coníferas constituyen la vegetación dominante, continuando con la pradera de alta montaña o pastizal alpino, vegetación herbácea de no más de 50 cm de altura, que colinda con las

nieves permanentes. Entre estas dos zonas, se establece un ecotono constituido por una franja de aproximadamente 100 metros, en buen estado de conservación. Las principales especies que se distribuyen en el ecotono son: *Larrea cuneifolia* Car. (jarilla), *Digitalis sp.*, *Argemone mexicana* L. (cardo santo), *Lupinus sp* y *Verbascum thapsus* (gordolobo).

Bosques

México es el país con mayor diversidad de pinos. De las más de 100 especies reconocidas por los taxónomos, todas son originarias del hemisferio norte, cerca de la mitad se distribuyen en nuestro país. La cifra exacta aun es objeto de discusión taxonómica; algunos autores aseguran que son 43 (Forjón *et al*, 1997) y otros que son 49 (Ramamoorthy, 1998); otros más elevan la cifra de especies y subespecies hasta más de 70.

En el Popocatepetl, a los 3,100 m de altitud se encuentran asociaciones dominadas por *Pinus montezumae*, que forman un dosel de 20 a 30 m., frecuentemente asociado con especies de los géneros *Quercus*, *Abies*, *Arbutus*, *Alnus*, *Salix* y *Buddleia*. Por su parte, en Zoquiapan la distribución del bosque de pino, predominan las especies de *Pinus hartwegii*, *P. montezumae*, se asocia más a las condiciones de suelos profundos o someros pero con bastante materia orgánica.

En las partes más elevadas y abruptas hacia los 3,600 msnm se establece el bosque de *P. hartwegii* tolerante a las temperaturas bajas, frecuentes nevadas y probablemente uno de los pinos más adaptados a los incendios superficiales; en las partes bajas forma rodales abiertos con árboles entre 15 y 20 m de altura, asociado con zaca tonal denso y leguminosas como *Lupinus spp.*, pero hacia las partes más elevadas (4,000 m de altitud), con frecuencia constituye un bosque achaparrado (de 5 a 8 m de alto) y más bien abierto, aunque algunos individuos aislados pueden encontrarse en los 4,200 m, que es el límite altitudinal arbóreo en México.

La especie dominante de los bosques de oyamel es la conífera *Abies religiosa*. Tiene un rango altitudinal entre 2,400 a 3,500 metros. Las asociaciones de bosques de encino son todavía más complejas que las del pino y se entremezclan con otros tipos de vegetación. De 2,400 a 3,100 msnm se distribuye la asociación de *Quercus laurina* con *Q. crassifolia*, *Q. rugosa*, con abetos, madroños, cedros y *Pinos*.

Pastizal

El zacatonal que se distribuye en el parque nacional está representado por una combinación de zacatonales primigenios y secundarios como consecuencia de la introducción de zacatales destinados a la ganadería.

El pastizal alpino se establece entre los 4,000 y los 4,500 msnm. En esta comunidad se consideran las asociaciones vegetales en las que dominan las gramíneas amacolladas. Así, se distinguen al menos dos grandes comunidades vegetales: el zacatonal, que se desarrolla en los llanos sobre sitios bajos y mal drenados, dedicados históricamente al pastoreo de ganado, donde predominan gramíneas que rara vez exceden los 30 cm de alto o estoloníferas de los géneros: *Agrostis*, *Bromus*, *Calamagrostis*, *Festuca*, *Muhlenbergia* y *Poa* y ciperáceas como *Carex peucophila*.

Los pastizales subalpinos se caracterizan por la presencia de gramíneas amacolladas que oscilan entre 60 y 120 cm de altura y se localizan en altitudes de 2,700 a 4,350 metros. Frecuentemente se trata de comunidades secundarias inducidas, también llamadas pastizal inducido por la sustitución de la vegetación original o por la destrucción del bosque de pino previa a su establecimiento. A pesar de que su fisonomía es muy homogénea, las especies dominantes de estas comunidades varían de acuerdo a la altitud, formando cinturones definidos. Esto mismo se observa en las características del suelo y la topografía.

Entre la primera zona y el ecotono se distribuye una diversidad de hongos, como orejas y manzana falsa (*Amanita muscaria*), los cuales, representan dos de las 74 especies de hongos que se distribuyen en el Parque Nacional y zona de influencia; también se encuentra el tecomate, yullo, yemita o ahuevado (*Agaricus placomyces*). En este sentido la región también cuenta con una rica cultura de aprovechamiento de plantas comestibles y medicinales. (López López, 1991).

VII.2 Parque Nacional Malinche

Localización geográfica

El volcán La Malinche, Malintzi o Matlacuéyetl se localiza entre los 19° 05' y 19° 22' de latitud norte y los 97° 53' y 98° 12' de longitud oeste, en la porción sureste de Tlaxcala. Abarca poco más de 30 km de diámetro, y se eleva de los 2,300 a los 4,461 msnm (Hernández, 1992). Comprende una superficie de 46,093 ha, de las cuales 33, 161 ha comprenden a Tlaxcala y 12, 938 a Puebla. Es el quinto más alto de la faja Volcánica Transmexicana. Forma parte de los siguientes municipios del Estado de Tlaxcala: San Juan Ixtenco, Chiautempan, Huamantla, Teolochochco, Zitlatepec, Tzompantepec, Mezatecochco, Acuamánalá, Contla, San Pablo del Monte. En la zona de Puebla con los municipios de Amozoc, Puebla, Acajete y Tepatlaxco de Hidalgo (Fig.).

Aspectos físicos

Geomorfología

La Matlalcueye de 4430 msnm es un cono volcánico perfectamente aislado, único en el paisaje de nuestra área de interés. Se considera que surgió hace 25 millones de años en el periodo Oligo – Miocénico, su estructura volcánica se caracteriza por tener materiales piro – fragmentados de brecha y aglomerados volcánicos empacados por gravilla, arena y piedra pómez, además de manto de lava fluida del tipo basáltico andesítico, marcando una diferenciación magmática en el proceso de formación. Actualmente, tiene un avanzado deterioro por efecto de los agentes meteóricos, originando depósitos de arenas y limos y en menor proporción arcillas proluviales. Un evento volcánico superior cubre la antigua morfología de rocas plegadas del Mesozoico, afectada por fallas normales que conforman pilares y fosas estructurales. Cuenta con varios conos secundarios que se encuentran situados al pie del volcán y que corresponden a periodos más recientes. En la cima sur se presentan las colinas llamadas Xaltonalli, arenal del sol, la Tetilla, y Octlayo, todos son picachos secundarios. Por el rumbo oriental se encuentra la profunda cañada de Axaltzintle para otros de San Juan, que llega hasta el corazón de la montaña y que parece ser el vestigio del verdadero cráter (Fig.4).

Suelos

Los suelos existentes en el volcán se originaron a partir de las erupciones efectuadas por los cráteres satélites durante el Pleistoceno y Holoceno, que aportaron el material para la actual formación de la capa edáfica superior.

En el Parque Nacional Malinche se encuentran presentes varios tipos de suelos; en la parte superior, entre 4500 y 4300 metros sobre el nivel del mar se encuentra una zona de Litosoles eútricos y dístricos, consistentes en rocas volcánicas coherentes, arena muy pedregosa y algo de tobas volcánicas. De los 4300 a los 3900 metros sobre el nivel del mar se encuentran los Regosoles dístricos consistentes en corrientes de ceniza, arena limosa y material gravoso y pedregoso, generalmente se encuentra cubierto por pastizal; se pueden encontrar con Litosoles y Andosoles. De los 3900 a los 3200 metros sobre el nivel del mar se encuentra la zona boscosa asentada sobre Andosoles húmicos y vítricos, consistentes en cenizas andesíticas, ricas en alofanos, con contenidos altos a regulares de materia orgánica. A estos, sigue una zona de Andosoles vítricos y ócricos en donde comienzan los terrenos de cultivo, más o menos a 2800 metros sobre el nivel del mar, en los que aparecen Regosoles eútricos y Fluvisoles arenosos, migajón limoso o migajones areno limosos

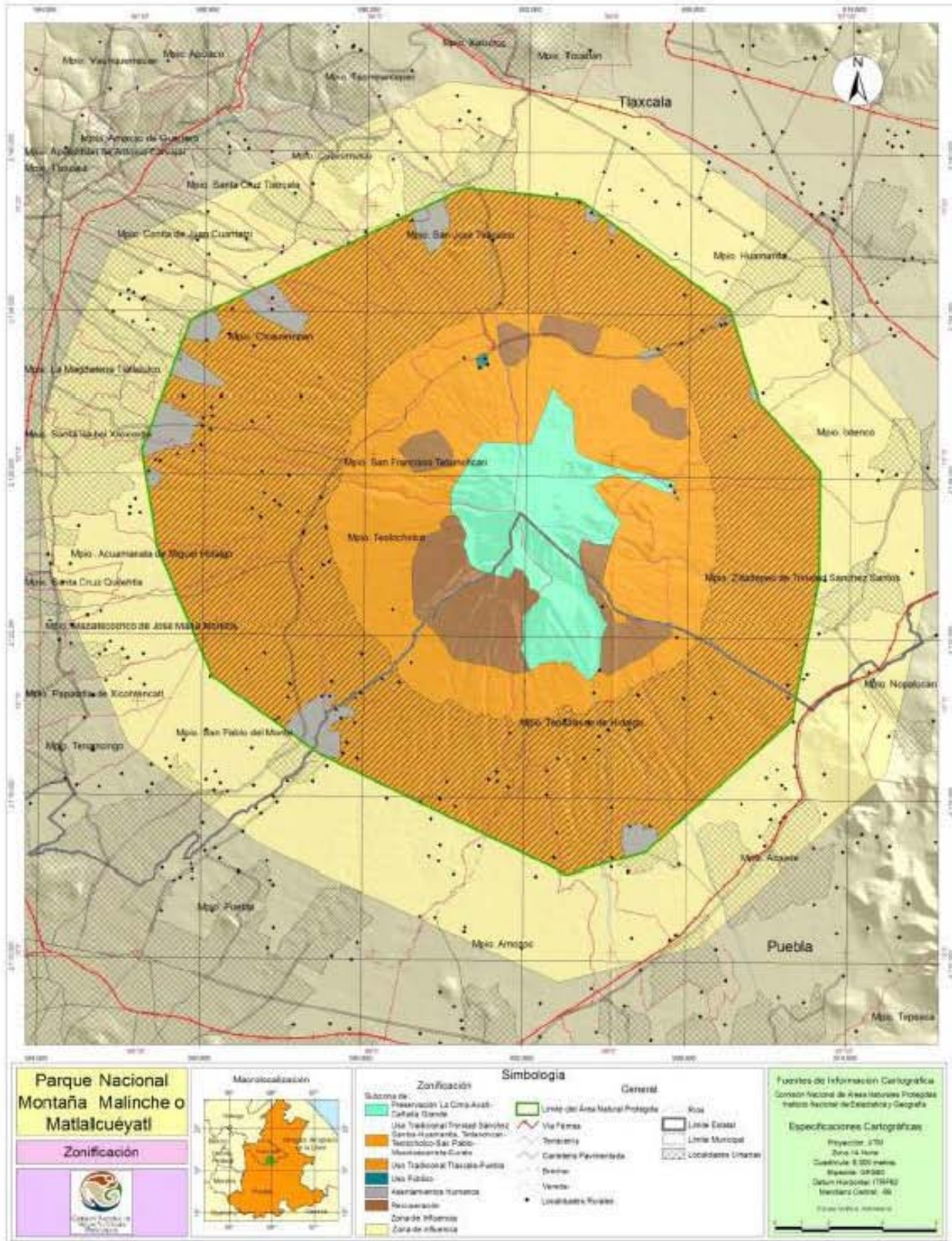


Figura. 4. Mapa de del Parque Nacional La Malinche. Tomado de la página de la CONANP

Clima

Se presenta de los 3,500 a 4,000 msnm de altitud, con temperaturas que oscilan entre los 4 y 6° C, excepto en los meses de invierno donde se presentan bajo cero y con la presencia de nieve. La precipitación media anual se presenta en un rango que va de 1,000 a 1,200 mm. La vegetación está formada por bosques de *Pinus hartwegii* y, además, se presentan 195-360 días con heladas; los vientos dominantes provienen del noreste y escasamente del suroeste, estas condiciones climáticas extremas han permitido el establecimiento del páramo de altura.

Hidrología

El Parque Nacional Malinche forma parte de la cuenca del Río Atoyac (región hidrológica del Río Balsas) y cuenca cerrada Guadalupe (región hidrológica río Papaloapan).

Forma parte de la Cuenca Hidrográfica del Río Atoyac - Zahuapan. El volcán es sumamente importante en el abastecimiento de agua para la región, ya que aporta volúmenes considerables a las corrientes subterráneas, gracias a la cual subsiste la actividad agropecuaria. Este parque protege afluentes que alimentan al Río Zahuapan y Atoyolca, por el lado de Puebla protege la Presa de Valsequillo. Presenta una sola corriente permanente, denominada Río Barranca de la Malinche, la cual se origina en el lado este de la montaña, atravesando el Municipio de Trinidad Sánchez. Las demás corrientes son temporales como el Río Apizaco, al Noroeste; el Río San Juan, al Oeste; el Río Barranca Seca; el Río Barranca de la Soledad y el Río Barranca Hejotitla, al Suroeste.

Aspectos biológicos

Vegetación

Los tipos de vegetación localizados dentro de la poligonal y en el área de influencia de la montaña son: Bosque de pino (24.92 %), Bosque de oyamel-pino (4.46 %), Bosque de encino (3.41 %) y las asociaciones de B. de pino-encino (1.36 %), B. encino-pino (0.17 %), B. pino-oyamel (5.38 %), así como pastizal natural (5.38 %), páramo de altura (1.66 %), y agricultura de temporal (53.27 %)(SARH, 1993).

Las especies de pinos identificadas en la región de La Malinche son: *Pinus leiophylla*, *P. montezumae*, *P. hartwegii*, *P. teocote*, *P. pseudostrobus* y *P. patula* (Acosta, 1992). Dentro del parque nacional se encuentran los siguientes tipos de vegetación:

Zacatonal. Comprende áreas ubicadas arriba de 4000 metros sobre el nivel del mar y hasta los 4500; sus componentes característicos son *Calamagrostis toluensis* (Kunth) Trin. ex Steud. y *Festuca toluensis* Kunth, hasta los 4300 msnm; a más altitud son sustituidas por *Festuca livida* (Kunth) Willd. ex Spreng. y *Arenaria bryoides* Willd. ex D.F.K. Schldl. que llegan hasta los 4500 metros sobre el nivel del mar. Bosque de alta montaña

Esta zona se encuentra aproximadamente entre 3200 y 4000 metros sobre el nivel del mar, está constituido por *P. hartwegii*; se mezcla en las partes bajas, especialmente en las barrancas con oyamel *Abies religiosa* Kunth Schldl. et Cham., en las áreas bajas con cedro (*Cupressus lindleyi* Klotzsch ex Endl.); la vegetación herbácea de este bosque la constituye el zacate *F. toluensis*.

Bosque de oyamel. El principal componente de este tipo de vegetación es el oyamel *A. religiosa*; se encuentra en altitudes que van de 2800 a 3200 metros sobre el nivel del mar, aunque llega alcanzar la cota de 3500; dependiendo de altitudes y exposiciones. Dentro de este bosque se pueden encontrar: *P. hartwegii*, *P. montezumae*, *C. lindleyi* y *Alnus sp.*

Bosque de pino-encino. Se distribuye a una altitud entre 2600 y 2850 metros sobre el nivel del mar, en las partes bajas suele dominar el encino y en las altas los pinos, en la parte media se encuentran mezclas en proporciones variables; las especies representativas son *Pinus leiophylla*, *P. montezumae*, *P. pseudostrobus*, *P. patula* y *P. ayacahuite*; las latifoliadas más frecuentes son los encinos *Quercus sp.* de dos tipos, uno perennifolio y otro caducifolio.

Áreas de táscate. Se extiende en las partes medianas y bajas del parque, ocupando áreas de gran amplitud, las especies representativas son: *Juniperus deppeana* y *J. deppeana* var. robusta. Otras asociaciones son táscate con magueyales y nopaleras.

Pastizal. Son de tipo inducido, las especies más representativas son *Bouteloa gracilis* (Willd. ex Kunth) Lag. ex Griffiths, *Muhlenbergia porteri* F. Lanson-Shcibner ex W. Beal e *Hilaria cenchroides* Kunth (SARH, 1993).

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

Cronología de actividades de campo

1. Detección de zonas infestadas: recorridos terrestres. utilización de mapas
2. Selección de zonas infestadas: Geolocalización de los sitios de muestreo
3. Selección de árboles para tratamientos: registro de datos dasométricos y de factores ambientales (altitud sobre el nivel del mar, pendientes). Georreferenciación de los arboles
4. Recolección de muestras patológicas (muérdago enano) y botánicas (Hospedantes)
5. Inoculación de los hongos antagonistas
6. Evaluaciones de árboles inoculados
7. Recolección de muérdagos inoculados

Cronología de actividades de laboratorio

1. Aislamiento de hongos antagonistas de las muestras de muérdago enano
2. Determinación de hongos antagonistas
3. Pruebas de patogenicidad *in vitro*
4. Producción de hongos antagonistas
5. Preparación de tratamientos para inoculación

VIII.1 Actividades de campo

Áreas de estudio

Las áreas donde se realizó el presente estudio fueron localizadas y seleccionadas tomando como primer criterio las zonas más infestadas por el muérdago enano (*Arceuthobium vaginatum*) en los dos parques Nacionales. Se tramitaron los permisos con las autoridades del lugar para poder ingresar a los sitios, ya que se encuentran dentro de las Áreas Naturales Protegidas. Posteriormente se delimitaron dos áreas de muestreo en el Parque Nacional Iztaccihuatl – Popocatépetl - Zoquiapan (Huilapa y Tres Cruces (cercano a la Estación Experimental Zoquiapan)), mientras que en el Parque Nacional la Malinche se seleccionó el área conocida como carretera 58- 59.



Parque Nacional Iztaccihuatl - Popocatepelt - Zoquiapan
Huilapa
Ixtapaluca, Estado de México

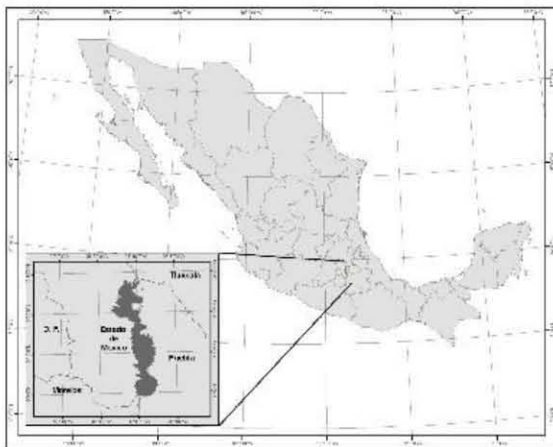
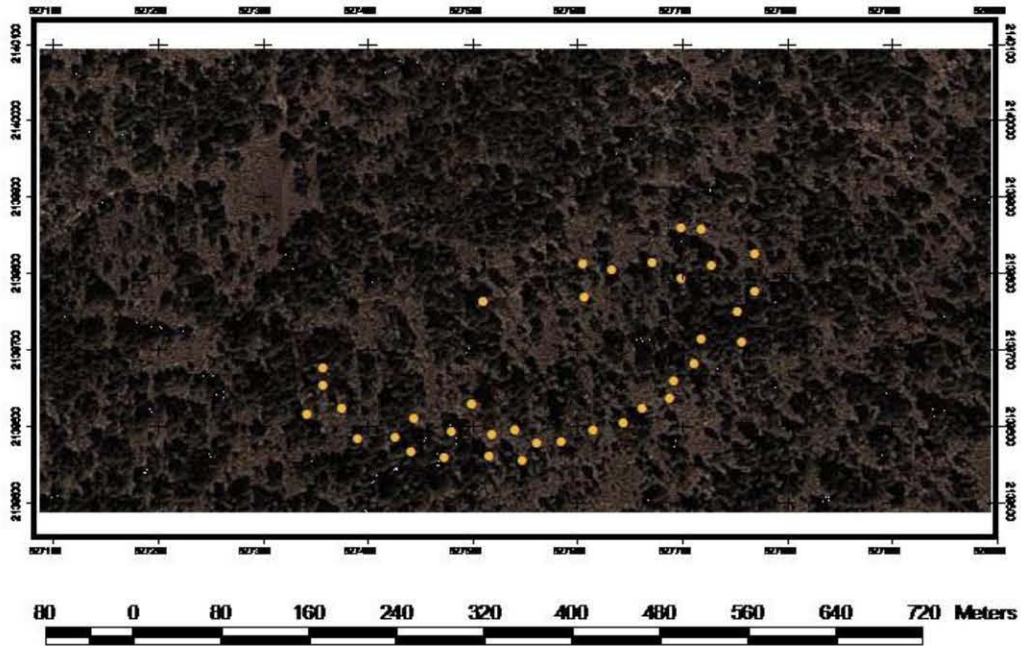


Figura 5. Mapa del primer área de estudio Huilapa, Ixtapaluca, Estado de México. Parque Nacional Iztaccihuatl – Popocatepetl - Zoquiapan



Parque Nacional Iztaccihuatl - Popocatepetl - Zoquiapan
Estacion Experimental Zoquiapan
Zoquiapan, Estado de México

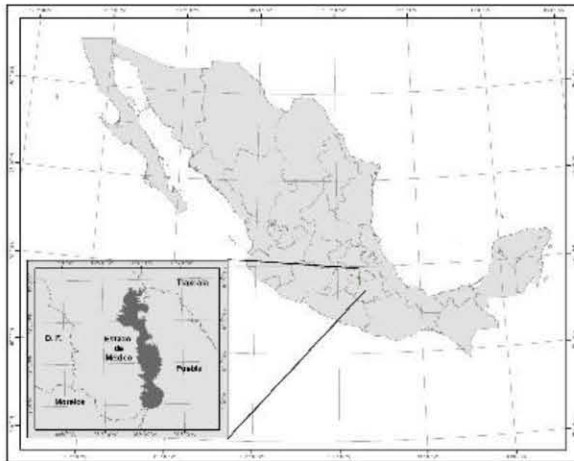
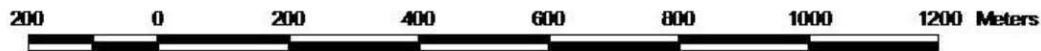
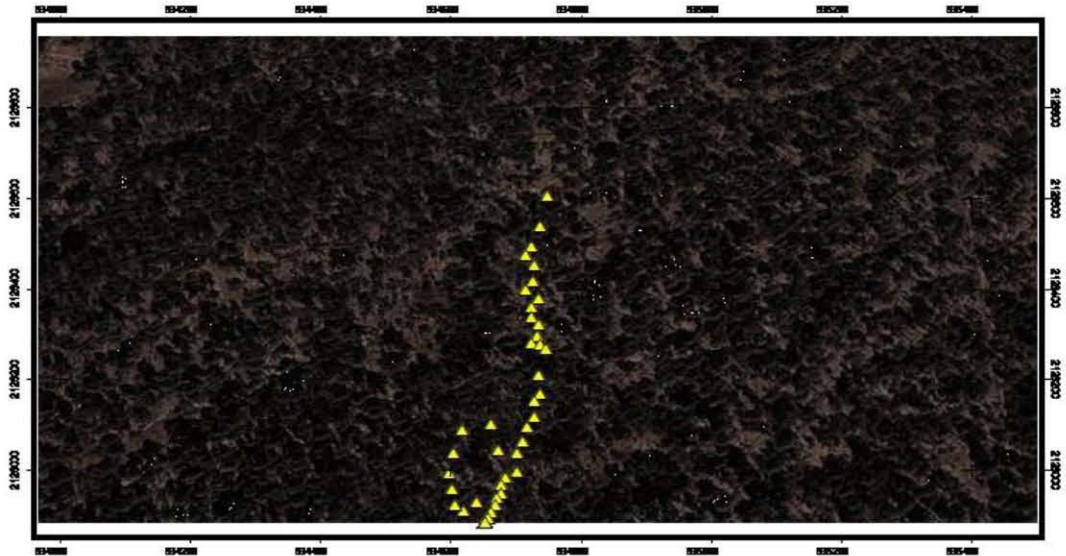
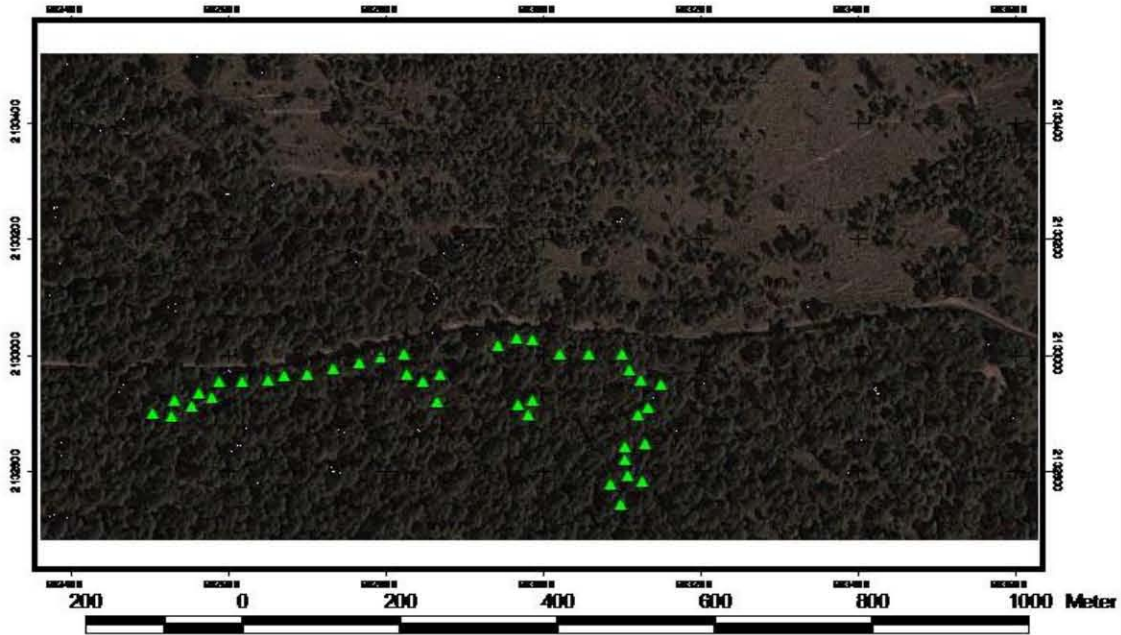


Figura 6. Mapa de la segunda área de estudio Tres Cruces (Estación Forestal Experimental Zoquiapan), Estado de México. Parque Nacional Iztaccihuatl – Popocatepetl - Zoquiapan



Parque Nacional La Malinche
Camino 58 - 59
Huamantla, Tlaxcala



▲ Arboles.shp

Figura 7. Mapa de la tercera área de estudio. Camino 58-59, Huamantla, Tlaxcala. Parque Nacional La Malinche

El paraje Huilapa se localiza en el municipio de Ixtapaluca, Estado de México, con coordenadas UTM (Universal Transverse Mercator) del área de estudio de 527219m E, 2139728m N, a una elevación media de 3512 msnm (Fig. 5). El segundo sitio estuvo dentro de los límites de la Estación Forestal Experimental Zoquiapan, Estado de México, específicamente en el cerro de Tres cruces, con las coordenadas UTM del área de estudio de 534666m E, 2128099m N, a una elevación media de 3690 msnm (Fig. 6). El tercer sitio se encuentra ubicado sobre el camino 58 -59 del Parque Nacional La Malinche, en Huamantla, Tlaxcala. Con las coordenadas UTM del área de estudio de 603099m E, 2133200m N, a una elevación media de 3025 msnm (Fig. 7).

Obtención de muestras

Se realizaron recorridos en cada uno de los sitios con la finalidad de seleccionar muérdago enano con diferentes sintomatologías (presencia de daño). El muestreo y la recolecta se realizó en el mes de marzo de 2012, en una superficie aproximadamente de 500m² por cada sitio, se seleccionaron árboles jóvenes de regeneración natural para la aplicación de los tratamientos.

En cada una de las áreas de muestreo se seleccionaron 10 árboles infestados por *A. vaginatum*. Se anotaron las características del lugar, los síntomas de daño en las plantas parásitas y se procedió a la recolecta. Mediante unas tijeras de podar (Trupper) se cortaron muestras patológicas del muérdago, las cuales se colocaron en bolsas de plástico resellable con una dimensión de 17 X 15 cm., además se tomaron fotografías en el sitio y se registraron los datos del lugar de colecta.

Posteriormente fueron llevadas al laboratorio de Sanidad Forestal del CENID-COMEF del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agropecuarias y Pecuarias INIFAP, para ser procesadas.

VIII.2 Actividades de laboratorio

Las muestras de muérdago enano colectadas en campo se sacaron de las bolsas y fueron depositadas en mesas de trabajo cubiertas con papel para quitar el exceso de humedad y tener una mejor manipulación de los organismos. Para evitar mezclar las muestras se trabajó por separado cada una de ellas. Posteriormente se anotaron datos en la bitácora sobre las sintomatologías del muérdago y se tomaron fotografías con una cámara profesional CANON EOS 550D, de 10.1 megapíxeles.

Para confirmar que los daños observados en las muestras de muérdagos fueron causados por hongos, se observaron en el microscopio estereoscópico marca Carl Zeiss Stemi 2000 – C, se tomaron microfotografías de las zonas con evidencia de daño, con una cámara PowerShot A640, Canon de 10 megapíxeles con adaptación para microscopio.

Para el análisis del material patológico se utilizó el método descrito por Flores y Romero (2001), el cual se describe a continuación:

Se realizaron cortes a los tallos de muérdago que presentaron sintomatologías como canchales, necrosis, cambio de color o tumoración. La dimensión de estos fue de aproximadamente 0.5 cm, los cuales se colocaron en cajas Petri marcadas con los datos de la muestra correspondiente.

Los fragmentos obtenidos fueron asepticados, para lo cual se colocaron en un vaso de precipitado y se le agregó Hipoclorito de sodio al 1% durante tres minutos para evitar la contaminación por organismos saprobitos y organismos oportunistas que interfirieran con el desarrollo de los hongos patógenos. Después se enjuagaron tres veces con agua destilada durante un minuto para quitar el exceso de Hipoclorito de sodio y residuos; por último se decantó el exceso de líquido y se dejaron secar en cajas Petri con papel filtro previamente esterilizadas.

Con ayuda de pinzas de disección estériles se sembraron los trozos de muérdago en cajas Petri conteniendo el medio de PDA (Papa – Dextrosa- Agar), en cada caja se colocaron 5 trozos. Lo anterior fue realizado junto a la flama y en un cuarto de siembra en condiciones asépticas con la finalidad de evitar contaminación de las muestras. El proceso de preparación del medio PDA se explica en el Anexo 1.

Las cajas Petri ya con las muestras fueron rotuladas con los datos de las muestras, así como con la fecha de siembra. Se incubaron a 27°C durante 3 días o hasta que se presentara el crecimiento del micromiceto.

Se hicieron observaciones diarias del desarrollo de los organismos, se contó el número de colonias, caracterizaron y señalaron con la finalidad de aislarlos conforme fueron apareciendo, para evitar la confusión, contaminación o enmascaramiento de los hongos. Conforme se presentó el crecimiento de los hongos, las cajas se transfirieron de la cámara de incubación a una zona de refrigeración para reducir el desarrollo del hongo (Fig. 8).

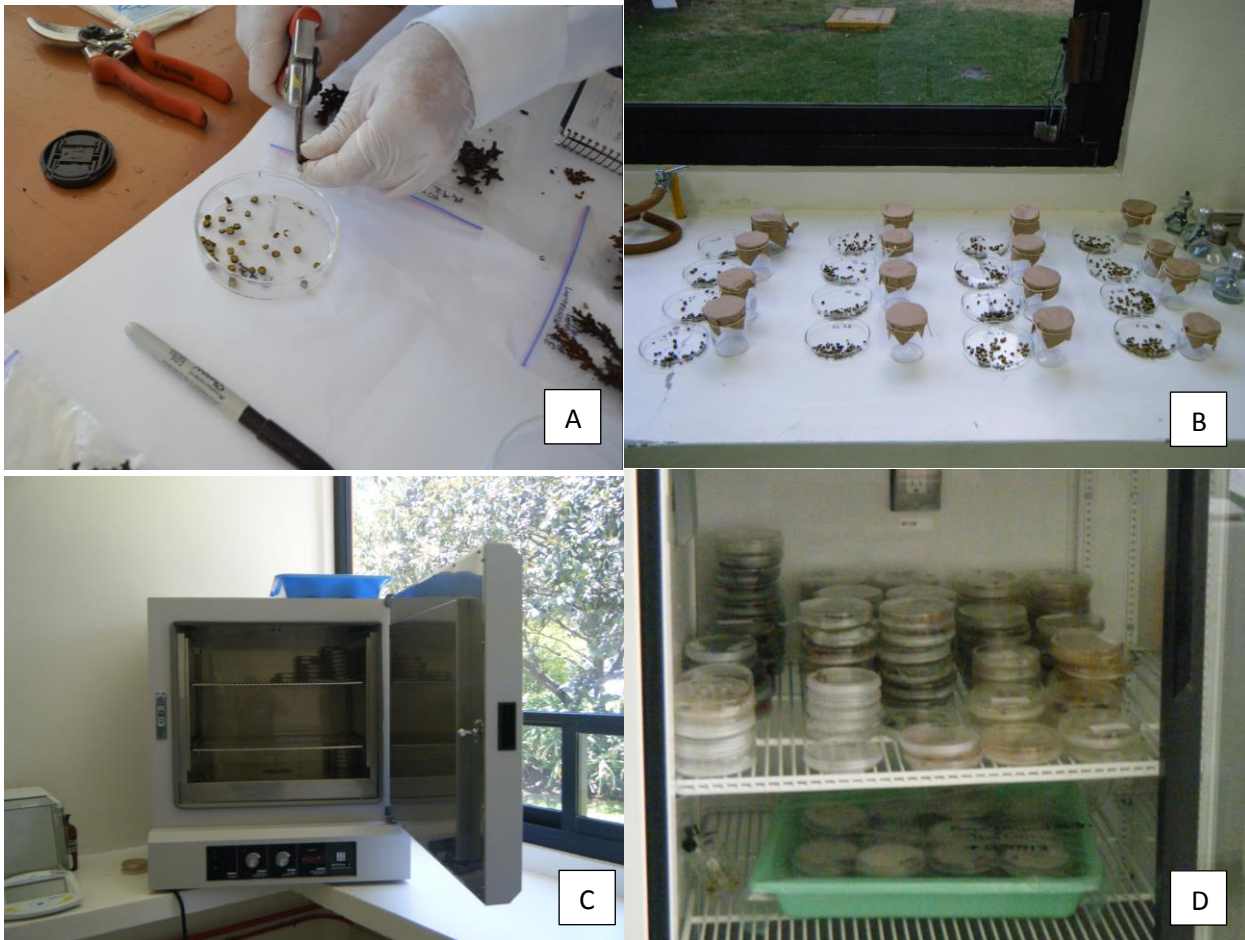


Figura 8. A) Trozos de las muestras muérdago enano, B) preparación para aseptización de los trozos de muérdago, C) incubación de las muestras y D) refrigeración de las colonias hongos obtenidas.

VIII.2.1 Obtención de cultivo monospórico

Los hongos seleccionados y que se reportaran como patógenos fueron aislados en el cuarto de siembra del laboratorio de fitopatología, donde con un asa de siembra aséptica se tomó una parte de micelio y sembró en cajas Petri con medio de cultivo PDA. Las cajas se marcaron con los datos de la zona, día de siembra, así como con el tipo de medio que se utilizó. Estas se cerraron y sellaron con cinta PARAFILM para evitar contaminación. La incubación fue a una temperatura de 27°C durante 7 días o hasta que se observó el crecimiento del hongo.

Una vez que se observó la presencia de la colonia en la caja se retiró de la cámara de incubación y llevó al refrigerador para detener el crecimiento hifal. Posteriormente se caracterizó el crecimiento de cada colonia de hongo.

VIII.2.2 Identificación de los hongos antagonistas

Las cepas que se aislaron de los tejidos infectados de muérdago enano (*A. vaginatum*) se identificaron de acuerdo a sus características morfológicas y características moleculares. Las especies de micromicetos que fueron reportados como patógenos y que coincidieron con los síntomas encontrados en la planta parásita, se sembraron nuevamente en cajas con medio PDA para utilizarlos posteriormente. La caracterización morfológica y molecular se describe a continuación.

VIII.2.2.1 Caracterización morfológica

La identificación morfológica se realizó observando características macroscópicas de las cajas con crecimiento de colonias, como: producción de pigmentos en el medio de cultivo, textura, tipo de micelio producido, tamaño de las colonias, velocidad de crecimiento.

Para el estudio microscópico se realizaron preparaciones directas en portaobjetos, cubreobjetos, y se usó el colorante azul de lactofenol de algodón para teñir las estructuras fúngicas, esto permitió observar características como tipo y coloración del micelio; así como forma, tamaño y coloración de las esporas.

De forma más detallada se tomó una pequeña porción del hongo y con una aza de siembra se colocó en el portaobjetos, se le agregó una gota de azul de lactofenol, se cubrió con el portaobjetos cuidando que no se formaran burbujas y se observó en el microscopio óptico, marca Carl Zeiss Axiolab. Para la determinación se usaron las siguientes fuentes bibliográficas y claves taxonómicas: Barnett y Hunter (1972), Ellis (1971) y Cibrián (2007).

Una vez que se identificaron morfológicamente, se hizo una revisión de la literatura especializada para obtener información y separar los micromicetos patógenos de los saprobios.

VIII.2.2.2 Caracterización molecular

Para confirmar la identificación morfológica de los micromicetos reportados como posibles fitopatógenos del muérdago enano, se utilizó la metodología PCR (Cadena de Acción de Polimerasa), que a continuación se describe.

Las actividades realizadas comprendieron la extracción de ADN para determinar las especies de micromicetos que fueron reportados en la literatura como patógenos, cuya metodología se describe a continuación:

La extracción de DNA de los hongos antagonistas *Alternaria sp.*, *Cladosporium sp.* y *Fusarium sp* asociados al muérdago enano (*Arceuthobium spp.*), se realizó en el laboratorio de Fitopatología en el área de sanidad forestal del INIFAP Coyoacán.

Se preparó una solución de buffer AP (fosfatasa alcalina) para la extracción de DNA del hongo. Para lo cual se colocaron 500 µL de buffer de extracción AP en tubos Eppendorf, posteriormente en la campana de flujo laminar, se tomó de una caja Petri el micelio del hongo, se colocó en los tubos Eppendorf con el buffer de extracción. Estos se colocaron en el microondas durante 20 segundos para separar las hifas.

Se colocaron 200 µL más en los tubos Eppendorf para tener un volumen de buffer AP de 700 µL y se dejaron reposar durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugaron durante cinco minutos a 12000 rpm, se sacaron los tubos y se quitó el sobrenadante (que contenía el DNA).

El sobrenadante se depositó en un nuevo tubo y se colocó 400µL de fenol cloroformo, después se agitó en el vórtex durante 2 minutos. Se dejó reposar durante 2 minutos, después se colocaron los tubos en la centrifuga a 12000 rpm durante 6 minutos. Este procedimiento se repitió hasta la centrifugación, pero ahora se le agrego menor cantidad (200 µL) de fenol cloroformo proporción 1:1. Posteriormente el sobrenadante se pasó a nuevos tubos y se agregaron 500 µL, de acetato de sodio.

Se dejó reposar durante 15 minutos y se agitó por inmersión a temperatura ambiente. Se centrifugo durante 15 minutos y se decantó, dejando solamente la pastilla, en seguida se lavó con alcohol al 70% agregando 50 µL, se volvió a centrifugar durante 2 minutos, se decantó el etanol y agrego nuevamente 50 µL de alcohol al 70%.

Nuevamente se decantó el alcohol teniendo cuidado de no tirar la pastilla, se puso a secar el tubo en una sanitas. La pastilla se secó y se resuspendió en 30 µL de agua libre de nucleasas.

Se amplificaron de las regiones ITS1 e ITS2 de los genes ribosomales (rRNA), se realizó mediante la técnica de PCR con los Oligos ITS4 (Secuencia 5'- 3', TCCTCCGCTTATTGATATGC) e ITS5 (Secuencia 5'- 3', GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG), se utilizaron para la amplificación de un segmento de 591 pd (pares de bases) del gene rDNA 18S (fragmento de la subunidad ribosomal).

Antes de la preparación del mix se hizo una dilución de 1:50, 1 μ L de ADN + 49 μ L H₂O libre de nucleasas.

Preparación de Mix

Para la preparación del mix de PCR, se colocó la mezcla en un tubo de Eppendorf de 1.5 μ L, para lo cual se utilizaron los siguientes reactivos (Tabla 2) (Fig. 9).

Tabla 2.- Mix PCR

Reactivos	Volumen de Reacción 1x	Volumen de Reacciones Finales 3x
H ₂ O	16.25 μ L	48.75 MI
Buffer PCR	2.5 μ L	7.5 μ L
DNTP's	0.5 μ L	1.5 MI
Oligo 1 Its 4	1 μ L	3 MI
Oligo 2 Its 5	1 μ L	3 μ L
MgCl ₂	1.25 μ L	3.75 μ L
Taq polimerasa	05 μ L	15 μ L
DNA	2 μ L	

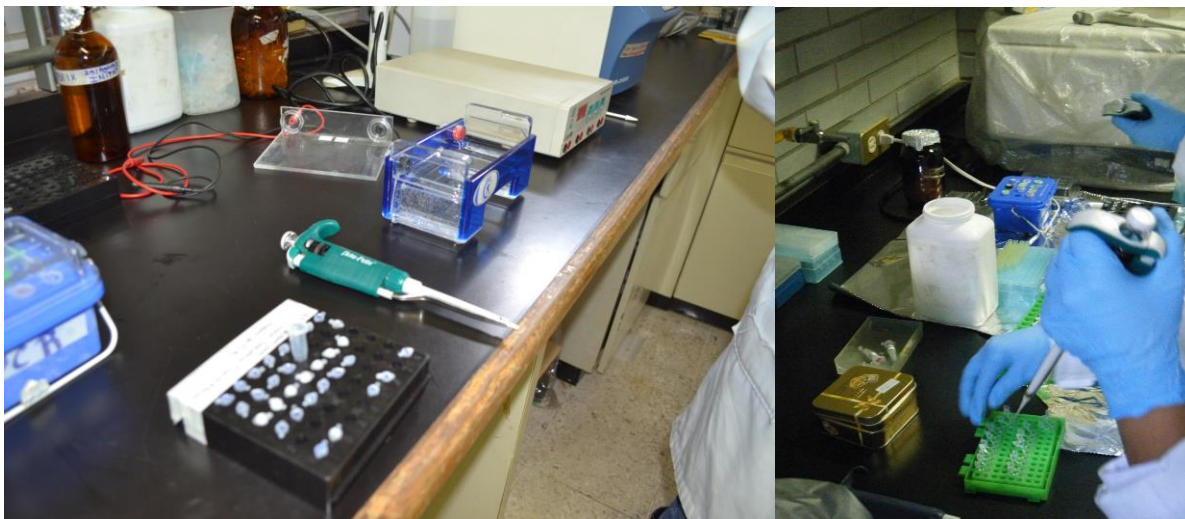


Figura 9. Preparación del Mix.

Se hicieron diez reacciones para PCR de volumen total de 23 μ l (Tabla 3).

Tabla 3. Reacciones para PCR

Control	Control	Hongo
(+)	(-)	<i>Alternaria sp.</i> (2 repeticiones)
		<i>Cladosporium sp.</i> (3 repeticiones)
		<i>Fusarium sp.</i> (3 repeticiones)

Termociclador

Se colocaron los tubos en el Termociclador Applied Biosystems con el siguiente programa de PCR (Tabla 4).

Tabla 4.- Programa del Termociclador

Temperatura	Tiempo	Ciclo
95° C	5 min	1x
57° C	1min	30x
72° C	1min	1x
14° C	10 min	1x

Método de Electroforesis

Se preparó un gel de agarosa al 1% para ADN, se agregaron 0.3 g de agarosa y 30 ml de TAE 1X, posteriormente se mezcló y se introdujo al horno de microondas durante 20 segundos hasta que se disolvió la agarosa, y cambio a un color transparente.

Se colocó el porta gel dentro de la cámara con el peine para la formación de pozos, donde se colocaron las muestras, en seguida se vertió la agarosa sobre el porta gel, se retiró el peine cuando el agarosa se gelificó. Se llenó la cámara electroforética hasta que quedo cubierto el gel con la solución de TAE 1X para ADN (Fig. 10). Se cargaron las muestras con las siguientes soluciones, 3 μ l de marcador molecular de 1000 bp + 3 μ l buffer de carga, 2 μ l de control positivo y negativo + 3 μ l de buffer de carga, 6 μ l de muestra del hongo y 3 μ l de buffer de carga; cada muestra se cargo en un pozo del gel, el cual se expuso a un campo eléctrico (la corriente corrió de (-) a (+), ya que la carga de los ácidos nucleicos es negativa. Posteriormente se programó la fuente de poder con un voltaje de 85 volts durante 60 minutos (Fig. 11).

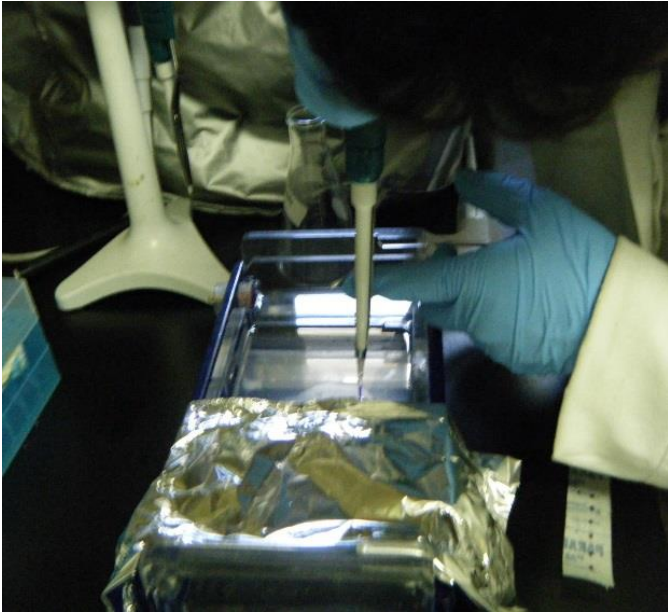


Figura 10. Carga de muestras en pozos.

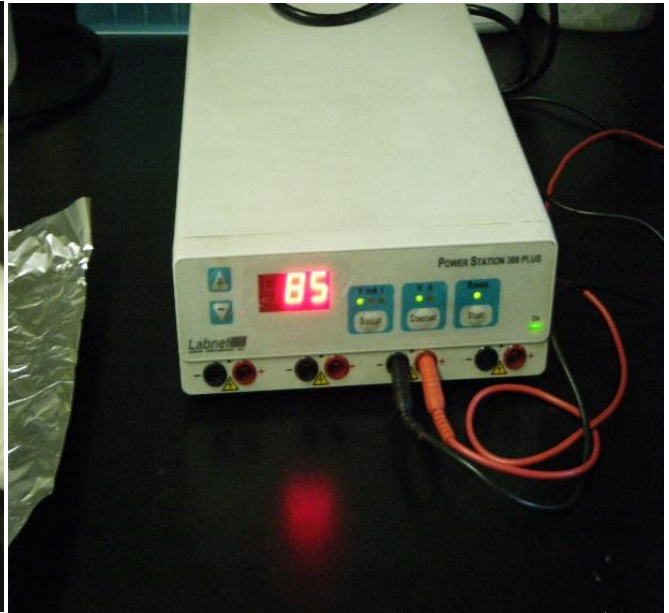


Figura 11. Fuente de poder 85 volts

Al terminar la corrida se sacó el gel para teñirlo en BrEt (Bromuro de Etidio) a una concentración de $0.1 \mu\text{L}$ en 100 ml de agua destilada durante veinte minutos. Una vez completado el tiempo en la cámara de tinción, se extrajo el gel y se llevó al fotodocumentador (Bio Rad Universal Hood II), se utilizó el programa (Quantity One) en donde fue expuesto a la radiación UV y se tomó la foto con un analizador de imágenes (Fig. 12 y 13).



Figura 12. Programa (Quantity One).

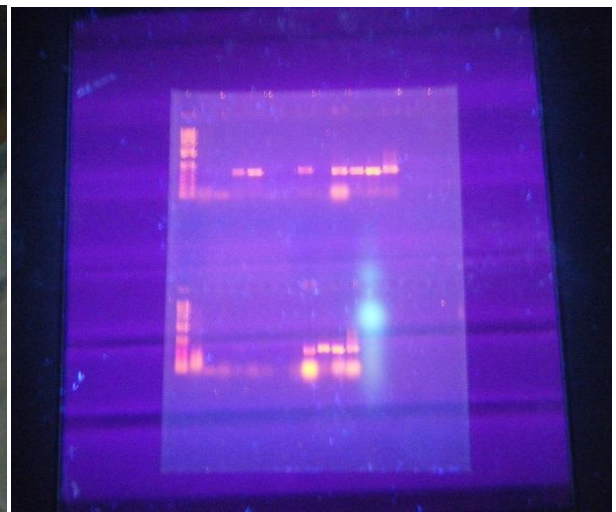


Figura 13. Gel de agarosa al 1% teñido

PCR

Se observó la amplificación del ADN genómico de los micelios de los hongos antagonistas aislados e identificados morfológicamente como *Alternaria alternata*., *Cladosporium cladosporioides* y *Fusarium proliferatum*. En el carril 3 se observó un fragmento de 591 bp aproximadamente, se amplificaron las regiones específicas del rDNA 18S, 5.8S y las regiones interespaciadoras ITS1 e ITS2.

Purificación de PCR

Se cortaron las bandas de los carriles número tres, cuatro y cinco y se depositaron en tubos Eppendorf. Se realizó la purificación de PCR con el kit comercial de Wizer purification Clean-up system de promega; siguiendo las indicaciones del proveedor, posteriormente de la muestra purificada de PCR con el Kit Wizer, se tomó 5 µL y se mandaron a secuenciar al laboratorio de Análisis y Química de DNA, en la UBIPRO de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Análisis de secuencias

Se utilizó el secuenciador: Modelo 3130xl Genetic analyzer de 16 capilares Química de DNA: BigDye Terminator versión 3.1 Sequencing Kit Movilidad: soporte polímero DT3100pop7(BD)v3 Capilar: 50cm. El Tiempo de electroforesis que se utilizó fue de secuencia: 1 hora, 45 mints.

Las secuencias obtenidas se alinearon con las secuencias disponibles en el banco de genes de la base de datos de secuencias genéticas del NIH (National Institutes of Health de Estados Unidos) GENBANK en el BLAST. De los valores generados se consideraron las secuencias con el porcentaje más altos de identidad. Las secuencias obtenidas se muestran en el Anexo 3.

VIII.2.3 Pruebas de patogenicidad *in vitro*

Para evaluar el efecto de los hongos antagonistas aislados de los tejidos del muérdago enano son los causantes de los daños observados, se realizaron pruebas de patogenicidad *in vitro*. Estas pruebas son rápidas, efectivas y facilitan la detección de un agente infeccioso (Agrios, 1991).

La prueba de patogenicidad consistió en inocular plantas sanas o sus órganos con los organismos aislados en cultivo puro de material enfermo, con el objeto de comprobar su patogenicidad y causa de la enfermedad (Ames, 1997). Para esto se utilizó la metodología descrita por Plascencia *et al.*, 2008, a la cual se le realizaron modificaciones.

En el laboratorio las muestras se observaron al microscopio estereoscópico de la marca Carl Zeiss, modelo Stemi 2000 / Axiover 40 y se realizó registro fotográfico. Se colectaron muestras sanas de muérdago enano para inocular en éstas los patógenos que se consideraron más eficientes, y así poder probar su efecto sobre el tejido. Una vez que se confirmó que las muestras estuvieran sanas se cortaron en trozos de 1 a 2 cm aproximadamente y se aseptizaron, conforme al siguiente protocolo.

Los trozos de muérdago se sumergieron en un vaso de precipitado de 250 ml que con hipoclorito de sodio al 3%, se movió constantemente durante un minuto, se decantó para quitar el NaClO (hipoclorito de sodio), después se enjuagó y agitó con agua destilada en tres ocasiones. Se adicionó alcohol al 70%, y se removió durante un minuto, nuevamente se enjuagaron los trozos tres veces con agua destilada, en agitación y se dejaron secar en una caja Petri con papel filtro previamente esterilizado.

En condiciones de asepsia y con ayuda de pinzas estériles se colocó un trozo muérdago aseptizado, en una caja Petri con medio PDA y a una distancia de 1 a 2 cm del muérdago se sembró el hongo patógeno. Las cajas se rotularon con los datos de la siembra (fecha de la siembra, micromiceto inoculado y medio de cultivo empleado) y sellaron con cinta PARAFILM e incubaron durante 7 días a una temperatura de 25°C en la cámara de incubación, se observó diariamente el crecimiento del hongo y su invasión al muérdago.

Para la prueba de patogenicidad se utilizaron tres hongos identificados como antagonistas del muérdago enano, así como un testigo donde solo se esterilizó y se sembró el muérdago, cada uno con dos repeticiones. La evaluación de la afectación se realizó periódicamente de forma visual, en cada muestra se observó el tiempo de invasión así como los daños que presentó la muestra de muérdago enano.

VIII.2.4 Conteo de conidios

Para contar el número de conidios, fue necesario realizarlo en dos etapas; en la primera los conidios se obtuvieron de las especies de hongo que se desarrollaron en el PDA, en el que inicialmente se sembraron (solución madre). Conociendo esta cantidad de conidios se hicieron los cálculos para determinar el número de cajas necesarias por especie de hongo, para alcanzar el número de conidios por mililitro (1×10^6 conidios/ml), que reportan Castellanos *et. al.*, (2012) como la cantidad mínima necesaria para que los síntomas de la enfermedad se desarrollen en un menor tiempo, para la inoculación en campo.

En la segunda etapa las esporas se obtuvieron de los sustratos y los medios que se inocularon para la producir conidios. De igual forma que en el paso anterior, se realizó el conteo, se hicieron los cálculos para determinar la cantidad necesaria por hongo antagonista de cada medio.

Para el conteo de conidios se realizaron diluciones en serie. El objetivo de hacer diluciones fue evitar alta producción de conidios y facilitar su conteo. Las diluciones se hicieron en agua destilada estéril con Tween 80 al 0.1%.

Para el recuento de las esporas se utilizó la cámara de Neubauer (Cañedo y Ames, 2004) y mediante una pipeta Pasteur se tomó una alícuota de la dilución seleccionada para el conteo (10^{-5} o 10^{-6}) y se colocó en la cámara; luego a través del microscopio óptico se realizó el cálculo de conidios, este paso se repitió varias veces hasta obtener un rendimiento promedio. Los pasos para el conteo de conidios se encuentran en el Anexo 3.

VIII.2.5 Propagación e incremento de conidios de los hongos antagonistas

Se probaron tres medio de cultivo: agar Papa - Dextrosa (PDA), medio líquido de Papa – Dextrosa y arroz(sustrato) que sirve como medio de crecimiento para encontrar en cuál de ellos se desarrolla mejor los conidios de los hongos antagonista *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides* y *Fusarium proliferatum*.

De los tres medio de cultivo se seleccionó aquel que tuvo mayor cantidad de conidios en menor tiempo y a menor costo de producción para cada una de las especies de hongos antagonistas. La cantidad mínima necesaria para la aspersion de acuerdo a Castellanos (2012) fue de 1×10^6 conidios/ml. La preparación detallada de los medios de cultivo se explica en el Anexo 2.

VIII.2.6 Preparación de tratamientos para la inoculación

Para recobrar los conidios de los hongos antagonistas obtenidos de la superficie de los medios y sustratos, se pasa al proceso de conteo de conidios (ver Anexo 4) y viabilidad. La extracción se realizó 24 horas antes de la inoculación con la finalidad de no perder viabilidad y evitar daños en la estructura de los conidios.

Para la inoculación en campo se procedió a la recuperación de conidios de los sustratos, para lo cual se determinó la cantidad de medio de cultivo necesario para obtener el número de conidios deseados por cada hongo antagonista. El proceso se describe a continuación (Fig. 14):

- Se agregó agua destilada estéril a las cajas Petri que contenían los hongos antagonistas y mediante una espátula estéril se raspo la superficie del medio para desprender las conidios; con una gasa estéril se filtró esta suspensión con la finalidad de separar las partículas como restos de agar y micelio, y así obtener los conidios que se depositaron en un frasco estéril (Castellanos, 2012).
- Para la obtención de conidios del sustrato (arroz), este último se lavó con agua destilada y se le agregó Tween 80 al 1% (se utilizó como detergente y emulsificante), y se calculó la cantidad de gramos de arroz necesarios para obtener la cantidad óptima de conidios por mililitro, en 30 litros de agua. Se volvió a contar en números de conidios para confirmar la concentración.
- El medio líquido ya con la cantidad de conidios recomendable se colocó en frascos estériles con tapa para su posterior transporte al sitio de la inoculación.

VIII.2.7 Prueba de viabilidad

Después del aumento en los medios y sustratos, se prepararon pruebas de viabilidad a los conidios resultantes con el fin de evaluar si la célula está o no viva. Esto se realizó a través de una prueba de germinación conidial a un tiempo de 8 horas y una temperatura de 27° C en cajas Petri con medio de cultivo PDA; colocando un conidio en la caja con medio de cultivo y al cabo del tiempo previsto se observó si hubo desarrollo de las hifas.

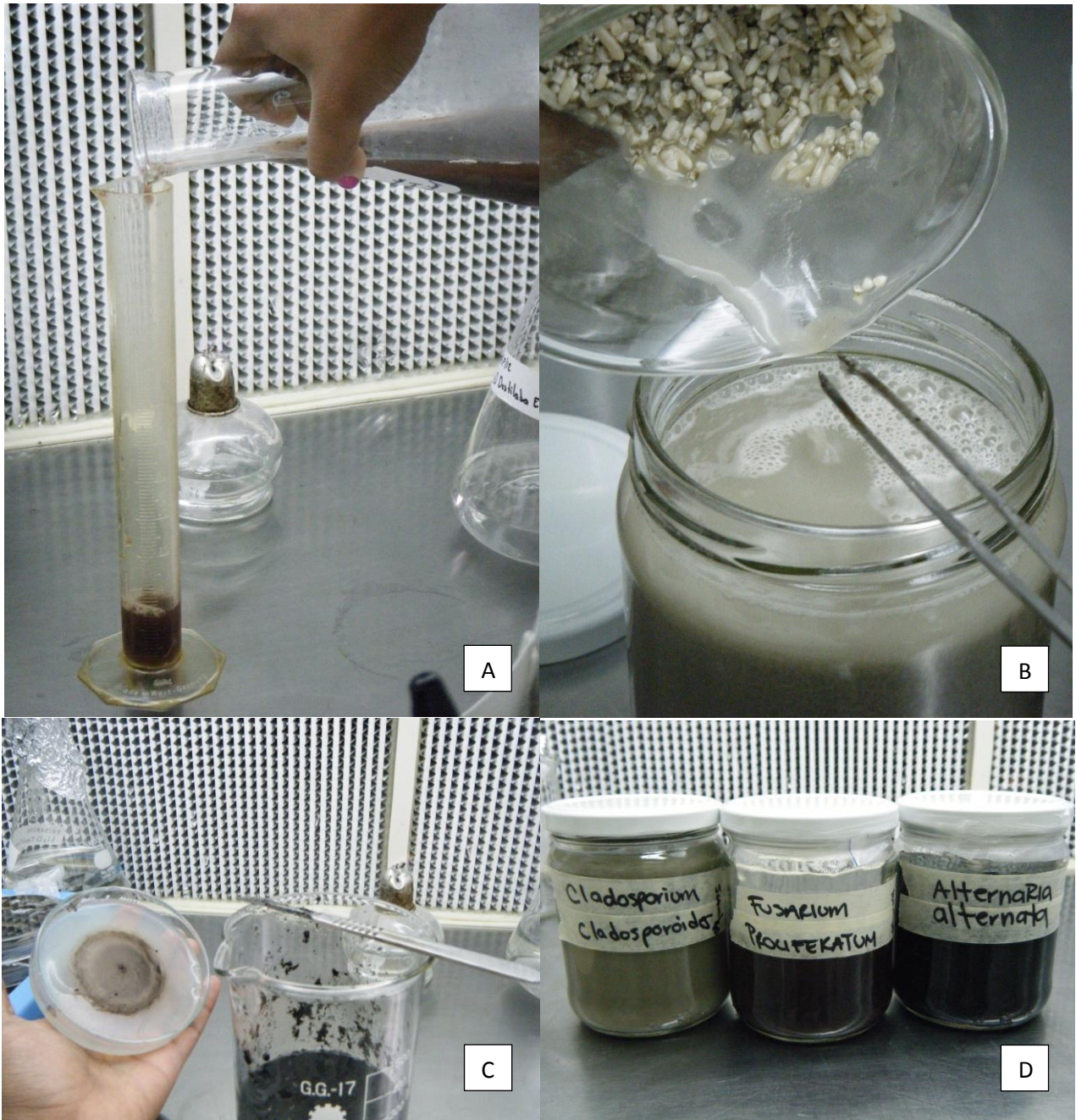


Figura 14. Recuperación de hongos antagonistas de los medios de cultivo: A) *F. proliferatum*, B) *C. cladosporioides*, C) *A. alternata* y D) Hongos antagonistas en frascos para su transporte.

VIII.3 Actividades de campo

VIII.3.1 Diseño experimental

Para la inoculación de los hongos antagonistas en las áreas de muestreo: Parque Nacional Iztaccihuatl – Popocatépetl - Zoquiapan (Huilapa y Tres cruces) y Parque Nacional la Malinche (camino 58 y 59), se agregó la suspensión de conidios de cada hongo en 30 litros de agua y se añadió 1 ml de coadyuvante de la marca Hidrix por cada litro de agua, esto para mantener la humedad necesaria de los conidios. Para vaciar el inoculo en la mochila de aspersión (marca SOLO, SWISSMEX) se utilizó un embudo, cerrando herméticamente y revisando que no tuviera fugas (Castellanos, 2012) (Fig. 15 y 16).



Figura 15. Garrafones con agua para la inoculación



Figura 16. Mochila de aspersión y recipiente para la mezcla de los productos

La aspersión de los hongos se realizó con una boquilla de chorro directo sobre las matas de muérdago hasta quedar a punto de goteo. Esta boquilla se utilizó para producir gotas grandes y proporcionar una distribución plana y más uniforme en la planta, reduciendo el gasto de la suspensión de micromicetos, que puede ser provocada por el viento y altas temperaturas del sitio (Urzúa, 1989)

La aplicación se realizó después de la época de lluvias, ya que de esta manera el porcentaje de humedad relativa del ambiente favorece el crecimiento de los hongos de acuerdo al ciclo de vida y también se evita que los hongos inoculados sean lavados con las lluvias. De esta manera los hongos antagonistas inoculados tienen una mayor probabilidad de desarrollo (Fig. 17).



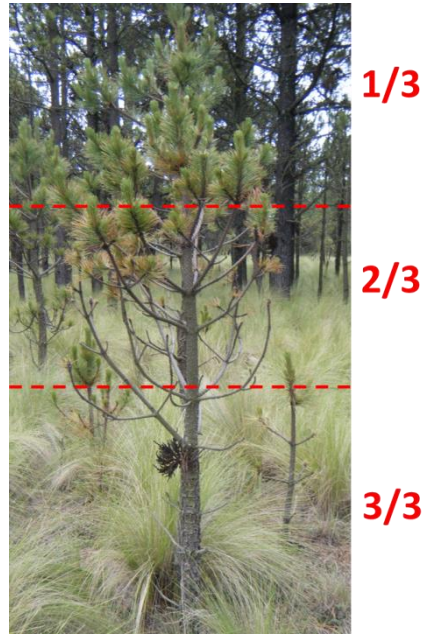
Figura 17. Aplicación de tratamiento con mochila de aspersión, para el control de muérdago enano (*Arceuthobium vaginatum*), en árboles de renuevo de *Pinus hartwegii*.

Se establecieron tres tratamientos y un grupo control, cada uno estuvo constituido por 10 árboles, obteniéndose un total de 40 individuos por área, que multiplicado por las tres áreas donde se aplicaron estos hongos sumaron un total de 120 árboles. Se evaluó el grado de infestación con base a la escala de clasificación de 6 clases de Hawksworth, de esta se aplicó los niveles 2 (nivel de infección leve) y 4 (nivel de infección moderada). Se seleccionaron árboles jóvenes con una altura promedio de 2 a 5 metros.

La mochila se calibró para determinar la dosis por árbol necesaria por árbol, tomando en cuenta las características de cada individuo mediante el grado de infestación, número de matas de muérdago, altura y diámetro normal (1.30 m).

El sistema de 6 clases generado por Hawksworth (1977), para evaluar los grados de infección, se describe a continuación:

- A) Dividir la copa viva en tres tercios
- B) Evaluar cada tercio por separado. A cada tercio se le asigna un valor de 0, 1 ó 2 como se describe a continuación:
 - (0) Infección no visible
 - (1) Infección ligera ($\frac{1}{2}$ o menos de las ramas infectadas)
 - (2) Infección severa (más de $\frac{1}{2}$ de las ramas infectadas)
- C) Sumar los valores de clasificación de cada tercio para obtener su nivel de infección



Los árboles que entren en la clasificación de 1 a 4 son árboles susceptibles de tratamiento de poda. Los árboles que entren en la clasificación de 5 y 6 son árboles que no ameritan tratamiento de poda, por lo tanto estos árboles se procede a un programa de manejo (CONAFOR, 2006) (Tabla 5).

Tabla 5. Grado de infestación y manejo

GRADO DE INFECCIÓN	MANEJO
1, 2, 3 y 4	Poda de saneamiento
5 y 6	Programa de manejo

Se tomaron los grados de infestación mediante la escala Hawksworth, en cuatro tiempos, una antes de la inoculación (t0) que fue los grados iniciales, después de la inoculación se realizaron tres evaluaciones más (t1, t2, t3) un cada mes respectivamente de la otra.

También se tomaron evaluaciones de cinco variables en los muérdagos enanos: coloración, manchado, necrosis, marchitamiento y cancrrosis. Con valores de 0, 1, y 2, donde cero es la ausencia

de cambio, 1 es cambio menor al 50% y 2 es un cambio mayor al 50%. Los datos se vaciaron en un formato con las características necesarias. Apéndice 2.

Al finalizar las evaluaciones, se recolectaron muestras de los muérdagos inoculados que fueron llevados al laboratorio para realizar la siembra y aislamiento, para analizar las muestras con la finalidad de confirmar la presencia de los hongos inoculados dentro de la estructura de la planta parasita (Fig. 19).

VIII.3.2 Tomas de datos de campo

Se realizaron cuatro muestreos para evaluar el efecto causado por los hongos antagonistas inoculados. Se utilizaron dos tipos de formatos, uno en el que se evaluó la escala Hawksworth (niveles de infestación del muérdago enano) por árbol; y otro formato que evaluó características físicas del muérdago (coloración, manchado, necrosis, marchitamiento y cancrrosis) tomando como valores: 0 (cero) si no hubo cambio, 1 (uno) si el cambio era menor al 50% y 2 (dos) si el cambio fue mayor al 50%. Los primeros datos se obtuvieron antes de la inoculación mientras que los siguientes datos se obtuvieron después de la aplicación a los 30, 60 y 90 días (Fig. 18).



Figura 18. Evaluación de las plantas parasitas *in situ*



Figura 19. Evaluación de las plantas parasitas en el laboratorio.

VIII.3.3 Procesamiento de datos

Con la información de los datos de campo contenida en los formatos de registro, se pasaron a hojas de cálculo de Microsoft Excel 2010. Con la finalidad de ordenar los datos para calcular los grados de infestación de los muérdagos por sitio, características de la planta parasita, para cada uno de los tratamientos y en cada uno de los sitios.

VIII.3.4 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa IBM SPSS Statistics 21.0. Del cual se utilizó la prueba de ANOVA de medidas repetidas con la finalidad de determinar el efecto del tiempo, los tratamientos de los hongos antagonistas sobre los síntomas del muérdago enano (coloración, manchado, necrosis, marchitamiento y cancro) y el sitio. Para cada caso, se probó el supuesto de esfericidad con la prueba de Mauchly.

En caso de que alguna la prueba de medidas repetidas no presentara esfericidad, se realizó la ANOVA no paramétrica de Friedman para muestras dependientes, si esta resultara significativa se aplicaron análisis de comparación de Wilcoxon para dos muestras dependientes, con el factor de corrección de Bonferroni en el nivel de significancia (P). En caso de que la prueba de Friedman fuese significativa y la prueba de comparación de Wilcoxon no mostrara diferencias entre las medias, se optó por no aplicar el nivel de corrección de Bonferroni, con el fin de observar las diferencias entre las medias.

Con la finalidad de correlacionar los factores como el tiempo x el tratamiento de los hongos antagonistas del muérdago enano y el tiempo x el sitio, se utilizó la prueba de Tukey, con intervalos de confianza de 0.95.

Para determinar si la presencia de los diferentes hongos en las muestras de muérdago dependieron del tratamiento de hongo antagonista que se aplicó, se realizó un análisis χ^2 con tabla de contingencia, si este análisis resultó significativo se realizaron pruebas *post hoc* de residuos estandarizados.

VIII.3.5 Prueba de fitotoxicidad

Las prueba de fitotoxicidad en los hospederos de (*Pinus sp.*), se realizó mediante la evaluación con base en escala de la European Weed Research Society (EWRS) (Tabla 6).

Tabla 6. Escala propuesta por EWRS, para la evaluación de fitotoxicidad en cultivos (Burril *et al.*, 1977; citado por Quintana, 2008)

Valor puntual	Efecto sobre cultivo	Fitotoxicidad del cultivo en porcentaje (%)
1	Sin efecto	0
2	Síntomas muy ligeros	1.0 - 3.5
3	Síntomas ligeros	3.5 - 7.0
4	Síntomas sin daño en rendimiento	7.0 - 12.5
5	Daño medio	12.5 – 20
6	Daño elevado	20 -30
7	Daño muy elevado	30 – 50
8	Daño severo	50 – 99
9	Muerte completa	100

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IX.1 Sintomatología

Los síntomas observados en los brotes de *A. vaginatum* se caracterizaron por presentar manchas irregulares de color café oscuro, decoloración de ramas y frutos, marchitamiento, canchros del mismo color, flacidez en las ramas y necrosis (Fig. 20 - 25). También se observaron cavidades en las ramas causa de insectos (Fig. 26 y 27).



Figura 20. Rama de muérdago enano (*A. vaginatum*) con presencia de canchros



Figura 21. Muérdago enano (*A. vaginatum*) con síntomas de marchitamiento



Figura 22. Frutos de Muérdago enano (*A. vaginatum*) con síntomas de marchitamiento con decoloración



Figura 23. Rama de Muérdago enano (*A. vaginatum*) con presencia de cancro



Figura 24. Manchas café rojizas en la rama de Muérdago enano (*A. vaginatum*)



Figura 25. Rama de Muérdago enano (*A. vaginatum*) con presencia de cancro



Figura 26. Daño por insecto en la rama de Muérdago enano (*A. vaginatum*)



Figura 27. Daño por insecto en las ramas y en los frutos de Muérdago enano (*A. vaginatum*)

Existen distintos síntomas que son producidos por hongos patógenos, que van desde los que producen necrosis local o general, provocando la muerte de los tejidos vegetales que infectan; hipertrofia e hipoplasia, causando atrofia de plantas completas o de sus órganos; los que provocan hiperplasia produciendo crecimiento excesivo de las plantas o de algunos de sus órganos (Agris, 1991).

El patógeno se desarrolla y produce varias estructuras, sobre la superficie de su hospedante. Estas estructuras, que incluyen al micelio, esclerocios, esporoforos, cuerpos fructíferos y esporas, se les denominan signos y difieren de los síntomas, los cuales sólo se refieren a la apariencia que toman las plantas o sus tejidos cuando han sido infectados. Lo que se observa con mayor frecuencia son los

signos representados por las esporas y el crecimiento veloso y blanquizco del micelio del hongo sobre las hojas, frutos o tallo de la planta, mientras que los síntomas consisten en lesiones necróticas o cloróticas que aparecen sobre las hojas, frutos y tallo, crecimiento deficiente de la planta, etc. (Agrios, 1991).

De acuerdo a Hawksworth y Wiens (1996) a menudo los insectos y algunos hongos son altamente destructivos de muérdagos enanos en algunas áreas en ciertos años. Sin embargo, sus efectos totales sobre las poblaciones son probablemente insignificantes.

Las galerías de insecto observadas, son un factor importante al igual que el viento y la lluvia como medio de transporte de los conidios hacia la planta parasita. Los factores que inducen o regulan estos brotes son resultado de interacciones complejas y con frecuencia indirectas de tiempo en una comunidad multitrófica de organismos (Hawksworth 1972, Shamoun 1998).

IX.2 Identificación de Aislamientos

Caracterización morfológica

Se obtuvo un total de 258 colonias: 104 colonias de hongos en el sitio de Camino 58 – 59, 90 colonias de hongos en la Tres Cruces y 64 colonias de hongos en el sitio Huilapa.

A partir de la caracterización morfológica de las colonias aisladas en los trozos de *Arceuthobium vaginatum*, se identificaron diez micromicetos, de los cuales tres fueron descritos en la literatura como patógenos, posiblemente antagonistas de la planta parasita, (*Alternaria alternata*, *Cladosporium sp.* y *Fusarium Sp.*) y siete saprobios (*Alternaria citri*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Pithomices sp.*, *Rhyzpus sp.* y *Torula sp.*) (Tabla 7).

Las actividades realizadas para el aspecto molecular comprendieron la extracción de DNA para la determinar de la especies de micromicetos que fueron reportados en la literatura como patógenos: *Alternaria alternata*, *Cladosporium sp.* y *Fusarium sp.*

Tabla 7. Micromicetos obtenidos en las muestras de muérdago enano (*Arceuthobium vaginatum*), en los tres sitios: Huilapa, Tres cruces y Camino 58.

Especies identificadas	Huilapa	Tres cruces	Camino 58-59
<i>Alternaria alternata</i> .	✓	✓	✓
<i>Alternaria citri</i>			✓
<i>Aspergillus sp.</i>		✓	
<i>Aspergillus niger</i>		✓	
<i>Cladosporium sp.</i>	✓	✓	✓
<i>Fusarium sp.</i>	✓	✓	✓
<i>Penicillium sp.</i>	✓	✓	✓
<i>Pithomices sp.</i>	✓		
<i>Rhyzpus sp.</i>			✓
<i>Torula sp.</i>			✓

Caracterización molecular

Los micromicetos identificados hasta nivel de especie, como posibles antagonista del muérdago fueron: *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides* y *Fusarium proliferatum*. De acuerdo a la bibliografía consultada se consideró que estos hongos podrían resultar buenos agentes de control biológico del muérdago enano.

Descripción de los hongos antagonistas identificados

Alternaria alternata (Fr.) Keissl

Hongo filamentoso con conidióforos simples, tabicados, en cuyo extremo se forman unos conidios muriformes, de color pardo, con septos transversales y verticales de disposición irregular. Por gemación de la célula apical se genera un nuevo conidio, formándose largas cadenas con sucesión acrópeta de 10 o más conidios, simples o ramificadas (Fig. 28). Colonias de crecimiento rápido (tres o cuatro días), vellosas, al principio de color gris, después el centro se oscurece (tonos negros más o menos intensos) pero los bordes siguen siendo grisáceos. Reverso de la colonia de color negro (Ulloa y Herrera, 1994).

Las esporas pueden llegar a las plantas sanas por viento, gotas de agua de lluvia o por riego. La producción de conidios es continua en invernaderos. La germinación de los conidios se presenta en la

superficie de la hoja o acícula, cuando las hojas o tallo están mojados, producen de uno a varios tubos germinativos cortos que penetran por los estomas, directamente por la epidermis o aprovechan pequeñas heridas para entrar al tejido y formar una red de hifas entre los espacios intercelulares. Se desarrolla parcialmente dentro del tejido de la planta y parcialmente en la superficie de las hojas, tallos y brotes (Cibrián et al., 2007).

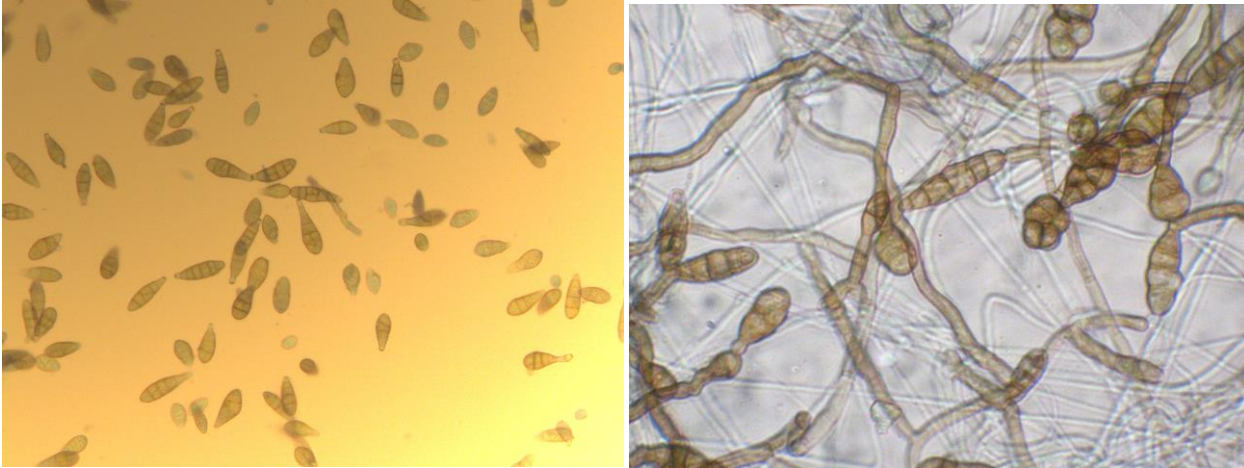


Figura 28. Conidios de *A. alternata*

En pruebas de patogenicidad se reconocen los primeros síntomas a los siete días de la inoculación, entonces se tiene la muerte del tejido. Las masas de conidios aparecen en este tiempo sobre acículas y tallos dándole un tono oscuro a todo el tejido afectado. Las plantas infectadas mueren en pocas semanas (Cibrián et al., 2007).

Este micromiceto es importante en plantas debilitadas, contribuye a la muerte de partes o de toda la planta. Causa una enfermedad ocasional en viveros, siempre asociado a factores de estrés que afectan a la planta. Si se mantiene alta humedad relativa, en viveros, puede causar daño considerable. En plántulas mayores de tres meses el ataque se observa en hojas cercanas al suelo o causa defoliación parcial, por lo que no se considera de importancia el daño. La destrucción que produce en follaje de árboles adultos (tizón), se considera de poca importancia, puede pasar desapercibido ya que sólo afecta a algunos tallos (Cibrián et al., 2007). Es un saprófito extremadamente común y se encuentra en muchos tipos de plantas y otros sustratos incluyendo el suelo. Es cosmopolita (Ellis, 1971).

Es importante señalar que esta especie se observó en la mayoría de los sitios de muestreo y observación, esto al parecer se debió a su carácter cosmopolita, pero además su presencia pudiera ser de interés ya que Hawksworth (1961), la reporta como un agente de control biológico del

muérdago enano. Esta especie soporta temperaturas máximas de 63 °C y mínimas de 0 °C en muestras aisladas; tolerando humedad mínima en el ambiente (Domsch *et al.* 1980). Es considerado saprobio facultativo, siendo patógeno en los momentos en que su hospedero se encuentra débil.

A. alternata ha sido utilizado como control biológico para algunas enfermedades foliares las cuales han reducido en forma significativa (en más de un 50%) al rociar las hojas de las plantas con esporas de este hongo (Agrios, 1991). Shamoun y DeWald (2002) mencionan que *A. alternata* es un hongo parásito asociado con tallos aéreos de muérdago enano.

Cladosporium cladosporioides (Fresen.) GA de Vries (1952)

Es un hongo imperfecto, oportunista y dematiáceo que pertenece a la división *Ascomycota*, clase *Dothideomycetes*, orden *Capnodiales*, familia *Mycosphaerellaceae* y género *Cladosporium*. Presenta hifas septadas, células conidióforas de longitud variable (macro o micronematosas), con ramificaciones laterales simples o poco ramificadas y terminales; conidios elipsoidales, fusiformes, esféricas, rugosas, dispuestas en cadenas acrópetas (cada conidio se produce en el extremo apical de la cadena) y en solitario. El aspecto macroscópico de las colonias es de color amarillento y oliváceo, aterciopelado y polvoriento o piloso (Fig. 29).

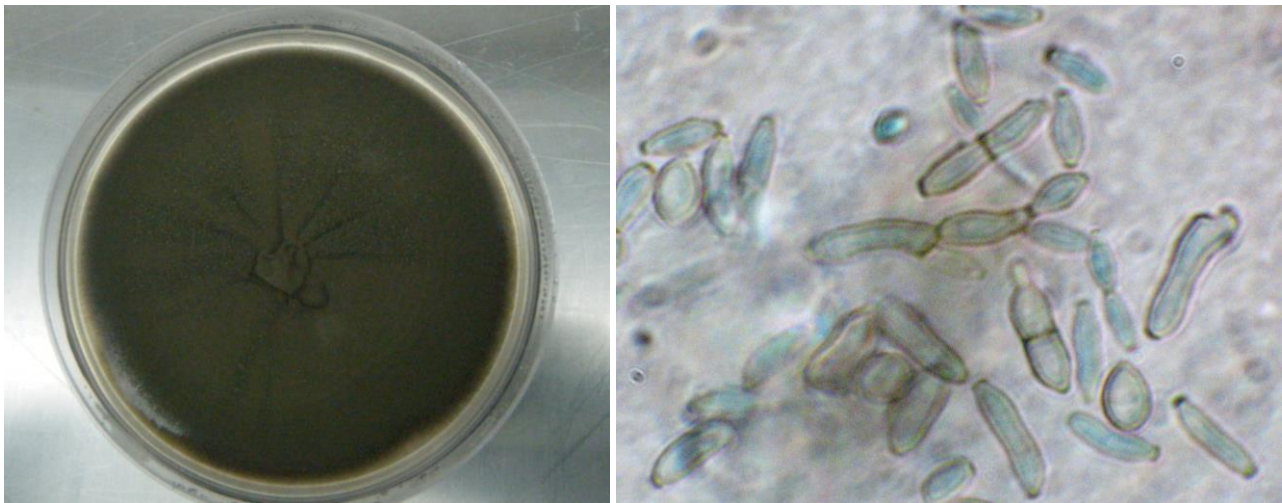


Figura 29. Colonia y conidios de *C. cladosporioides*

Se caracterizan por su capacidad de soportar determinados niveles de sequedad, considerándolas ligeramente xerófilas, aunque de manera general requiere de humedad para crecer porque tiene una actividad de agua elevada (a entre 0.8 y 0.9) lo que indica que requiere valores de humedad relativa, iguales o mayores a 80 % (Nielsen 2003; Górnay, 2004). Una vez que las esporas se establecen en

una superficie húmeda, pueden germinar formando una red de hifas, que siguen creciendo, y si las condiciones son convenientes, se produce la esporulación. Se caracteriza por la liberación de pigmentos oliváceos (melagenina), que forman colonias oliváceas a negras cuando se encuentra en su fase activa de crecimiento.

La patogenicidad de *C. cladosporioides* no se ha aclarado completamente. Los resultados de diversos estudios sugieren que la capacidad de *C. cladosporioides* de parasitar las plantas hospederas examinadas es generalmente limitada. En condiciones favorables, los aislamientos de este hongo fueron capaces de penetrar en las hojas verdes y sanas, pero se limitaron principalmente a las cavidades sub-estromatal y sólo unas pocas células huésped murieron (Smith *et. al* 1988).

Mediante la diseminación de esporas *Cladosporium sp.* ha sido utilizado en las plantaciones de árboles frutales para evitar la infección que causan los patógenos inductores de canchros como *Nectria galligena* y *Cytospora sp* (Agris, 1991).

Fusarium proliferatum (Matsushima) Nirenberg (1976)

Las hifas son septadas y hialinas. Los conidióforos son de longitud media, simple o ramificada. Con células conidiógenas son monofiálides y polifiálides. Microconidios abundantes, unicelulares y clavados, mide 4.5 - 10.5 x 1.3 a 2.5 µm. Macroconidios puede ser poco frecuente, y son muy similares a *Fusarium moniliforme* (Sheldon). Clamidoconidios están ausentes (Nelson *et al.* 1983).

Produce esporas microscópicas en forma de canoa llamadas conidios. Estos conidios asexuales tienen 3-7 células y se producen en hifas especializadas llamadas conidióforos. Un segundo tipo más pequeño, de conidios con células 1 o 2, llamado también microconidios (Fig. 30). El crecimiento de *Fusarium* se ve favorecida por la humedad y temperaturas en un rango de 25-31°C. *F. proliferatum* produce muchas esporas en la superficie del tejido del hospedero infectado. Algunos microconidios también se producen con la descomposición del tejido. Formando masas algodonosas blancas en el tejido enfermo que son esporas y micelios del hongo. Estas esporas son sopladas o se salpican a las plantas cercanas o de otros tejidos sanos (Nelson *et al.* 1983).

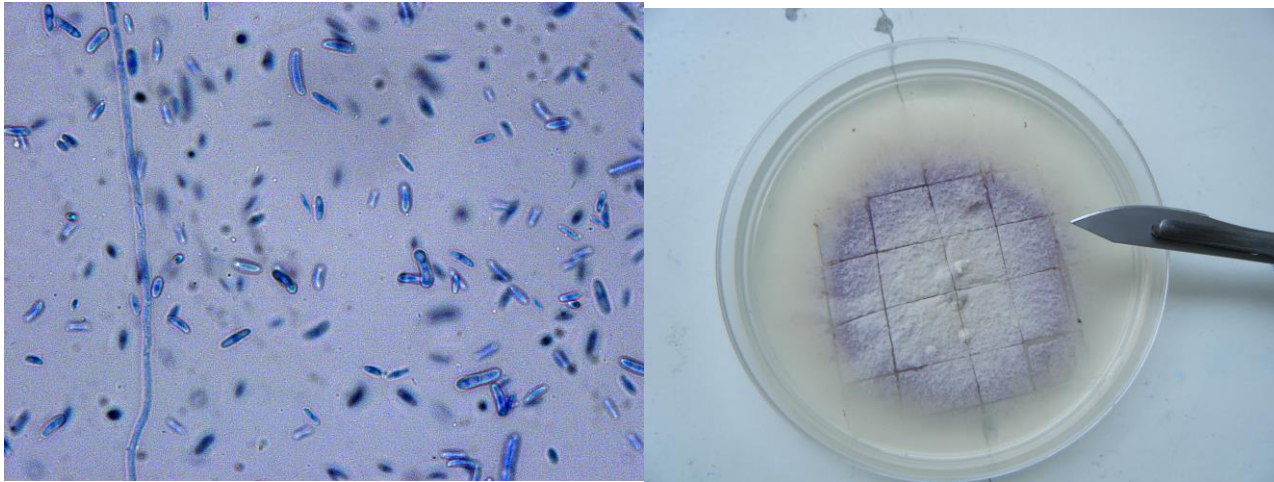


Figura 30. Conidios y colonia de *F. proliferatum*

Se ha detectado que *F. proliferatum* afecta a plantas de orquídeas del género *Dendrobium*, en Hawái. Varias partes de la planta de orquídea son atacadas por este hongo. Los brotes jóvenes son muy susceptibles a la infección y el desarrollo rápido de la enfermedad. Las pudriciones de esta planta matan a muchos y atrofian el crecimiento de los supervivientes. En la orquídea al menos de 9 meses de edad, los nuevos brotes se encuentran ennegrecidos por las infecciones, se pudre lentamente a partir de la punta de la hoja. Las hojas se pierden y todo el extremo apical de los nuevos brotes mueren. Este micromiceto provoca pequeñas manchas ovaladas de borde irregular de 2 – 5 mm, que se expanden lentamente (Uchida, 1966).

Fusarium sp. crece y se reproduce con mayor rapidez en las agallas provocada por nematodos que en otras áreas de la raíz, induciendo así una degradación temprana de los tejidos de la planta infectada (Agrios, 1991).

F. proliferatum se ha citado como patógeno del ajo en el noroeste de los Estados Unidos y Serbia, causando podredumbres húmedas de color pardo en los dientes de los ajos infectados. Recientemente el patógeno se ha descrito en España. En bulbos de las variedades de ajos fueron analizados, detectándose en ellos la presencia de *F. proliferatum*. Hay muy pocas referencias de que este patógeno no pudiera afectar al ajo durante el cultivo, o enfermar a otras especies del género. Resultados obtenidos en pruebas de patogenicidad realizadas en puerro (*Allium ampeloprasum* var. *porrum* (L.) J. Gay) demuestran la capacidad patógena de *F. proliferatum*, donde la enfermedad se localiza en el sistema radicular de la planta, provocando la disminución del peso seco causando el descenso del rendimiento en el cultivo de puerro (García *et al.* 2011).

De acuerdo a los resultados obtenidos los tres hongos patógenos encontrados, coinciden con los reportados por Plascencia (2008) para el muérdago enano (*Arceuthobium sp.*) en el estado de Michoacán: en el que se reporta la aparición de 11 hongos patógenos en el muérdago enano (*Arceuthobium sp.*) entre los que se encuentran: *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.* y *Aspergillus sp.*

Alternaria sp. y *Fusarium sp.* fueron reportados como las especies dominantes en la identificación de hongos del muérdago, lo que concuerda con los estudios realizado para el muérdago enano (*Arceuthobium sp.*) (Plascencia, 2008).

IX.3 Patogenicidad *in vitro* del muérdago enano

Los tres hongos patógenos (*A. alternata*, *C. cladosporioides* y *F. proliferatum*) inoculados en las muestras de muérdago enano, se presentaron a partir del tercer día. El séptimo día las muestras de muérdago inoculadas con *A. alternata* y *F. proliferatum* cubrieron en su totalidad los trozos de muérdago mostrando exudaciones de color café - ámbar; las muestras de muérdago con el hongo *C. cladosporioides* se cubrieron con una delgada capa de micelio blanco sobre el tejido hasta el día 10.

Se presentó una ligera momificación en las muestras de muérdago enano inoculadas con *A. alternata* y *F. proliferatum*; las muestras de muérdago con *C. cladosporioides*, no tuvieron cambios significativos en su estructura. Las muestras control de muérdago enano, no tuvieron ningún cambio a lo largo de los 10 días que duró la prueba (Fig. 31 -33).



Figura 31. Muestra de muérdago enano *A. vaginatum* cubiertas con el hongo *A. alternata* y con exudación en el tejido.



Figura 32. Muestra de muérdago enano *A. vaginatum* cubiertas con el hongo *F. proliferatum* y con exudación en el tejido de color ámbar.

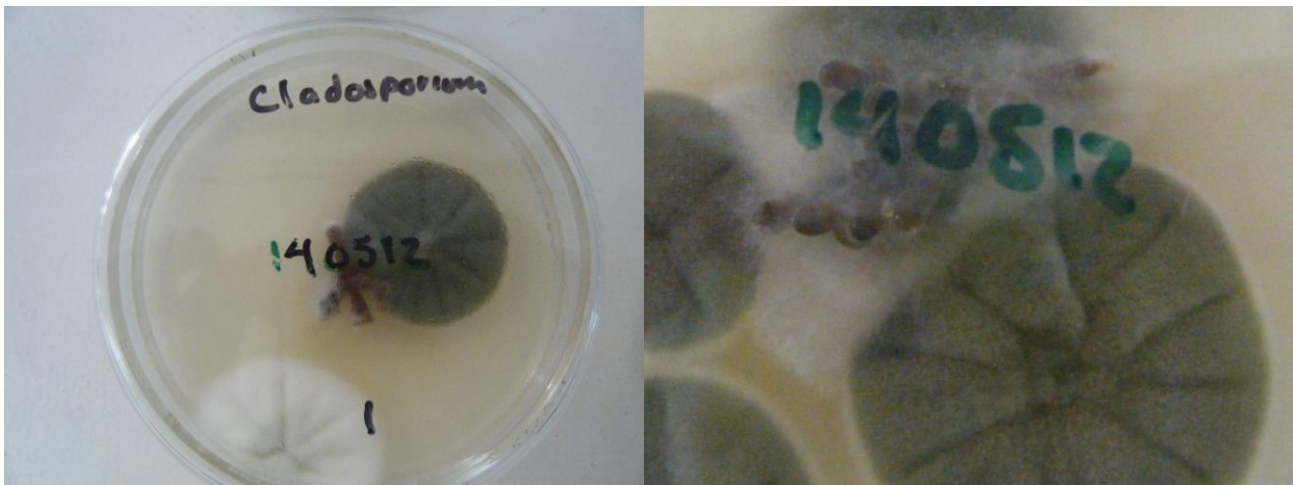


Figura 33. Muestra de muérdago enano *A. vaginatum* cubiertas con micelio blanco del hongo *C. cladosporioides*.

De acuerdo al tiempo en que los hongos patógenos infectaron las muestras de *A. vaginatum*; *A. alternata* y *F. proliferatum* se desarrollan en menor tiempo en comparación de *C. cladosporioides*, el cual hasta el día 10 empezaba a infectar al muérdago, esto va relacionado a que el desarrollo de este hongo es más lento.

El método utilizado para la prueba in vitro tomados de Plascencia *et al.* 2008, resulta eficiente para observar la patogenicidad de las colonias de hongos, así como el crecimiento de estos. Aunque en muchos casos la respuesta observada difiere drásticamente de la reacción que se observa en plantas completas. En consecuencia, esta técnica no siempre puede aplicarse a los procesos que suceden en plantas *in situ* por las variables encontradas en el ambiente (Agrios, 1991)

Con este método, resulta efectivo el estudio de los efectos de los mecanismos que conforman al hongo así como las funciones que tienen en la patogenicidad, en particular las toxinas que secretan; también se puede estudiar las barreras estructurales y las sustancias bioquímicas que producen las células y los tejidos de las variedades vegetales resistentes como mecanismos de defensa, con relación a las reacciones observadas en las variedades susceptibles (Agrios, 1991).

IX.4 Aumento del número de conidios

De los medios de cultivo que se utilizaron para el desarrollo y aumento de conidios, en el que mejor crecieron los tres hongos antagonistas fue el medio agar Papa – Dextrosa; en el medio líquido de Papa – Dextrosa el hongo que tuvo mayor crecimiento fue *Fusarium proliferatum* en comparación con el PDA; en el sustrato (arroz) se desarrolló mejor el hongo antagonista *Cladosporium cladosporioides* en comparación con el medio de PDA.

El número de conidios que se determinó en cada medio de cultivo para cada hongo antagonista se describe en la Tabla 8.

Tabla 8. Números de conidios por mililitro por hongo en cada medio de cultivo

Hongo antagonista	Agar PDA	Papa - dextrosa	Arroz
<i>Alternaria alternata</i>	1,283,000 cc	Micelio	micelio
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	998,333 cc	Micelio	5,162,506 cc
<i>Fusarium proliferatum</i>	3,216,000 cc	25,292,500 cc	micelio

*conidios (cc)

En base a los resultados anteriores se eligió utilizar agar PDA para la propagación de *Alternaria alternata* (Fig. 36), sustrato (arroz) para *Cladosporium cladosporioides* (Fig. 35) y el medio líquido de Papa – Dextrosa para *Fusarium proliferatum* (Fig. 34). La determinación de la cantidad de medio de cultivo necesario para cada uno de los hongos antagonistas se tomó como base que la concentración mínima necesaria que es de 1×10^6 conidios por mililitro, en 30 litros de agua por cada sitio (Fig. 37) (Tabla 9).

Tabla 9. Medios de cultivo utilizados para la propagación de hongos antagonistas

Hongo	Medio de cultivo	Cantidad	Agua	Concentración de conidios
<i>Fusarium proliferatum</i>	Papa – Dextrosa (Líquido)	118.61 ml	30 lt	1X10 ⁶ conidios/ml
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Sustrato (Arroz)	581 g	30 lt	1X10 ⁶ conidios/ml
<i>Alternaria alternata</i>	Papa – Dextrosa – Agar	34 cajas	30 lt	1X10 ⁶ conidios/ml

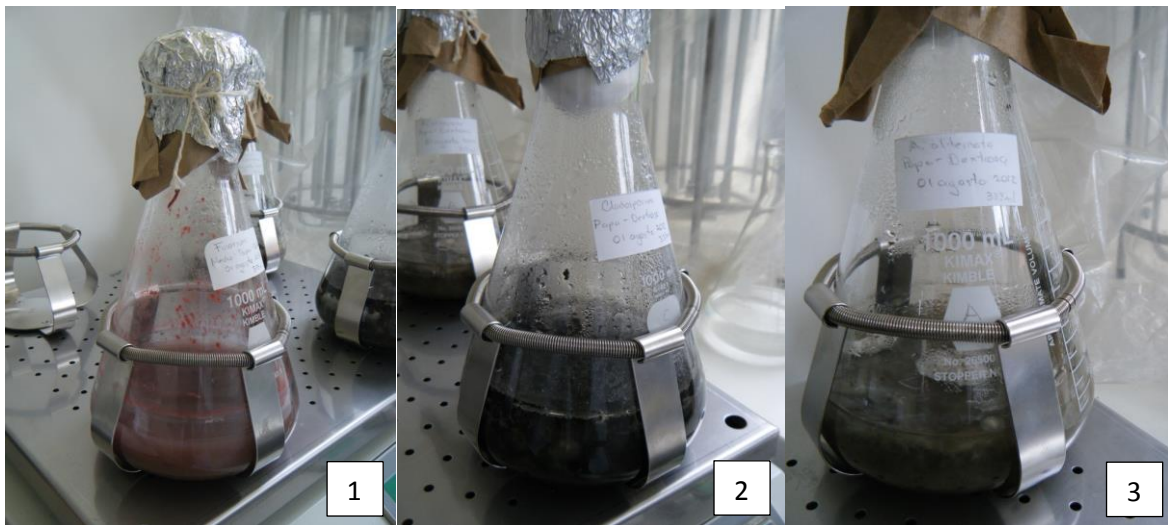


Figura 34. Medio de cultivo líquido de Papa – Dextrosa, con los hongos antagonistas del muérdago enano: *F. proliferatum* (1), *C. cladosporioides* (2) y *A. alternata* (3).



Figura 35. Bolsas con sustrato (arroz) inoculados con los hongos antagonistas del muérdago enano (1). Crecimiento de *C. cladosporioides* en el sustrato (2).

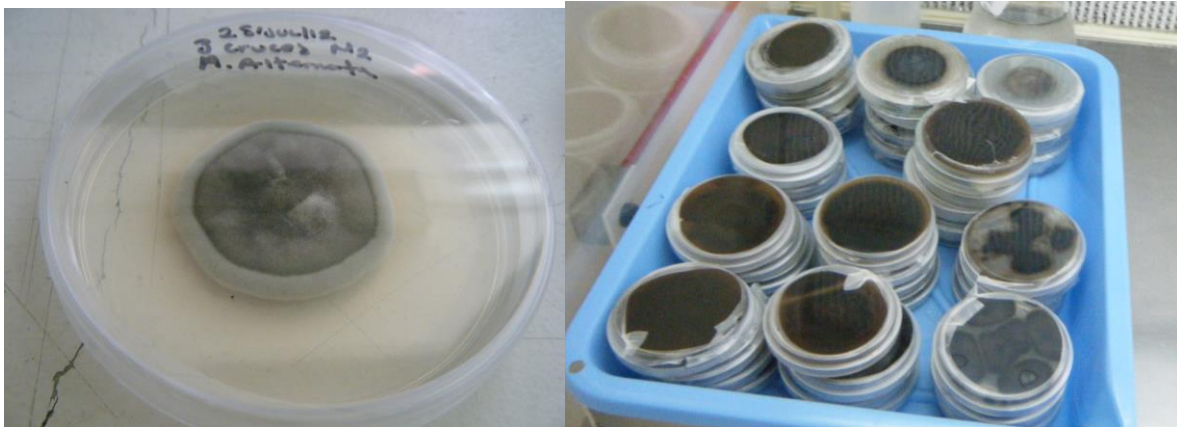


Figura 36. Cajas con crecimiento de *A. alternata* en medio de cultivo PDA.

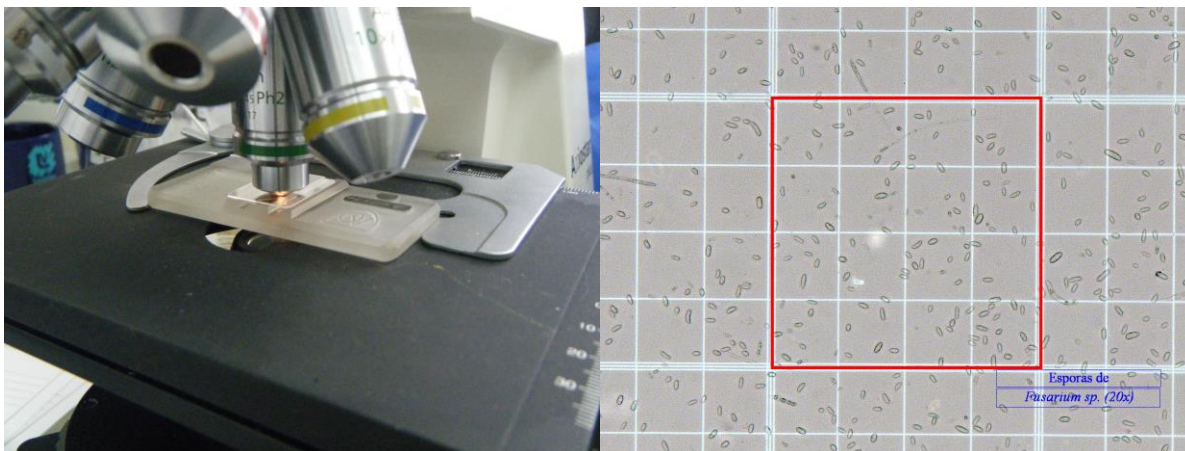


Figura 37. Conteo de conidios con la Cámara Neubauer.

Como todos los organismos vivos, los microorganismos requieren de ciertos nutrientes básicos y factores físicos para su mantenimiento, estas necesidades varían según el tipo de microorganismo. Es preciso conocer las necesidades nutricionales de cada organismo para suministrarlas en el laboratorio, mediante el uso de medios de cultivo artificiales, así como las necesidades físicas óptimas de los siguientes factores: temperatura, pH y gases, los cuales se deben encontrar en un rango óptimo específico para cada microorganismo; por lo tanto su variación puede acelerar o disminuir el crecimiento de los hongos (Rojas-Treviño, 2011).

De acuerdo a Quintero *et al.* (2008), para el cultivo de organismos, como los micromicetos, es necesario considerar varios aspectos como: a) presencia de mutaciones, b) pérdida parcial o total de la patogenicidad, c) los hongos pueden o no formar cuerpos fructíferos en medios artificiales; estos cuerpos pueden presentar variación, d) en hongos que no se pueden cultivar (parásitos obligados) y

otros que requieren medios complejos para su desarrollo. Por lo tanto es necesario utilizar el medio de cultivo correcto para tener una buena producción de conidios.

Mediante el uso del medio líquido se fomenta el rápido crecimiento micelial y de cuerpos fructíferos. La principal ventaja de este proceso es la rápida colonización y formación de conidios del hongo, reduciendo el tiempo de incubación, por lo tanto es el método de producción más económico. En la producción industrial, los hongos son llevados a un cultivo líquido en grandes recipientes de fermentación que son controlados y monitoreados electrónicamente. El medio líquido usado en la etapa de producción debe contener una fuente de carbono como energía y nitrógenos como elemento útil, además de elementos traza, esenciales para el crecimiento de los hongos (Jenkins, *et al.* 1998).

Los medios de cultivo más conocidos para hongos en la práctica son agar Papa Dextrosa-PDA, Agar Oxitetraciclina-Glucosa-Extracto de Levadura-Ogy y agar Saboraud. Estos medios son muy utilizados para el crecimiento de hongos patógenos. Su acción selectiva se debe a su alta concentración de azúcar y bajo pH (Rojas-Treviño, 2011).

IX.5 Pruebas de viabilidad

Los resultados de las pruebas de viabilidad se observaron crecimiento hifal a las 8 horas de haberlos inoculado en la caja de con medio de cultivo, confirmando que los conidios resultantes de la producción de conidios, estuvieron vivos y viables, para seguir con la siguiente etapa del proyecto (Fig. 38).

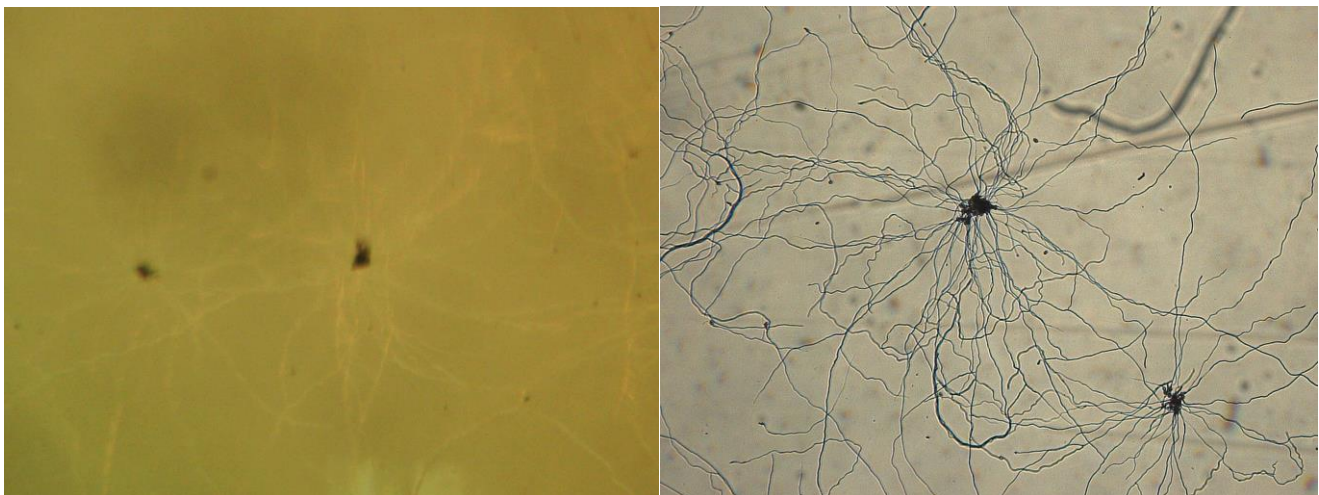


Figura 38. Desarrollo de hifas en los conidios de los hongos antagonistas obtenidos de la producción y aumento.

IX.6 Inoculación de hongos antagonistas en campo

Para la inoculación de los hongos antagonistas se consideraron los siguientes aspectos:

a). De acuerdo a la prueba de patogenicidad *in vitro* los hongos *A. alternata*, *C. cladosporioides* y *F. proliferatum*, fueron efectivos contra las muestras de *A. vaginatum*, se procedió a la aplicación en campo. Como los hongos fueron aislados de los muérdagos de las zonas, no se introdujo especies que a otros seres vivos o que afecten el ambiente.

b) Se utilizó el equipo adecuado y bien calibrado, con la finalidad de colocar el inóculo de hongos antagonistas en las matas de muérdago enano con la dosis y cobertura suficiente para proporcionar buen control. Las aplicaciones defectuosas dan como resultado controles deficientes y necesidad de nuevas aplicaciones, así como daños fitotóxicos al cultivo por exceso en la dosis, pérdidas económicas por requerirse más producto, mayor número de horas máquina y horas hombre, y pérdidas en la producción (Urzúa, 1989).

c) Las aplicaciones se realizaron en horarios donde hubo menos radiación, lo cual reduce el gasto de producto y se puede tener mayor establecimiento del inóculo sobre el objetivo.

d) Las aplicaciones se realizaron después del tiempo de lluvias para evitar que el inóculo se pierda con las lluvias, pero con la suficiente humedad para que los hongos antagonistas pudieran desarrollarse e infectar a la planta parásita. De esta manera no se vuelve a aplicar de manera innecesaria sino sólo aquellas que técnicamente sean justificadas, y desde luego, tomando en cuenta la relación beneficio-costos de la aplicación del inóculo y el posible deterioro del medio por contaminación (Urzúa, 1989).

Escala Hawksworth

Los datos obtenidos para los grados de infestación de muérdago enano, mediante la escala Hawksworth, a los 30, 60 y 90 días, no reflejaron cambios en ninguna de las evaluaciones con respecto a la evaluación realizada antes de la inoculación de los hongos antagonistas (*Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides* y *Fusarium proliferatum*) (Tabla 10). De igual forma no hubo diferencia en ninguno de los sitios inoculados: Huilapa y Tres cruces, cerca de la Estación

Experimental Zoquiapan en el Parque Nacional Iztaccihuatl – Popocatépetl; y en el Camino 58 – 59 en el Parque Nacional La Malinche (Tabla 10).

La falta de cambio significativo durante las evaluaciones, puede explicarse a que la escala Hawksworth (1977), registra nivel de infestación de muérdago enano y no cambios en la estructura del organismo (es decir, solo presencia o ausencia de muérdago). Pero obtener registros con posibles cambios, es necesario mayor tiempo para observar si hay un efecto significativo en los tratamientos biológicos inoculados.

En el mundo biológico existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen a que en la mayoría de los casos no se desarrollen las enfermedades. En condiciones naturales los microorganismos están en un equilibrio dinámico en la superficie de las plantas (Fernández – Larrea, 2001).

Evaluación de los síntomas del muérdago enano

Los resultados de las evaluaciones de los síntomas, fueron separados por sitio, tiempo y por tratamiento, de esta forma se pudo realizar interacciones entre los efectos, decidiendo cual es el mejor hongo antagonista, en que tiempo de evaluación funciono mejor y el sitio donde se presentó mayor diferencia significativa.

Las ANOVAs de medidas repetidas señalaron que el tiempo, el tratamiento de los hongos antagonistas, el sitio y las interacciones del tiempo x tratamiento de los hongos antagonistas y el tiempo x sitio tuvieron un efecto significativo sobre la coloración de los muérdagos. Asimismo el tratamiento tuvo un efecto significativo sobre el machitamiento del muérdago enano (Tabla 10).

En contraste, no se encontró un efecto significativo del tratamiento de los hongos antagonistas, el sitio y las interacciones del tiempo x el tratamiento de los hongos antagonistas, el tiempo x el sitio, el tratamiento de los hongos antagonistas x el sitio y el tiempo x el tratamiento de los hongos antagonistas x el sitio en efecto, sobre el decaimiento del muérdago enano y los grados de infestación de la escala Hawksworth.

En cuanto al manchado, necrosis y cancro del muérdago enano, no hubo un efecto del tiempo, el tratamiento de hongos antagonistas y el sitio, así como de las interacciones entre estos (el tiempo x el tratamiento de hongos antagonistas, el tiempo x el sitio, el tratamiento de hongos antagonistas x el sitio y el tiempo x el tratamiento de hongos antagonistas x el sitio)(Tabla 10).

Tabla 10. Resultados de los ANOVAs de medidas repetidas para determinar el efecto del tiempo, el tratamiento de los hongos antagonistas (*A. alternata*, *C. cladosporioides*, *F. proliferatum*), el sitio y las interacciones entre estos sobre los síntomas del muérdago enano *A. vaginatum* (coloración, manchado, necrosis, marchitamiento y cancro) y la medida de los grados de infestación. Se muestra que los valores de las variables no cambian a lo largo de los cuatro registros (ND* No Determinado).

Síntomas	ANOVA de medidas repetidas			Esfericidad de Mauchly			
	Efecto	F	g.l.	P	χ^2	g.l.	P
Coloración	Tiempo	78.2	1	0.00	12.95	5	0.02
	Tratamiento	5.53	1	0.04	5.02	5	0.41
	Sitio	7.81	1	0.03	4.05	2	0.10
	Tiempo × Tratamiento	1.51	1	0.00	ND	44	1.00
	Tiempo × Sitio	13.22	1	0.00	53.68	20	0.00
	Tratamiento × Sitio	1.75	1	0.68	17.8	20	0.64
	Tiempo × Tratamiento × Sitio	0.77	1	0.40	ND	170	1.00
	Marchitamiento	Tiempo	51.9	1	0.00	ND	5
Tratamiento		6.85	1	0.28	3.09	5	0.06
Sitio		0.00	1	1.00	1.06	2	0.58
Tiempo × Tratamiento		0.00	1	0.24	ND	44	1.00
Tiempo × Sitio		1.54	1	1.00	ND	20	1.00
Tratamiento × Sitio		0.11	1	0.74	14.6	20	0.82
Tiempo × Tratamiento × Sitio		0.77	1	0.40	ND	170	1.00
Manchado		Tiempo	1.00	1	0.34	ND	5
	Tratamiento	1.00	1	0.34	ND	5	1.00
	Sitio	1.00	1	0.34	ND	2	1.00
	Tiempo × Tratamiento	1.00	1	0.34	ND	44	1.00
	Tiempo × Sitio	1.00	1	0.34	ND	20	1.00
	Tratamiento × Sitio	1.00	1	0.34	ND	20	1.00
	Tiempo × Tratamiento × Sitio	1.00	1	0.34	ND	170	1.00
	Necrosis	Tiempo	1.00	1	0.34	ND	5
Tratamiento		1.00	1	0.34	ND	5	1.00
Sitio		1.00	1	0.34	ND	2	1.00
Tiempo × Tratamiento		1.00	1	0.34	ND	44	1.00
Tiempo × Sitio		1.00	1	0.34	ND	20	1.00
Tratamiento × Sitio		1.00	1	0.34	ND	20	1.00
Tiempo × Tratamiento × Sitio		1.00	1	0.34	ND	170	1.00
Cancro		Tiempo	1.00	1	0.34	ND	5
	Tratamiento	1.00	1	0.34	ND	5	1.00
	Sitio	1.00	1	0.34	ND	2	1.00
	Tiempo × Tratamiento	1.00	1	0.34	ND	44	1.00
	Tiempo × Sitio	1.00	1	0.34	ND	20	1.00
	Tratamiento × Sitio	1.00	1	0.34	ND	20	1.00
	Tiempo × Tratamiento × Sitio	1.00	1	0.34	ND	170	1.00
	Hawksworth	Tiempo	ND	1	1.00	ND	5
Tratamiento		8.64	1	0.01	8.81	5	0.11
Sitio		5.62	1	0.42	2.39	2	0.30
Tiempo × Tratamiento		-	1	1.00	ND	44	1.00
Tiempo × Sitio		-	1	1.00	ND	20	1.00
Tratamiento × Sitio		0.04	1	0.83	29.09	20	0.11
Tiempo × Tratamiento × Sitio		0.00	1	1.00	ND	170	1.00

Pruebas de Fisher LSD

Los resultados de las pruebas de Fisher LSD realizado a los 30 días de la aplicación, mostró que existe diferencia significativa en el tratamiento de hongo antagonista *Alternaria alternata* para el control del muérdago enano con respecto a los demás tratamientos, en la variable de marchitamiento (Tabla 11, Fig. 39).

Tabla 11. Prueba de *post hoc* de Fisher LSD a 30 días de la aplicación de la inoculación del tratamiento del hongo antagonista *Alternaria alternata*.

Marchitamiento				
Tratamiento	N ¹	\bar{x} ²	S ³	E.E. ⁴
<i>Alternaria alternata</i>	40	0.56	0.5	0.09
<i>Fusarium proliferatum</i>	40	0.4	0.56	0.10
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	40	0.43	0.56	0.10
Testigo	40	0.13	0.34	0.06

¹ Número de repeticiones
² Media
³ Desviación Estándar
⁴ Error Estándar

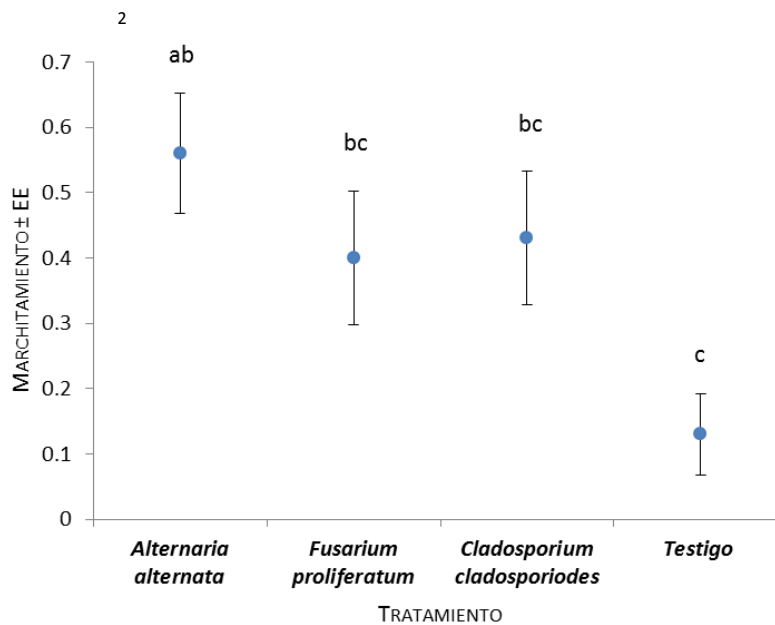


Figura 39. Resultado de las pruebas de comparación de Fisher LSD en la evaluación a los 30 días entre tratamientos inoculados para el control de muérdago enano (*A. vaginatum*). Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

Los resultados del análisis estadístico realizado a los 90 días de la aplicación de el tratamiento de *Fusarium proliferatum* para el control de muérdago enano (*Arceuthobium vaginatum*), mostró diferencia significativa entre los demás tratamientos en la variable de coloración (Tabla 12) (Fig. 40).

Tabla 12. Prueba de Fisher LSD a 90 días de la aplicación de la inoculación del tratamiento del hongo antagonista *Fusarium proliferatum* para el control de muérdago enano (*A. vaginatum*).

Coloración				
Tratamiento	N¹	\bar{x}²	S³	E.E.⁴
<i>Alternaria alternata</i>	40	0.6	0.62	0.11
<i>Fusarium proliferatum</i>	40	0.63	0.66	0.12
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	40	0.5	0.62	0.11
Testigo	40	0.26	0.44	0.08

¹ Número de repeticiones

² Media

³ Desviación Estándar

⁴ Error Estándar

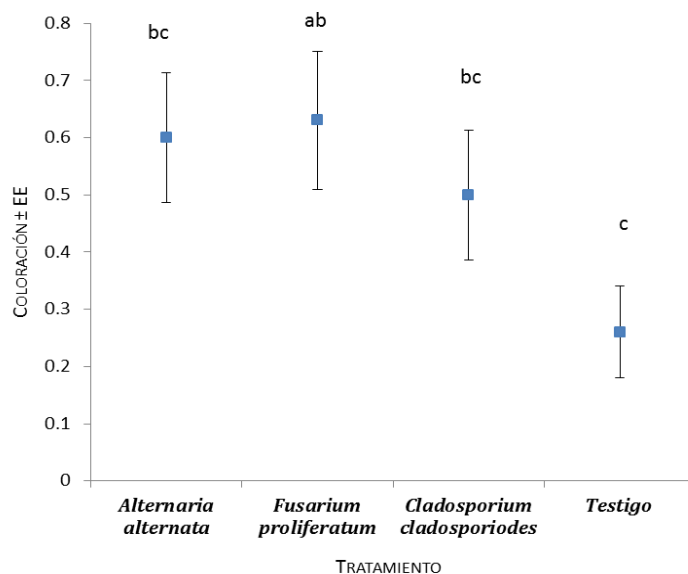


Figura 10. Resultado de la pruebas de comparación de Fisher LSD en la evaluación a los 90 días, entre tratamientos inoculados para el control de muérdago enano (*A. vaginatum*).

De acuerdo a la prueba de Fisher LSD para la variable de coloración entre los Tratamientos de hongos antagonistas x Tiempo, solo *Fusarium proliferatum* tuvo diferencias significativas a los 90 días de la evaluación con respecto a los tres tratamientos *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides* y el testigo (Fig. 41).

Alternaria alternata y *Fusarium proliferatum* tuvieron aumento en el cambio de coloración a los día 60 despues de la inoculación con respecto al tratamiento testigo. El tratamiento con el hongo *Cladosporium cladosporioides* tuvo un aumento significativo en el cambio de coloración a los 30 días de la inoculación y después se mantuvo constante a los 60 y 90 días.

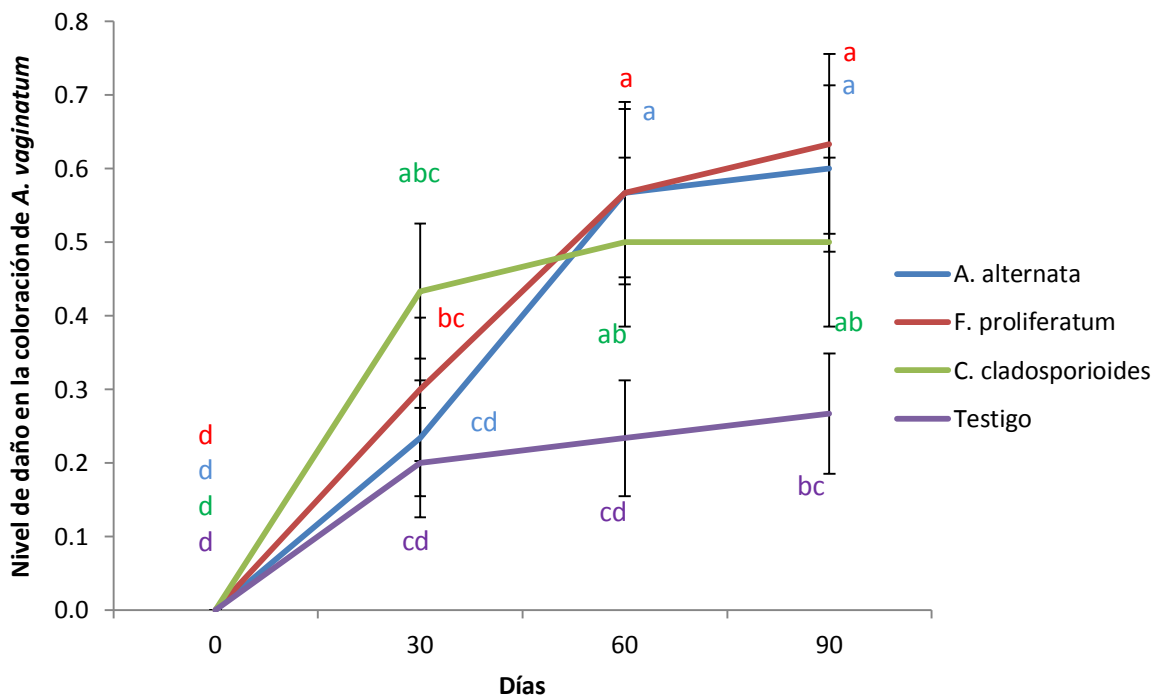


Figura 41. Prueba de Fisher LSD HDS de la variable de coloración de Tratamiento x Tiempo, con un intervalos de confianza de 0.95. Donde las letras distintas indican diferencia significativa ($P < 0.05$)

Para la prueba de Tukey con la variable de coloración entre los sitios Huilapa, Tres Cruces y Camino 58 - 59, se observo mayor nivel de daño en el sitio de Huilapa a partir de el día 30 despues de la inoculación, aumentando significativamente a comparación de los otros dos sitios (Tres Cruces y Camino 58 – 59) a los 60 días y 90 días.

A partir del día 30 se observa mayor diferencia significativa en el sitio Huilapa en comparación con el sitio ubicado en el Camino 58 - 59 y este a su vez es mayor a el sitio en ubicado en Tres Cruces.

En el día 60, Huilapa aumento la diferencia significativa en cuanto a los sitios Camino 58 - 59 y Tres Cruces.

A los 90 días el Huilapa aumento nuevamente la diferencia significativa en comparación con el sitio Camino 58 - 59 que siguió en el mismo nivel, el sitio Tres Cruces aumento pero sin diferencia significativa con respecto al sitio Camino 58 – 59 (Fig. 41).

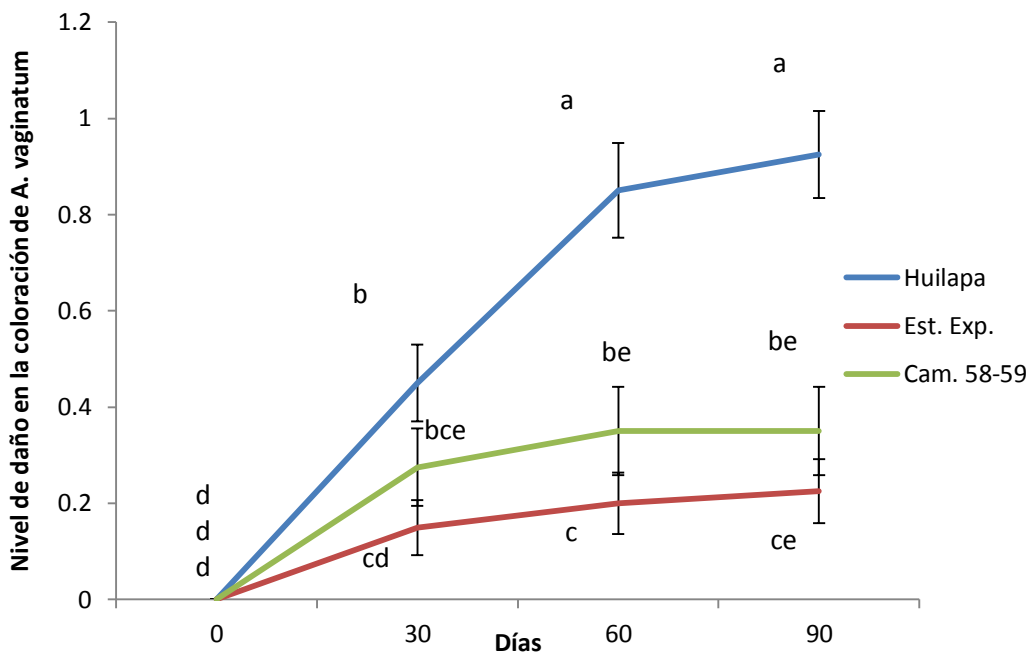


Figura 42. . Prueba de Fisher LSD de la variable de coloración de Sitio x Tiempo, con un intervalos de confianza de 0.95. Donde las letras distintas indican diferencia significativa ($P < 0.05$)

De acuerdo a al análisis estadístico, solo dos síntomas tuvieron diferencia significativa: cambio de coloración de los tallos de muérdago enano y presencia de marchitez. Tales síntomas fueron causados por dos hongos antagonistas; *A. alternata* para el síntoma de marchites y *F. proliferatum* para el síntoma de coloración.

Los hongos antagonistas que tuvieron efecto en el estudio fueron: *A. alternata* a los 30 días de la inoculación; *F. proliferatum* tuvo efecto en la tercera evaluación a los 90 días y *C. cladosporioides* no

tuvo diferencia significativa en ninguna de las evaluaciones. Aunque los resultados no fueron significativos para *Cladosporium cladosporioides*, posiblemente necesite mayor tiempo para desarrollarse, debido a que este hongo crece con mayor lentitud, como se observó en las pruebas del laboratorio.

Trabajos como el O'Donnell *et al.* (1980) demuestran que *A. alternata* y *C. cladosporioides*, pueden ser considerados como hongos parásitos en los tejidos de plantas débiles. Debido a que son capaces de penetrar en las hojas a través de los estomas y pueden mantenerse dentro de la cavidad subestomática. El desarrollo de micelio intercelular, puede causar que algunas células del mesófilo se tornen necróticas, provocando una pérdida acelerada de la clorofila en las hojas infectadas y un aumento en sus niveles de ribonucleasa.

Tomando en cuenta que estas colonias son capaces de penetrar en hojas sanas, el efecto se produce lentamente y solo cuando las condiciones son excepcionalmente favorables para el crecimiento de hongos, con una humedad cercana al punto de saturación y a una temperatura de 20-25 °C, solo así la infección puede ser entre 1-14 días. Estas condiciones ambientales son probablemente poco comunes en el campo. Sin embargo, a veces ocurren condiciones adecuadas para el crecimiento de estos hongos (O'Donnell *et al.* 1980).

El micromiceto *C. cladosporioides* se caracteriza por desarrollar un metabolito secundario llamado "Cladosporol", el cual es un inhibidor de la biosíntesis de β -1,3-glucano; el cual se presenta en las plantas como celulosa (Youji *et al.* 1995).

Los patrones de crecimiento de *Fusarium proliferatum* así como su producción de fumonisinas son respuesta a temperatura estrés hídrico. La luz es una señal muy importante para los hongos ya que influye en muchas de las respuestas fisiológicas, tales como la pigmentación, reproducción sexual asexual, el metabolismo secundario donde encontraríamos a la producción de toxinas. Existen numerosos genes que codifican proteínas implicadas en la detección de la luz y puede activar las respuestas fisiológicas y morfológicas (Marín *et al.* 1998).

F. proliferatum producen grandes cantidades de enzimas hidrolíticas como N-acetil- β -D-glucosaminidasa y β -glucosidasa, los cuales degradan las capas de la planta para poder infectar (Marín *et al.* 1998). Los micromicetos han desarrollado diferentes estrategias para invadir las semillas y otros tejidos de la planta. En general, secretan un cóctel de enzimas hidrolíticas incluyendo cutinasas, celulasas, pectinasas y proteasas (Knogge, 1996). Sin embargo la penetración de las

plantas se puede lograr simplemente por la entrada a través de aberturas naturales de la planta (Marín *et al.* 1998).

Todo lo anterior demuestra la importancia que representan estos hongos como factores biológicos de control en la naturaleza, por lo tanto es importante seguir con esta línea de investigación con la finalidad de desarrollar un medio de inoculación en el campo que asegure la entrada de conidios a la planta de *A. vaginatum*.

Determinación de la presencia de los tratamientos en el muérdago enano por sitio

De acuerdo a los resultados del análisis χ^2 utilizado para determinar la relación entre los hongos identificados por sitio con los hongos antagonistas del muérdago enano inoculados, se concluyó que los hongos identificados no dependen de los tratamientos inoculados para el control del muérdago enano ($\chi^2= 0.05$ g.l.=9 , $P= 16.92$) (Tabla 13).

Por lo tanto no se realizó pruebas *post hoc* de residuos estandarizados ya que los tratamientos en este análisis no resultaron significativo.

Tabla 13. Tabla de contingencia de χ^2 para la determinación de los tratamientos de los hongos antagonistas inoculados en los sitios de Huilapa, Tres Cruces y Camino 58 – 59.

Prueba de χ^2			
Sitio	χ^2	g.l.	P^6
Huilapa	3.57937362	9	0.93
Tres Cruces	3.9032323	9	0.91
Camino 58-59	0.06397281	9	0.99
Global	2.54577604	9	0.97

⁵ Grados de libertad
⁶ Probabilidad

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo en la fase de laboratorio, es probable que los hongos antagonistas *A. alternata*, *C. cladosporioides* y *F. proliferatum*, puedan ser utilizados como

control biológico del muérdago enano. Por lo tanto, las posibilidades de que los efectos no tuvieran los mismos efectos *in situ* como *in vitro* pueden ser por las siguientes causas:

Aunque la aplicación con la mochila de aspersión se realizó de la manera correcta de acuerdo a los pasos descritos por Urzúa (1989), posiblemente necesite otro métodos de aspersión en el que se asegure que los conidios entran en la planta parasita; posiblemente con heridas pequeñas en el muérdago o poda antes de aplicar los hongos.

El ambiente como el ciclo de vida del muérdago enano y los hongos antagonistas, son variables que dificultan la acción de los hongos antagonistas (Agrios, 1991), pero si se consideran aspectos como el tiempo de desarrollo de cada hongo en el momento de la aspersión, podría aumentarse la cantidad de evaluaciones y el tiempo entre estas.

Además de las variables del ambiente, también existen interacciones con otros hongos, los que posiblemente inhiban el crecimiento de los hongos inoculados dependiendo la época del año en que se inocule. Del mismo modo es necesario aplicar los hongos antagonistas en diferentes ciclos de vida del *A. vaginatum*, ya que probablemente en alguna de estas etapas, se encuentre tan vulnerable como para facilitar la entrada y daño de estos hongos.

XI. CONCLUSIONES

1. Las lesiones más comunes en las muestras de muérdago enano, fueron canchales, manchas irregulares de color café, marchitamiento, flacidez de las ramas, necrosis y daños por insecto.
2. Se identificaron 10 hongos asociados al muérdago enano (*A. vaginatum*): *Alternaria alternata*, *Alternaria citri*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sp.*, *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, *Pithomyces sp.*, *Rhizopus sp.* y *Torula sp.*
3. Se determinó morfológica y molecularmente a los hongos antagonistas: *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides* y *Fusarium proliferatum*. Cabe mencionar que para *F. proliferatum* no existen reportes de su presencia en el muérdago enano.
4. Las pruebas *in vitro* sobre la patogenicidad de los hongos antagonistas *A. alternata*, *C. cladosporioides* y *F. proliferatum*, demostraron un daño ligero en la planta parásita, debido a que probablemente fue poco tiempo de evaluación.
5. La producción de conidios de los hongos antagonistas tuvo diferente respuesta dependiendo de las necesidades nutricionales de cada micromiceto, así tenemos que para *A. alternata* se desarrolla mejor en medio de cultivo de PDA, mientras que para *C. cladosporioides* se propaga bien en el sustrato (Arroz), en cambio *F. proliferatum* tuvo mejor respuesta en medio líquido Papa – Dextrosa.
6. Estadísticamente ninguno de los tratamientos ocasionó la caída de los brotes aéreos del muérdago enano.
7. Solo dos de los hongos antagonistas inoculados al muérdago ocasionaron diferente respuesta (sintomatología) De esta forma *A. alternata*, produjo un ligero marchitamiento a los 30 días de la inoculación sobre *A. vaginatum*, mientras que *F. proliferatum* ocasionó un cambio leve de coloración del hospedante a los 60 y 90 días de la inoculación.
8. La zona donde hubo mayor diferencia significativa de acuerdo al nivel de infestación fue Huilapa en el Parque Nacional la Malinche.
9. Los hongos obtenidos en el laboratorio de las muestras de muérdago enano inoculadas con los hongos antagonistas, no dependen de los tratamientos inoculados para el control del muérdago enano.
10. El desarrollo de este estudio permitió esbozar un protocolo para el empleo de hongos antagonistas del muérdago enano (*Arceuthobium vaginatum*). Sin embargo conviene modificar el o los métodos de inoculación *in situ*.

XII. RECOMENDACIONES

1. Es posible que exista una asociación entre ataques de insecto y la presencia de hongos antagonistas, es recomendable estudiar más asociaciones de organismos para el control biológico.
2. La entrada de los hongos antagonistas en la estructura interna del muérdago enano es de vital importancia para su efectividad, por lo cual es conveniente desarrollar un método que ocasione daños en el tejido de la planta parásita.
3. La integración de métodos de control biológico con otros métodos de manejo como la utilización de productos químicos tendría mayor efectividad para el control del muérdago enano *A. vaginatum*.
4. Debido a que *F. proliferatum* tuvo mayor efecto después de los 60 días de la inoculación, se recomienda ampliar los periodos de evaluación.
5. Es necesario realizar más investigaciones en cuanto a los métodos de control biológico.

XIII. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de medio para el cultivo de hongos del muérdago

Procedimiento para la elaboración de Agar-Papa-Dextrosa (PDA).

1. Se peso 39gr. del medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) y se agregó 1 litro de agua destilada, y se mezcló en un matraz Erlenmeyer con capacidad de 2000 ml. Se agito sobre la flama hasta que se obtuvo homogeneidad en la solución.
2. Posteriormente se esterilizo en la autoclave, a una presión de 15 libras y una temperatura de 120 ° C, durante 15 minutos. Este proceso dura aproximadamente 40 minutos.
3. El medio esterilizado se dejó enfriar hasta una temperatura aproximada de 40°C o hasta su manipulación al tacto y se vertió en cajas Petri, a razón de 20 ml por caja aproximadamente. El cuarto así como el material debe estar esterilizado, también es necesario utilizar cubre bocas en el momento del vaciado, para evitar contaminaciones.
4. Las cajas con el medio el PDA, se dejaron incubar a 27°C durante dos días, como prueba de esterilización. Así las cajas contaminadas después de este tiempo se desechan y se puede trabajar con aquellas en las que no se presento ningún contaminante.
5. Después de esta prueba de esterilización (48 horas), se realizó la siembra de las muestras de muérdago con presencia de daño por hongo.

Anexo 2. Preparación de medios de cultivo para la propagación de conidios

Procedimiento para la preparación de Agar – Agar (Agar agua).

1. En un matraz Erlenmeyer de capacidad de 2000 ml se agregan los 16 g de Agar y se disuelve en un litro de agua destilada, se calienta la mezcla hasta observar que la mezcla esta homogenizada.
2. Una vez disuelto y homogenizado el Agar en el agua destilada se procede a la esterilización en la autoclave durante 15 minutos a 120°C y 15 libras de presión.
3. Esterilizado el medio se deja enfriar a temperatura ambiente o con ayuda de paños húmedos con agua fría para acelerar el proceso, cuando se alcanza una temperatura de aproximadamente 40°C o una temperatura en la que sea posible manipular, se realiza el vaciado en cajas Petri a un poco menos de la mitad de la caja.

Preparación del sustrato arroz para la propagación y aumento de conidios

1. Se separaron 200 grs. de arroz en vasos de precipitado de capacidad de 500 ml, los cuales se remojaron en agua destilada durante dos horas para eliminar impurezas.
2. Mediante el uso de un colador de capacidad suficiente se filtro el exceso de agua, dejando húmedo el arroz, se depositó/ vació en la bolsa de polipropileno de alta densidad y se amarro. NOTA. Como precaución de una posible rotura por el incremento de vapor en el interior de la bolsa se depositaron en doble bolsa de polipropileno.
3. Las bolsas con arroz fueron esterilizadas en la autoclave durante 90 minutos a 120°C y 15 lb de presión.
4. Una vez esterilizado, se dejó enfriar a temperatura ambiente para su posterior manipulación.
5. El arroz se dejo durante 48 horas como prueba de esterilidad/ libre de contaminación.
6. Una vez que se enfrió el sustrato, se depositaron cuadros de 1 x1 cm de Agar PDA con el crecimiento del hongo. Después se cerraron las bolsas y se metieron en la incubadora a una temperatura de 25°C, fotoperiodo 12:12h.por 10 días.
7. Las bolsas se revisaron diariamente para verificar el crecimiento de los hongos y descartar aquellas que estuvieran contaminadas.
8. Transcurridos los 7 días de incubación, se tomó 1 g por cada bolsa y fueron diluidos en 9 ml de agua destilada y solución de tween 80 al 0.1% para realizar la remoción de conidios. Con la

solución obtenida se realizaron diluciones seriadas base 10 hasta 10⁻¹⁰ y se realizó nuevamente el recuento de conidios en la cámara de Neubauer.

9. El procedimiento de la matriz de fermentación fue llevado a cabo con cinco repeticiones manteniendo las mismas condiciones de cultivo; del mismo modo se llevaron a cabo los recuentos en la cámara de Neubauer en cada una de las muestras con seis repeticiones en cada una de ellas.

Preparación del medio líquido Papa - Dextrosa para la propagación y aumento de conidios

El medio líquido papa- dextrosa (PD) se utilizó para la identificación molecular de las tres especies de hongos y para la propagación de conidios.

Papas partidas	200 gr
Dextrosa (glucosa)	13 gr
Agua destilada	1000 ml

1. Hervir las papas partidas previamente en 500 ml de agua durante 20 minutos.
2. Colar el caldo de las papas con ayuda de un colador o manta cielo.
3. Vaciar el caldo en un matraz Erlenmeyer con capacidad de dos litro y afóralo con agua destilada hasta llegar a 1 litro, mezclar con la Dextrosa y agitarlo con sobre la flama hasta que este homogéneo.
4. El medio se divide en tres matraces de capacidad de 1 litro, de manera que quede en cada matraz 333.3 ml de el medio aproximadamente. Se tapan los matraces y se llevan a esterilizar en la autoclave a 120°C con 15 lb de presión durante 20 minutos.
5. Una vez esterilizado se deja enfriar a temperatura ambiente para su posterior manipulación. Es recomendable dejarlos 48 hrs para confirmar que no existe contaminación.
6. En una campana de flujo laminar se agrega/siembra con un asa estéril el hongo antagonista y se vuelve a cerrar el matraz.

Los medios se someten a agitación constante a 80 rpm, durante 15 días aproximadamente. A los 7 días ya se puede realizar el conteo de esporas.

Anexo 3. Datos y secuencias de los hongos aislados de las muestras de muérdago enano.

Secuenciador: Modelo 3130xl Genetic analyzer de 16 capilares

Química de ADN: BigDye Terminator versión 3.1 Sequencing Kit

Movilidad: soporte polímero DT3100pop7(BD)v3

Capilar: 50cm.

Alternaria alternata

CTGAAAGGTACTCTCCTGATCCGAGGTCAAAGTTGAAAAAGGCTTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATA
GAGAGTGCGACTTGTGCTGCGCTCCGAAACCAGTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAG
CAAAGCTAGAGACAAGACGCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGC
CCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTA
CTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATTATTA
ATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTTGTCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGA
AACAAGAAGTACGCAAAGACAAGGGTGAATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGC
CTTCATATTTGTGTAATGATCCCTCCGCAGGTTACCTACGGAGACCTTGTTACGATTTTTAACTTCCAA

Fusarium proliferatum

CTGAGGGCTCCTACCTGATCCGAGGTCACATTCAGAAGTTGGGGTTTAAACGGCGTGGCCGCGACGATTAC
CAGTAACGAGGGTTTTACTACTACGCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCCAATCAATTTGGGGAACGCGATT
TGA CTGCGAGTCCCAACACCAAGCTGGGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAG
AATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCG
CATTTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTATGGTTT
TACTCAGAAGTTACATATAGAAACAGAGTTTAGGGGTCCTCTGGCGGGCCGTCCCGTTTTGCCGGGAGCG
GGCTGATCCGCCGAGGCAACAATTGGTATGTTACAGGGGTTTGGGAGTTGTAAACTCGGTAATGATCCCT
CCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACGATTTTTTACCTTCCA

Cladosporium cladosporioides

ATGGCACCTACCTGATCCGAGGTCACCTTAGAAATGGGGTTGTTTTAGGGCGTAGCCTCCCGAACACCCTT
TAGCGAATAGTTTCCACAACGCTTAGGGGACAGAAGACCCGCCCGGTGCGATTTGAGGTTTGCGGCGGACC
GCGTTGCCCAATACCACGCGAGGCTTGAGTGGTGAATGACTCTCGAACAGGCATGCCCCCGGAATACC
ATGGGGCCCAATGTGCGTTCAAAGATTCTGTGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTC
GCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAAGTTTTAATTTATTAATTAATTTTACTC
ATACTGAAAAGTTACTCAAAGTTTGAATTGTCCACCCGAGCCCCCGCCCGAAGGTCGGGTCGCCCCGG
AGGCAACAGAGTCGGACAACAAAGGGTTATGAACATCCCGGTGGTTAGACCGGGGTCATTGTAATGATC
CCTCCGCAGGTTACCTACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCCAATTCCGCAGGT

Anexo 4. Procedimiento para el conteo de conidios

Procedimiento de acuerdo a Cañedo y Ames (2004).

1. Se preparó una suspensión de conidios en agua destilada con Tween 80 al 0.1%.
2. Con una pipeta Pasteur se llenó la cámara con la suspensión de conidios y cubrió con el cubreobjetos.
3. Con el microscopio óptico se observaron las estructuras de los hongos, mediante el aumento de 40x.
4. Para el conteo de conidios se utilizaron los cuadrados de los cuatro ángulos y el centro, o en forma diagonal empezando por el primero de la parte superior izquierda. Se contó un total de cinco cuadros por cámara, realizando seis repeticiones.
5. La fórmula que se empleó para determinar el número de conidios por ml y el número total de conidios fue:

Conidios / ml = # de conidios contadas x 25,000 x factor de dilución

Conidios total = conidios / ml x Vol. de la suspensión original de conidios.

XIV. GLOSARIO

Acrópeta: Dícese de lo que se desarrolla desde la base hacia el ápice.

Agallas: Porciones alargadas de las plantas que por lo común están llenas del micelio del hongo.

Ahogamiento o secadera: Muerte rápida y colapso de plántulas muy jóvenes que se cultivan en el campo o en el almácigo.

Antagonismo: Interacción entre organismos sustancias que causa la pérdida de actividad de uno de ellos,

Antracnosis: Lesión necrótica que se asemeja a una úlcera profunda y que se produce en el tallo, hojas, frutos o flores de las plantas hospedantes. Sarna. Lesiones que se producen sobre el fruto, hojas, tubérculos y otros órganos de las plantas hospedantes, por lo común ligeramente realizadas o bien profundas y agrietadas, lo cual les da una apariencia costrosa.

Aislado: Una sola espora o cultivo y los cultivos que se derivan de ellos. Se utiliza también para indicar las colecciones de un patógeno obtenidas a diferentes tiempos.

Cancro: Herida localizada o lesión necrótica; con frecuencia sumida bajo la superficie del tallo de una planta leñosa.

Cepa: Progenie de un solo aislamiento en un cultivo puro; aislado; grupo de aislados similares; una raza. En los virus de las plantas, es un grupo de aislados virales que comparten en común la mayoría de sus antígenos.

Ciclo de vida: La fase o etapas sucesivas del crecimiento y desarrollo de un organismo que se lleva a cabo entre la aparición y reaparición de la misma etapa de su desarrollo (por ejemplo, la espora).

Control biológico Destrucción parcial o total de las poblaciones del patógeno por medio de otros organismos.

Control integrado Proceso que intenta utilizar todos los métodos disponibles para el control de una enfermedad, o de todas las enfermedades y plagas de un cultivo para lograr un mejor control al menor costo y con un daño mínimo al ambiente.

Cuerpo fructífero: Estructura compleja de los hongos que contiene esporas.

Cultivo: Crecimiento artificial de microorganismos o tejidos vegetales en un medio nutritivo preparado; colonia de microorganismos o células vegetales mantenidos artificialmente en dicho medio nutritivo.

Decaimiento: Crecimiento deficiente de las plantas; las hojas son pequeñas, quebradizas, amarillentas o de color rojo; las plantas muestran cierto grado de defoliación y muerte descendente

Enchinamiento foliar: Deformación, engrosamiento y enchinamiento de las hojas.

Escobas de bruja: Ramificación profusa y hacia arriba que se produce en las ramas jóvenes.

Haustorio: Órgano intracelular de absorción que se origina en una hifa de un parásito y que penetra en una célula del huésped. Tiene forma globosa y está en estrecho contacto con la membrana celular invaginada de la célula huésped. / Término usado también en el caso de las estructuras intracelulares de absorción que penetran en las células de las algas en el caso de los líquenes. / En las planta parásitas vasculares, órgano especializado de la raíz que penetra en los tejidos vivos del huésped y absorbe las sustancias nutritivas./ En los embriones, órgano que sirve para digerir y absorber sustancias de reserva del endospermo y trasladarlas hacia el embrión.

Hernia de las raíces: Raíces alargadas en forma de huso o mazo.

In vitro: En cultivo; fuera del hospedante.

In vivo: En el hospedante.

Inoculo: Patógeno o partes de él que causan infección; partes de los patógenos que entran en contacto con el hospedante.

Manchas foliares: Lesiones localizadas en las hojas de los hospedantes que constan de células muertas y colapsadas.

Marchitamiento: Por lo común, es un síntoma secundario generalizado en el que las hojas o los retoños de las plantas pierden su turgencia y se cuelgan debido a las alteraciones que sufre el sistema vascular de la raíz o del tallo.

Mildiu: Zonas necróticas o cloróticas que aparecen sobre las hojas, tallo y frutos de una planta y que por lo común se cubren con el micelio y los cuerpos fructíferos del hongo.

Muerte descendente: Necrosis generalizada de las ramitas de las plantas que se inicia en sus puntas y avanza hacia su base. Pudrición de la raíz. Pudrición o desintegración de todo el sistema radical de una planta o parte de él.

Pudrición basal del tallo: Desintegración de la parte inferior del tallo. Pudriciones blandas y pudriciones secas. Maceración y desintegración de frutos, raíces, bulbos, tubérculos y hojas carnosas de las plantas.

Roya: Muchas lesiones pequeñas, por lo común de color rojizo, que aparecen sobre las hojas o el tallo de las plantas.

Tizón: Coloración café general y extremadamente rápida de las hojas, ramas, ramitas y órganos florales de una planta, que dan como resultado la muerte de estos órganos.

Verrugas: Protuberancias en forma de verruga que se forman sobre los tubérculos y los tallos.

XV. REFERENCIAS CONSULTADA

- Acosta-Pérez, R., J. L. Delgado Montoya y P. Cervantes Saldaña, 1992. La vegetación del Estado de Tlaxcala. México. Folleto Divulgativo No. 6. Gobierno del Estado de Tlaxcala-Jardín Botánico Tizatlán.
- Acosta - Pérez, R. 1992. Algunas coníferas del estado de Tlaxcala. Tlaxcala, México, Jardín Botánico Tizatlán-Gobierno del Estado de Tlaxcala,. Pp. 8 y 29.
- Agrios, G. N. 1991. Fitopatología. Limusa. México. 756 pp. Berlanga-Padilla, A. M. 2006. Manejo y conservación de hongos entomopatógenos. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. Colima, México. 12 pp.
- Aguirre Bravo C. y Rey C. J. A. 1980. Escorrentía y pérdida de suelo en asociaciones vegetales sujetas a quemas controladas. Revista Chapingo 23-24: 18-24.
- Ames de Icochea T. 1997. Enfermedades fungosas y bacterianas de raíces y tuberculos Andinos. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 09 p.
- Arriaga, L., J. M. Espinoza, C. Aguilar, E. Martínez, L. Gómez y E. Loa. 2000. Regiones terrestres prioritarias de México. CONABIO, México.
- Barnett, H. L. y B. Hunter. 1972. Illustrated genere of imperfect fungi. Burgess Publishing Company. Third Edition. EUA. pp. 241
- Benítez Badillo G. 1988. Efectos del fuego en la vegetación herbácea de un bosque de *Pinus hartwegii* Lindl. en la sierra del Ajusco. En: Aportes a la ecología urbana de la Ciudad de México. (E. H. Rapoport e I.R. López M., Eds.). MAB-Limusa. México, D. F. pp. 111-152.
- Blanco, Z. S.; Ceballos, G. G.; Galindo L. C.; Maass M. J.; Patrón, S. R.; Pescador, A.; Suárez, A. 1981. Ecología de la estación experimental Zoquiapan (Descripción General, Vegetación y fauna). Serie Agronomía No.2. Dirección de Difusión Cultural. Departamento de Bosques. Universidad Autónoma de Chapingo. 35 p.
- Comisión Nacional Forestal. 2006. Manual de Tratamientos Fitosanitarios. Coordinación General de Conservación y Restauración. Gerencia de Sanidad Forestal. México. pp. 32-39.

- Campos V. A. P., Garcia V. V., Legazpi Z. M., Queijeiro B. M., Romo C. H., Valencia C. E., Velazquez Q. P. 2012. Viabilidad y potencial germinativo en dos especies de muérdago enano del centro de México”. Concurso Universitario Feria de las Ciencias. UNAM. México. Pág. 20.
- Cañedo V., Ames T. 2004. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima, Perú; Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, 62 p.
- Castellanos G., Jara C., Mosquera G. 2012. Guía práctica 1: Manejo del hongo en laboratorio. Fitopatología del frijol. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Colombia. Pag. 34.
- Cibrián D., Alvarado D., García S.E. 2007. Enfermedades forestales en México/Forest diseases in México. Universidad Autónoma Chapingo, CONAFOR-SEMARNAP, Forest Service USDA, NRCAN Forest Service, COFAN, FAO. Estado de México, México. 587pp.
- Cibrián T., D. I. Vázquez C., y J. Cibrián T. 2007. Enfermedades Forestales en México/Forest diseases in México. Universidad Autónoma Chapingo, CONAFOR-SEMARNAP, ForestService USDA, NRCAN ForestService, COFAN, FAO. Estado de México, México. pp. 376, 390-392.
- CONANP. 2010. Áreas Protegidas Decretadas. http://www.conanp.gob.mx/que_hacemos/ (5 de marzo de 2013)
- Domsch, K. H., W. Gams y T. Anderson. 1980. Compendium of soil fungi. Volume 1. Academic Press. GB.859 pp.
- Eguiluz P., T. 1982. Clima y distribución del genero Pinus en México. Revista Ciencias forestales (Méx.) 38(7): 31 -44.
- Ellis, M. B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute. GB. 607 pp.
- Farjon, A., Perez De La Rosa, J.A. and Styles, B.T. (1996). A field guide to the pines of Mexico and Central America. 121pp. Oxford Forestry Institute (OFI). Oxford, UK. Pp. 52.
- Farjom, A. y Styles, B. T. 1997. Flora Neotropical, Monograph 75. Pinus (Pinaceae). Organization for Flora Neotropical by The New York Botanical. Garden New York. pp.192-195.
- Fernández-Larrea Vega, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-sintéticos. Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica. No. 62. 96-100 p.

- Flores, A. I. Romero, C. A. J. 2001, Diagnostico fitosanitario del arbolado en pie de ocho especies de angiospermas, en el vivero de Coyoacan, Tesis profesional, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, México.167 p.
- Flores Villegas Mónica Yazmín. 2008. Evaluación del efecto que causa el muérdago enano (*Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum*) en el crecimiento de *Pinus cooperi* en Pueblo Nuevo, Durango. Tesis de Maestria. Centro interdisciplinario de investigación para el desarrollo integral regional unidad Durango. IPN. México. 145 p.
- García de Miranda E. 1981. Apuntes de climatología. UNAM. México, D. F. 155 p.
- García, E. 2004 Modificaciones al sistema de clasificaciones de Köppen. Quinta edición: corregida y aumentada. Instituto de Geografía, UNAM. 90pp.
- García, M., M. de Cara, L., Gálvez, C. Iglesias, L., Vares, D. Palmero. 2011. Host specificity of isolates of *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg on species within the *Allium* genus. *BBol. San. Veg. Plagas*, 37:195 -206.
- Geils, Brian W.; Cibrián Tovar, Jose; Moody, Benjamin, tech. coords. 2002. Mistletoes of North American Conifers. Gen. Tech. Rep. RMRS–GTR–98. Ogden, UT: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. 123 p.
- Gilbert, J.A. 1984. The biology of dwarf mistletoes (*Arceuthobium spp.*) in Manitoba. Winnipeg: University of Manitoba.Tesis. 138 p.
- Górný, R. L. 2004. «Filamentous microorganisms and their fragments in indoor air: A review», *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 11: 185–197.
- Gutiérrez, R. R. M. 1968. Efecto del parasitismo del muérdago enano (*Arceuthobium spp.*) sobre el desarrollo en grosor del tronco de *Pinus montezumae* y *P. Hatwegii*, en el cerro Telapón, Edo, de México. Tesis profesional. UNAM. México. Pag. 20.
- Hawksworth, F. G. 1961. Dwarf mistletoe of ponderosa pine in the Southwest. Tech. Bull. 1246. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture. 112 p.
- Hawksworth, F. G. 1972. Biological control of the mistletoes. In: Nordin, V.J., comp. Biological control of forest diseases. Fifteenth Congress of the International Union of Forestry Research Organizations. 1971 March. Gainesville, FL. Ottawa, ON. Canadian Forestry Service.Pag. 83–92.

- Hawksworth, F. G.; Wicker, E.F.; Scharpf, R.F. 1977. Fungal parasites of dwarf mistletoes. Gen. Tech. Rep. RM-36. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station. 14 p.
- Hawksworth, F. G.; Wiens, D. 1996. Dwarf mistletoes: biology, pathology, and systematics. Agric. Handb. 709. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service. 410 p.
- Hawksworth, F.G., D. Wiens., B. W. Geils. 2002. *Arceuthobium* in North America. En: Gelis, B., J. Cibrián-Tovar, B., Moody, (coords). Mistletoes of North American conifers. Rep RMRS-GTR-98. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. EUA. 29 – 56p.
- Hernández – Benítez, R., Z. Cano – Santana e I. Castellanos – Vargas. 2005. Incidencia de infestación de *Arceuthobium globosum grandicaule* (Hawks. Y Wiens) en *Pinus hartwegii* (Lindl.). Revista Ciencia Forestal en México, 30:79 – 86.
- Hernández, L., R. Acosta y G. Galindo, 1992. Los muérdagos enanos (*Arceuthobium spp*) en los bosques de los pinos del volcán de la Malinche, estado de Tlaxcala, Jardín Botánico Tizalapan-Gobierno del estado de Tlaxcala, no. 15, Tlaxcala, 55 pp.
- Jenkins, E. N., Heviefo, G., Langewald, J., Cherry, A. J. and Lomer, J. 1998. Development of mass production technology for aerial conia for use as mycopesticides. Biocontrol New and information 1998 Vol. 19 No. 12IN -31N.
- Knogge, W., 1996. Fungal infection of plants. The plant Cell. 8, Pag. 1711 - 1722
- Kope, H.H.; Shamoun, S. F. 2000. Mycoflora associates of western hemlock dwarf mistletoe plants and host swellings collected from southern Vancouver Island, British Columbia. Canadian Plant Disease Survey. 80. Pág. 144–147.
- López López, Horacio Alejandro. 1991. Plantas medicinales de la Sierra Nevada. Las enseñanzas de doña Paula, Pacmyc, CNCA. México.
- Mae-Rietman, L. 2004. Assesment of *Neonectria neomacrospora* as a Potential Biological Control Agent for Homlock Dwarf Mistletoe. University of British Columbia. Tesis de maestría. 121 pp.
- Marín S., Sanchis V., Ramos A. J, Magan N. 1998. Effect of water activity on hydrolytic enzyme production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* during colonisation of maize. International Journal of Food Microbiology 42 (1998) 185 – 194.

- Mendoza Briseño M. A. 1977. Datos meteorológicos de la Estación de Enseñanza e Investigación Forestal Zoquiapan, México. Información Técnica de Bosques 4(10): 23-25.
- Nelson, PE, TA Toussoun y WFO Marasas. 1983. Especies de *Fusarium*. Un manual ilustrado para identificación. Pennsylvania State University Press, University Park, PA.
- Nielsen, K. F. 2003. «Mycotoxin production by indoor molds», Fungal Genetics and Biology, 39: 103-117.
- O'Donnell J., Dickinson C. H. 1980. PATHOGENICITY OF ALTERNARIA AND CLADOSPORIUM ISOLATES ON PHASEOLUS. Department of Plant Biology, University of Newcastle upon Tyne, U. K. Trans. Br. Mycol, Soc. 74 (2) 335 – 342.
- Perry Jr., J. P. 1991. The pines of Mexico and Central America. Portland. Oregon. EE.UU. 231 p.
- Plascencia G. A., López P. I., Malagón. A. M. 2008. Validación del uso de hongos patogénicos para el control del muérdago enano *Arceuthobium sp.* En el Estado de Michoacán. Memorias del XIV simposio Nacional de parasitología forestal. México. Pag. 184 – 189.
- Queijeiro B. M. E. 2007. Interacciones entre dos especies de muérdago enano (*Arceuthobium spp.*) y *Pinus hartwegii* en el Parque Nacional Zoquiapan, Estado de México : el papel del disturbio. Tesis de Licenciatura. UNAM . México. Pág. 46.
- Quintana-Lemus, R. 2008. Evaluación del muerdago-killer (diatomeas) para el control del muérdago enano (*Arceuthobium globosum*) en *Pinus pseudostrobus* Lindl. Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo. Tesis de licenciatura. Michoacán, México. 62 pp.
- Quintero-Benítez. J. A., Apodaca-Sánchez, M. A., Loredo-Vegaing, J. G., Fierro-Corrales, D. 2008. Manual de prácticas micológicas. Universidad de Sinaloa. México, Sinaloa. 34 pp.
- Ramamoorthy, T. P., Robert Bye, Antonio Lot, John F. 1998. Diversidad biológica de México: orígenes y distribución. Instituto de Biología, UNAM.
- Rodríguez A. A. 1985. Infestación del muérdago enano *Arceuthobium vaginatum* (Willd) Presl. spp. *vaginatum* en el repoblado de *Pinus hartwegii* Lindl. del Parque Nacional Zoquiapan, Estado de México. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). Boletín técnico No. 122. ISSN-0185-2310. México. D. F. Pág. 27.

- Rojas – Treviño A. 2011. Conceptos y Práctica de Microbiología General. Universidad Nacional de Colombia. Manual de Microbiología. Palmira, Colombia. 32-39 pp
- Romero T. A. 2006. Influencia del muérdago enano (*Arceuthobium spp.*) en densidad básica, ancho de anillos, porcentaje de madera temprana y tardía en dos especies de pinos de Singuilucan, Hidalgo. Tesis de Ingeniero en manejo de recursos forestales. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. Pág. 69.
- Rzedowski J. (1978). Vegetación de México. Limusa. México, D. F. 432 p.
- Rzedowski J. (1981). Principales comunidades vegetales. En Flora fanerogámica del Valle de México. (J. Rzedowski y G. C. de Rzedowski, Eds.) Vol. I. CECSA. México, D. F. pp. 47-54.
- Rzedowski, J., 2006. Vegetación de México. 1ra. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, 504 pp.
- SARH. 1993. Diagnóstico del Parque Nacional Malinche o Matlacueyatl, Tlax. Subsecretaría Forestal y de fauna Silvestre. Pausa. Noviembre. 39 páginas, más cinco de anexos: florístico, faunístico, jurídico y cartográfico (18 páginas).
- Shamoun, S.F. 1998. Development of biological control strategy for management of dwarf mistletoes. In: Sturrock, R., comp. Proceedings 45th western international forest disease work conference; 1997 September 15–19; Prince George, BC. Victoria, BC: Canadian Forest Service, Pacific Forestry Centre. Pág. 36 – 42.
- Shamoun, S.F. 2000. Application of biological control to vegetation management in forestry. In: Spencer, N.R., ed. Proceedings of the X international symposium on biological control of weeds. 1999 July 4–14. Montana State University, Bozeman, MT. Pág. 87–96
- Shamoun, S. F. y L. E. DeWald. 2002. Management Strategies for Dwarf Mistletoes: Biological, Chemical and Genetic Approaches. En: Gelis, B., J. Cibrián-Tovar, B., Moody, (coords). Mistletoes of North American conifers. Rep RMRS-GTR-98. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. EUA. 75- 82 p.
- Shamoun S., Van der Kamp B. J. 2003. Biological Control of western hemlock dwarf mistletoe. Annual Report to Forestry Innovation Investment. Department of Forest Sciences, UBC. Vancouver, B. C. Canadá. Pág. 14.

- Smith I. M., Dunez J., Lelliott R. A., Phillips D. H., Archer S. A. 1988. European handbook of plant diseases. Blackwell Scientific Publications. 583 p.
- Uchida, J. Y. 1966. New developments in fungal pathology on ornamentals. Floriculture Production Seminar. Sept. 1996. Honolulu HI.
- Ulloa, M. C. y R. T. Herrera. 1994. Etimología e iconografía de géneros de hongos, Universidad Autónoma de México. 98 p.
- Urzúa S., F. 1989. Equipos y técnicas de aplicación de plaguicidas. Departamento de Parasitología Agrícola, UACH, Chapingo, México. 283 p.
- Valderrama J.; Medina O. 2002. Evaluación de muérdago enano (*Arceuthobium spp.*) en rodales del género (*Pinus spp.*) y propuesta de manejo en la estación forestal experimental Zoquiapan, México. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo. pp. 1-10.
- Valdivia-Sánchez, J. de J. 1964. Patología Forestal. I-El muérdago enano (*Arceuthobium sp.*) en los bosques de la zona noreste de Michoacán. Comisión Forestal del Estado de Michoacán. Boletín No. 15. Michoacán. 67 pp.
- Vilchis , G. L., Reséndiz M. J. F. 1994. Fenología del muérdago enano en el desierto de los leones, D. F. Revista Ciencia Forestal en México. Vol. 19. Núm. 75. Enero –Junio: 41-62 pp
- Youji S., Akemi S., Osamu H., Takashi M., Shingo M. 1995. Cladosporol, β -1,3-glucan biosynthesis inhibitor, isolated from fungus, *Cladosporium cladosporioides*. Department of agricultural Chemistry, Nagoya University, Chikusa, Nagoya. Japón. Pag 1469 - 1472

Paginas WEB consultadas

http://iztapopo.conanp.gob.mx/documentos/programa_de-manejo_izta_popo.pdf

<http://www.montero.org.mx/anterior/tlalocan.htm#tres>

<http://www.fao.org/docrep/x5373s/x5373s00.gif>

<http://www.maph49.galeon.com/biodiv2/pino.html>

<http://nugen.uece.br/arquivos/pdf/resumocolgloes.pdf>. Consultada en Marzo del 2012.

<http://www.agro.ar.szczecin.pl/~jblaszkowski/Mycota/Cladosporium%20cladosporioides.html>

