



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES FOLIARES EN PINOS DE
ÁREAS FORESTALES DEL ESTADO DE PUEBLA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA

TRUJILLO PEÑA KAREN MARISOL

DIRECTOR DE TESIS

BIÓL. JOSÉ FRANCISCO RESÉNDIZ MARTÍNEZ



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

«Son las dolencias externas de nuestro herido mundo, que no sólo tienen un impacto en el entorno en el cual vivimos, sino también en lo que podríamos llamar nuestra ecología interna, nuestra alma y nuestro sentido de ser humanos» Wangari Maathai

Dedicatorias

A Dios

En un mundo lleno de dudas y adversidad siempre he recibido la confianza y el valor para continuar adelante a través de Ti, gracias por regalarme la fe, la esperanza y el amor. Para muchos sólo eres una fantasía, una invención, pero a lo largo de mi vida he sentido Tu presencia y no me avergüenzo de reconocer que creo en Ti, porque sin Ti, nada podría hacer...

A mi madre

Desde que nací has estado conmigo, y a pesar de todo, has sabido ser mi madre, mi padre y mi soporte. Sé que algunas veces has sentido que no eres tan buena, pero te equivocas; tú me educaste de la mejor manera posible, me llevaste de la mano, me corregiste (y lo sigues haciendo) y a pesar de nuestras diferencias y malos entendidos, no te cambiaría por nada. Gracias por darme tu vida, tu tiempo, tu esfuerzo, tus palabras y continuar apoyándome, aunque muchas veces falle.

A Jorge

Te encontré en uno de los momentos más difíciles de mi vida, sin imaginar que serías una bendición. Aunque es poco el tiempo que llevamos recorriendo este camino, te has convertido en una de las personas más importantes de mi vida. Gracias por animarme, apoyarme, aconsejarme y estar conmigo en las buenas y en las no tan buenas; por compartir risas y lágrimas, emociones y preocupaciones. Sé que esta aventura apenas comienza y quiero que me acompañes en ella.

A mi familia

Son muchos y este pequeño espacio no alcanza para mencionarlos a todos, hay quienes se encuentran lejos y quienes están más cerca; pero a todos les agradezco su cariño, sus oraciones y su apoyo incondicional.

A mis amigos

Gracias Luis, por ser más que mi amigo, en muchas ocasiones me has ayudado, regañado y soportado; además de haber compartido conmigo tus conocimientos en esta investigación; sin tu apoyo no podría haber concluido esta fase, hermano. Árbol que nace torcido, jamás su tronco endereza (¿o sí?).

Perla, desde que nos conocimos comenzamos a compartir muchas cosas, gracias por cantar, platicar, reír y hasta adoptar gatos conmigo. Eres la mejor amiga que podría tener.

A todos los que he conocido en este camino, desde el kínder hasta la universidad, en la iglesia, en el inifap... Gracias por tomarse el tiempo de conocerme y compartir conmigo toda clase de experiencias.

«Los árboles son símbolos vivos de paz y esperanza. Un árbol hunde sus raíces en la tierra, pero se alza hasta el cielo, demostrándonos así que debemos mantener los pies en el suelo, pues por alto que nos propongamos llegar, la fuerza procederá siempre de nuestras raíces» Wangari Maathai

Agradecimientos

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)

Por el apoyo brindado en la realización de este proyecto.

Al Biól. José Francisco Reséndiz Martínez

Por haberme permitido trabajar con usted durante este tiempo y compartir conmigo su conocimiento, sus experiencias, sus consejos y su manera de ver la vida. Gracias porque a pesar de las diferencias y dificultades que tuvimos, me ayudó siempre a salir adelante y especialmente a terminar este proyecto. No sólo lo considero un profesor sino un amigo.

A los investigadores del INIFAP, Dra. Adriana Rosalía Gijón Hernández y Dr. Víctor Arriola Padilla

Por brindarme su apoyo en la realización de este proyecto, mediante la realización de técnicas de laboratorio y facilitando la información necesaria para el mismo.

Al Dr. Víctor López Gómez

Por tomarse el tiempo de instruirme y ayudarme en la realización de análisis estadísticos para complementar este trabajo de tesis, su aportación fue muy valiosa.

Al comité sinodal UNAM-FES Iztacala

Mtro. Ezequiel Carlos Rojas Zenteno

Mtra. Ana Lilia Muños Viveros

Mtra. María Edith López Villafranco

Mtra. María Elena Huidobro Salas

Por su tiempo, dedicación y apoyo para realizar las correcciones y ajustes en este trabajo.

RESUMEN

México posee una gran extensión territorial de bosques, que son de importancia para el desarrollo óptimo de numerosos procesos naturales. Una de las entidades que cuenta con una importante área forestal es el estado de Puebla, donde el 32% de su territorio se compone por bosques y selvas. La integridad de los bosques, se ve amenazada por la deforestación, la contaminación, el cambio climático, los incendios, las plagas y enfermedades. Algunas de las enfermedades que más atacan a los pinos son ocasionadas por hongos, en su mayoría patógenos oportunistas que aprovechan la debilidad de los árboles. En los últimos años se han registrado daños en las áreas boscosas del país, como en Puebla, donde se ha reportado marchitez en numerosos pinos de distintas localidades de la Sierra Norte. Durante el año 2015 se realizaron recorridos para localizar pinares con signos de daño y se llevaron a cabo muestreos en cinco municipios, donde se recolectaron muestras patológicas de acículas. Las muestras se trasladaron al laboratorio de Sanidad Forestal del INIFAP, CENID-COMEF, donde fueron analizadas; se enlistaron los signos y síntomas observados y se sembraron fragmentos de acículas en cajas con medio de cultivo PDA. Se realizó la identificación taxonómica de cinco géneros fúngicos: *Alternaria* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Pestalotiopsis* sp. y *Phoma* sp. De acuerdo con la literatura, los géneros identificados como patógenos son *Pestalotiopsis* sp. y *Phoma* sp., por lo que se trabajó con sus cepas para realizar pruebas de patogenicidad. Posteriormente se formaron tres tratamientos, con 10 plántulas de *Pinus patula* cada uno, el primero correspondió a la punción con *Pestalotiopsis* sp., el segundo a la punción con *Phoma* sp. y el tercero al grupo testigo, que sólo se regó con agua. Se observaron y registraron los cambios observados cada 15 días durante dos meses, para lo cual se elaboró una escala del nivel de daño. Al finalizar el periodo de evaluación 16 árboles presentaron nivel de daño 0 (sin cambios) y los 14 restantes el nivel 1 (daño mínimo). Se realizaron siembras con muestras de acículas de los tres tratamientos y se obtuvieron dos cepas para los tres grupos, *Alternaria* spp. y *Pestalotiopsis* sp. Con base en los resultados se concluyó que los hongos *Pestalotiopsis* sp. y *Phoma* sp. no fueron agentes primarios de la enfermedad de caída foliar de los pinos.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Antecedentes.....	2
Justificación	5
OBJETIVOS	6
Objetivo general	6
Objetivos particulares.....	6
MARCO TEÓRICO	7
Generalidades de los pinos.....	7
Características de <i>Pinus patula</i> Schiede and Deppe.....	8
Situación forestal actual.....	9
Enfermedades foliares en pinos	10
Características de <i>Pestalotiopsis</i> sp.	11
Características de <i>Phoma</i> sp.	12
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Área de estudio.....	14
Delimitación del área de estudio.....	17
Procesamiento de muestras.....	17
Propagación de micromicetos.....	19
Caracterización molecular de micromicetos	20
Diseño experimental para las pruebas de patogenicidad	20
Pruebas de patogenicidad	21
Inoculación por punción	21
Evaluación de daños y comparación de cepas.....	23
Análisis estadísticos	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
Signos y Síntomas	25
Determinación de micromicetos	28
<i>Pestalotiopsis</i> sp.....	28
<i>Phoma</i> sp.....	30
Hongos saprobios.....	31
Identificación molecular	33
Extracción de ADN.....	33

Secuenciación y alineamiento	33
Evaluación de daños	34
Análisis estadístico	40
Reaislamiento posterior a la inoculación	40
CONCLUSIONES	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
APÉNDICE	54
Caracterización molecular	54
Extracción de ADN	54
Calidad de ADN	55
PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)	55
Amplificación ITS1 e ITS5	56
Amplificación ITS4 e ITS5	56
Purificación de ADN	56
Análisis estadístico	57

INTRODUCCIÓN

Los sistemas forestales son conjuntos complejos conformados por plantas, hongos, animales y microorganismos que desempeñan un rol específico y contribuyen a su equilibrio. Dicho equilibrio puede romperse debido a la acción nociva de alguno de sus componentes vivos o de factores ambientales adversos, llegando a ocasionar impactos en su salud (Gómez, *et al*, 2010).

Entre las principales causas del deterioro de los sistemas forestales se encuentran las enfermedades ocasionadas por factores bióticos, tales como virus, hongos, bacterias, nematodos, entre otros. Se sabe que los hongos son los principales causantes de enfermedades forestales (Pildain y Errasti, 2011), puesto que provocan daños en cualquier estructura de la planta, ocasionando enfermedades como pudrición de la raíz, manchas foliares, tizones, royas, carbones y antracnosis, entre otras (Curvelo y Rojas, 2010). Más de 8,000 especies de hongos provocan enfermedades, todas las plantas superiores pueden ser infectadas y dañadas por más de una especie de hongo fitopatógeno. El daño que ocasionan, no sólo se refiere a las pérdidas de producción económica; sino también, a las pérdidas en la producción biológica (Agrios, 2004). A nivel mundial originan grandes pérdidas económicas anuales (National Academy of Sciences, 1980). Se estima que esas pérdidas van del 5 al 25% en países desarrollados y del 20 al 50% en países en desarrollo (FHIA, 2007).

México tiene una amplia cobertura forestal y es uno de los mayores centros de diversidad mundial del género *Pinus* (Romeu, 1995). En el Estado de Puebla, el área que corresponde al bosque de pino abarca 98,499 hectáreas; y el bosque de pino-encino ocupa 98,383 has (CONAFOR, 2013). Sus bosques poseen una gran biodiversidad, 17 de las 49 especies del género *Pinus* reportadas en México, crecen en su territorio (Rzedowski 1986; Perry 1991).

En Puebla, los bosques de pinos han sufrido serios daños debido a una gran variedad de factores bióticos, abióticos y antrópicos. Por lo cual, es necesario identificar a los agentes causales de las enfermedades que padecen, así como evaluar su efecto a través de pruebas de fitopatogenicidad; tales como la inoculación artificial, uno de los métodos utilizados con el fin de evaluar la resistencia de las plantas a los patógenos, o bien, efectuar estudios específicos de los mismos (Gilchrist-Saavedra, *et al*, 1995).

Antecedentes

Los trabajos realizados con respecto a hongos fitopatógenos que afectan a las áreas forestales en México, son pocos; sin embargo, hay algunos desarrollados en América latina que sirven como referentes para el presente estudio.

Mohali (1998) realizó un diagnóstico fitopatológico para determinar el estado de un huerto de *Pinus caribaea* en Venezuela; primero probó la capacidad patogénica del hongo aislado en plantas de pino caribe de aproximadamente seis meses de edad; para lo cual inoculó plantas sin heridas y con heridas provocadas con una aguja de disección estéril con suspensiones de conidios en agua destilada estéril, en la base de las acículas. Después de inoculadas, cubrió las plantas con bolsas de plástico transparentes por cinco días para garantizar altas condiciones de humedad, y las revisó diariamente para observar el desarrollo de la enfermedad; finalmente realizó aislamientos de los tejidos inoculados para comprobar los postulados de Koch. De acuerdo con sus resultados *Phoma prunicola* fue causante de lesiones en acículas verdes; y *Lophodermium australe* en acículas secas, aunado a ello describió una asociación entre ambas especies.

Cruz (2002) identificó a los patógenos involucrados en la marchitez de *Pinus halepensis* en la zona de reforestación de Zapalinamé, Coahuila, México; para determinar la presencia de patógenos en las muestras de material vegetal procedentes del área de muestreo, tomó fragmentos de raíz, ramas, corteza, tallos y agujas que presentaban síntomas de amarillamiento necrosis y muerte. Sembró las muestras desinfectadas en medios de cultivo Papa Dextrosa Agar acidificado (PDA), Agar Nutritivo (AN) y Jugo de V8 (V8), a partir de esas cajas aisló y purificó diferentes cepas. Determinó que los patógenos involucrados en la muerte de *Pinus halepensis* en raíces fueron *Dematophora* sp, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Verticillium* sp, *Monilia* sp; en agujas y ramas *Pestalotia* sp. (*Pestalotiopsis*), *Aposphaeria* sp, *Alternaria solani* y *Fusarium subglutinans*. Concluyó que la presencia de dichos patógenos está asociada a las condiciones desfavorables de clima y estrés en que se encuentran los pinos en la zona de reforestación de Zapalinamé.

Morales-Ramírez (2007) evaluó cepas del hongo *Sphaeropsis sapinea* provenientes de Arauco y Valdivia (Chile), debido a que el hongo se asocia con una enfermedad en pinos en la primera localidad y en la otra se considera saprobio. Realizó ensayos de patogenicidad, inoculando dicho hongo en plantas de *Pinus radiata*. Para la inoculación realizó una incisión cercana a la zona apical de las plantas, donde introdujo el inóculo proveniente de las cepas seleccionadas; posteriormente cubrió la herida con un trocito de

papel absorbente humedecido que se envolvió con cinta parafilm y midió el avance del hongo en las plantas cada siete días, durante tres semanas. Como resultado, las dos cepas de *S. sapinea* presentaron la misma fisiología y patogenicidad.

Baltodano (2009) diagnosticó la problemática sanitaria que afecta a pinos en Nicaragua; destacando las enfermedades causadas por hongos que ocasionan manchas y tizones en acículas, canchales en ramas y tallos, y marchitamiento vascular. Los principales hongos asociados a dichos síntomas resultaron *Lecanosticta* sp., causante de mancha parda y *Dothistroma* sp. de la banda roja. Otros géneros de hongos: *Phoma* sp., *Phyllosticta* sp., *Sphaeropsis* sp. y *Pestalotia* sp. (*Pestalotiopsis*) se consideraron como patógenos secundarios. Los hongos *Chrysosporium* sp., *Nectria* sp., *Botryodiplodia* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Botryosphaeria* sp. y *Phoma* sp., fueron reportados como causantes de cancro.

Delgado (2009) trabajó con plántulas forestales en un vivero de Perú, identificó los síntomas de enfermedad en plántulas de eucalipto, bolaina, cacapana, paliperro, cedro rosado y teca; así como a los patógenos causantes de enfermedad. Los síntomas que caracterizaron a las enfermedades fungosas diagnosticadas fueron: manchas amarillentas, necróticas, secamiento, lesiones y clorosis en hojas, ahogamiento, chupadera y muerte descendente en plántulas; identificó los siguientes patógenos *Armillaria* sp., *Colletotrichum dematium*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cylindrocladium* sp., *Fusarium oxysporum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *Phyllosticta* sp. y *Rhizoctonia* sp.

Pérez (2009) identificó cinco hongos ophiostomatoideos y probó su patogenicidad; hizo una herida en la corteza de 50 pinos provenientes de Zoquiapan, Estado de México; introdujo un disco con micelio, cubrió las zonas inoculadas con algodón humedecido en agua estéril y selló con Parafilm; evaluó la sintomatología y el número de plantas muertas. Los hongos *Leptographium guttulatum*, *Ophiostoma nigrocarpum* y *O. olivaceapinii* causaron clorosis, muerte de follaje y necrosis en plantas de pino.

García (2009) evaluó la incidencia y severidad de las enfermedades de *Pinus oocarpa* en Nicaragua y las condiciones que favorecen su desarrollo; realizó dicha evaluación mensualmente, además de que midió el diámetro y altura de los árboles en los sitios de muestreo. Cuantificó las enfermedades en dos bosques de la finca Las Tapias; y encontró que los géneros de hongos causantes de manchas o tizones de acículas fueron *Lecanosticta* sp. (mancha parda) y *Dothistroma* sp. (banda roja). Los géneros *Phoma* sp., *Pestalotia* sp. (*Pestalotiopsis*), *Phyllosticta* sp. y *Sphaeropsis* sp. fueron considerados como

secundarios. Asociados a cancro en tallos y ramas encontró a *Chrysosporthe* sp., *Nectria* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Botryosphaeria* sp., y *Phoma* sp. Los hongos relacionados al marchitamiento fueron *Fusarium* sp., *Ophiostoma* sp. y *Graphium* sp. Concluyó que el daño presente en las acículas, el amarillamiento del follaje y muerte de los árboles, así como los canchros en ramas, es favorecido por factores abióticos como la deficiencia nutricional e hídrica, las altas temperaturas, alta densidad del bosque, así como la intervención humana, además de la ausencia de manejo.

Calderón y Santos (2015) realizaron un estudio para identificar microorganismos del género *Phytophthora* que afectan a bosques naturales mixtos de *Pinus* sp. y *Quercus* sp. en Guatemala. Para aislar el hongo procesaron muestras de suelo y tejido vegetal, posteriormente realizaron ensayos de patogenicidad en *Pinus caribaea*, *Pinus oocarpa*, *Pinus pseudostrobus* Lindl, *Pinus maximinoi* y *Pinus tecunumanii*. Llevaron a cabo la inoculación en plántulas de 45 días de edad, colocando 2000 zoosporas/ml en la base del tallo. Por cada cepa a evaluar inocularon 6 plantas. Al grupo testigo le aplicaron agua destilada estéril y utilizaron un modelo completamente al azar. La cepa VP16 aislada de viveros de San Miguel Petapa del departamento de Guatemala produjo los síntomas característicos de un ataque de *Phytophthora* sp. en plántulas de pino, como la necrosis en la base del tallo, amarillamiento y reducción del crecimiento normal de las plántulas de las 5 especies de pino inoculadas.

Justificación

Los bosques proveen numerosos servicios a nivel ecológico, social, económico y cultural como que; contribuyen al ciclo hidrológico, son el hábitat de fauna silvestre, la fuente principal de madera y poseen gran valor estético. La conservación, restauración y manejo sustentable de estos bosques, proporcionan servicios ambientales de los cuales dependen ciudades y comunidades rurales, mantienen la biodiversidad, regulan el clima, la calidad del aire, los recursos hídricos, ayudan a la polinización, la dispersión de semillas, dan mantenimiento a los suelos, amortiguan los fenómenos naturales y también son de importancia económica ya que proveen materiales de construcción, medicinas y energía, entre otros bienes (CONAFOR, 2013).

Sin embargo, los bosques son alterados por el clima, los incendios, las sequias, corrimientos de tierra, especies invasoras, insectos y brotes de enfermedades, lo cual afecta su estructura, función y composición (FAO, 2015).

En México, algunas de las zonas afectadas se encuentran en el estado de Puebla, especialmente en la Sierra Norte, donde se observaron daños desde 2011; y más severamente a partir de 2014. La problemática se presentó en las comunidades de Zitlalcuautla del Municipio de Tetela de Ocampo, en Tomatlán, Tuliman y San Miguel Tenango, municipio de Zacatlán; y Rancho Viejo, municipio de Aquixtla, así como los municipios de Zautla, Xochiapulco y Zacapoaxtla, donde en el 2014 se dio a conocer el análisis de la problemática de las plagas y enfermedades presentes en los bosques de las zonas antes señaladas, principalmente graves defoliaciones en especies de pino como: *Pinus moctezumae*, *P. patula*, *P. leiophylla*, *P. pseudostrobus*, *P. gregii*. De acuerdo con los signos y síntomas se observó que el agente patógeno fue el género *Lophodermium*, pero se requieren estudios que confirmen su presencia.

La declinación de este ecosistema hace necesario contribuir al diagnóstico acertado del agente causal que afecta los bosques de la Sierra Norte de Puebla, como paso trascendental hacia su control. Por lo cual, el presente trabajo sirvió como complemento para las investigaciones del área de sanidad forestal del CENID-COMEF, INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias) para determinar la patogenicidad de hongos como *Pestalotiopsis* sp. y *Phoma* sp. mediante pruebas de patogenicidad.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar signos, síntomas y características morfológicas de los micromicetos aislados que afectan las acículas de los pinos de cinco municipios de la Sierra Norte de Puebla, así como realizar pruebas de patogenicidad con los hongos *Pestalotiopsis* sp. y *Phoma* sp., en plántulas de *Pinus patula*.

Objetivos particulares

- Identificar signos y síntomas que afectan las acículas de los pinos de la Sierra Norte de Puebla.
- Determinar por sus características morfológicas a los micromicetos aislados a partir de las acículas de pino afectadas.
- Comprobar si los hongos *Pestalotiopsis* sp. y *Phoma* sp. son agentes causales de la caída foliar en *Pinus patula*, aplicando los postulados de Koch.
- Evaluar el nivel de daño ocasionado a las plántulas por los hongos inoculados (*Pestalotiopsis* sp. y *Phoma* sp.).

MARCO TEÓRICO

Generalidades de los pinos

Los pinos son considerados el primer género de árboles en los bosques mexicanos por su distribución; además de encontrarse de manera natural en la mayoría de los estados. México es un centro secundario de diversificación del género *Pinus* con 49 de las aproximadamente 120 especies existentes (Gernandt y Pérez-de la Rosa, 2014).

Los árboles de este género se distribuyen en altitudes desde los 1,500 a los 3,000 msnm, pero pueden llegar a los 3,650 m en el norte y 4,000 m en el centro y sur de México (Yeaton, 1982; Earle, 2007). En los bosques de pino la temperatura media anual fluctúa entre los 6° y los 28°C y la precipitación promedio anual va de 350 a más de 1,000 mm (Rzedowski, 1978 en Sánchez-González, 2008).

A continuación, se muestra la jerarquía taxonómica del género (ITIS, 2017):

Reino: Plantae
Subreino: Viridiplantae
Infrareino: Streptophyta
Superdivisión: Embryophyta
División: Tracheophyta
Subdivisión: Spermatophytina
Clase: Pinopsida
Subclase: Pinidae
Orden: Pinales
Familia: Pinaceae
Género: *Pinus* L.

Los pinos son un recurso natural de gran valor, de ellos se obtienen madera, trementina, semillas, carbón, aguarrás, brea, ácido piroleñoso, alquitrán, alcohol metílico, entre otros. En México la madera para aserrar es el producto más importante, seguido de la pulpa para papel kraft y el cartón (Martínez, 1992).

En México las especies más explotadas son *Pinus patula*, *P. oocarpa*, *P. pseudostrobus*, *P. herrerae*, *P. leiophylla* y *P. arizonica* (Perry, 1991; Ramírez-Herrera *et al.*, 2005 en Sánchez-González, 2008).

Características de *Pinus patula* Schiede and Deppe

Es una especie nativa de Centroamérica y en México se distribuye de manera natural en la Sierra Madre Oriental, el Eje Neovolcánico y la Sierra Madre de Oaxaca, en los estados de Nuevo León, Tamaulipas, Hidalgo, Puebla, Veracruz, Oaxaca, Querétaro, Tlaxcala y la Ciudad de México; las poblaciones con óptimo desarrollo se ubican en Hidalgo, Puebla y Veracruz, y las grandes plantaciones comerciales en el Estado de México, Puebla, Michoacán y la Ciudad de México (CONABIO y PRONARE, 2006). Puede crecer en masas puras o asociado con otras especies como *Pinus teocote* (Dvorak y Donahue, 1992).

Se caracteriza por tener una altura media entre los 20 y 30 m, dependiendo de las condiciones ambientales y de suelo (Vela, 1976). El tronco es recto, cilíndrico en un comienzo y bastante cónico en casi toda su longitud. En árboles jóvenes, inicialmente la corteza es lisa y rojiza, y luego, ésta se torna marrón, áspera y se desprende en escamas. La distribución de las ramas no es uniforme, aunque en general son verticiladas, las ramas pequeñas son escamosas y rojizas. Los rebrotes con algunos nódulos glabros, son verde pálido hasta pardo rojizo. La copa es extendida con ramas largas y colgantes. Esta especie desarrolla un buen sistema radical, pivotante y profundo (FNC, 2011).

Su follaje es ralo, verde claro, esparcido, más o menos péndulo. Usualmente tiene cuatro acículas por fascículo, algunas veces tres o cinco; y de 12 a 25 cm de longitud. Las vainas de las acículas son de color ceniza, persistentes y de 1,5 cm de largo. Las yemas terminales son largas, erguidas y amarillentas (FNC, 2011).

Los conos son persistentes, pequeños, duros, cafés, barnizados y brillantes, estrechamente conoidales, puntiagudos al ápice, redondos y asimétricos a la base; nacen individualmente o en pares, en pedúnculos de hasta 2.0 cm de longitud; las escamas de los conos son angostas con apófisis alzados, a veces con espinas proyectadas hacia adelante (Styles, 1994). Son serótinicos, es decir; se abren paulatinamente a medida que disminuye la humedad ambiental, de manera que la mayor cantidad de semilla se desprende en la temporada seca, previa a la estación lluviosa. La raíz no se extiende horizontalmente, lo cual permite una elevada densidad del arbolado (Vela, 1976).

Los bosques de *Pinus patula* se distribuyen altitudinalmente entre los 1800 y los 3000m. Su crecimiento bajo cultivo es de aproximadamente un metro por año y en condiciones naturales un poco menor. Los árboles llegan a su madurez entre los 30 y 35 años de edad (Figura 1) (Vela, 1976).



Figura 1. Ejemplar de *Pinus patula*

La madera es blanda, recién cortada presenta olor a resina, es de color ligeramente amarillento, de durabilidad natural baja; debido a la susceptibilidad al ataque insectos xilófagos y de hongos que descomponen la madera. Se seca relativamente bien, tanto al aire libre como en el secado artificial, lo que permite que sea ampliamente utilizada como madera de aserrío. Es de fácil preservación por los métodos de inmersión, baño caliente frío y vacío presión, lo cual permite utilizarla en construcción, como tablilla para pisos, postes de transmisión de energía y telefónicos (FNC, 2011).

Situación forestal actual

Los ecosistemas forestales son de gran importancia ya que actúan como base de los sistemas y ciclos ecológicos, contribuyen a la efectividad de los procesos de reciclado de carbono y agua, regulan los flujos hídricos y protegen el suelo; además de albergar una gran riqueza biológica (FAO, 2005).

México posee una de las principales extensiones de bosques y selvas del mundo, en 2015 el porcentaje estimado de área boscosa en el país fue de 34%, que corresponde a una superficie de 66.04 millones de ha, misma que lo colocó en el lugar 11 a nivel mundial, de acuerdo con las *Evaluaciones de Recursos Forestales Mundiales (FRA)* (FAO, 2015).

Puebla ocupa el décimo noveno sitio de superficie territorial entre las entidades del país. El 32% de su territorio está cubierto por bosques y selvas, ubicándose en el vigésimo lugar a nivel nacional por su área forestal (CONAFOR, 2013), lo cual indica que tiene un potencial forestal maderable y no maderable importante, mismo que contrasta con el 44.7% de su superficie especializada en cultivos agrícolas. De los 3.4 millones de hectáreas del estado, 1.7 millones son de aptitud forestal, de las cuales 770 mil son arboladas, 302 mil de zonas áridas, 142 mil en proceso de restauración y 485 mil degradadas de acuerdo con el Plan Estatal de Desarrollo 2011-2017 (Gobierno del Estado de Puebla, 2011).

La integridad de los bosques es amenazada por la deforestación, la degradación, la fragmentación, la contaminación y el cambio climático; fenómenos que perjudican la biodiversidad forestal. Gran parte de los daños se originan debido a las políticas agropecuarias que propician actividades agrícolas y ganaderas de forma extensiva en áreas de aptitud forestal. Adicionalmente existen otros factores como los incendios, plagas y enfermedades, cambios de uso de suelo y talas clandestinas (UNICEDER-UACH, 2001).

Durante el 2016 se dio a conocer que la Comisión Nacional Forestal destinó seis millones de pesos para acabar con la plaga que afectaba 3,000 hectáreas de pino en la Sierra Norte de Puebla (motivo del presente estudio). Investigadores de la BUAP, el Colegio de Posgraduados, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, la Universidad de Nuevo León, y la Universidad Autónoma de Chapingo, se encontraban realizando estudios al respecto; el daño fue atribuido a *Lophodermium* sp (Poblanerías, 2016).

Enfermedades foliares en pinos

Los bosques de pino sufren enfermedades causadas principalmente por hongos, numerosas especies fúngicas aprovechan la debilidad de los árboles para producir alteraciones en sus tejidos. Si bien sólo algunos hongos se consideran parásitos primarios, el carácter oportunista de la mayoría, favorece la muerte de los árboles (Muñoz, 2003).

Las enfermedades foliares más comunes en pinos son la pérdida de acículas y la marchitez; la primera se refiere a la caída prematura del follaje; y la segunda a las acículas muertas que permanecen en las ramas, confiriendo a los pinos una apariencia pardo rojiza; después de tiempo, estas se desprenden, defoliando parcial o totalmente el árbol (Martínez, 2009, Agrios, 2004).

Los daños más frecuentes en las acículas, son las manchas foliares y los tizones. Las primeras, son lesiones localizadas que se desarrollan de forma concéntrica, lo que produce una clorosis inicial; con el paso del tiempo, dichas lesiones se diseminan en todo el tejido necrosándolo. Los tizones son lesiones cafés que se distinguen por causar una quemadura sobre las agujas, estos se necrosan hasta provocar la muerte del tejido (García, 2009).

Durante los últimos años se han observado daños en las áreas boscosas del estado de Puebla, donde las zonas más afectadas de 2000 a 2007 fueron la Mixteca y el Valle de Atlixco; en menor medida la Sierra Negra y la Sierra Norte (Páez, 2016).

Así mismo se ha reportado la enfermedad denominada caída foliar de los pinos, atribuida a los hongos *Lophodermium* sp., *Dothistroma* sp. y *Botryosphaeria* sp. Las especies más afectadas en el estado son *Pinus pseudostrobus*, *Pinus oaxacana* y *Pinus patula*. De acuerdo con lo observado, el daño en el follaje inicia con una coloración que pasa de amarilla a rojiza conforme avanza el ataque de los hongos, hasta provocar la caída de las acículas. El árbol puede producir brotes nuevos, sin embargo, después de repetidas defoliaciones se vuelve vulnerable al ataque de plagas y es propenso a morir (Mena, 2016).

Actualmente en Puebla el daño se localiza en los municipios de Aquixtla, Amixtlan, Atempan, Cuyoaco, Chignahuapan, Chignautla, Ixtacamaxitlan, Libres, Tetela de Ocampo, Teziutlán, Tlatlauquitepec, Xiutetelco, Xochiapulco, Zacapoaxtla, Zacatlán, Zaragoza y Zautla (CONAFOR, 2014).

Características de *Pestalotiopsis* sp.

El género *Pestalotiopsis* pertenece a la familia Amphisphaeriaceae, grupo heterogéneo conformado por 205 especies descritas (Keith, Velásquez y Zee, 2006). Sus conidias son fusiformes, con cinco células de color café a negro, presentan apéndices apicales y basales. La identificación interespecífica de este género se basa en la morfología de sus conidias, conidiogénesis y asociación telomórfica (Liu y Guo, 2007).

Son comúnmente patógenos de especies tropicales y subtropicales de plantas; aunque son saprobios presentes en corteza y material vegetal en descomposición, también se encuentran como endófitos de una gran variedad de familias alrededor del mundo (Tejesvi *et al.*, 2007).

Si bien hay reportes de *Pestalotiopsis* spp. ocasionando daños en diversos hospederos, son en su mayoría patógenos oportunistas que afectan a plantas debilitadas (Keith, Velásquez y Zee, 2006). Ataca el follaje que ha sido dañado o debilitado por un clima desfavorable y penetra a través de heridas en la corteza. Comúnmente, la enfermedad comienza en la punta de la hoja y progresa hacia su base; el color del follaje va de verde a amarillento y luego se vuelve marrón oscuro (Schuster, 2017).

En pinos, la lesión progresa anualmente, ocasionando la muerte de las ramillas, cuyas acículas muestran síntomas generalizados de marchitez, forma acérvulos negros y emite sus conidios a través de cirros del mismo color. Provoca la formación de pequeños chancros en las ramillas y tiene la capacidad de colonizar sus hojas, la mayor incidencia se presenta en árboles jóvenes, viveros forestales y suelos pobres (Hansen, 2003).

La clasificación taxonómica del género se presenta a continuación (ITIS, 2017):

Reino: Fungi

Subreino: Dikarya

División: Ascomycota

Subdivisión: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Xylariomycetidae

Orden: Xylariales

Familia: Amphisphaeriaceae

Género: *Pestalosphaeria* (anamorfo *Pestalotiopsis*)

Características de *Phoma* sp.

El género *Phoma*, está conformado por un gran grupo de hongos que se encuentran en numerosos nichos ecológicos. Sus conidias son ovaladas, unicelulares, hialinas y aseptadas; desarrolladas en picnidios de forma globosa, semi hundidos en el estrato

epitelial, adheridos por hifas alargadas emitidas desde su base; los picnidios presentan una coloración gris clara que se torna más oscura cuando envejecen (Caceres, 1999).

Dentro del género existen patógenos, oportunistas y saprobios; algunas especies han sido encontradas en materiales inorgánicos; en contraste, más del 50% de las especies descritas se presentan en tejidos vivos como oportunistas o patógenos primarios. Las infecciones de *Phoma* suelen afectar animales, pero la gran mayoría de las especies colonizan material vegetal. Se conocen más de 110 especies como patógenos primarios de plantas, principalmente especializadas en un solo género o familia. Sólo en algunos casos la naturaleza de *Phoma* es considerada benéfica, como bio control contra patógenos de plantas. Incluso ciertas especies han sido encontradas parasitando hongos y oomicetos (Aveskamp, De Gruyter y Crous, 2008; Sullivan y White Jr., 2000).

Comúnmente ataca órganos jóvenes (hojas, tallos, frutos) de la planta; en acículas de pino, causa muerte regresiva, seguida de la defoliación. Sobre la epidermis, forma una hendidura pronunciada de color marrón, en la cual se forman las estructuras fructíferas del hongo, cuando la masa micelial penetra la epidermis y el parénquima de la acícula, causa la muerte del tejido (Mohali, 1998).

La clasificación taxonómica del género es la siguiente (ITIS, 2017):

Reino: Fungi

Subreino: Dikarya

División: Ascomycota

Subdivisión: Pezizomycotina

Clase: Dothideomycetes

Subclase: Pleosporomycetidae

Orden: Pleosporales Luttrell ex M.E. Barr, 1987

Familia: Pleosporaceae

Género: *Phoma* Saccardo, 1880

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El estado de Puebla se localiza al sureste de la altiplanicie mexicana, entre los meridianos 96°39'14" y 99°04'05" de longitud oeste; y los paralelos 17°50'52" y 20°50'13" de latitud norte; la superficie total del estado es de 33,919 km² (SAGARPA, 2015). En Puebla se encuentran cuatro de las catorce provincias fisiográficas del país: Sierra Madre Oriental, Llanura Costera del Golfo Norte, Eje Neovolcánico y Sierra Madre del Sur (CONABIO, 2011). Posee varios climas, desde semicálido húmedo, templado subhúmedo, templado semiseco, hasta cálido subhúmedo; en general las lluvias se presentan en verano (SAGARPA, 2015). En el territorio del estado convergen cuatro Regiones Hidrológicas, cuenta con 22 ríos y once presas con una capacidad total de 643 millones de metros cúbicos (Gobierno del estado de Puebla, 2005 en CONABIO, 2011). Los tipos de vegetación presentes son principalmente tres: bosques, selvas y matorrales; el resto se agrupa en vegetación inducida, hidrófila y zonas agrícolas (CONABIO, 2013).

El estado se divide en siete regiones socioeconómicas, donde la región I: Huauchinango, corresponde a la Sierra Norte, lugar donde se llevó a cabo el presente estudio (Figura 2).



Figura 2. Mapa de la Región I de Puebla con su división territorial municipal.

Se localiza al noroeste del estado, colinda al Norte con Veracruz, al Oeste con Hidalgo y Tlaxcala; y al Este con la Región II. Es la segunda región más habitada del estado, su

extensión territorial es de 5903.5 km² y comprende 35 Municipios; tiene un clima predominantemente húmedo y cálido con abundantes lluvias en verano (Inafed, 2016).

La Sierra Norte de Puebla es la porción sureña de la Sierra Madre Oriental, misma que recorre el país en dirección noroeste-sureste, desde Coahuila hasta Veracruz. Se localiza en el centro oriente de México de los 19°40' a los 20°55' de latitud norte y de los 98°37' a los 99°43' de longitud oeste; su altitud va de 70 a 2 300 msnm (Lugo-Hubp *et al*, 2005). La geología de la Sierra Norte está representada por materiales cársticos del Cenozoico, algunas rocas y lutitas del Mesozoico Superior y materiales volcánicos y areniscas del Terciario. Los suelos son en su mayoría arcillo limosos y arenosos, hay luvisoles, cambisoles y litosoles.

La vegetación es muy variada, debido a la diversidad de suelos y climas; comenzando por las alturas menores, los tipos de vegetación de la sierra son: bosque tropical perennifolio de 70 a 650 msnm; encinares tropicales de tierras bajas de 70 a los 300 msnm; bosques mesófilos de montaña entre los 700 a 1 600 msnm, bosques mixtos de pino y encino de los 900 a los 1 800 msnm; sobre los 1 800 msnm hay bosques de pino, o encino; en diferentes altitudes a orillas de arroyos y de ríos hay bosques riparios, en charcas y lagunas se presenta vegetación acuática (Figura 3) (Martínez *et al*, 2002).

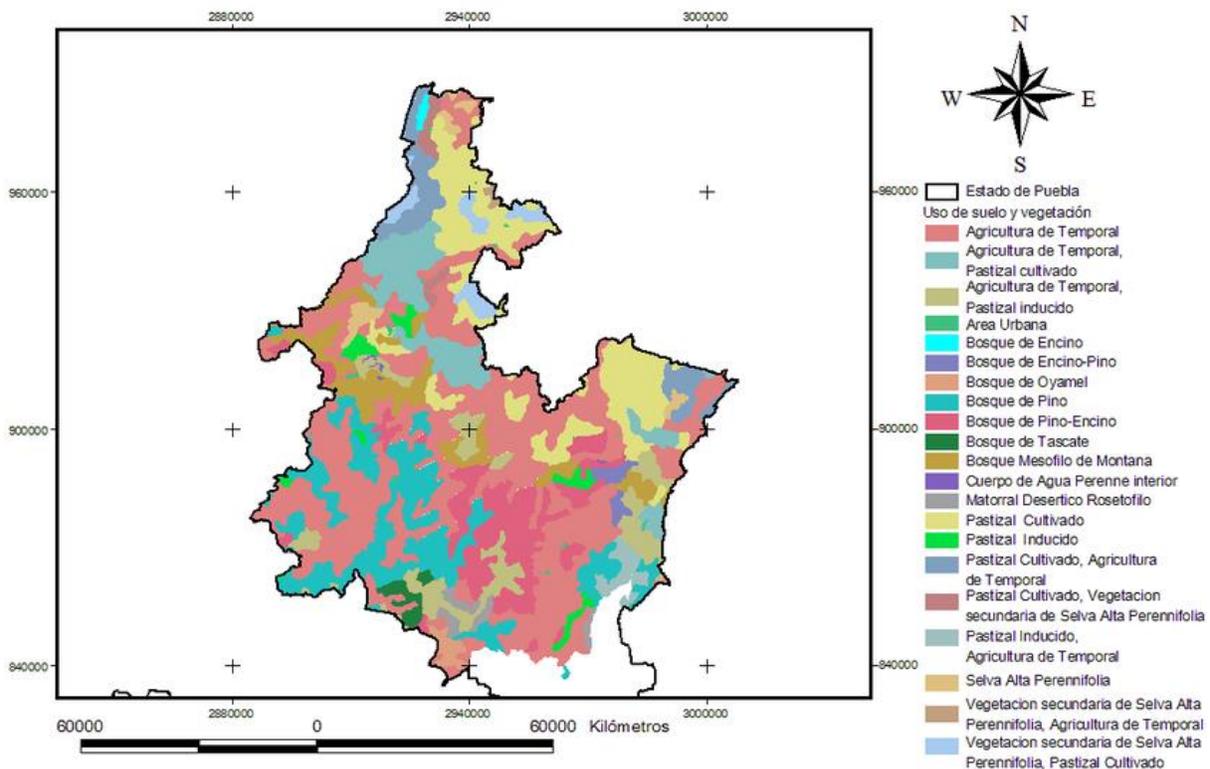


Figura 3. Mapa de tipos de vegetación en la Sierra Norte de Puebla.

En el territorio de la Sierra Norte de Puebla se localizan casi todas las especies de pinos reportadas para este estado, que corresponden a 16 de las 49 especies de pinos presentes en el país (Cuadro 1); y ocupan 327 428.83 ha, equivalentes al 9.7 % de la superficie del estado (Gernandt y Pérez-De la Rosa, 2014).

Los bosques dominados por *Pinus patula* se desarrollan en el norte; mientras que en las regiones montañosas del Popocatepetl, Iztaccihuatl, Pico de Orizaba y La Malinche crecen *Pinus hartwegii*, *P. rudis*, *P. montezumae*, *P. pseudostrobus*, *P. oaxacana*, *P. ayacahuite*, *P. leiophylla*, entre otras especies (CONABIO, 2011).

Cuadro 1. Especies del género *Pinus* en el estado de Puebla

<i>Pinus ayacahuite</i> var. <i>ayacahuite</i>	<i>Pinus montezumae</i> var. <i>gordoniana</i>
<i>Pinus ayacahuite</i> var. <i>veitchii</i>	<i>Pinus montezumae</i> var. <i>montezumae</i>
<i>Pinus cembroides</i> subsp. <i>cembroides</i> var. <i>cembroides</i>	<i>Pinus oocarpa</i>
<i>Pinus chiapensis</i>	<i>Pinus orizabensis</i>
<i>Pinus devoniana</i>	<i>Pinus patula</i> var. <i>patula</i>
<i>Pinus greggii</i>	<i>Pinus pringlei</i>
<i>Pinus hartwegii</i>	<i>Pinus pseudostrobus</i> var. <i>apulcensis</i>
<i>Pinus maximinoi</i>	<i>Pinus pseudostrobus</i> var. <i>pseudostrobus</i> fo. <i>protuberans</i>
<i>Pinus lawsonii</i>	<i>Pinus pseudostrobus</i> var. <i>pseudostrobus</i> fo. <i>pseudostrobus</i>
<i>Pinus leiophylla</i> var. <i>leiophylla</i>	<i>Pinus teocote</i>

La fauna está representada por mamíferos pequeños como el tlacuache (*Didelphis marsupialis*), el zorrillo (*Mephitis macroura*), el gato montés (*Felis sp.*), el coyote (*Canis latrans*), el zorro gris (*Urocyon cinereoargenteus*), la ardilla (*Sciurus aureogaster*, *Sciurus deppei*), el ratón (*Heteromys sp.*, *Peromyscus oaxacensis* y *Neotoma sp.*), el tejón (*Nasua narica*), el mazate (*Mazama americana temamma*), el venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y otros, como la iguana negra (*Ctenosaura pectinata*) y el ajolote (*Ambystoma velasci*), además de una gran variedad de aves (Martínez et al, 2002).

De acuerdo con los registros, existen 122 especies de mamíferos en la zona, los cuales constituyen el 84.7% del total en el estado. En comparación con otras regiones del país, se considera que la mastofauna está bien representada (Peralta, 2011).

Delimitación del área de estudio

El área de estudio fue determinada por investigadores del INIFAP para el proyecto denominado “Determinación del agente causal de la caída foliar del pino en Puebla, México”. Se localizó en la Sierra Norte de Puebla, donde se realizaron recorridos para localizar los pinares con daños visibles de secamiento y caída foliar, durante los meses de noviembre y diciembre del 2015. De esta forma fueron elegidos cinco rodales al azar, distribuidos en municipios diferentes; en cada uno se trazó un sitio de muestreo de forma circular, con un radio de 11.28 m (400 m² de superficie).

Las localidades en donde se colectaron muestras fueron: San Miguel Tenango (municipio de Zacatlán); Rancho Alegre (Tetela de Ocampo); Ayocuantla (Aquixtla); Almeya (Ixtacamaxtitlán); y Buenavista (Zautla) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Localidades del estado de Puebla donde se realizaron muestreos.

Rodal	Localidad	Municipio	Latitud	Longitud
1	San Miguel Tenango	Zacatlán	19°54'11.31"	97°55'51.67"
2	Rancho Alegre	Tetela de Ocampo	19°51'32.25"	97°51'29.24"
3	Ayocuantla	Aquixtla	19°46'07.35"	97°52'38.66"
4	Almeya	Ixtacamaxtitlán	19°42'53.04"	97°52'37.33"
5	Buenavista	Zautla	19°44'00.25"	97°44'22.12"

Procesamiento de muestras

Para la determinación morfológica de micromicetos se tomaron muestras de follaje de árboles con síntomas de enfermedad (Figura 4), se colocaron en bolsas herméticas con papel periódico y se etiquetaron con los datos del sitio, posteriormente se trasladaron al laboratorio de Sanidad Forestal del CENID-COMEF, INIFAP, donde se mantuvieron en refrigeración para evitar la pérdida de humedad.

Las acículas fueron revisadas en un microscopio estereoscópico Carl Zeiss® Stemi 2000 para describir los signos y síntomas de daño foliar.

Las acículas con lesiones fueron cortadas en fragmentos de 7 mm y se aseptizaron con alcohol etílico al 10% por un minuto, posteriormente se colocaron en hipoclorito de sodio al 0.5% durante cinco minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril (Figura 5a). Después se sembraron en medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar) colocando cinco muestras patológicas por caja (Figura 5b).



Figura 4. Toma de muestras de acículas en uno de los sitios de muestreo.

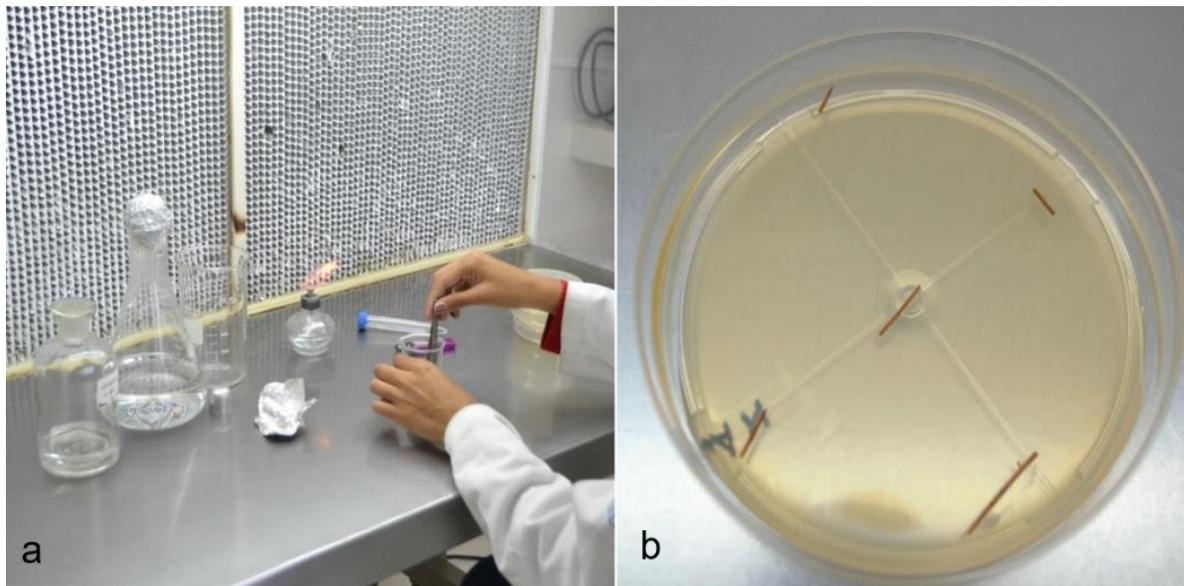


Figura 5. a) Lavado de los fragmentos de acículas; b) Siembra de los fragmentos en medio de cultivo PDA.

Los hongos desarrollados fueron aislados con la finalidad de obtener cultivos puros para su determinación; por lo cual se realizaron preparaciones semipermanentes (Figura 6a y b), mediante la técnica de tinción azul-algodón-lactofenol, que consistió en depositar una gota del colorante sobre un portaobjetos, en ella se dispersó una muestra de micelio, tomada con un asa de siembra o asa bacteriológica, por último, se colocó un cubreobjetos. Para la identificación taxonómica se observaron las laminillas con el microscopio óptico Carl Zeiss® y se utilizaron las claves de Barnet y Hunter (1972).

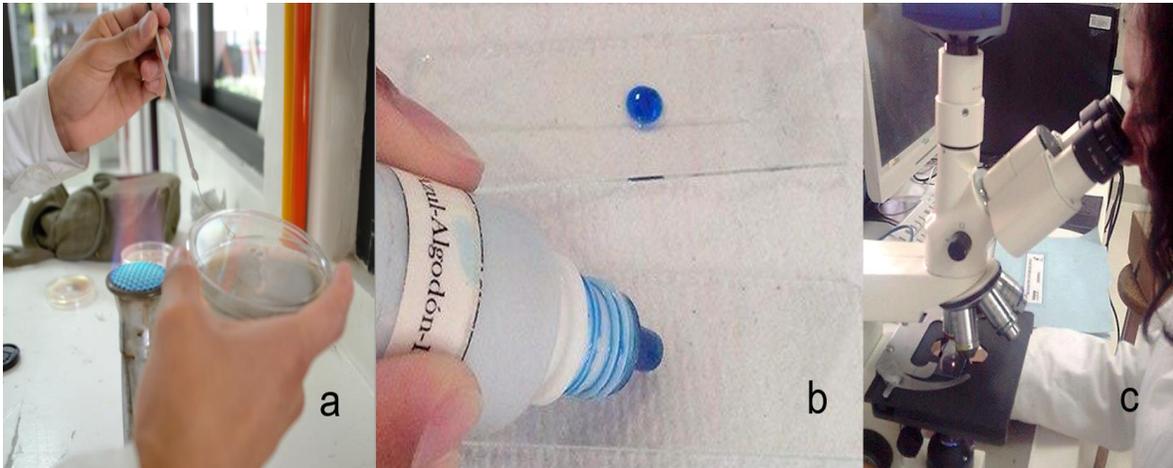


Figura 6. a) Toma de micelio con asa bacteriológica, b) Elaboración de laminillas, c) Observación de preparaciones en el microscopio.

Propagación de micromicetos

Después de realizar la determinación de los hongos, se seleccionaron aquellos con registros de actividad patogénica en pinos, tales fueron *Phoma* sp. y *Pestalotiopsis* sp. Una vez desarrolladas las cepas puras, se procedió a su propagación en cajas con medio de cultivo PDA, y su posterior incubación a temperatura ambiente, de 25 a 27°C (Figura 7).



Figura 7. Incubación de las colonias fúngicas.

Caracterización molecular de micromicetos

Adicionalmente, se realizó la caracterización molecular de algunas cepas de los hongos determinados con ayuda de investigadores del INIFAP. Puesto que la obtención de ADN puro es fundamental para el buen desempeño de las técnicas utilizadas en biología molecular, se probaron dos protocolos tradicionales para extracción de ADN, el método AP y CTAB, los cuales tienen ventajas por su bajo costo y alto rendimiento (Tang *et al.* 2005, Wang *et al.* 2005).

Para llevar a cabo los protocolos, se utilizaron cultivos monospóricos jóvenes, que no ocupaban la superficie total de la caja Petri (para más detalles ver Apéndice).

La secuenciación se realizó con el primer ITS 5, se enviaron 16 muestras para su secuenciación en MACROGEN, Korea. Las secuencias fueron alineadas y su homología se determinó en el servidor del National Center for Biological Information (NCBI), específicamente en el banco de genes (Genbank); la edición de las secuencias se realizó con el programa Bioedit Sequence Alinment Editor.

Diseño experimental para las pruebas de patogenicidad

Para realizar el experimento se seleccionaron 30 plántulas de *Pinus patula* de aproximadamente un año de edad, procedentes de los Viveros de Coyoacán; dicha especie fue elegida por su importancia y distribución natural en el estado de Puebla.

El diseño experimental utilizado fue de bloques completamente al azar y se formaron tres tratamientos con diez repeticiones cada uno, los cuales fueron:

T1: Punción con *Pestalotiopsis* sp.

T2: Punción con *Phoma* sp.

T3: Testigo; únicamente regado con agua.

El ensayo se llevó a cabo en un invernadero del CENID-COMEF, INIFAP; con una dimensión aproximada de 2.5m de ancho por 3.5m de largo. Para evitar la contaminación de los pinos por microorganismos ajenos al experimento, el invernadero se limpió y desinfectó con jabón e hipoclorito de sodio al 10%.

Pruebas de patogenicidad

El método utilizado para las pruebas de patogenicidad se basó en los postulados de Koch, utilizados para corroborar la causa de las enfermedades planteando la asociación de un agente patógeno con el hospedero enfermo, los cuales se enlistan a continuación:

- El microorganismo debe estar presente en todos los individuos con la misma enfermedad.
- El microorganismo debe ser recuperado del individuo enfermo y poder ser aislado en medio de cultivo.
- El microorganismo proveniente de ese cultivo debe causar la misma enfermedad cuando se inocula en otro huésped.
- El individuo experimentalmente infectado debe contener al microorganismo, mismo que debe coincidir en sus rasgos morfológicos y biológicos con el patógeno original (Volcy, 2008).

Inoculación por punción

El experimento se realizó durante los meses de agosto a octubre del 2016, para lo cual, previamente se propagaron los hongos *Pestalotiopsis* sp. y *Phoma* sp. en cajas con medio de cultivo PDA, se prepararon agujas Vacoutainer estériles y tiras de parafilm (Figura 8).



Figura 8. Material utilizado para la punción de los pinos.

Los pinos fueron etiquetados con un número y seleccionados al azar para formar tres grupos; los dos tratamientos y el testigo (Figura 9).



Figura 9. Pinos etiquetados y ordenados en el invernadero para su inoculación.

La inoculación se realizó por la mañana; inicialmente se desinfectó la parte del tallo a inocular con alcohol al 70%, se tomó una muestra de la cepa con una aguja estéril; y con ella se punzó el tallo, posteriormente se cubrió la herida con una tira de cinta parafilm para evitar su contaminación. A cada pino se le aplicaron tres punciones, la primera a 5cm de la base; la segunda en la parte media del tallo y la tercera cerca de la punta (Figura 10).

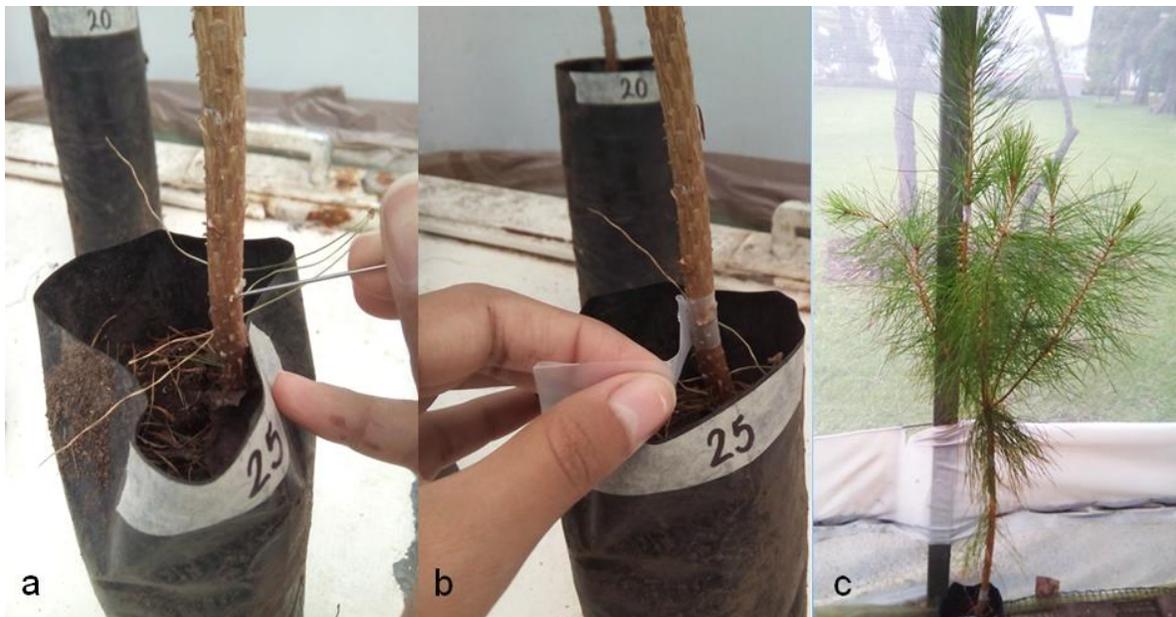


Figura 10. a) Punción de uno de los pinos con la aguja Vacutainer; b) Sellado de la herida con cinta parafilm; c) Vista de un organismo inoculado.

Evaluación de daños y comparación de cepas

Pasados 15 días de la inoculación se realizó la primera evaluación, se tomaron fotografías de los pinos. Desde ese momento se llevó un registro de los cambios observados en los individuos cada 15 días por dos meses (en total cuatro revisiones) y durante todo el proceso se cuidó que los pinos contaran con condiciones adecuadas de humedad. Transcurridos los dos meses se evaluó el nivel de daño causado por los hongos, con base en la observación y se otorgó un valor de daño a cada pino (cuadro 5).

Posteriormente se seleccionaron cinco acículas de cada pino, se cortaron en fragmentos de aproximadamente 7 mm que fueron separados según su tratamiento; dichos fragmentos se colocaron con pinzas estériles en vasos de precipitado, donde se aseptizaron con alcohol al 10% un minuto y después con hipoclorito de sodio al 0.5% por cinco minutos, posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces y el exceso de agua en las muestras patológicas se absorbió con papel filtro previamente esterilizado.

Se preparó medio de cultivo PDA y se utilizaron 10 cajas por tratamiento (30 en total), en cada caja se colocaron cinco fragmentos de acículas. Cuando los hongos se desarrollaron fueron registradas sus características morfológicas y el número de veces que se presentaron (frecuencia) entre las cajas de dicho tratamiento.

Se aislaron las diferentes cepas de hongos que se desarrollaron a partir de las muestras sembradas, se hicieron preparaciones con el colorante azul algodón lactofenol, para lo cual se utilizó el siguiente procedimiento: se depositó una gota del colorante sobre un portaobjetos, se tomó una muestra del hongo con un asa bacteriológica, se disgregó sobre la gota y se colocó un cubreobjetos (Figura 11). Las preparaciones fueron observadas con el microscopio Carl Zeiss y determinadas taxonómicamente utilizando las claves de Barnett y Hunter (1972).

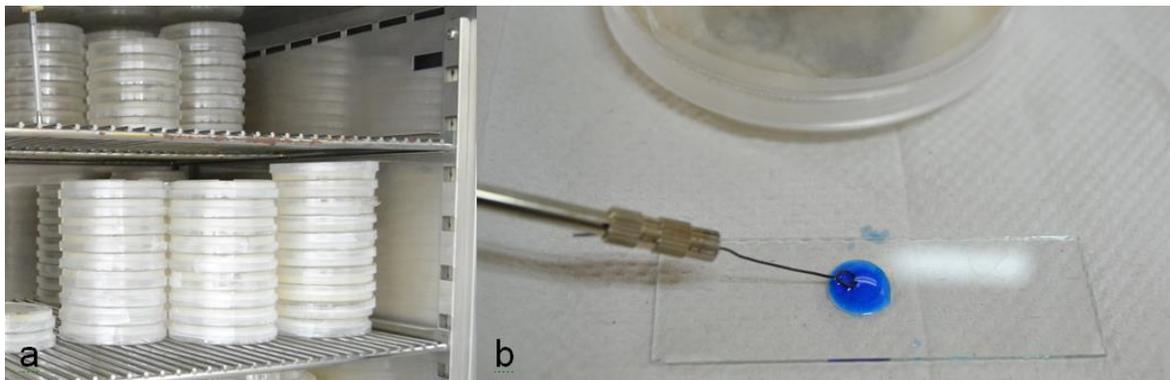


Figura 11. a) Incubación de las cepas; b) Elaboración de preparaciones semipermanentes.

Análisis estadísticos

Para determinar el efecto de los tres tratamientos de punción sobre el nivel de daño en el follaje de plántulas de *Pinus patula* se utilizó una prueba no paramétrica de Friedman. Esta prueba permite la comparación de más de dos medias de registros dependientes con distribuciones no normales y variables ordinales. Si resulta significativa ($\alpha < 0.05$) se elaboran comparaciones múltiples entre los tratamientos con la prueba de Wilcoxon, la cual es otra prueba no paramétrica que permite comparar dos muestras con registros dependientes, distribuciones no normales y para variables ordinales.

Para estas pruebas el nivel de significancia fue corregido con el ajuste de Bonferroni ($\alpha' = \text{nivel de significancia} / \text{número de comparaciones} = 0.05 / 3 \text{ comparaciones} = 0.0167$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Signos y Síntomas

Con ayuda del microscopio estereoscópico se revisaron las sintomatologías de las acículas provenientes de las localidades de estudio, en las que se observaron, diferenciaron y describieron en total siete signos y síntomas (Cuadro 2).

Cuadro 3. Signos y síntomas encontrados en las distintas localidades.

Signos y síntomas	Descripción	Localidad
	Manchas negras, de forma redonda a ovalada, detectadas en acículas secas. Con una medida promedio de 0.92 mm.	San Miguel T. Rancho Alegre Ayocuantla Almeya Buenavista
	Banda café rojiza con el contorno amarillo y la porción central seca, presenta cuerpos fructíferos de forma circular y color negro. Con un tamaño medio de 4.66 mm.	San Miguel T. Ayocuantla Almeya Buenavista
	Bandas anchas de color café y a los costados pequeñas bandas de color amarillo. Con un tamaño promedio de 2.2 mm.	Rancho Alegre Buenavista Almeya
	Lesión de color café rojizo con apariencia traslúcida; algunas deformadas, con abultamientos y aberturas. Con un tamaño promedio de 3.3 mm.	San Miguel T. Rancho Alegre

	<p>Lesión de color café claro, con abultamiento y abertura longitudinal. Con un tamaño promedio de 7.23 mm.</p>	<p>Ayocuantla</p>
	<p>Abultamientos de color café claro a lo largo de la acícula, con un tamaño promedio de 2.06 mm.</p>	<p>Ayocuantla</p>
	<p>Bandas anchas de color café claro con pequeñas bandas de color amarillo a los costados. Con un tamaño promedio de 2.03 mm.</p>	<p>San Miguel T.</p>

El síntoma predominante en las cinco localidades fue el manchado negro de forma ovalada en acículas secas; seguido de la banda café rojiza con la porción central seca, presente en cuatro localidades. Los cinco síntomas restantes se presentaron en uno o dos de los sitios.

Las manchas con tejido necrótico en el centro y bandas cloróticas a los lados, coinciden con la descripción de García (2009) quien señala que algunos de los síntomas más comunes de enfermedades en pinos son las manchas foliares, lesiones concéntricas que producen una clorosis inicial y con el tiempo ocasionan necrosis en el tejido. Por otro lado, describe a los tizones como lesiones de color café con una quemadura sobre los órganos foliares, misma que necrosa el tejido hasta ocasionar su muerte; este síntoma es el mismo que se muestra en el cuadro 3.

Algunos de los síntomas descritos se encuentran relacionados entre sí, tal es el caso del manchado foliar y los tizones, en el primero las acículas todavía presentaban partes de tejido vivo, mientras que las acículas con el segundo síntoma mostraron un mayor nivel de

daño, ya que estaban completamente secas. En ambos casos se distingue el desarrollo de protuberancias (cuerpos fructíferos) de color negro, esto permite relacionar ambos síntomas, el primero es una fase previa al desarrollo completo del tizón, que se encuentra en el segundo.

Otros dos síntomas relacionados fueron las lesiones con abultamientos ovalados color café claro encontradas en las muestras de Ayocuantla. En uno de los casos las lesiones fueron más pequeñas y en el otro, las lesiones ya eran más grandes con una abertura longitudinal.

Las fracciones de acículas con tizones se incubaron durante 12 horas, con la finalidad de inducir la maduración de las estructuras; se hicieron finos cortes transversales a los cuerpos fructíferos con una navaja de afeitar y se utilizaron para elaborar preparaciones semipermanentes tiñendo las estructuras con azul-algodón-lactofenol al 1%, para posteriormente observarlas en el microscopio estereoscópico.

Al observar al microscopio óptico se detectaron ascas de forma alargada, dentro de los apotecios, así como ascosporas filiformes dentro de una masa gelatinosa (Figura 12). Una vez revisadas las preparaciones, se determinó que dichos tizones fueron ocasionados por *Lophodermium* sp.

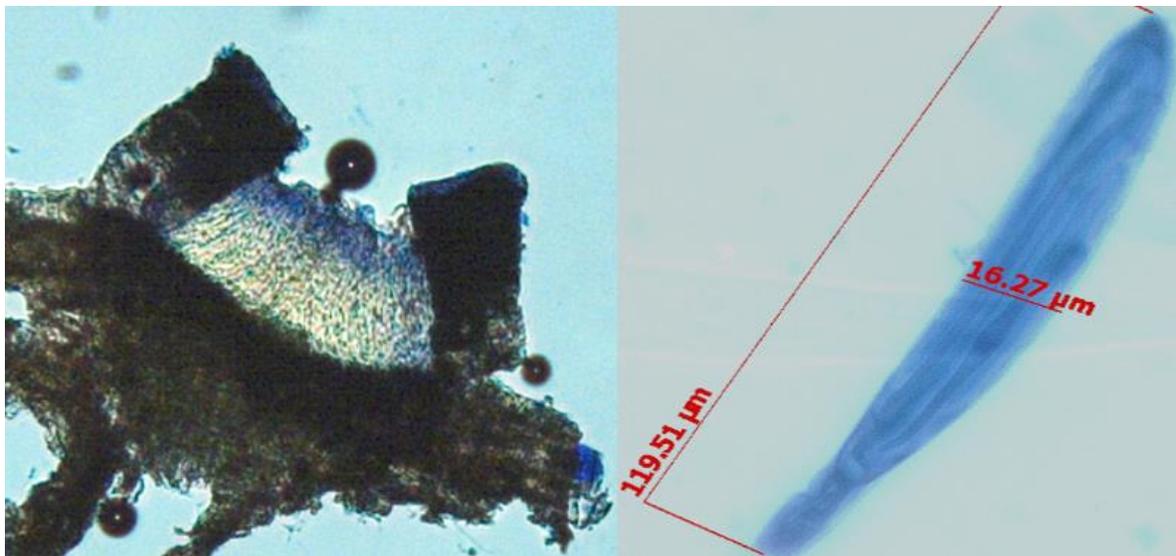


Figura 12. Corte de acícula con lesión causada por *Lophodermium* sp. donde se aprecia el apotecio (a la izquierda) y un asca (a la derecha).

Lophodermium es un hongo que permanece durante todo su ciclo de vida en el árbol, y ataca individuos poco desarrollados y débiles (González, 2004). Los síntomas que ocasiona, son pequeñas pústulas de forma ovoide y color negro de aproximadamente 1mm

de largo sobre las acículas, mismos que coinciden con los encontrados en las acículas a las que se les realizaron cortes.

Las acículas son infectadas a finales de verano u otoño y el patógeno permanece en ellas durante el invierno. En la siguiente primavera, el hongo reinicia su crecimiento, y al final de la estación ocasiona la muerte del tejido (Cibrian *et al*, 2007). Los árboles maduros afectados presentan coloraciones amarillentas, con abundantes acículas muertas a lo largo del tronco o en la base de las ramas. En organismos jóvenes afecta acículas a partir de la primera etapa de crecimiento con lo que disminuye su capacidad fotosintética y afecta su crecimiento (INAB, 2017).

De acuerdo con investigaciones realizadas, *Lophodermium* puede tener una mayor distribución en un futuro cercano debido al cambio climático. Los factores climáticos más importantes, que determinan la presencia del hongo en los pinos son las precipitaciones moderadas, temperaturas frías y humedades relativas elevadas (Pérez *et al*, 2016).

Determinación de micromicetos

Se determinaron cinco géneros distintos de micromicetos obtenidos de las muestras patológicas de acículas de pino, los cuales fueron *Alternaria* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Pestalotiopsis* sp. y *Phoma* sp.

***Pestalotiopsis* sp.**

En medio de cultivo PDA, *Pestalotiopsis* sp. presentó una coloración de blanca a beige, con textura algodonosa; el medio adquirió una tonalidad café claro, el crecimiento superficial de la colonia fue muy abundante, con micelio aéreo escaso (Figura 13a). El desarrollo de estructuras reproductivas (esporas) se inició con la aparición de puntos negros (acérvulos), con una consistencia viscosa.

Al revisar las preparaciones en el microscopio, se observaron conidios con cinco células, las tres células centrales de forma elipsoidal a fusiforme, mientras que la apical y la basal fueron puntiagudas y hialinas; y con dos apéndices (caulidios) apicales y uno en la parte basal (Figura 13b).

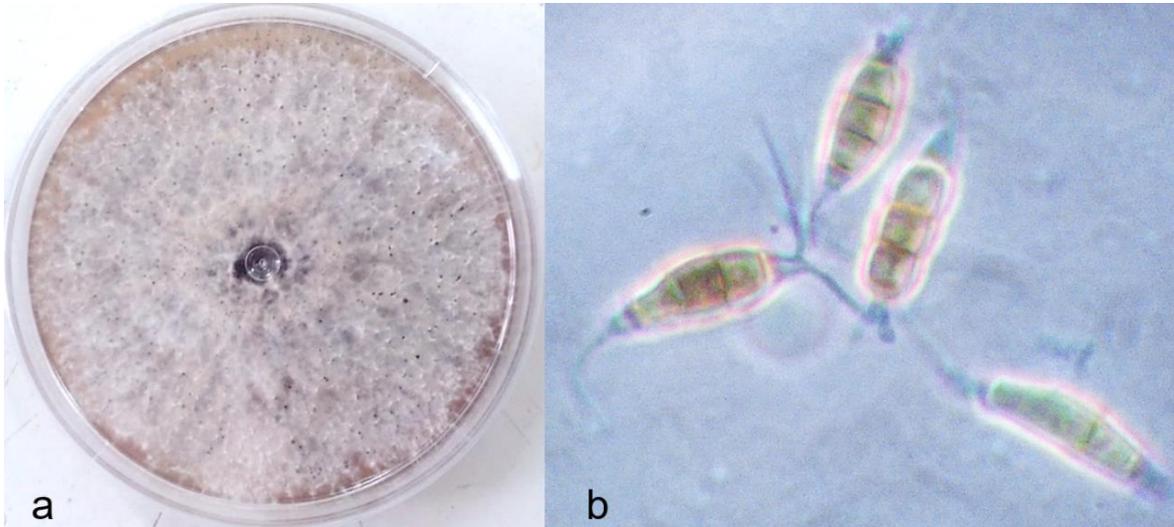


Figura 13. a) Crecimiento de la cepa en medio de cultivo PDA; b) Esporas de *Pestalotiopsis* sp. vistas al microscopio.

Además de observar las preparaciones en el microscopio óptico, se tomaron fotografías de las esporas en el microscopio electrónico de barrido (SEM) Carl Zeiss® modelo EVO MA15 (Figura 14).

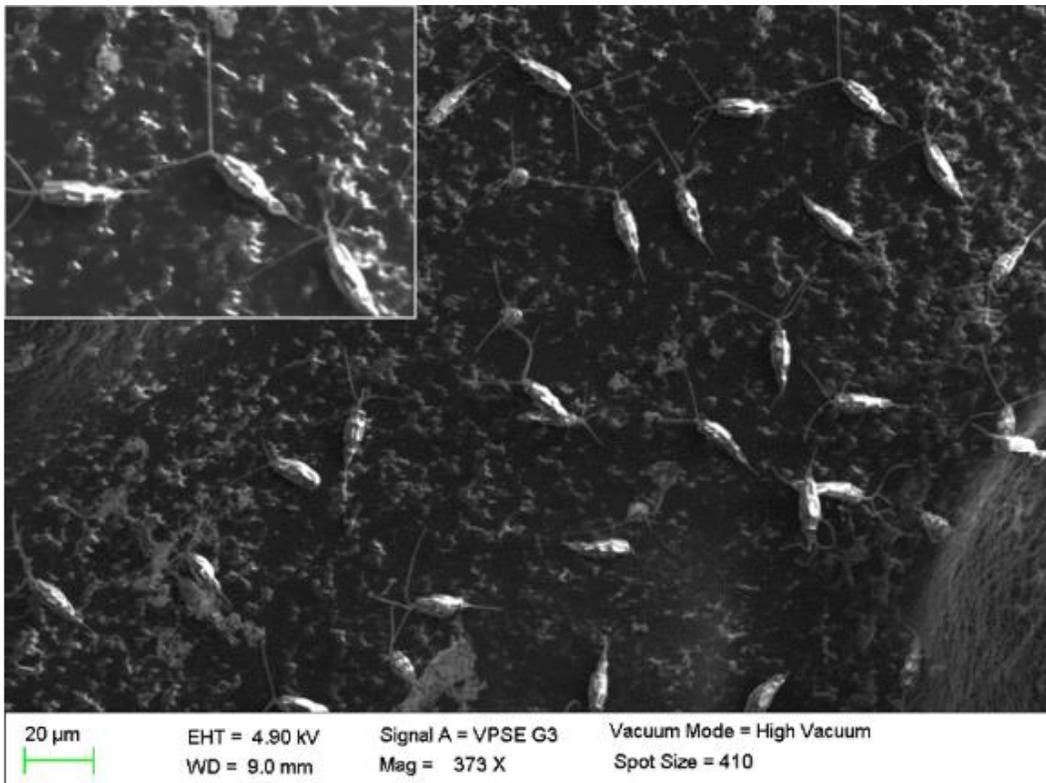


Figura 14. Microfotografía de los conidios de *Pestalotiopsis* sp. con un acercamiento en el que se aprecian con mayor detalle los caulidios.

Los fragmentos de acículas sembrados, a partir de los cuales crecieron las colonias de *Pestalotiopsis* sp. presentaron los siguientes síntomas: banda central color café claro flanqueada por dos bandas cloróticas, una en cada extremo (Figura 15a), también se observó una banda color café rojizo, con deformaciones, abultamientos y abertura del cuerpo fructífero (Figura 15b).



Figura 15. Tipos de lesiones a) Banda café claro; b) Abultamiento de la banda y crecimiento de cuerpos fructíferos; posiblemente causados por *Pestalotiopsis* sp.

Las lesiones descritas fueron atribuidas al hongo y coinciden con lo descrito por Cruz (2002), quien indica que los síntomas ocasionados por *Pestalotiopsis* se manifiestan inicialmente con una mancha amarilla y parda, comúnmente se desarrollan varias manchas cerca de la base de las agujas, mismas que con el paso del tiempo presentan marchitez.

Es importante mencionar que *Pestalotiopsis* ha sido reportado como un patógeno secundario asociado a las manchas foliares en pino (Muñoz *et al.* 2003 en García, 2009).

***Phoma* sp.**

En medio de cultivo PDA, *Phoma* sp. presentó un color blanquecino, de consistencia más lisa que algodonosa y textura terrosa, el medio no cambió de color (Figura 16). Al desarrollarse sus estructuras reproductivas se observó la presencia de puntos amarillos; una vez revisadas las preparaciones se identificaron los picnidios, de color negro, con paredes lisas y coriáceas.

Una vez elaboradas las preparaciones, se ejerció un poco de presión sobre los picnidios y se liberó una gran cantidad de conidios unicelulares, fusiformes y hialinos; a través del ostiolo.

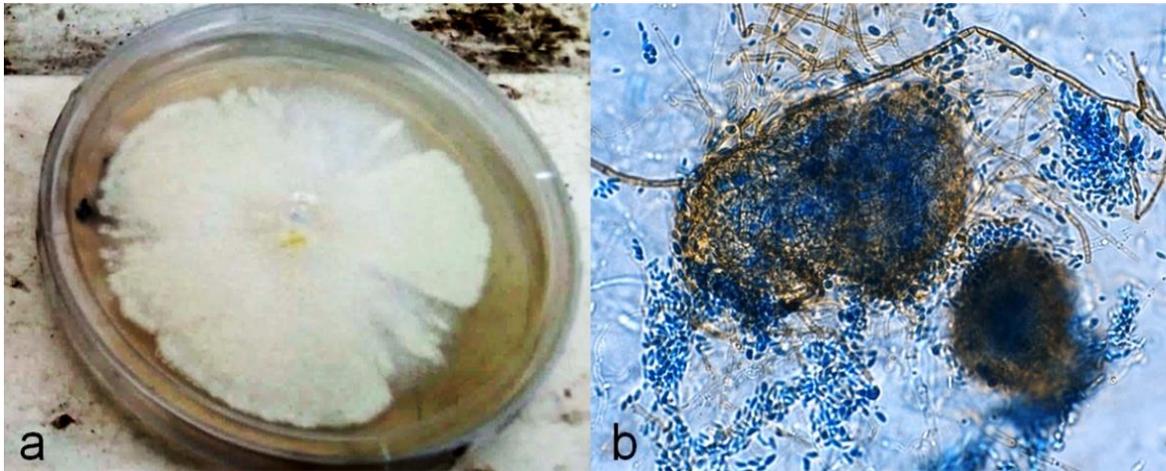


Figura 16. a) Crecimiento de *Phoma* sp. en medio de cultivo PDA; b) Vista al microscopio de los picnidios y esporas.

Los síntomas que *Phoma* ocasiona son lesiones en la base de las acículas y hendiduras protuberantes de color marrón que se elevan desde la superficie de la epidermis. Produce tizones en acículas y eventualmente ocasiona muerte regresiva y defoliación (Mohali, 1998). En el trabajo realizado por García (2009), lo reporta junto con otros géneros fúngicos, como causante de cancro y manchas foliares en pino.

Sus conidias son transportadas por el viento y la lluvia; y su presencia se asocia con áfidos que provocan heridas en la epidermis de las acículas, favoreciendo la entrada del hongo; por lo cual se considera un patógeno oportunista (Boerema, *et al.*, 1965-1973; Dorenbosch *et al.*, 1970, en Mohali, 1998).

Hongos saprobios

Bajo las mismas condiciones de siembra e incubación, crecieron y se identificaron los hongos *Alternaria* spp., *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. (Figura 17).

Las colonias de *Alternaria* sp. en medio de cultivo crecieron rápidamente y presentaron una coloración verde oscura; las laminillas, vistas al microscopio, permitieron observar sus conidios, que tienen forma de mora con septos longitudinales y transversales, formando conidióforos simples, cortos y oscuros con hifas septadas. Es un género de hongos saprófitos, es decir; que son degradadores de materia orgánica. Sin embargo, algunas especies ocasionan tizones, afectando ramas y acículas de pinos; aunque asociado a condiciones desfavorables de clima y estrés (Cruz, 2002).

Penicillium sp. se caracterizó por crecer en medio de cultivo como una colonia de color verde oliva, visto al microscopio sus conidióforos o fiálides son verticilados, sus conidios se producen en cadenas desde las fiálides, globosos y de superficie ornamentada. Entre los diversos hongos que pertenecen al género la mayoría son considerados saprófitos y cosmopolitas, algunos otros son patógenos de cítricos y otros frutales; y otros tantos son utilizados en la medicina (Webster, 1986). No hay reportes de este organismo para pino.

El género *Aspergillus* creció en medio de cultivo como una colonia verde amarillenta de apariencia filamentosa con puntos oscuros en la superficie; caracterizado por presentar un conidióforo recto que termina con una vesícula que produce fiálides en forma de empalizada, estas producen conidios de cadena, unicelulares y globosos. Se conocen como mohos negros y son cosmopolitas; utilizan una gran cantidad de sustratos; producen micotoxinas y pueden dañar a los seres humanos (Reyes-Ocampo *et al.* 2013). Tampoco hay reportes de este hongo ocasionando daños en pino.

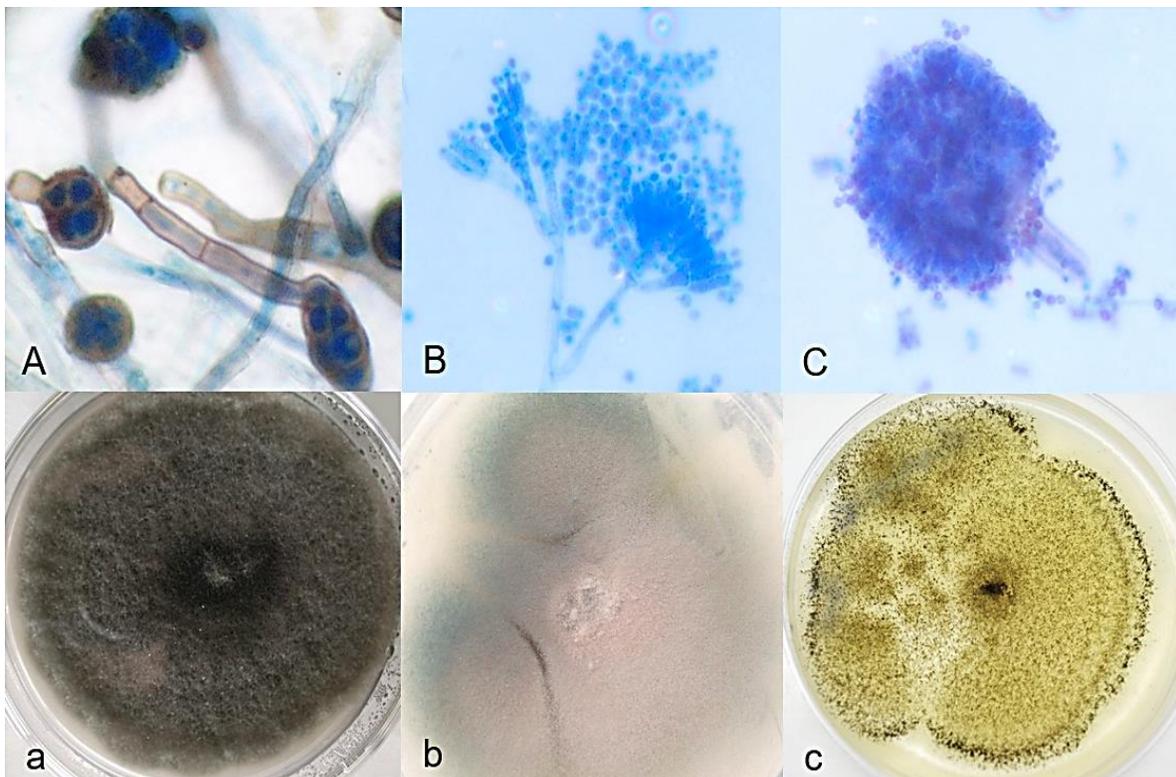


Figura 17. A) Esporas de *Alternaria* sp.; a) Crecimiento en medio PDA de *Alternaria* sp.; B) Fialides de *Penicillium* sp.; b) Crecimiento en medio PDA de *Penicillium* sp.; C) Conidiófora de *Aspergillus* sp.; c) Crecimiento de *Aspergillus* sp. en medio PDA.

Identificación molecular

Extracción de ADN

Los protocolos AP y CTAB; probados para la extracción de ADN de los hongos asociados a la caída foliar, permitieron obtener ADN íntegro y puro (Figura 18), lo cual es una parte fundamental para el éxito de la técnica de PCR. Las lecturas de la absorbancia a 260 nm y 280 nm fue de 1.9; y la proporción 260 nm /230 nm presentó un rango de 2.1, ambas son aceptadas como ADN puro.

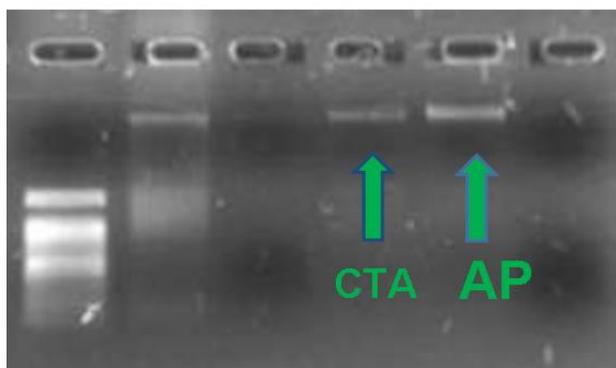


Figura 18. Calidad de ADN en gel de agarosa al 1%.

Secuenciación y alineamiento

De las 16 muestras secuenciadas, solo 10 generaron resultados; dichas secuencias fueron analizadas en el banco de genes del GenBank y los resultados se muestran a continuación.

Cuadro 4. Resultados de secuenciación de hongos asociados a la caída foliar de pino.

Género/Especie	Identidad %	No. de accesoión con que se alinea en GenBank
<i>Pestalotiopsis cocculi</i>	99	EF055190
<i>Pestalotiopsis neglecta</i>	99	EF055211
<i>Pestalotiopsis sp.</i>	100	KP050569
<i>Pestalotiopsis sp.</i>	99	JN578635
<i>Pestalotiopsis neglecta</i>	99	EF055208
<i>Pestalotiopsis sp.</i>	99	JN578635
<i>Pestalotiopsis neglecta</i>	95	EF055210
<i>Pestalotiopsis sp.</i>	99	JN578635
<i>Pestalotiopsis neglecta</i>	99	EF055212
<i>Phoma glomerata</i>	99	AY183371

La secuenciación con mayor porcentaje de identidad correspondió al género *Pestalotiopsis* sp.; en una cepa obtuvo el 100% y en otras tres un 99% de identidad.

Se identificaron 4 cepas de *Pestalotiopsis neglecta*, tres con 99% de identidad y una con 95%. Esta especie ha sido reportada como causante de manchas cloróticas en plantaciones de maíz (*Zea mays*) (Tagne y Mathur, 2000). A su vez, se han obtenido aislamientos provenientes de *Cupressus torulosa*, causando interés por su posible aplicación en la industria farmacéutica (Shaarma *et al.* 2016).

Otra de las cepas coincidió con *Pestalotiopsis cocculi* con 99% de identidad. Existen reportes de esta especie como agente causal del manchado de hojas en el árbol de pecan, en Brasil (Lazarotto *et al.* 2014).

La cepa restante fue identificada como *Phoma glomerata* con 99% de identidad. Esta especie fue registrada como causante de una enfermedad que produce manchas en hojas de *Schisandra chinensis*, nativo de China (Wang, *et al.* 2012). Además, ha sido reportado como causante de cancro en brotes de árboles de durazno (Thomidis, *et al.* 2011). Esta especie también se ha reconocido en *Acacia retinodes*, asociada con manchados foliares, aunque no había registros previos de que produjera esa sintomatología en el hospedero (Reséndiz *et al.* 2015).

A pesar de que no existen registros para ninguna de las especies identificadas, que las señale como agente causal de manchado en acículas de pino, para todas las especies, se encontró información que las identifica como causantes de daños en plantas de distintas partes del mundo.

Evaluación de daños

Después de realizar la inoculación se tomaron fotografías de las plántulas de *Pinus patula* inoculadas con *Pestalotiopsis* sp. y *Phoma* sp. en cada revisión. En la siguiente imagen, se muestra el aspecto inicial y final de los pinos (Figura 19).

Además, se estableció una escala cualitativa de cuatro niveles, basada en los síntomas de la enfermedad, con el fin de determinar el daño que sufrieron los pinos, (Cuadro 5).

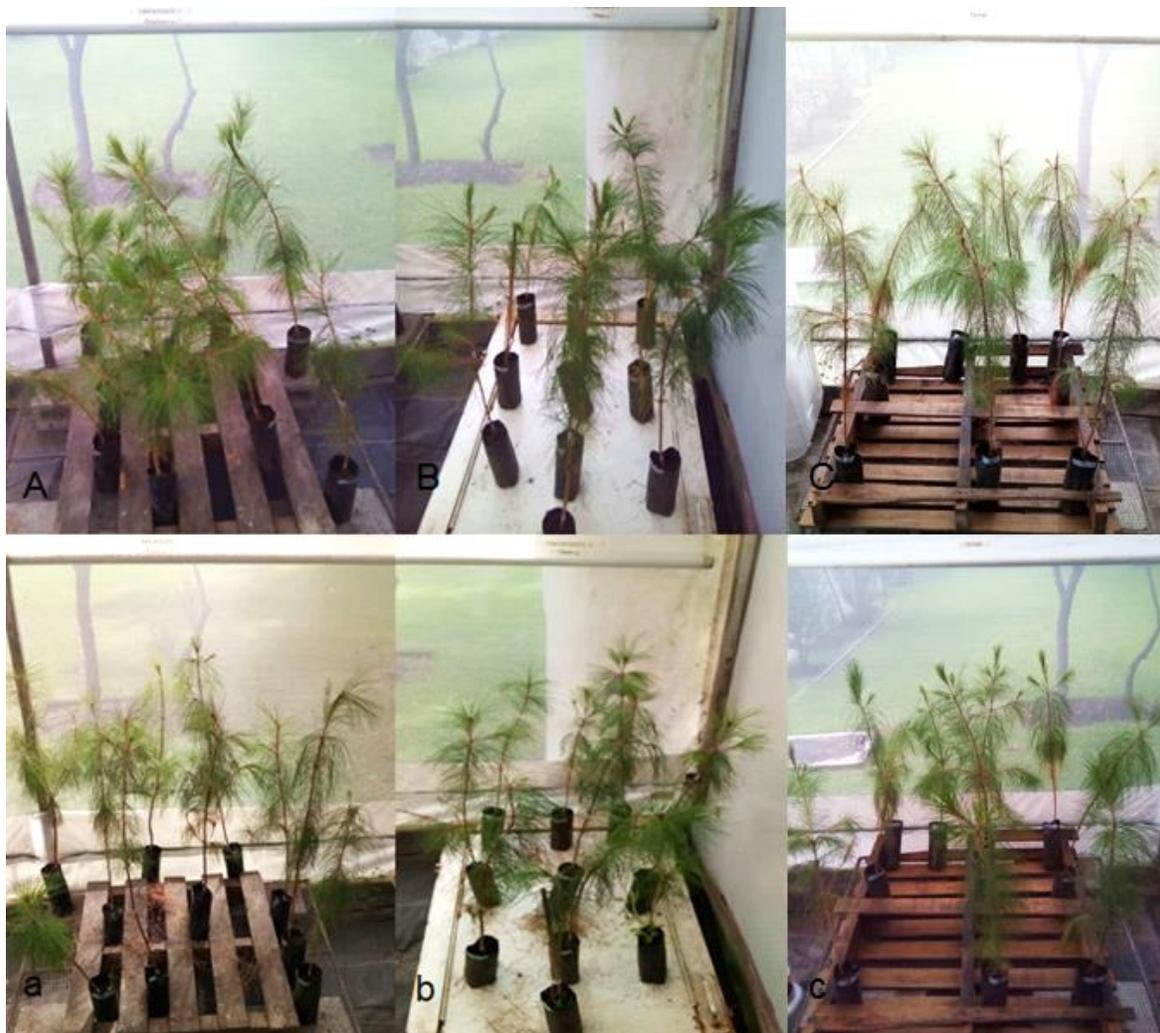


Figura 19. A) Estado inicial de los pinos inoculados con *Pestalotiopsis* sp.; a) Estado final de los pinos inoculados con *Pestalotiopsis* sp.; B) Estado inicial de los pinos inoculados con *Phoma* sp.; b) Estado final de los pinos inoculados con *Phoma* sp.; C) Estado inicial de los pinos del grupo testigo; c) Estado final de los pinos del grupo testigo.

Cuadro 5. Escala basada en los daños observados en las plántulas de pino.

Nivel de daño	Descripción del daño
0	No se observaron cambios (0%)
1	Se observaron puntas secas y algunas manchas cloróticas (1 a 25%)
2	Daño medio de acículas, algunas completamente secas (26 a 50%)
3	Daño severo de acículas, más de la mitad secas (51 a 100%)

* Escala elaborada con base en el desarrollo de la enfermedad observado a nivel de campo.

Con base en los registros de las cuatro revisiones de los pinos y los valores de la escala, se detectaron los siguientes cambios; tanto en el tratamiento con *Pestalotiopsis* sp. (Tabla

1) como el de *Phoma* sp. (Tabla 2), los daños observados en las plántulas de pino fueron mínimos. A los 15 días de haber sido inoculados, los pinos no desarrollaron ningún síntoma de infección, a los 30 días fue posible observar algunas acículas secas y puntas que empezaron a secarse. Sin embargo; la infección no avanzó en las revisiones posteriores, incluso algunos pinos permanecieron sin daños a lo largo de los dos meses.

Tabla 1. Nivel de daño observado en las plántulas inoculadas con *Pestalotiopsis* sp. (T1)

Punción con <i>Pestalotiopsis</i> sp.	Primera revisión	Segunda revisión	Tercera revisión	Cuarta revisión
<i>Pinus patula 1</i>	0	1	1	1
<i>Pinus patula 2</i>	0	0	0	0
<i>Pinus patula 3</i>	0	1	1	1
<i>Pinus patula 4</i>	0	1	1	1
<i>Pinus patula 5</i>	0	1	1	1
<i>Pinus patula 6</i>	0	0	0	0
<i>Pinus patula 7</i>	0	1	1	1
<i>Pinus patula 8</i>	0	1	1	1
<i>Pinus patula 9</i>	0	0	0	0
<i>Pinus patula 10</i>	0	0	0	0

Tabla 2. Nivel de daño observado en las plántulas inoculadas con *Phoma* sp. (T2)

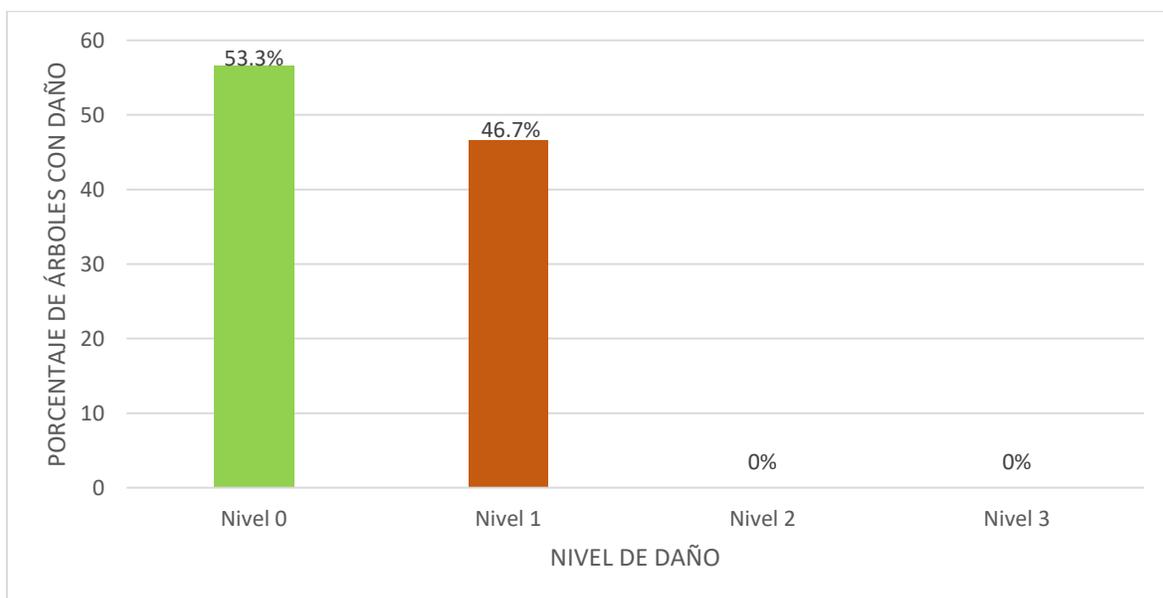
Punción con <i>Phoma</i> sp.	Primera revisión	Segunda revisión	Tercera revisión	Cuarta revisión
<i>Pinus patula 1</i>	0	1	1	1
<i>Pinus patula 2</i>	0	1	1	1
<i>Pinus patula 3</i>	0	1	1	1
<i>Pinus patula 4</i>	0	0	0	0
<i>Pinus patula 5</i>	0	1	1	1
<i>Pinus patula 6</i>	0	1	1	1
<i>Pinus patula 7</i>	0	1	1	1
<i>Pinus patula 8</i>	0	1	1	1
<i>Pinus patula 9</i>	0	0	0	0
<i>Pinus patula 10</i>	0	1	1	1

En el caso del grupo testigo, ninguna de las plántulas presentó daños, desde la primera hasta la cuarta revisión, todas permanecieron en buenas condiciones (Tabla 3).

Tabla 3. Observaciones de las plántulas testigo (T3)

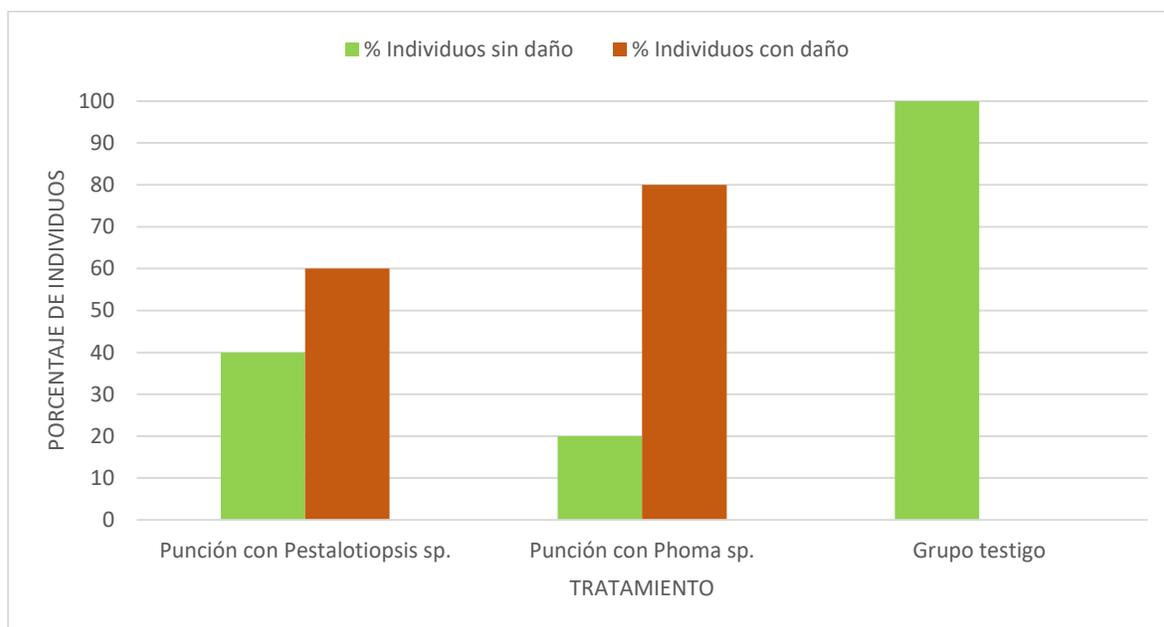
Testigo	Primera revisión	Segunda revisión	Tercera revisión	Cuarta revisión
<i>Pinus patula 1</i>	0	0	0	0
<i>Pinus patula 2</i>	0	0	0	0
<i>Pinus patula 3</i>	0	0	0	0
<i>Pinus patula 4</i>	0	0	0	0
<i>Pinus patula 5</i>	0	0	0	0
<i>Pinus patula 6</i>	0	0	0	0
<i>Pinus patula 7</i>	0	0	0	0
<i>Pinus patula 8</i>	0	0	0	0
<i>Pinus patula 9</i>	0	0	0	0
<i>Pinus patula 10</i>	0	0	0	0

En cuanto a la incidencia de cada nivel de daño en los 30 árboles con los que se realizaron las pruebas de inoculación, 16 (53.3%) presentaron el nivel de daño 0, es decir, no tuvieron ningún cambio. En tanto que, 14 (46.7%) de las plántulas desarrollaron el nivel de daño 1; y para los niveles de daño 2 y 3 el porcentaje fue de 0% (Gráfica 1).



Gráfica 1. Porcentaje de incidencia de cada nivel de daño establecido en la escala.

Mientras que los resultados por grupo fueron; en el tratamiento 1, 60% con nivel de daño 1 y 40% con nivel de daño 0. En el tratamiento 2, fueron 80% los que desarrollaron nivel de daño 1, y 20% el nivel 0. En el grupo testigo no sucedió ningún cambio desde la inoculación hasta la cuarta revisión (Gráfica 2).



Gráfica 2. Porcentaje de individuos que presentaron daño en cada tratamiento.

De acuerdo con Hansen (2003) en condiciones naturales, *Pestalotiopsis* sp. sobrevive en material vegetal muerto, donde se forman los acérvulos, que emiten conidios infectivos, los cuales son transportados por las lluvias y penetran a través de heridas en tejido debilitado o joven; generando lesiones que progresan hasta llegar a ocasionar la muerte de las ramas cuyas hojas presentan marchitez.

Por otra parte, Solarte (2014) probó la patogenicidad de varias cepas de *Pestalotiopsis* sp. en frutos de guayaba, encontró diferentes grados de agresividad y separó las cepas en tres grupos. Los aislamientos poco agresivos desarrollaron lesiones pequeñas y pocos acérvulos sobre los frutos; los aislamientos medianamente agresivos, provocaron mayor cantidad de acérvulos superficiales, pero poco micelio; y los aislamientos altamente agresivos ocasionaron gran cantidad de micelio y acérvulos superficiales.

En comparación con lo descrito por Hansen y extrapolando lo obtenido por Solarte, con la cepa de *Pestalotiopsis* sp., en el presente estudio éste género de hongo fue poco agresivo,

ya que los niveles de daño desarrollados en las plántulas de *Pinus patula* correspondieron a pocas manchas cloróticas y algunas puntas secas.

Con respecto a *Phoma* sp., de acuerdo con la investigación de Baltodano (2009) produce tizones y ocasiona muerte regresiva en acículas, seguida de defoliación. Las ramas donde se forman los chancros tienen la corteza fracturada e impregnada de resina, y sobre estas lesiones se desarrollan sus cuerpos fructíferos; éste tipo de cancro requiere que el cambium se encuentre expuesto (Cibrián y García, 2007). En época lluviosa observó mayor formación de cuerpos fructíferos sobre las lesiones, otra condición que predispone a los pinos a este daño es el bajo nivel nutricional del suelo.

Al igual que en el caso de *Pestalotiopsis* sp., la cepa de *Phoma* sp. resultó poco agresiva y no se observaron síntomas como los reportados por Baltodano.

Por otro lado, Ramírez (2009), probó seis métodos de inoculación y concluyó que el método más efectivo en cuanto a porcentaje de infección y que ocasionó mayor daño, fue el de inoculación con heridas, utilizando un palillo. Método que consistió en hacer un raspado con el escarbadiantes en la parte superficial de la cepa del hongo contenido en el medio de cultivo, para luego introducirlo a 3 cm sobre el cuello de la planta.

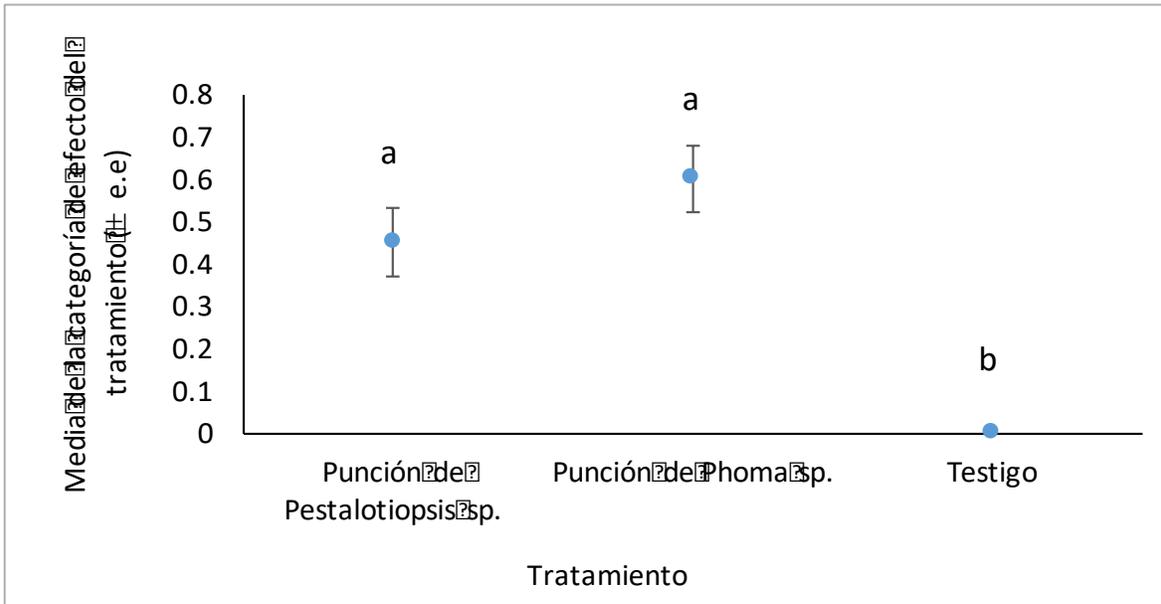
El método de punción utilizado en el este proyecto, es un análogo del utilizado por Ramírez; sin embargo, los cambios en las plántulas y el nivel de daño obtenido fueron mínimos, tal como se ha señalado previamente. Esto nos indica que las cepas de *Pestalotiopsis* sp. y *Phoma* sp. tuvieron una acción patogénica débil.

Aunado a lo expuesto anteriormente, se debe considerar que los daños que presentó *Pinus patula* están relacionados con material vegetal estresado, de mala calidad o condiciones medioambientales inadecuadas para la especie; por lo que pudo ser susceptible a una variedad de patógenos y enfermedades del follaje, tallo, conos, raíz y el duramen (FNC, 2011).

Esta información permite integrar el análisis de los resultados obtenidos y nos ayuda a señalar que otro factor determinante para el éxito de las pruebas de patogenicidad es la resistencia de los pinos, mismos que en este experimento fueron ejemplares sanos que se encontraban en condiciones adecuadas para su desarrollo; lo que les permitió resistir al ataque de los hongos inoculados.

Análisis estadístico

La prueba de Friedman mostró que hubo un efecto significativo de los tratamientos sobre los niveles de daño en los pinos ($\chi^2 = 34.66$, g.l. = 2, n = 40). Asimismo, las pruebas de comparación múltiple señalan que las medias de los niveles de daño con punción fueron significativamente mayores que con el tratamiento testigo (Gráfica 3).

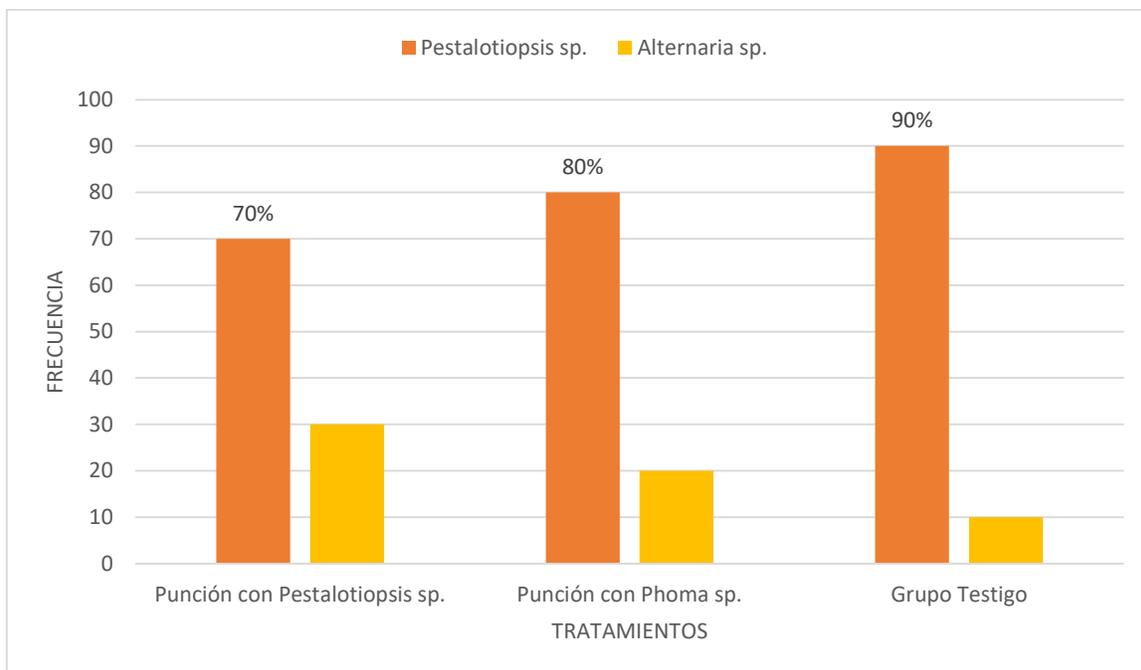


Gráfica 3. Medias de las categorías del nivel de daño de los tratamientos sobre los *Pinus patula* después de cuatro registros. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($\alpha' < 0.0167$).

Este análisis complementa lo que se ha señalado anteriormente; a pesar de que los tratamientos de punción con los hongos tuvieron un efecto significativo en las plantas, en comparación con el tratamiento testigo, *Pestalotiopsis* sp. y *Phoma* sp. mostraron poca capacidad patogénica y una respuesta débil, por lo que no pueden ser considerados como patógenos primarios, debido a la respuesta que ocasionaron en el bajo número de acículas dañadas, a pesar de que las plántulas fueron inoculadas mediante una herida el daño ocasionado a los pinos no resultó grave.

Reaislamiento posterior a la inoculación

A partir de las muestras de acículas de los pinos de los tres tratamientos se aislaron e identificaron dos hongos, *Pestalotiopsis* sp. y *Alternaria* spp.; en ninguno de los casos se obtuvo crecimiento de *Phoma* sp. (Gráfica 4).



Gráfica 4. Frecuencia de aparición de *Pestalotiopsis* sp. y *Alternaria* spp. en cada tratamiento.

El género fúngico con mayor frecuencia en los tres tratamientos fue *Pestalotiopsis*. Contrario a lo esperado, su menor frecuencia se dio en los aislamientos provenientes del tratamiento 1, con 70%; mientras que en el tratamiento 2, con un ligero aumento, se presentó 80% de las veces; y su mayor frecuencia se dio a partir de los aislamientos del grupo testigo.

Al comparar este resultado con la evaluación de daños, se puede apreciar que, a pesar de haber obtenido el desarrollo de la cepa inoculada, su presencia no se relaciona con el desarrollo de signos y síntomas de enfermedad en las plántulas de pino, ya que fue encontrada con mayor frecuencia en el grupo testigo, cuyas plantas no presentaron daños. Los datos nos confirman que la mayoría de las especies de *Pestalotiopsis* son cosmopolitas (Keith *et al.*, 2006). Por otro lado, la agresividad de los aislamientos de éste género es muy variable debido a su amplia dispersión, diversidad de especies y rango de hospederos (Solarte, 2014).

En cuanto al hongo *Alternaria* spp., con frecuencias de 30% en el tratamiento 1, 20% en el tratamiento 2, y 10% en el testigo; se atribuye su presencia a que es uno de los contaminantes más comunes a la hora de realizar siembras y aislamientos, puesto que es un microorganismo saprobio; aunque podría formar parte de la microbiota de esta especie

de pino, lo anterior se deriva de la revisión de los resultados de este trabajo, puesto que, dicho hongo creció a partir de las muestras de acículas de la Sierra Norte de Puebla, en los primeros aislamientos. A pesar de que no fue inoculado, estuvo presente en las plántulas de *Pinus patula*, empleadas para realizar las pruebas de patogenicidad, mismas que no desarrollaron daños significativos; lo que nos lleva a señalar que su presencia no afectó a la salud de los pinos.

La información consultada y los resultados obtenidos, nos dan herramientas para sugerir que *Phoma* sp. y *Pestalotiopsis* sp. no son agentes causales de la enfermedad de la caída foliar de pinos en la Sierra Norte de Puebla. Puesto que, aunque fueron aislados del material proveniente de la zona de estudio, no se logró reproducir la enfermedad encontrada a nivel de campo después de aplicar los postulados de Koch.

Los resultados nos confirman que tanto *Pestalotiopsis* sp. como *Phoma* sp. actuaron como saprobios o patógenos débiles en este trabajo de investigación.

Es importante considerar que *Pinus patula* es una especie intolerante a la sombra, es sensible a la competencia especialmente durante sus primeros años, así como al daño por sequías cuando se planta en sitios sujetos a temporadas secas prolongadas (mayores a 3 meses), en suelos poco profundos o que no retienen la humedad. Además, tiene una corteza delgada, lo que hace que sean árboles susceptibles al daño por el fuego. Por otro lado, al ser una especie de pino tropical, resiste las heladas hasta cierto punto, siempre y cuando se encuentre en un estado inactivo (Gillespie, 1992). También es importante no confundir los daños causados por hongos, con toxicidad por herbicidas o deficiencias nutricionales (FNC, 2011).

De acuerdo con Agrios (2004), la aparición de muchas enfermedades en las plantas, depende del tipo de condiciones climáticas que le antecedieron, las que predominan y las que probablemente prevalezcan durante su desarrollo. Tal y como se mencionó anteriormente para el caso específico de *Pinus patula*; la incidencia de una enfermedad que lo afecte está en función de la temperatura y la humedad. La falta de humedad en la atmósfera, combinada con las altas temperaturas y la rápida velocidad del viento, hace que el follaje de las plantas pierda una cantidad excesiva de agua, favoreciendo el chamuscado y la marchitez temporal o permanente de las plantas.

En este contexto, desde el 2009 se registró que el estado de Puebla perdió 107 mil 174 hectáreas de bosque, 30% de su superficie boscosa total; de acuerdo con datos del Instituto

Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) (Mena, 2009). Para el 2012 se reportó que México vivió una prolongada sequía con efectos muy graves, tanto en la producción agrícola como ganadera (Valiente, 2012). Otros reportes señalaban que se trataba de un problema grave, que podía agudizarse (Quiroz, 2012).

En el 2016, el director del Instituto de Investigaciones Interdisciplinarias en Medio Ambiente de la Universidad Iberoamericana Puebla, Benjamín Ortiz Espejel, señaló que en Puebla existían dos focos de alta vulnerabilidad, uno ubicado en la Sierra Norte y el otro en la zona de la Mixteca. Además, expuso que, en el caso de la Sierra Norte de Puebla, existe una franja de municipios pobres sujetos a un escenario de altas probabilidades de eventos extremos, tanto de reducción de lluvia como de aumento de temperatura (Mondragón, 2016).

Reportes de sequías han continuado hasta el presente, en un estudio realizado por el gobierno de Puebla, se señaló que la precipitación pluvial anual del estado, puede disminuir 14.6% en un futuro cercano y la temperatura media tiende a incrementarse (Mena, 2017).

Es importante considerar al problema no como un hecho aislado ocasionado por un solo factor, sino como parte de un conjunto de eventos que han afectado el ecosistema en la Sierra Norte. No se trata únicamente de encontrar el o los agentes patógenos; para ocasionar un daño tan grave como el observado en la zona, fue necesario que se presentaran condiciones adversas causadas por alteraciones del medio ambiente, tales como cambios bruscos de temperatura y humedad, deficiencia o exceso de minerales en el suelo, anegamiento, sequías, incendios, entre otros.

Por lo tanto, se considera que la enfermedad encontrada en la Sierra Norte de Puebla, fue ocasionada por agentes abióticos o patógenos primarios que produjeron un estado de debilidad en los árboles; o bien, por condiciones desfavorables para el desarrollo normal de los pinos, mismas que ocasionaron estrés en los pinos, permitiendo a los hongos identificados colonizar las acículas (García, 2009).

CONCLUSIONES

Se realizó la identificación de siete síntomas en acículas de pino procedentes de la Sierra Norte de Puebla y el síntoma predominante en las cinco localidades fue el manchado negro en acículas secas, correspondiente a los tizones; además se determinó que algunos de los síntomas se relacionaron por ser diferentes etapas de desarrollo entre sí.

Se identificaron cinco géneros fúngicos y se describieron sus características morfológicas, *Alternaria* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Pestalotiopsis* sp. y *Phoma* sp. los dos últimos destacaron ya que se encontraron reportados como patógenos secundarios.

En las pruebas de patogenicidad con *Pestalotiopsis* sp. y *Phoma* sp. se cumplió con las condiciones necesarias para que los hongos infectaran a las plántulas de pino, sin embargo, no se obtuvieron los resultados esperados, 53.3% de los pinos presentaron el nivel de daño 0; 46.7% desarrollaron el nivel de daño 1; y 0% de las plántulas tuvieron los niveles de daño 2 y 3. La actividad patogénica de estos hongos no ocasiono daños severos en las plántulas de *Pinus patula*.

El análisis estadístico demostró que los tratamientos de punción con los hongos tuvieron un efecto significativo en los pinos, en comparación con el tratamiento testigo; sin embargo, por su acción patogénica débil, *Pestalotiopsis* sp. y *Phoma* sp. no son considerados causantes de la caída foliar en de los pinos en la Sierra Norte de Puebla.

Se debe de considerar que la problemática de que afrontan los pinos (la caída foliar) de la Sierra Norte de Puebla es causada por agentes abióticos y sucesos como sequías que empezaron a suceder desde el 2009 cómo efectos del cambio climático; y que han continuado, siendo la del año 2012 una de las más graves. Además de otras condiciones adversas en la zona (incendios que ocurren periódicamente).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. N. 2004. Fitopatología. 1ra. ed. Editorial Limusa. México. 431, 432, 433, 312, 313, 368, 369 pp.
- Aveskamp, M.M., De Gruyter, J. and Crous, P.W. 2008. Biology and recent developments in the systematics of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance. *Fungal Diversity* 31: 1-18.
- Baltodano, I. 2009. Diagnóstico de enfermedades en Pino (*Pinus sp*) en fincas del municipio de San Fernando, Nueva Segovia. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua.
- Barnett, H. L: y B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing. E.U.A. 241 pp.
- Boerema, G. H. 1976. The *Phoma* species studied in culture by Dr. R. W. G. Dennis. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 67: 289-319.
- Caceres, P. V. 1999. Evaluación de tres fungicidas en el control del derrite del café (*Phoma sp.*). Tesis de licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Agronomía. Guatemala. 88 pp.
- Calderón, D. J. y Santos, B. M. 2015. Identificación de microorganismos del género *Phytophthora* asociados a especies de *Quercus sp.* y *Pinus sp.*, en los departamentos de Guatemala y Sacatepéquez. *Ciencia, tecnología y salud* 2 (1): 47-52.
- Cibrián, T.D., Alvarado, R.D. Y García, D.S. 2007. Enfermedades Forestales en México. 1era Ed. México. Universidad Autónoma de Chapingo. 587 pp.
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad) - PRONARE (Programa Nacional de Reforestación). 2006. Sistema de Información para la Reforestación (SIRE). Paquetes tecnológicos. Especies varias. Recuperado de: <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/975Pinus%20patula.pdf>
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 2011. La Biodiversidad en Puebla: Estudio de Estado. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Gobierno del Estado de Puebla, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.

- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 2013. Estrategia para la conservación y uso sustentable de la biodiversidad del Estado de Puebla. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad de Puebla. México.
- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal). 2013. Bosques, cambio climático y REDD en México. Guía básica. Coordinación General de Producción y Productividad Segunda edición. México.
- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal). 2014. Enfermedad de caída foliar de los pinos. Tríptico. Promotoría de desarrollo forestal de Chignahuapan, Puebla.
- Cruz, C. L. 2002. Patógenos Involucrados en la muerte de pino *Pinus halepensis* Mill en la zona de Reforestación de Zapalinamé. Tesis de Ingeniería. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 72 pp.
- Curvelo, G. y Rojas, B. 2010. Revisión preliminar de medios de cultivo empleados en estudios de microorganismos de los phylums Ascomycetes, Deuteromycetes y Oomycetes como agentes causantes de enfermedades en plantas. Tesis de licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 86 pp.
- Delgado, L. E. 2009. Identificación de agentes causantes de enfermedades en plántulas forestales, en Fondebosque-Juan Guerra-San Martín. Tesis de licenciatura. Perú. 95 pp.
- Dorenbosch, M. M. 1970. Key to nine ubiquitous soil-borne *Phoma* like fungi. *Persoonia* 6 (1): 1-14.
- Dvorak, W.S.; Donahue, J.K. Camcore cooperative research review 1980-1992. North Carolina: North Carolina State University, 1992. 93 p.
- Earle, J. C. 2007. Gymnosperm Database. Recuperado de: <http://www.conifers.org/index.htm>.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2005. Situación de los bosques del mundo. FAO. Roma, Italia.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2015. Evaluación de los recursos forestales mundiales. FAO. Roma, Italia.

- FHIA (Forest Home Improvement Association). 2007. Deterioro postcosecha de los frutos y hortalizas frescas por hongos y bacterias. Recuperado de: <http://www.fhia.org.hn/downloads/fhiainfdic2007.pdf>
- FNC (Fondo Nacional del Café). 2011. El pino patula. Guías silviculturales para el manejo de especies forestales con miras a la producción de madera en la zona andina colombiana. Editorial Blanecolor. Colombia, 105 pp.
- García, V. A. 2009. Estudio del comportamiento de enfermedades en bosques de pino (*Pinus oocarpa* Schiede ex Schltldl), en el municipio de San Fernando en Nueva Segovia. Tesis de ingeniería. Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua. 91 pp.
- Gernandt, D. S. y Pérez-de la Rosa, J. A. 2014. Biodiversidad de Pinophyta (coníferas) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84: 126-133.
- Gilchrist-Saavedra, L., Fuentes-Dávila, G. y Martínez-Cano, C. 1995. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. CIMMYT. México, Distrito Federal.
- Gillespie, Andrew J.R. 1992. *Pinus patula* Schiede and Deppe. Patula pine. SO-ITF-SM-54. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 5 p.
- García, V. A. 2009. Estudio del comportamiento de enfermedades en bosques de pino (*Pinus oocarpa* Schiede ex Schltldl), en el municipio de San Fernando en Nueva Segovia. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua.
- Gobierno del Estado de Puebla. 2005. Enciclopedia de los municipios de México, Puebla. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal.
- Gobierno del Estado de Puebla. 2011. Plan Nacional Forestal del Estado de Puebla 2011-2017. México. 308 pp.
- Gómez, C., Greslebin, A., y Rajchenberg, M. 2010. Plagas y enfermedades de *Pinus* sp. en la región Andino Patagónica. Facultad de Ingeniería. UNPSJB. Buenos Aires, Argentina.

- González S., M. L. 2004. Caracterización del complejo de patógenos causales del tizón de la acícula del pino en la Finca Saquichai, Cobán, Alta Verapaz. Facultad de Agronomía. Universidad de San Carlos. Guatemala, Guatemala. 42 p.
- Hansen, E. M., Lewis, K. J. 2003. Plagas y enfermedades de las coníferas. 2da edición. Editorial Mundi Prensa. España. 121 pp.
- Inafed (Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal). 2016. Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México; Estado de Puebla. Recuperado de: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM21puebla/regionalizacion.html>.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática). 2006. Sistema Fisiográfico DGGTENCAL. Escrito de la Subdirección de Actualización de Recursos Naturales: "Las Provincias Fisiográficas de México y sus Subdivisiones". México.
- Instituto Nacional de Bosques (INAB). 2017. Pino Candelillo *Pinus maximinoi* H.E. Moore Paquete tecnológico forestal. Guatemala. 37 pp.
- ITIS (Integrated Taxonomic Information System). 2017. Taxonomic hierarchy. Recuperado de: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=18035#null.
- Keith, L. M., Velásquez, M. E., y Zee, F. T. 2006. Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing scab disease of guava, *Psidium guajava*, in Hawaii. Plant Disease 90: 16-23.
- Lazarotto, M., Pitorini, B. M., Briao, M. M., Harakawa, R., Silveira, R. L. y Figueredo, S. A. 2014. Identificación y caracterización de especies patogénicas de *Pestalotiopsis* en árboles de pecan en Brasil. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 49(6).
- Liu, A.R., Xu, T. y Guo, L.D. (2007). Molecular and morphological description of *Pestalotiopsis hainanensis* sp. nov., a new endophyte from a tropical region of China. Fungal Diversity 24: 23-36.
- Lugo-Hubp, J., Zamorano-Orozco, J., Moshe Inbar, L. y Alcántara-Ayala, I. 2005. Los procesos de remoción en masa en la Sierra Norte de Puebla, octubre de 1999: Causa y efectos. Revista Mexicana de Ciencias Geológicas 22(2): 212-228.

- Martínez, A. M., Evangelista, O. V., Basurto, P. F., Mendoza, C. M. 2002. La etnobotánica y los recursos fitogenéticos: El caso de la Sierra Norte de Puebla. *Revista de Geografía Agrícola* 31:79-88.
- Martínez, M. 1992. Los pinos mexicanos. 3ª ed. Ediciones Botas. México, D.F. Pp. 38-78.
- Martínez, S. J. 2009. Estudio del comportamiento de enfermedades en bosques de pino (*Pinus caribaea* Schiede ex Schltdl), en el municipio de San Fernando en Nueva Segovia. Tesis de ingeniería. Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua.
- Mena, M. 17 de junio de 2009. Se pierden más de 107 mil hectáreas de bosque en Puebla. Fondo para la comunicación y la educación ambiental. Recuperado de: <https://agua.org.mx/se-pierden-mas-de-107-mil-hectareas-de-bosque-en-puebla/>
- Mena, M. 9 de octubre de 2016. Con plaga tres mil hectáreas de pinos en la Sierra Norte de Puebla. Local. Recuperado de: <https://www.elsoldepuebla.com.mx/local/con-plaga-tres-mil-hectareas-de-pinos-en-la-sierra-norte-de-puebla>
- Mena, M. 21 de marzo de 2017. Padecen sequía 68 municipios de Puebla. El Sol de Puebla. Recuperado de: <https://www.elsoldepuebla.com.mx/local/padecen-sequia-68-municipios-de-puebla-861408.html>
- Mohali, S. 1998. Asociación de *Lophodermium australe* y *Phoma pomorum* en acículas de pino caribe. *Revista de Ecología Latinoamericana* 5(3):7-14.
- Mondragón, L. 30 de mayo de 2016. Prevén situación crítica ante el Cambio climático, en la Sierra Norte. Local. Recuperado de: http://intoleranciadiario.com/detalle_noticia/144391/municipios/preven-situacion-critica-ante-el-cambio-climatico-en-la-sierra-norte
- Morales-Ramírez, A. 2007. Evaluación de la patogenicidad de *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & Sutton colectado en material de *Pinus radiata* D. Don, en Valdivia y la Costa de Arauco. Tesis de licenciatura. Chile.
- Muñoz, L. C., Pérez, F. V., Cobos, S. P., Hernández, A. R. y Sánchez, P. G. 2003. Sanidad Forestal: Guía en imágenes de plagas, enfermedades y otros agentes presentes en los bosques. 2da edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.

- National Academy of Sciences. 1980. Desarrollo y Control de las Enfermedades de las Plantas. Control de Plagas de Plantas y Animales. Vol 1. Editorial Limusa. México. 223 pp.
- Páez, G. S. 7 de noviembre de 2016. Bosques en Puebla, en riesgo de desaparecer. Poblannerías. Recuperado de: <http://www.poblannerias.com/2016/11/bosques-en-puebla-en-riesgo-de-desaparecer/>
- Peralta, M. J. 2011. Estado actual de los mamíferos silvestres de la Sierra Norte de Puebla. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Tesis de licenciatura. México.
- Pérez, M. R., Romero S. M., González H. A., Pérez S. E. y Arriola P. V. J. 2016. Distribución potencial de *Lophodermium* spp. en bosques de coníferas, con escenarios de cambio climático. Revista Mexicana de Ciencias Forestales 7 (36): 81 – 97.
- Pérez-Vera, O. 2009. Caracterización morfológica, molecular e histopatología de hongos ophiostomatoideos asociados al pino de las alturas (*Pinus hartwegii* Lindl). Tesis de doctorado. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado de México.
- Perry, J. P. 1991. The pines of Mexico and Central America. Timber Press. Portland, Oregon. 231p.
- Pildain M. B. y Errasti A. 2011. Hongos patógenos de Pinos en la Patagonia y su asociación con plagas entomológicas. Laboratorio de Ecología de Insectos, EEA INTA Bariloche. 13 pp.
- Poblannerías. 10 de octubre de 2016. Plaga afecta 3 mil hectáreas de pino en la Sierra Norte de Puebla. Local. Recuperado de: <https://www.poblannerias.com/2016/10/plaga-afecta-3-mil-hectareas-de-pino-en-la-sierra-norte-de-puebla/>
- Quiroz, C. 18 de enero de 2012. La mitad del país padece la sequía; Segob teme que se agrave. Excelsior. Recuperado de: <https://www.excelsior.com.mx/2012/01/18/nacional/803053>
- Ramírez-Herrera, C., Vargas-Hernández, J.J. y López-Upton, J. 2005. Distribución y conservación de las poblaciones naturales de *Pinus greggii*. Acta Botánica Mexicana 72: 1-16.

- Ramírez, F. Y., Orrego, F. A. 2009. Eficiencia de diferentes métodos de inoculación artificial de *Macrophomina phaseolina* en soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Revista Investigación Agraria, 10 (2): 66-71.
- Reséndiz, M. J. F., Guzmán, D. L., Muñoz, V. A. L., Nieto de Pascual, P. C. y Olvera, C. L. P. 2015. Enfermedades foliares del arbolado en el Parque Cultural y Recreativo Tezozómoc, Azcapotzalco, D.F. Revista Mexicana de Ciencias Forestales 6(30): 126-123.
- Reyes-Ocampo, I.; González-Brambila, M.; López-Isunza, F. 2013. Un análisis del metabolismo de *Aspergillus niger* creciendo sobre un sustrato sólido. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 12 (1): 41-56.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Editorial Limusa, México. 432 p.
- Rzedowski, J. 1986. Vegetación de México. Editorial Limusa. México. 432 p.
- Romeu, E. 1995. Los pinos mexicanos, récord mundial de biodiversidad. CONABIO. Biodiversitas 2: 11-15. México.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2015. Agenda Técnica Agrícola de Puebla. Sagarpa. 2ª edición. México. 92 p.
- Sambrook J., Russell, D. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU. 2100 pp.
- Sánchez-González, A. 2008. Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. Revista Madera y bosques. 14 (1): 107-120.
- Schuster, J. 2017. Enfoque: Plantas y enfermedades; *Pestalotiopsis* sp. Extensión de la Universidad de Illinois. Departamento de agricultura. Recuperado de: http://extension.illinois.edu/focus_sp/pestaloblighlight.cfm
- Sharma, D., Pramanik, A. y Agrawal, P. K. 2016. Evaluation of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus *Pestalotiopsis neglecta* BAB-5510 isolated from leaves of *Cupressus torulosa* D. Don. 3 Biotec 6:210. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0518-3>
- Solarte, Q. A. F. 2014. Caracterización morfológica, molecular y patogénica de *Pestalotiopsis* sp. Agente causante de la enfermedad del clavo en la guayaba

- Psidium guajava* L. y evaluación in-vitro de biofungicidas. Tesis de Maestría en Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia. 103 pp.
- Styles. 1994. Pinos de Nicaragua. Centro de Mejoramiento Genético y Banco de Semillas Forestales. MARENA-DANIDA. Hispamer. Managua, Nicaragua. 48 pp.
- Sullivan, R.F. y White Jr, J.F. 2000. *Phoma glomerata* as a mycoparasite of powdery mildew. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 425-427.
- Tagne, A. y Mathur, S. B. 2000. First report of chlorotic spot of maize caused by *Pestalotiopsis neglecta*. *New Disease Reports* 3:1.
- Tang, H., Quertemous, T., Rodriguez, B., Kardia, S. L., Zhu, X., Brown, A., Pankow, J., Province, M., Hunt, S., Boerwinkle, E., Schork, N. y Risch, N. 2005. Genetic structure, self-identified race/ethnicity, and confounding in case-control association studies. *Am J Hum Genet* 76(2): 268-275.
- Tejesvi, M.V., Kini, K.R., Prakash, H.S., Ven Subbiah y Shetty, H.S. (2007). Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. *Fungal Diversity* 24: 37-54.
- Thomidis, T., Michailides, T. J. y Exadactylou, E. 2011. *Phoma glomerata* (Corda) Wolenw & Hochapfel a new threat causing cankers in shoots of peach trees in Greece. *European Journal of Plant Pathology* 131:171. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9796-0>
- Unidad de Investigación, Capacitación y Evaluación para el Desarrollo Rural de la Universidad Autónoma Chapingo (UNICEDER-UACH). 2001. Evaluación del Programa Nacional de Reforestación, Estado de Puebla. CONAFOR. 58pp.
- Valiente, A. 2 de febrero de 2012. Dañadas por la sequía dos millones de hectáreas en el norte del país. Boletín UNAM-DGCS-068. Recuperado de: http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2012_068.html
- Vela, G. L. 1976. *Pinus patula* una importante especie mexicana de pino. *Revista Ciencias Forestales* 1(1): 12-20.

- Volcy, C. 2008. Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 26: 1. Pp. 107-115. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Wang, J. T., Shan, H., Shasha D. y Piel, W. 2005. Fast structural search in phylogenetic databases. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 37-46.
- Wang, X., Wang, J., Gao, J. y Yang, L. 2012. First report of leave spot disease on *Schisandra chinensis* caused by *Phoma glomerata* in China. *The American Phytopathological Society* 96(2):289.
- Webster J. 1986. *Introduction to Fungi*. 2^o ed. Cambridge University Press.
- Yeaton, R. I. 1982. The altitudinal distribution of the genus *Pinus* in the western United States and Mexico. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 42:55-71.

APÉNDICE

Caracterización molecular

Extracción de ADN

- Método AP:** Se tomaron dos asadas del micelio del hongo que se transfirió a un tubo eppendorf y se lavó con 500 µl de agua destilada estéril con la finalidad de eliminar restos de medio de cultivo. Posteriormente se maceró con 250 µl de buffer AP (urea 7M, NaCl 35M, Tris base 0.05M, EDTA 0.02M, SDS 1%) en un tubo eppendorf estéril y luego de macerar se aforó a un volumen de 750 µl, se incubó el tubo 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó 1 minuto a 12, 000 RPM, se tomó el sobrenadante y se transfirió a otro tubo. Se limpió la muestra con fenolcloroformo volumen a volumen (aproximadamente 500 µl de fenol cloroformo), se centrifugó 3 minutos a 12, 000 RPM y se recuperó la fase acuosa (2 veces), se precipitó con un volumen de isopropanol (500 µ) y 0.2 volúmenes de acetato de amonio 10 M (50 µl), se mezcló y centrifugo a 12, 000 RPM por 10 minutos, se desechó el sobrenadante y la pastilla fue lavada con 50 µl de etanol al 70 %, se centrifugó por 3 minutos y se desechó el etanol (se repitió el paso 2 veces). La pastilla se suspendió nuevamente en 20 µl de agua libre de nucleasas (Sambrook y Russell, 2001).
- Método CTAB:** Se precalentó el CTAB 2% Tris-HCL 10 mM Ph 8.0, Na₂ EDTA H₂O 20 mM Ph 8.0, CTAB, NaCL 1.4 M a 80 °C en baño maría (96 °C). Se agregaron 250 µl de H₂O HPLC en el tubo, posteriormente con una espátula se raspó y se tomó el micelio del hongo a extraer, se diluyó y se agregó 1mL de CTAB. Se incubó a baño maría (96 °C) por 40 minutos y se mezcló durante 10 minutos. Se centrifugó a 12,000 RPM durante 5 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo al que se agregaron 500 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión 5 minutos y se centrifugó a 12,000 RPM 10 minutos. Se extrajo la fase acuosa y se colocó en tubo nuevo, se agregaron 500 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló por inversión 5 minutos. Se centrifugó a 12, 000 RPM durante 10 minutos y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Se agregaron 950 µl de etanol al 100%, se mezcló suavemente por inversión durante 5 minutos y se incubó 2 hr a -20 °C. Se centrifugó a 12, 000 RPM durante 20 minutos, se decantó el sobrenadante y se conservó la pastilla. La pastilla se resuspendió en agua HPLC y se incubó a 55 °C por 15 minutos. Se agregaron 34 µl de Na OAc 3M y 1 mL de

etanol 95 % e incubaron a -20 °C por 1 hr. Se centrifugó a 12, 000 RPM 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se lavó con 500 µl de isopropanol al 70% (2 veces). Se centrifugó a 12, 000 RPM y se dejó secar la pastilla por 30 minutos. Se suspendió la pastilla nuevamente con agua libre de nucleasas (la cantidad de agua depende del tamaño de la pastilla) y se incubó a 80 °C durante 10 minutos, se dio un spin y se cuantificó por espectrofotometría. Finalmente se almacenaron a -20 °C.

Calidad de ADN

La calidad de ADN se verificó por medio de dos métodos:

- 1. Espectrofotometría:** La calidad y concentración de ADN se verificó en un Nanodrop. El software calculó automáticamente el ácido nucleico, coeficientes de concentración y pureza. Después de la medición de la muestra, se revisó la imagen espectral para evaluar la calidad.
- 2. Electroforesis en gel de agarosa:** La calidad del ADN se verificó mediante la electroforesis en gel de agarosa al 1%. El gel se preparó con TAE 1X (40 mM Tris base pH 7.8, 20 mM acetato de sodio y 2 mM EDTA), se colocó en una cámara de electroforesis y se cubrió el gel con solución TAE 1X. En cada pozo se depositaron 5 µl de ADN más 2 µl de amortiguador de carga (ver anexo). En el primer pozo se depositaron 4 µl de marcador molecular de 50 pares de bases (Gibco, BRL). Las muestras se corrieron a 80 voltios por 1.5 horas. Al gel se le agregó 1µl de bromuro de etidio (bromuro 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinium). La banda de ADN se visualizó con luz ultravioleta en fotodocumentador. El ADN se considera de buena calidad cuando se observa una banda de alto peso molecular.

PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Los iniciadores utilizados para amplificar la región ITS del ADNr fueron ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'), ITS 4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') e ITS 5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3').

Amplificación ITS1 e ITS5

Las reacciones de PCR se realizaron por medio de la adición de 16.25µL de agua libre de nucleasa, 1.25 µL de MgCl₂, 0.5µL de dNTPs, 1µL de cada primer, 2.5 BufferPCR, 0.5 µL de Taq DNA polimerasa y 2 µL de ADN diluido 2:50 (2µl de ADN y 50µl de agua libre de nucleasa). La amplificación se realizó usando las siguientes etapas: desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, segunda desnaturalización de 94°C por 1 minuto, alineación de 55°C por 58 segundos, una extensión de 72°C 1 minuto, por 35 ciclos, y una extensión final a 72 °C 7 minutos.

Los fragmentos de las regiones ITS amplificados se corrieron en gel de agarosa al 1%, se visualizaron en un fotodocumentador Infinity-ST5 Vilber Lourmat con 0.4µL de bromuro de etidio y se cortaron las bandas de interés para su purificación.

Amplificación ITS4 e ITS5

Se utilizaron los primers universales ITS1 e ITS4 para la amplificación de regiones del ADN ribosomal. Las reacciones de PCR se realizaron por medio de la adición de 16.25 µl de agua libre de nucleasa, 1.25 µl de MgCl₂, 0.5 µL de dNTPs, 1 µL de cada primer, 2.5 Buffer PCR, 0.5 µl de Taq DNA polimerasa y 2 µl de ADN diluido 2:50 (2 µl de ADN y 50 µl de agua libre de nucleasa). La amplificación se realizó usando las siguientes etapas: desnaturalización inicial a 96°C por 2 minutos, segunda desnaturalización de 96 °C 1 minuto, alineación de 55°C 1 minuto, una extensión de 72°C 2 minutos, por 35 ciclos, y una extensión final a 72 °C 10 minutos.

Los fragmentos de las regiones ITS amplificados se corrieron en gel de agarosa al 1%, se visualizaron en un fotodocumentador Infinity-ST5 Vilber Lourmat con 0.4µL de bromuro de etidio y se cortaron las bandas de interés para su purificación.

Purificación de ADN

Se purificó la banda del producto de PCR de interés, para la cual se utilizó el kit WIZARD® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, 1999). Se adicionaron 50µl de la solución 1 al gel de agarosa conservado en tubos eppendorf, se incubó a 65°C hasta que el gel se disolvió. Se transfirió el mix del gel diluido a una mini columna insertada en un tubo colector y se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto, se centrifugó a 14,000 RPM por 1 minuto y se decantó el sobrenadante del tubo colector. Posteriormente se lavó con 450 µl

de la solución 2 y se centrifugó a 14,000 RPM por 1 minuto, se decantó el sobrenadante del tubo colector, se realizó un segundo lavado de la misma manera con 400 µl de solución 2. Se transfirió la mini columna a un tubo eppendorf estéril. Se dejó secar a temperatura ambiente hasta que el etanol se evaporó. Por último, se adicionaron 30µl de agua libre de nucleasas e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y se centrifugó a 14,000 RPM por 1 minuto, se retiró la mini columna y se conservó el microtubo con el producto a 4°C.

Análisis estadístico

Friedman ANOVA and Kendall Coeff. of Concordance (Spreadsheet1) ANOVA Chi Sqr.

(N = 40, df = 2) = 34.66667 p = .00000 Coeff. of Concordance = .43333 Aver. rank r = .41880

Tratamiento	Average Rank	Sum of Ranks	Mean	Std.Dev.	Std. Err.
<i>Pestalotiopsis</i>	2.15	86	0.45	0.503831	0.07966268
<i>Phoma</i>	2.375	95	0.6	0.496139	0.07844646
Testigo	1.475	59	0	0	0

Ajuste de Bonferroni alfa entre el número de comparaciones: 0.01666667

Alfa significativo: 0.01666667

Pruebas entre medias

Wilcoxon Matched Pairs Test (Spreadsheet1) Marked tests are significant at p <.05000				
	Valid - N	T	Z	p-value
Pesta & Phoma	12	19.5	1.529706	0.126091

Wilcoxon Matched Pairs Test (Spreadsheet1) Marked tests are significant at p <.05000				
	Valid - N	T	Z	p-value
Pesta & Testigo	18	0	3.723555	0.000196

Wilcoxon Matched Pairs Test (Spreadsheet1) Marked tests are significant at p <.05000				
	Valid - N	T	Z	p-value
Phoma & Testigo	24	0	4.285714	0.000018