



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DIVISIÓN DE CIENCIAS FORESTALES
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

**FUNDAMENTOS EN EL MANEJO DEL TIZÓN FOLIAR *Lophodermium sp.* EN
BOSQUES DE PINO DE LA SIERRA NORTE DE PUEBLA.**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

PRESENTA:

EDGAR ESPINOSA GUERRERO

DIRECTOR:

DR. DAVID CIBRIAN TOVAR



INVESTIGACIÓN GENERAL ACADÉMICA
CONTROL DE SERVICIOS ESCOLARES
SISTEMA DE EXÁMENES PROFESIONALES

CHAPINGO, EDO. DE MÉXICO, MAYO DE 2019



**FUNDAMENTOS EN EL MANEJO DEL TIZÓN FOLIAR *Lophodermium sp.*
EN BOSQUES DE PINO DE LA SIERRA NORTE DE PUEBLA**

Tesis realizada por Edgar Espinosa Guerrero, bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

DIRECTOR:



DR. DAVID CIBRIÁN TOVAR

CO-DIRECTOR:



DRA. LUZ JUDITH RODRIGUEZ ESPARZA

ASESOR:



DRA. SILVIA EDITH GARCIA DÍAZ

ASESOR:



DR. DANTE ARTURO RODRIGUEZ TREJO

Chapingo, Texcoco, Estado de México, Mayo de 2019

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS	IV
INDICE DE CUADROS.....	V
DEDICATORIA.....	VI
AGRADECIMIENTOS	VII
DATOS BIOGRÁFICOS	VIII
RESUMEN GENERAL	IX
GENERAL ABSTRACT.....	X
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 Objetivo general.....	3
1.2 Objetivos específicos	3
CAPÍTULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Estudios de <i>Lophodermium</i> a nivel mundial.....	3
2.1.1 Estudios de <i>Lophodermium</i> en México	7
2.2 <i>Lophodermium</i> sp.	8
2.2.1 Clasificación taxonómica.....	9
2.2.2 Ciclo biológico.....	9
2.2.3 Distribución	10
2.2.4 Ecología.....	11
2.3 Diagnósis.....	12
2.4 BIBLIOGRAFÍA.....	13
CAPÍTULO 3.- FLUCTUACIÓN DE ASCOSPORAS DE <i>Lophodermium</i> sp. EN <i>Pinus oaxacana</i> MIROV. EN ZAUTLA, PUEBLA.	18
3.1 RESUMEN.....	18
3.2 ABSTRACT	19
3.3 INTRODUCCIÓN.....	20
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
3.6 CONCLUSIONES	35
3.7 AGRADECIMIENTOS.....	36

3.8 REFERENCIAS	36
Capitulo 4. Taxonomic determination of <i>Lophodermium</i> in the forest of pino de Zautla, Puebla.	38
Determinación taxonómica de <i>Lophodermium</i> en bosque de pino de Zautla, Puebla.....	38
4.1 Abstract	38
4.2 Resumen	39
4.3 INTRODUCCIÓN.....	40
4.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
4.6 CONCLUSIONES	51
4.7 AGRADECIMIENTOS.....	51
4.8 LITERATURA CITADA	52
5. CONCLUSIONES GENERALES.....	53
6. APÉNDICES.....	54
Apéndice 1. Medición de histerotecios.....	54
Apéndice 2. Medición de ascas y ascosporas.....	55
Apéndice 3. Código de muestreo sistemático en el software R.....	58

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Acículas infectadas por <i>Lophodermium</i>	13
Figura 2. Estructuras reproductivas de <i>Lophodermium</i>	13
Figura 3. A) Elaboración de trampas. B) y C) Colocación de trampas en campo. D) Caja de preparaciones para llevar a campo las trampas.....	23
Figura 4. Vista del muestreo de ascosporas sobre una trampa, las líneas de color naranja indican las unidades de muestreo.....	25
Figura 5. Ascosporas observadas en las trampas para esporas fungales aéreas (vaselina).	27

Figura 6. Tipos de ascosporas en las Hypodermataceae. a) Busiforme en <i>Bifusella</i> , <i>Isthmiella</i> ; b) Simétrica en <i>Melloderma</i> y <i>Virgella</i> ; c) Clavado en <i>Hypodermella</i> y <i>Lophodermella</i> ; d) Clavado-septado en <i>Elytroderma</i> ; e) Filiforme en <i>Lophodermium</i> y <i>Rhytisma</i> ; f) Filiforme-septado en <i>Lophomerum</i> (Tomado de Funk, 1985).....	28
Figura 7. Comportamiento de la esporulación de <i>Lophodermium</i> sp. en Zautla, Puebla.	29
Figura 8. Correlación entre precipitación y la fluctuación de ascosporas de <i>Lophodermium</i> sp.	31
Figura 9. Correlación entre temperatura y la fluctuación de ascosporas de <i>Lophodermium</i> sp.	32
Figura 10. A. <i>Pestalotiopsis</i> sp., B y G. <i>Colletotrichum</i> sp., C. <i>Lasiodiplodia</i> sp., D. <i>Alternaria</i> sp., E y F. <i>Seiridium</i> sp., H. <i>Helminthosporium</i> sp., I. <i>Sphaeropsis sapinae</i> .	34
Figura 11. <i>Lophodermium indianum</i> . A) Acículas con histerotecios. B) Corte transversal de un histerotecio. C) Histerotecio. D) Colonia del hongo creciendo en MEA.	46
Figura 12. Crecimiento de la colonia en EMA de <i>Lophodermium indianum</i> . A) Sitio 1. B) Sitio 2. C) Sitio 3.	47

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Factores que inciden el desarrollo y crecimiento de <i>Lophodermium</i>	11
Cuadro 2. Fechas de cambio de trampas fungales aéreas en Zautla, Puebla.	24
Cuadro 3. Número de ascosporas de <i>Lophodermium</i> sp. capturadas por trampa.....	28
Cuadro 4. Estimación del total por periodo con intervalos de confianza al 95 %	30
Cuadro 5. Condiciones climáticas donde se ha presentado <i>Lophodermium</i>	33
Cuadro 6. Coordenadas de los sitios de colecta en Zautla, Puebla.	45
Cuadro 7. Secuencias de los ADNs amplificados con ITS.....	48
Cuadro 8. Porcentaje de acículas dañadas por tipos de agente causal (tomado de Cabrían, 2016).....	51

DEDICATORIA

A mi familia

Por mi formación profesional, gracias a su cariño, guía y apoyo. Este presente simboliza mi gratitud por toda la responsabilidad e invaluable ayuda que siempre me han proporcionado.

Sabiendo que no existirá forma alguna de agradecer una vida de sacrificios, esfuerzos y amor, quiero que sientan que el objetivo alcanzado también es de ustedes y que la fuerza que me ayudo a conseguirlos fue su gran apoyo.

Con amor, admiración y respeto. Muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

A mi alma mater, Universidad Autónoma Chapingo, y en particular al programa de Maestría en Ciencias en Ciencias Forestales por brindarme la oportunidad de obtener un grado más.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de la maestría, con la ayuda otorgada hizo cumplir los objetivos.

A la Dirección General de Investigación y Posgrado (DGIP) por el apoyo brindado para la realización de esta investigación.

Al Dr. David Cibrián Tovar, su amabilidad, paciencia, conocimientos brindados y tiempo durante el proceso de mi formación de posgrado y el desarrollo de la investigación. Un gran mentor en esta loable formación, mi admiración y respeto.

Al Dr. Omar Alejandro Pérez Vera por su amistad, el apoyo brindado y su colaboración para la realización de este trabajo.

A Uriel Marcos Rivera y familia por la hospitalidad brindada para la realización de este trabajo.

A Jorge Nuñez Peñaloza por el apoyo brindado para la toma de datos en campo.

A mis amigos y compañeros, por el tiempo compartido, por las experiencias vividas y todo lo que juntos aprendimos, les agradezco por su gran apoyo y amistad.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Edgar Espinosa Guerrero

Fecha de nacimiento: 6 de noviembre de 1991

Lugar de nacimiento: San Andrés Calpan, Puebla

CURP: EIGE911106HPLSRD00

Profesión: Ingeniero en Restauración Forestal

Cédula profesional: 10316751

Desarrollo académico:

- Bachillerato: Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No.185 Ext.1 en el municipio de Calpan, Puebla de 2006-2009.
- Universidad: Universidad Autónoma Chapingo, en la licenciatura de Ingeniería en Restauración Forestal de la División de Ciencias Forestales de 2009-2014.

Se obtuvo el título de Ingeniero en Restauración Forestal en mayo de 2016, con la Tesis titulada "Flora arbórea de la Laguna Guadalupe, Putla Villa de Guerrero, Oaxaca". En 2013-2014 laboró en el proyecto titulado "Monitoreo de Mariposas Monarca en la Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca en colaboración con WWF-México. En Zitácuaro, Michoacán". En 2017 tuvo la gran oportunidad de ingresar en el programa de estudios de posgrados de la Maestría en Ciencias en Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma Chapingo.

RESUMEN GENERAL

Fundamentos en el manejo del tizón foliar *Lophodermium sp.* en bosques de pino de la Sierra Norte de Puebla

El presente estudio se enfocó en el hongo patógeno *Lophodermium*, que es uno de los agentes que incide en la declinación forestal en la Sierra Norte y Nororiental de Puebla. Los objetivos fueron identificar a nivel de especie el patógeno *Lophodermium*, mediante caracterización morfológica y molecular, y determinar la fluctuación de la población de ascosporas de *Lophodermium*, en *Pinus oaxacana* que es la especie mas susceptible. La toma de datos se realizó en el bosque de pino del municipio de Zautla, Puebla, donde se tomaron tres sitios de muestreo, cada sitio de muestreo constó de una superficie de 1000 m². Los resultados que se obtuvieron en la caracterización morfológica y molecular mostraron que la especie que está en la zona de estudio es *Lophodermium indianum*, ya que de acuerdo con el Genbank hubo una similitud del 98.9%, aunque en la parte morfológica difieren en la longitud de las ascas. Con respecto a la fluctuación de ascosporas se determinó que la precipitación y la temperatura tienen correlación en el periodo de liberación de ascosporas, ya que, al haber una precipitación constante y una temperatura adecuada, hace que las ascosporas se liberen.

Palabras clave: *Lophodermium indianum*, *Pinus oaxacana*, Zautla, caracterización molecular.

¹ Tesis de Maestría en Ciencias en Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo.
Autor: Edgar Espinosa Guerrero.
Director: Dr. David Cibrián Tovar.

GENERAL ABSTRACT

Fundamentals in the management of leaf blight *Lophodermium* sp. in pine forests of the Sierra Norte de Puebla

The present study focused on the pathogenic fungus *Lophodermium*, which is one of the agents that affects the forest decline in the Sierra Norte and Northeast of Puebla. The objectives were to identify at the species level the pathogen *Lophodermium*, by morphological and molecular characterization, and to determine the fluctuation of the ascospore population of *Lophodermium*, in *Pinus oaxacana*, which is the most susceptible species. The data collection was made in the pine forest of the municipality of Zautla, Puebla, where three sampling sites were taken, each sampling site consisted of an area of 1000 m².

The results that were obtained in the morphological and molecular characterization showed that the species that is in the study area is *Lophodermium indianum*, since according to the Genbank there was a similarity of 98.9%, although in the morphological part they differ in the length of the ascas. With respect to ascospore fluctuation, it was determined that precipitation and temperature correlate in the ascospore release period, since, having a constant precipitation and an adequate temperature, causes the ascospores to be released.

Key words: *Lophodermium indianum*, *Pinus oaxacana*, Zautla, molecular characterization.

² Thesis of Maestría en Ciencias en Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Edgar Espinosa Guerrero.

Advisor: Dr. David Cibrián Tovar.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Se requieren esfuerzos considerables de investigación para desenredar con precisión el papel y cuantificar el impacto de todos los factores que contribuyen al deterioro de los bosques. Existen pocas dudas de que la gran mayoría de las pérdidas de madera son causadas por enfermedades, situándose muy por delante de los insectos, incendios y condiciones climáticas adversas (Tainter y Baker, 1996).

Uno tiene que preguntarse si la subestimación del papel desempeñado por las enfermedades forestales puede ser el resultado de la incapacidad humana para reconocer visualmente los agentes microscópicos que causan estas enfermedades, en oposición a la capacidad de ver insectos y de presenciar eventos destructivos como incendios forestales o huracanes.

Las enfermedades forestales constituyen uno de los cuatro factores principales que determinan la dinámica de los ecosistemas forestales junto con las plagas, el fuego y las condiciones climáticas (Pildain y Errasti, 2011).

Gonthier (2013) menciona que las enfermedades de los árboles forestales son responsables no solo de la muerte de los árboles, sino también de las reducciones en el crecimiento y las anomalías del crecimiento, y pueden ser causadas por agentes abióticos o por agentes infecciosos bióticos. Dentro de los factores bióticos, la gran mayoría de las enfermedades en los árboles son causadas por virus, fitoplasmas, bacterias, hongos, plantas parásitas y nematodos.

De los diversos microorganismos fitopatógenos que atacan a las plantas, los hongos son los principales causantes de enfermedades forestales, ya que, pueden atacar diferentes partes de la planta y afectan su funcionamiento en varias formas. Se sabe que más de 8000 especies de hongos pueden causar enfermedades en las plantas. Todas las plantas superiores pueden ser infectadas y dañadas por más de una especie de hongo fitopatógeno, y una especie de

hongo fitopatógono puede atacar a más de una especie de planta (National Academy of Sciences 1980, Agrios 1988).

El ataque de los diversos agentes nocivos puede dividirse de acuerdo a la parte del árbol que infestan. No solo los insectos se encuentran dañando el desarrollo de los árboles, sino que a estos se les agrega un gran número de enfermedades causadas por hongos (Cibrián, Méndez, Campos, Yates y Flores, 1995).

En el caso de los hongos que causan enfermedades en el follaje de los árboles son diversos, destacan por las distintas enfermedades que ocasionan; varios de ellos son parásitos primarios y otros son oportunistas o secundarios. Los efectos negativos que ocasionan a los árboles son la muerte del follaje, la pérdida de vigor y, por consecuencia, los predisponen al ataque por otros agentes de tipo biótico o abiótico (Cibrián, Alvarado y García, 2007).

El presente estudio describe a la enfermedad ocasionada por el hongo fitopatógono *Lophodermium* que pertenece al orden Rhytismatales; son los causantes de los tizones foliares en acículas de pino, además, producen necrosamiento, anillado y rotura de las acículas. Dentro de este grupo algunos se comportan como saprófitos o endófitos, sin embargo, otros son considerados importantes patógenos, como en el caso de la Sierra Norte y Nororiental de Puebla, que es uno de los agentes causales de la declinación forestal.

El objeto de estudio es determinar mediante caracterización morfológica y molecular que especie del género *Lophodermium* está presente en el área de estudio. La imprescindible y correcta identificación del mismo, permitirá diferenciarlo inequívocamente de otras especies, para que posteriormente se pueda intervenir de forma eficiente. También, reconocer el período de fluctuación de ascosporas que servirá de base en estudios posteriores y con ello se puedan establecer métodos que posibiliten su control de forma efectiva.

1.1 Objetivo general

- Establecer los fundamentos del tizón foliar *Lophodermium* sp. mediante caracterización morfológica y molecular para el manejo de la declinación forestal.

1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar la sintomatología de *Lophodermium* en acículas de *Pinus oaxacana* Mirov.

- Determinar la identidad del patógeno a nivel de especie mediante caracterización morfológica y molecular.

- Reconocer el periodo de liberación de ascosporas del tizón en el follaje.

CAPÍTULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Estudios de *Lophodermium* a nivel mundial

Polmanis, Gaitnieks, Beļeviča, Rungis y Baumanė (2017) en Letonia, analizaron la ocurrencia de *Lophodermium* Chevall., en *Pinus sylvestris* L., con las condiciones meteorológicas, donde obtuvieron que la precipitación y la temperatura se correlacionan para que haya una mayor incidencia de *Lophodermium*.

Ahanger, Dar, Beig y Sofi (2016) evaluaron diversos fungicidas en plántulas de pino azul (*Pinus wallichiana* A.B. Jacks.) en Cachemira, India, para atacar a *Lophodermium pinastri* (Schrad.) Chevall., que es una de las enfermedades que más se presenta tanto en viveros como en plantaciones, donde resultó significativo que las plántulas tratadas con mancozeb y clorotalonil mostraron una menor incidencia e intensidad en la enfermedad.

Li, Taylor y Hou (2016), a través de caracterización molecular en China, describieron a *Lophodermium pini-taiwanensis* Z.J. Li & C.L. Hou, como una nueva especie, y se encuentra asociada con *Lophodermium conigenum* (Brunaud) Hilitzer.

Pusz, Weber, Dancewicz y Kita (2016), determinaron mediante un modelo estadístico el efecto de las condiciones climáticas sobre la incidencia del tizón amarillo *Lophodermium* en Polonia, a partir de esto, se obtuvo que las condiciones atmosféricas como: temperatura, precipitación, humedad relativa, radiación y velocidad media del viento, arrojaron que en junio y julio tenían el mayor impacto en la variabilidad de la infestación.

Koukol, Pusz y Minter (2015) en un estudio realizado en las montañas de los gigantes en Polonia, mencionan a *Lophodermium concorticum* Koukol & Pusz., como una nueva especie de *Lophodermium* que fue encontrada en *Pinus mugo* Turra. Para poder determinarlo a nivel de especie se hizo caracterización morfológica y molecular, morfológicamente se asemejó a *Lophodermium pinastri* aunque difería en la longitud de conidiomas, ascomata y asci.

Kuzmina, Senashova y Kuzmin (2015), analizan la distribución de *Lophodermium* en Rusia, donde observaron que la distribución más extensa del patógeno fue de 2003-2007 y que la temperatura, precipitación y humedad relativa son factores que incidieron en la maduración, propagación y diseminación de esporas del patógeno.

Prihatini, Glen, Wardlaw, Ratkowsky y Mohammed (2015) mencionan que en Tasmania, Nueva Zelanda, en plantaciones de *Pinus radiata* D. Don, que en árboles de 5 años de edad, estaba presente *Lophodermium pinastri*, además, se determinó que el desarrollo de las comunidades fúngicas en acículas de pino, dependen de la temperatura y la precipitación así como de la edad de las acículas.

Reignoux, Green y Ennos (2014) hicieron la comparación para determinar si eran las mismas especies de *Lophodermium* en Escocia, tanto en las acículas de pino que estaban en las ramas como las que estaban en el suelo; y través de caracterización molecular determino que *Lophodermium seditiosum* Minter, Staley y Millar., *Lophodermium conigenum* se encontraban en acículas que estaban en las ramas, y *Lophodermium pinastri* se encontraba en acículas que estaban en el suelo.

Gao, Lin, Huang y Hou (2013) en Catay, China mencionan a *Lophodermium cathayae* Y.R. Lin, H.Y. Huang & C.L. Hou, como una nueva especie que ataca a *Cathaya argyrophylla* Chun & Kuang (abeto plateado), esta nueva especie reportada fue identificada a través de caracterización morfológica y molecular.

Guillman (2011) menciona que *Lophodermium seditiosum* es un patógeno agresivo, en dos, tres y algunos pinos de cincos acículas en ciertas situaciones en crecimiento, mientras que otras especies de *Lophodermium* son patógenos débiles o saprófitos sobre otras coníferas, y comúnmente ataca a especies de *Pinus nigra* J.F. Arnold, *Pinus resinosa* Aiton y *Pinus sylvestris*, y puede matar a los árboles jóvenes dentro de un año.

Terhonen, et al. (2011) analizaron la diversidad de hongos en tres zonas geográficas (norte, centro y sur) en Finlandia, los sitios de estudio fueron elegidos en la misma latitud, habiendo una variación en la temperatura en promedio en el norte era de -11°C, en el centro -8°C y en el sur -3°C, a través de esto se determinó que la mayoría pertenecían a los Ascomycota y de estos hongos *Lophodermium pinastri* fue el más abundante. En base a los resultados se obtuvo que cuando aumenta la latitud; la abundancia y la diversidad de hongos disminuyen en las acículas de pino silvestre.

Osono y Hirose (2011) demostraron que *Lophodermium pinastri* en Japón, es un colonizador dominante de acículas muertas en etapas tempranas y tiene la

capacidad de descomponer la lignina en las acículas muertas, además, puede colonizar acículas sanas de manera latente como endófito.

Lilja et al. (2010) mencionan que en Finlandia, una de las principales enfermedades que ataca a *Picea abies* (L.) H. Karst. (picea noruega), *Pinus silvestris* (pino silvestre) y *Betula pendula* Roth (abedul plateado) en los viveros forestales es *Lophodermium seditiosum*, y se presenta con puntos amarillos a marrones en las acículas donde llega a provocar necrosis, por lo que recomiendan controlarlo con fungicidas.

Luo, Lin, Shi y Hou (2010) describieron dos nuevas especies de *Lophodermium* en acículas en China; *Lophodermium dilutum* C.L. Hou, & Y.R. Lin., en *Pinus armandii* Franch. y *Lophodermium tsugae* J.T. Luo, C.L. Hou & Y.R. Lin., en *Tsuga dumosa* (D. Don) Eichler, además, mencionan un nuevo registro de seis especies en Yunnan, las especies encontradas fueron: *L. autumnale* Darker, *L. confluens* Y.R. Lin, C.L. Hou & W.F. Zheng., *L. himalayense* P. F. Cannon & Minter, *L. kumaunicum* Minter & M.P. Sharma, *L. laricinum* Duby., y *L. nitens* Darker.

Simpson y Grgurinovic (2004) mencionan el primer registro de *Lophodermium conigenum* en Australia, ya que su distribución natural es en Europa, Asia y Norteamérica.

Sokolski, Piché y Berubé (2004), a través de caracterización molecular con muestras de herbario y campo determinan a *Lophodermium macci* Sokolski & Bérubé., como una nueva especie en Canadá; su morfología, hábitat y ecología es similar a *L. pini-excelsae* Ahmad, *L. staleyi* Minter., y *L. nitens*. Erróneamente se había identificado como *L. pinastri* en *Pinus strobus* L., en muestras de herbarios.

Sakuyama (1997) menciona que *Lophodermium iwatense* Sakuyama, en Japón mostro una fuerte patogenicidad de 1972-1974, ya que afectó de 6 a 7 millones de plántulas de 2 años de edad y el método que utilizaron para su control fue pulverizar Maneb, cuatro veces a intervalos de 2 semanas desde finales de julio a principios de septiembre.

Minter (1981) en su libro *Lophodermium on pines*, describe a 60 especies de *Lophodermium* en pinos, donde incluye a sus anamorfos y una clave dicotómica para su identificación.

Morgan y Hulton (1977) menciona que en Canadá las ascosporas de *Lophodermium nitens* se desarrollan en la primavera en las acículas de *Pinus strobus*.

2.1.1 Estudios de *Lophodermium* en México

Pérez, Romero, González, Pérez y Arriola (2016), mencionan que en los bosques de coníferas en los estados de Puebla, Tlaxcala e Hidalgo se registraron problemas principalmente por ataques de *Lophodermium* sp. y el insecto chupador de savia *Ocoaxo* sp., donde se detectó que alrededor de 3000 hectáreas de bosque de pino presentan una sintomatología de secamiento de follaje, además, se describe que la temperatura, precipitación, evapotranspiración y humedad relativa son factores que están relacionados con el desarrollo y crecimiento de *Lophodermium*.

Salas (2013) establece que *Lophodermium nitens* es la especie más abundante en los pinos del subgénero *Strobus*, cuyos principales representantes en las zonas templadas de México son *Pinus strobiformis* Engelm., y *P. ayacahuite* Ehrenb. Ex Schltl., en este estudio se utilizaron dos marcadores genéticos (fragmentos de los genes de la actina y quitina-sintetasa I) para evidenciar los patrones de estructura genética y recombinación de *L. nitens* en México. Los

resultados muestran que hay mucha variación genética en las poblaciones, con muchos alelos raros y polimorfismo compartido.

Cibrián et al. (2007) refieren que *Lophodermium* es el agente causal de la caída de acículas de pino. Es un hongo que permanece durante todo su ciclo de vida en el árbol, y ataca individuos poco desarrollados y débiles (González, 2004).

Ortiz et al. (2003), realizaron un análisis filogenético a través de espaciadores internos transcritos (ITS) y mencionan a cuatro especies de *Lophodermium* que no habían sido descritas para pinos mexicanos, las especies encontradas fueron: *Lophodermium australe* Dearn., en *Pinus pseudostrobus* Lindl., *Lophodermium baculiferum* Mayr., en *Pinus montezumae* Lamb., *Lophodermium indianum* Suj. Singh & Minter., en *Pinus greggi* Engelm. Ex Parl., y *Pinus hartwegii* Lindl., *Lophodermium nitens* en *Pinus ayacahuite*.

Velasco et al. (2003), reportan a través del diagnóstico sanitario de los bosques del Distrito Federal, México que *Lophodermium* sp. es la enfermedad que más afecta a *Pinus hartwegii*.

French (1988) describe que *Lophodermium* ocasiona un grave problema en plantas de semilla (plantas de vivero) y en menor grado en árboles adultos y renuevos (regeneración natural). Los cuerpos fructíferos son brillantes, negros, elípticos, maduran en las acículas muertas, caídas y ocasionalmente en las acículas fijadas parcialmente verdes, estos cuerpos fructíferos pueden estar aislados o en grupos.

2.2 *Lophodermium* sp.

Lophodermium es un género grande y complejo de la familia Rhytismataceae, incluye más de 250 especies de hongos que habitan en las hojas (Johnston, 2001). Esto ha sido estudiado intensivamente en herbáceas (Johnston, 2001) y en acículas de pino (Minter, 1981; Cannon y Minter, 1986). Minter (1981), Minter y Millar (1980) reportan que en los pinos solo unas pocas son patógenas o

patógenas-oportunistas. En la mayoría de las especies de *Lophodermium* de pino, estos hongos colonizan acículas sanas, donde residen como endófitos dentro del tejido huésped asintomático

Macroscópicamente se reconocen por sus cuerpos fructíferos (histerotecios) en forma de baloncitos de futbol americano y color negro. Microscópicamente su carácter distintivo son las ascosporas alargadas, fusiformes o claviformes.

A pesar de lo característico que es morfológicamente el género *Lophodermium*, es difícil la separación de cada especie en particular. A veces se hace necesario hacerlos crecer en cultivos artificiales o preparar cortes microtómicos de los cuerpos fructíferos para su correcta identificación.

2.2.1 Clasificación taxonómica

Reino:	Fungi
División:	Ascomycota
Clase:	Leotiomycetes
Subclase:	Leotiomycetidea
Orden:	Rhytismatales
Familia:	Rhytismataceae
Género:	<i>Lophodermium</i>

2.2.2 Ciclo biológico

En cuanto a su biología reproductiva, los miembros de este género son capaces de propagarse tanto sexual como asexualmente (el nombre del anamorfo asociado es *Leptostroma*), aunque se piensa que los conidios en realidad sólo tienen función de gametos masculinos (o espermacios) y son incapaces de causar una infección por sí mismos (Osorio y Stephan, 1991). Asimismo, la producción de ascosporas y conidios a lo largo del año es variable y ha sido

ligada a los hábitos de la especie, por ejemplo si es parásita-oportunista, parásita o comensal (Minter y Millar, 1980; Minter, Staley y Millar, 1978).

Cibrián et al. (2007), anotan que el hongo patógeno *Lophodermium* infecta las acículas a fines del verano u otoño y pasa el invierno en las acículas del año actual. En la siguiente primavera, el hongo reinicia su crecimiento en las acículas infectadas y al final de la estación, causa la muerte de los tejidos en la hoja. A principios del verano, se forman los histerotecios y, de fines del verano hasta mediados del otoño, absorben humedad, maduran y descargan sus ascosporas, las cuales son diseminadas por el viento y la lluvia. Después de ocurrir la infección, el patógeno permanece como micelio vegetativo en los tejidos de la hoja durante el invierno. La parte inferior de la copa es la más afectada, pero el árbol entero puede ser uniformemente afectado. La presencia de la lluvia proporciona humedad suficiente para la apertura de los histerotecios; sin embargo, esto también ocurre; aunque, en menor cantidad, cuando las condiciones son secas. En periodos favorables al patógeno, la mayor parte del follaje del año anterior se cae en el otoño, y solo permanecen las hojas del año actual.

2.2.3 Distribución

Las especies del género *Lophodermium* (Rhytismatales, Leotyomicetes) son colonizadoras cosmopolitas y frecuentes en acículas de pino. La distribución geográfica varía, aunque hay excepciones, las especies individuales tienden a aparecer solo en los pinos Haploxyton (5 acículas) o Diploxyton (2 a 3 acículas), no en ambos (Koukol et al. 2015).

Pérez et al. (2016), mencionan que en México la distribución de *Lophodermium* se encuentra en los bosques de coníferas de los estados de Puebla, Tlaxcala e Hidalgo.

Cibrián et al. (2007), anotan que se distribuye en los estados de Hidalgo, Estado de México y Ciudad de México; además, de que el género es de amplia distribución en otras partes del mundo, pero siempre en especies de pino.

2.2.4 Ecología

Prácticamente no se ha publicado nada sobre la ecología de las especies de *Lophodermium* en acículas o conos primarios, por lo tanto, todos los estudios ecológicos que se han hecho se refieren a acículas secundarias. Minter (1981) hizo una clasificación donde menciona que *Lophodermium* en las acículas secundarias se encuentra en acículas senescentes, en ramas del árbol que han sufrido un daño y a menudo resulta en la muerte de las acículas, en acículas sanas que son retiradas prematuramente de la rama y caen de color verde al suelo donde mueren y se vuelven marrones y en acículas menores a un año donde el daño es grave.

En otros estudios que se enfocan en cómo se relaciona *Lophodermium* con las condiciones ambientales se expone lo siguiente:

Cuadro 1. Factores que inciden el desarrollo y crecimiento de *Lophodermium*.

ESTUDIO	TEMPERATURA (°C)	PRECIPITACIÓN (mm)	HUMEDAD RELATIVA (%)
Ocurrencia de <i>Lophodermium</i> spp. en pinos jóvenes de Letonia. ¹	14.6-16 °C	204-337.5 mm	-----
Distribución potencial de <i>Lophodermium</i> spp. en bosques de coníferas, con escenarios de cambio climático. ²	13.6-14.2 °C	343.2-445 mm	75.8-80.2%
Distribución de los agentes causantes de <i>Lophodermium</i> en acículas de pino silvestre en Siberia Central. ³	18-20.6 °C	147 mm	70-78%
Caracterización del complejo de patógenos causales del tizón de la acícula del pino en la Finca Saquichai, Cobán, Alta Verapaz. ⁴	<14 °C	400-600 mm	87-89%

1. Polmanis et al. (2017); 2. Pérez et al. (2016); 3. Kuzmina et al. (2015); 4. González (2004).

Los factores que propician el desarrollo de *Lophodermium* son temperatura (13.6-14.2°C), precipitación (343.2-445 mm) y humedad relativa (75.8-80.2%) (Pérez et al., 2016).

González (2004), menciona que las condiciones favorables para el desarrollo de *Lophodermium* son temperatura (<14°C), precipitación (400-600 mm) y humedad relativa (87-89%).

Polmanis et al. (2017) hallaron que la precipitación (204-337.5 mm) y la temperatura (14.6-16.0 °C) se correlacionan para que haya una mayor incidencia de *Lophodermium*. Por su parte, Kuzmina et al. (2015), establecen que la temperatura (18-20.6°C), precipitación (71-155 mm) y humedad relativa (70-78%) son factores que inciden en la maduración de los histerotecios.

A través de diferentes estudios, se puede observar (Cuadro 1), los factores que inciden en el crecimiento y maduración de los histerotecios son temperatura, precipitación y humedad relativa; donde las condiciones predominantes son temperaturas de 13-21 °C que favorecen el rápido desarrollo y la reproducción del patógeno, precipitaciones de 147-500 mm y una humedad relativa mayor a 70% que propicia que se produzca una abundante liberación de esporas.

2.3 Diagnósis

Lophodermium es un hongo patógeno que puede infectar las acículas verdes que recién brotan de su fascículo y es común que produzca la caída prematura de las acículas enfermas o cloróticas, aunque esto no se ha demostrado en su totalidad. Los daños ocurren normalmente en arbolado de más de dos años, por lo general en las ramas inferiores del árbol.



Figura 1. Acículas infectadas por *Lophodermium*.

Los síntomas se reconocen por necrosis en las hojas, al cambiar de color verde a un café- marrón, siempre la acícula infectada tiene un muñón verde, al menos durante una etapa de la infección, después puede morir también.

Las estructuras reproductivas del hongo se forman a lo largo de la acícula, se asemejan a baloncitos de futbol americano, con una línea de apertura por la parte media.



Figura 2. Estructuras reproductivas de *Lophodermium*.

2.4 BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G.N. (1988). Plant Pathology. Third Edition. Academic Press. New York. 803 p.

Ahanger, F. A., Dar, G. H., Beig, M. A., & Sofi, T. A. (2016). Management of needle blight (*Lophodermium pinastri*) disease in Blue pine trees in

- Kashmir, India. *Journal of Forestry Research*, 27(1), 185–192.
<https://doi.org/10.1007/s11676-015-0123-z>.
- Byther, R. S. (1976). Lophodermium Needle cast. WSU Cooperative Extension Service Western Washington Research and Extension Center Puyallup. Vol.1 Issue 9. 6 p.
- Cannon, P.F., & Minter, D.W. (1986). The Rhytismataceae of the Indian subcontinent. *Mycological Papers*. 155:123 p.
- Cibrián, T. D., Méndez, M.J., Campos, B. R., Yates III, O., y Flores, L.J. (1995). *Insectos Forestales de México*. Universidad Autónoma Chapingo, SARH Subsecretaría Forestal y de Fauna Silvestre USDA Forest Service, Natural Resources Canadá, Comisión Forestal de América del Norte/ North America Forestry Comision. 653 p.
- Cibrián, T., Alvarado, D., y García, D. S. (2007). Enfermedades forestales en México. *Forest diseases in México*. Universidad Autónoma Chapingo: CONAFOR-SEMARNAT, México; Forestry Service USDA, EUA; NRCAN Forest Service, Canadá y Comisión Forestal de América del Norte, COFAN, FAO. Chapingo, Edo. de Méx., México. 587 p. DOI: 10.1186/s40490-015-0055-6
- French, D. W. (1988). *Forest and Shade Tree Pathology*. University of Minnesota Department of Plant Pathology. S.T. Paul M.N., Minnesota. USA. 271 p.
- Gao, X.M., Lin, Y.R., Huang, H.Y., & Hou, C.L. (2013). A new species of *Lophodermium* associated with the needle cast of Cathay silver fir. *Mycological Progress*, 12:141–149. doi:10.1007/s11557-012-0817-y.
- Gonthier, P. (2013). *Infectious Forest Diseases*. Ed. by Gonthier, P. & Nicolotti, G. CABI: Wallingford, UK. Pp. xii-xiii.
- González, 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.

- Guillman, D. (2011). Lophodermium Needle Cast. The Center for Agriculture, Food and the Environment. The College of Natural Sciences. Consultado el 2 de mayo del 2017. Disponible en: <https://ag.umass.edu/landscape/fact-sheets/lophodermium-needle-cast>
- Johnston, P.R. (2001). Monograph of the monocotyledon-in-habiting species of Lophodermium. *Mycological Papers*. 176: 239 p.
- Kirk, P.M, Cannon, F.P., David, C.J., & Stalpers, A.J. (2001). Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi. 9th ed. Wallingford: CAB International. 655 p.
- Koukol, O., Pusz, W., & Minter, D. (2015). A new species of Lophodermium on needles of mountain pine (*Pinus mugo*) from the Giant Mountains in Poland. *Mycological Progress*, 14(5). <https://doi.org/10.1007/s11557-015-1038-y>.
- Kuzmina, N.A., Senashova, V.A., & Kuzmin, S.R. (2015). Distribution of Lophodermium Needle Cast Agents in Scots Pine Stands in Middle Siberia. *Contemporary Problems of Ecology*, 8(7): 909-915. <https://doi.org/10.1134/S1995425515070082>.
- Li, Z.J., Taylor, J.E., & Hou, C.L. (2016). An unusual Lophodermium species on needles of *Pinus taiwanensis* from China. *Mycological Progress*, 15(12): 1229-1237. DOI: 10.1007/s11557-016-1228-2.
- Lilja, A., Poteri, M., Petäistö, R.L., Rikala, R., Kurkela, T., & Kasanen, R. (2010). Fungal diseases in forest nurseries in Finland. *Silva Fennica* 44(3): 525–545.
- Luo, J.T., Lin, Y.R., Shi, G.K., & Hou, C.L. (2010). Lophodermium on needles of conifers from Yunnan Province, China. *Mycological Progress*, 9(2), 235-244. <https://doi.org/10.1007/s11557-009-0632-2>.

- Minter, D. W. (1981). Lophodermium on pines. (Vol. 147). Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute. 70 p.
- Minter, D.W. & Millar, C.S. (1980). Ecology and biology of three Lophodermium species on secondary needles of Pinus sylvestris. *European Journal of Forest Pathology*. 10:169-180.
- Minter, D.W., Staley, M.J. & Millar, S.C. (1978). Four species of Lophodermium on Pinus sylvestris. *Transactions of the British Mycological Society*. 71:295-301.
- Morgan, J. F., & Hulton, R.L. (1977). Ascocarp development in Lophodermium nitens. *Canadian Journal of Botany*. 55(20): 2605-2612.
- 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 p.
- Ortiz, G.S., Gernandt S.D., Stone K.J., Johnston R.P., Chapela H.I., Salas L.R., & Alvarez B.E. (2003). Phylogenetics of Lophodermium from pine. *Mycologia*, 95: (5), 846-859. Doi: 10.1080 / 15572536.2004.11833044.
- Osono, T., & Hirose, D. (2011). Colonization and lignin decomposition of pine needle litter by Lophodermium pinastri. *Forest Pathology*, 41, 156-162. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2010.00648.x>
- Osorio, M., & Stephan, B.R. (1991). Life cycle of Lophodermium piceae on Norway spruce needles. *European Journal of Forest Pathology*, 21: 152-163. Doi: 10.1111 / j.1439-0329.1991.tb01419.x
- Pérez, M. R., Romero, S. E., González, H. A., Pérez, S. E., y Arriola, P. V. (2016). Distribución potencial de Lophodermium spp. en bosques de coníferas, con escenarios de cambio climático. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. Vol. 7 (36): 81-97. <https://doi.org/https://doi.org/10.29298/rmcf.v7i36.61>
- Pildain, M.B., y Errasti, A. (2011). Hongos patógenos de pinos en la Patagonia y su asociación con plagas entomológicas. Ed. by Villacide J. & Corley J.

- Serie Técnica: Manejo Integrado de Plagas Forestales. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 14 p.
- Polmanis, K., Gaitnieks, T., Beļeviča, V., Rungis, D., & Baumanes, A. (2017). Occurrence of *Lophodermium* spp. in young scots pine stands in Latvia. *Research for Rural Development*, 1, pp. 14-20. DOI: 10.22616/rrd.23.2017.002.
- Prihatini, I., Glen, M., Wardlaw, T.J., Ratkowsky, D.A., & Mohammed, C.L. (2015). Needle fungi in young Tasmanian *Pinus radiata* plantations in relation to elevation and rainfall. *New Zealand Journal of Forestry Science*. New Zealand. 45:25.
- Pusz, W., Weber, R., Dancewicz, A., & Kita, W. (2016). Effect of weater conditions on the incidence of *Lophodermium* yellow needle blight in the Karkonosze and Izerkie Mountains (Poland). *Journal of Mountain Science* 13(3). DOI: 10.1007/s11629-014-3291-y.
- Reignoux, S.N., Green, S. & Ennos, R.A. (2014). Molecular identification and relative abundance of cryptic *Lophodermium* species in natural populations of Scots pine, *Pinus sylvestris* L. *Fungal biology*. Vol. 118 (9-10):835-845. doi:10.1016/j.funbio.2014.07.002.
- Sakuyama, T. (1997). Studies on Pine Needle Cast and Its Pathogens, Especially on a Virulent One, *Lophodermium iwatense* Sakuyama, in Japan. *Journal of Forest Research*, 2(1), 67.
- Salas, L.R. (2013). *Estructura genética y recombinación en Lophodermium, un hongo endófito de pinos* (tesis doctoral). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México. 153 p.
- Simpson, J.A., & Grgurinovic, C.A. (2004). First record of *Lophodermium conigenum* on *Pinus* in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 33(3), 447-448. <https://doi.org/10.1071/AP04039>.

- Sokolski, S., Piché Y. & Bérube A.J. (2004). *Lophodermium macci* sp. nov., a new species on senesced foliage of five-needle pines. *Mycologia*. 96:1261-1267 p.
- Tainter, F.H., & Baker, F.A. (1996). *Principles of Forest Pathology*. John Wiley, Hoboken. New Jersey. 805 p.
- Terhonen, E., Marco, T., Sun, H., Jalkanen, R., Kasanen, R., Vuorinen, M., & Asiegbu, F. (2011). The effect of latitude, season and needle-age on the mycota of Scots pine (*Pinus sylvestris*) in Finland. *Silva Fennica* 45(3): 301–317. <https://doi.org/10.14214/sf.104>.
- Velasco, B. E., Reséndiz, M. J., Sandoval, C. L., Olvera, C. L., Moreno, S. F., Gutiérrez, V. M. y Cedeño, S. O. (2003). Diagnóstico sanitario de los bosques del Distrito Federal, México. *Revisa Ciencia Forestal en México*. Vol. 27. Núm. 91. Pp. 8-26.

CAPÍTULO 3.- FLUCTUACIÓN DE ASCOSPORAS DE *Lophodermium* sp. EN *Pinus oaxacana* MIROV. EN ZAUTLA, PUEBLA.

ASCOSPORAS FLUCTUATION OF *Lophodermium* sp. IN *Pinus oaxacana* MIROV. IN ZAUTLA, PUEBLA.

Edgar Espinosa Guerrero¹, David Cibrián Tovar^{1*}, Silvia Edith García Díaz¹, Luz Judith Rodríguez Esparza¹

1 División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México. C. P. 56230.

* Autor de correspondencia, correo-e: dcibrian48@gmail.com

3.1 RESUMEN

El presente estudio se realizó en el municipio de Zautla, ubicado en la Sierra Nororiental del estado de Puebla. El objetivo fue determinar la fluctuación de la

población de ascosporas de *Lophodermium* sp., en *Pinus oaxacana* que es la especie más susceptible y afectada en esta zona por este hongo fitopatógeno.

Para determinar el periodo de liberación de ascosporas se hizo un trampeo en los cuales se utilizaron trampas fungales aéreas que fueron colocadas el día veintidós de febrero del 2018 y se cambiaron cada tres semanas hasta el veintiocho de octubre del mismo año. El número total de trampas colocadas fue de 180, a razón de quince trampas por cada cambio y el conteo de ascosporas se hizo mediante un muestreo sistemático.

De acuerdo con los resultados, se obtuvo que el periodo de máxima liberación de ascosporas de *Lophodermium* sp. fue del cuatro de junio al dieciséis de julio del 2018, sin embargo, el periodo de inicio y término de la liberación de ascosporas está relacionado con la precipitación y la temperatura.

Palabras clave: Fluctuación, ascosporas, *Lophodermium* sp., Sierra Nororiental.

3.2 ABSTRACT

The present study was conducted in the municipality of Zautla, located in the Northeast Sierra of the state of Puebla. The objective was to determine the fluctuation of the ascospore population of *Lophodermium* sp., In *Pinus oaxacana*, which is the most susceptible and affected species in this area by this phytopathogenic fungus.

To determine the period of release of ascospores, a trap was made in which aerial fungal traps were used, which were placed on February 22, 2018 and changed every three weeks until October twenty-eighth of the same year. The total number of traps placed was 180, at a rate of fifteen traps for each change and the ascospore count was made by systematic sampling.

According to the results, it was obtained that the period of maximum release of ascospores of *Lophodermium* sp. It was from June 4 to July 16, 2018, however,

the period of beginning and end of the release of ascospores is related to precipitation and temperature.

Key words: Fluctuation, ascospores, *Lophodermium* sp., Sierra Nororiental.

3.3 INTRODUCCIÓN

Las plagas y enfermedades forestales representan un riesgo para los ecosistemas y están consideradas como uno de los principales actores de daño en los bosques, ocasionando deformaciones, pérdida del crecimiento, debilitamiento y muerte del arbolado (CONAFOR, 2016). Si bien aún se requieren esfuerzos considerables de investigación para desenredar con precisión el papel y cuantificar el impacto de todos los factores que contribuyen al deterioro de los bosques, existen pocas dudas de que la gran mayoría de las pérdidas, son causadas por enfermedades, situándose muy por delante de los insectos, incendios y condiciones climáticas adversas (Tainter y Baker, 1996).

Las enfermedades de los árboles forestales son responsables no solo de la muerte de los árboles, sino también de las reducciones y anomalías en el crecimiento, y pueden ser causadas por agentes bióticos y abióticos (Gonthier, 2013). En el caso de los factores bióticos, la gran mayoría de las enfermedades en los árboles son causadas por virus, fitoplasmas, bacterias, hongos, organismos similares a hongos (por ejemplo, oomicetos), plantas parásitas y nematodos. Los agentes de enfermedades bióticas son infecciosos, ya sea por sí solos o gracias a un vector, y las enfermedades que causan son, por tanto, transmisibles de los árboles enfermos a los sanos (Tainter y Baker, 1996; Agrios 2005).

Los agentes de enfermedades infecciosas varían en su epidemiología según su biología y los vectores asociados. Todas las especies de árboles son susceptibles a los patógenos en diversos grados, y todos los componentes de los árboles, como el follaje, las ramas, los tallos y las raíces pueden estar enfermos

(Tainter y Baker, 1996). A pesar de ello, no todas las especies de árboles son susceptibles a los mismos patógenos y existe un grado considerable de variación en la resistencia entre huésped-patógeno. En los ecosistemas naturales, los patógenos típicamente han evolucionado conjuntamente con sus hospedantes y se han desarrollado mecanismos de resistencia al hospedador.

Sin embargo, en los últimos años debido a una alta frecuencia de factores de origen antropogénico como los incendios forestales, los aprovechamientos clandestinos, cambio de uso del suelo o desmontes, sobrepastoreo, entre otros; predisponen a los árboles a condiciones de estrés y debilidad (Cibrián *et al.* 2007); además el cambio climático afecta al patógeno, el huésped y la interacción entre ellos, dando como resultado cambios en el impacto de la enfermedad (Sturrock *et al.*, 2011). Esto ha hecho que los patógenos nativos sean más agresivos (Slaughter y Rizzo, 1999), y las pérdidas económicas en el bosque sean incalculables.

Por lo tanto, existe la necesidad de tener un control y manejo de las enfermedades mediante la adopción de medidas efectivas y sostenibles basadas en un profundo conocimiento de la biología de la infección y la epidemiología de los patógenos.

El presente trabajo se enfoca en reconocer el periodo de fluctuación de ascosporas del hongo patógeno *Lophodermium* sp., ya que junto con el insecto chupador de savia *Ocoaxo* cerca *fowleri* son agentes que afectan los bosques de la Sierra Norte y Nororiental de Puebla. De acuerdo con datos reportados por Pérez *et al.* (2016) su incidencia ha perjudicado alrededor de 3000 ha.

Cibrián (2016) señala que la presencia de estos agentes propicia el deterioro gradual del individuo y la pérdida del vigor del arbolado, lo cual se manifiesta a través de un amplio rango de síntomas lo que incluye: necrosamiento y decoloración del follaje, reducción del crecimiento, disminución del follaje e incluso puede ocasionar la muerte de los árboles.

En 2016, la Unión Agroforestal de Puebla A.C. integrada por asociaciones regionales de silvicultores y uniones de ejidos, en vinculación con las autoridades

que representan el gobierno federal, Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) y Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) llevaron a cabo el Plan de contingencia fitosanitaria para combatir a los principales actores que deterioran a las coníferas de Puebla, sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados se ha reportado muy poca efectividad en las actividades emprendidas y en la actualidad no se tienen resultados satisfactorios.

Por lo que el objetivo del presente estudio se enfoca en reconocer el periodo de fluctuación de las ascosporas del hongo patógeno *Lophodermium* Chevall., que es un agente causal que afecta a los bosques de esta región, esto servirá de base para ver su comportamiento y en estudios posteriores se puedan establecer métodos que posibiliten su control de forma efectiva.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del área de estudio

El área de estudio comprende el municipio de Zautla ubicado en la Sierra Nororiental del estado de Puebla, situado en las coordenadas geográficas 19° 37' 00" y 19° 49' 00", de latitud Norte y 97° 33' 00" y 97° 47' 00" longitud oeste, con altitud entre los 1700 y 3000 m. La temperatura media oscila de los 12-18 °C, la precipitación media anual es de 600-1100 mm. Los principales climas son templado húmedo con abundantes lluvias en verano C(m), templado subhúmedo con lluvias de verano C(w₂) que es el clima predominante y templado húmedo con lluvias en verano C(m)(f), el 62% de la superficie corresponde a bosque (INEGI,2009).

Elaboración de trampas

Para el reconocimiento del periodo de liberación de las ascosporas se utilizaron "trampas para esporas fungales aéreas" descritas por Ostrey y Nicholls (1982). Las trampas consistieron en portaobjetos los cuales fueron introducidos en petrolato puro (vaselina) derretido para obtener una capa fina; posteriormente

se removió la vaselina de uno de los lados y dicho portaobjeto se guardó en una caja de preparaciones.

Una vez preparados los portaobjetos con vaselina se llevaron a campo y con la ayuda de un soporte de alambre galvanizado y un broche, se colocaron en los árboles de *Pinus oaxacana* Mirov. que es la especie más susceptible y dañada en el área de estudio.

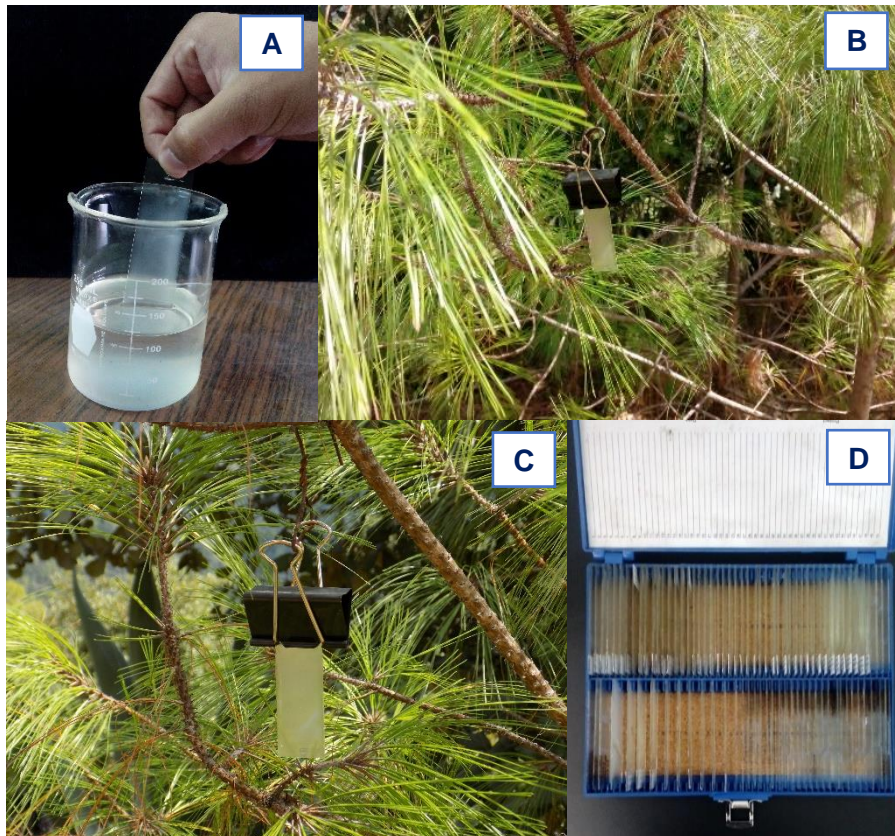


Figura 3. A) Elaboración de trampas. B) y C) Colocación de trampas en campo. D) Caja de preparaciones para llevar a campo las trampas.

Colocación de trampas y mantenimiento del trampeo

Los portaobjetos se llevaron a campo en una caja de preparaciones. Para la colocación de las trampas se seleccionaron 15 árboles que presentaran acículas infectadas. En cada uno de estos árboles se colocó una trampa de ascosporas, prefiriendo por lo regular la exposición Norte, debido a que en esta

se concentra mayor humedad. Las trampas se colocaron a una altura 2-8 m y a unos pocos centímetros dentro del follaje del árbol.

Las trampas se colocaron el día 22 de febrero del 2018 y se cambiaron cada 3 semanas hasta el 28 de octubre del mismo año (Cuadro 2). El número total de trampas colocadas fue de 180, a razón de 15 trampas por cambio.

Cuadro 2. Fechas de cambio de trampas fungales aéreas en Zautla, Puebla.

Cambios	Fecha
Instalación	22-febrero-2018
1	14-marzo-2018
2	4-abril-2018
3	24-abril-2018
4	14-mayo-2018
5	4-junio-2018
6	25-junio-2018
7	16-julio-2018
8	5-agosto-2018
9	26-agosto-2018
10	16-septiembre-2018
11	7-octubre-2018
12	28-octubre-2018

Cada trampa se etiquetó con los datos necesarios como fecha y número de trampa, principalmente, para realizar el conteo y poder registrar el número de ascosporas capturadas.

Procesamiento de las muestras colectadas

En cada periodo de cambio, las trampas fueron llevadas al laboratorio de Parasitología Forestal de la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma Chapingo para su análisis.

Con ayuda de un microscopio compuesto ZEISS Primo Star se utilizó el objetivo de 40X para el conteo de las ascosporas de *Lophodermium*.

Diseño de muestreo y estimación de la población

Para el conteo y la estimación del nivel de población de las ascosporas en un tiempo determinado, se utilizó la metodología que se empleó, en un estudio realizado por Cruz (2007), donde determinó el periodo donde existe una mayor fluctuación de ascosporas de *Phaeocryptopus gaeumannii* (T. Rohde) Petrak en *Pseudosuga macrolepis* Flous.

El diseño de muestreo utilizado para la estimación del nivel de la población de ascosporas de *Lophodermium* sobre las trampas, fue sistemático, y se realizó de la siguiente manera:

- Cada trampa se dividió en cinco bandas verticales y se contaron el número de ascosporas de la banda 2 y 4, la separación entre bandas fue de 1 cm. La superficie con vaselina de cada uno de los portaobjetos fue de 1250 mm² (portaobjetos de 7.5 x 2.5 cm, superficie de 1875 mm²). La superficie que ocupó cada banda fue de 22 mm², y la superficie total muestreada por trampa fue de 110 mm² (Figura 4).

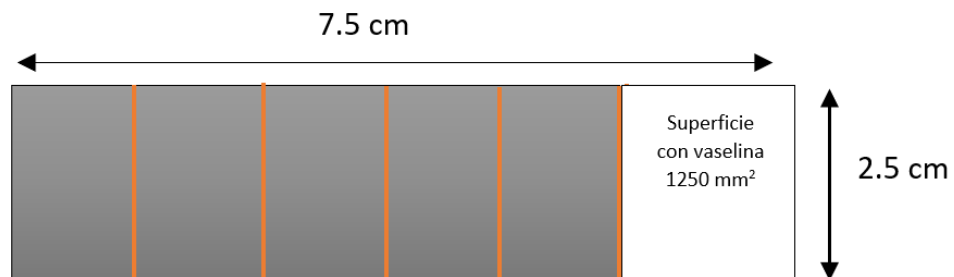


Figura 4. Vista del muestreo de ascosporas sobre una trampa, las líneas de color naranja indican las unidades de muestreo.

- Una vez, contado el número de ascosporas por banda, se calculó la media muestral, varianza de la media muestral y el total poblacional por trampa, con las siguientes formulas, a través del software R:

Media muestral sistemática: $\bar{y}_{\text{sis}} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n}$

Total de la muestra sistemática: $Y_{\text{sis}} = N\bar{y}_{\text{sis}}$

Donde:

y_i = valor registrado en la i-ésima unidad de muestreo de la muestra

n = Tamaño de muestra

N = Total de unidades de muestreo en que está dividida la población

$K = \frac{N}{n}$ (N=60, n=4)

Posteriormente se calcularon los límites para el error de estimación, del total poblacional, de cada trampa con las siguientes formulas:

Límites para el error de estimación del total

$LI = Y_{\text{sis}} - (Z_{1-\alpha/2}) \sqrt{\text{var}} (Y_{\text{sis}})$ Límite inferior

$LS = Y_{\text{sis}} + (Z_{1-\alpha/2}) \sqrt{\text{var}} (Y_{\text{sis}})$ Límite superior

$\text{Var} (\bar{y}_{\text{sis}}) = \frac{\sum_{i=1}^k (y_i - \bar{Y})^2}{K}$ Varianza del total a través de la muestra sistemática

Con los datos obtenidos de los conteos de ascosporas, se calculó la media muestral, para estimar la población total por trampa, con sus respectivos intervalos de confianza al 95% y se realizaron las gráficas correspondientes para observar el comportamiento de la liberación de las ascosporas.

3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comportamiento de la esporulación de *Lophodermium*

El trameo de ascosporas se estableció el 22 de febrero del 2018 y se revisó por periodos de 3 semanas hasta el 28 de octubre del mismo año. Por

periodo se revisaron 15 trampas y desde la instalación hasta el retiro de las trampas, se hicieron 12 cambios de las trampas, de manera que dio un total de 180 trampas.

En cada periodo de cambio, las trampas fueron llevadas al laboratorio de Parasitología Forestal de la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma Chapingo para su análisis.

Con ayuda de un microscopio compuesto, se utilizó el objetivo de 40X para el conteo de las ascosporas de *Lophodermium*.



Figura 5. Ascosporas observadas en las trampas para esporas fungales aéreas (vaselina).

Las ascosporas de *Lophodermium* sp. que se observaron en las trampas fungales aéreas, fueron cotejadas con las estructuras que se describen en *Lophodermium* on Pines (Minter, 1981) y Foliar Fungi of Western Trees (Funk, 1985).

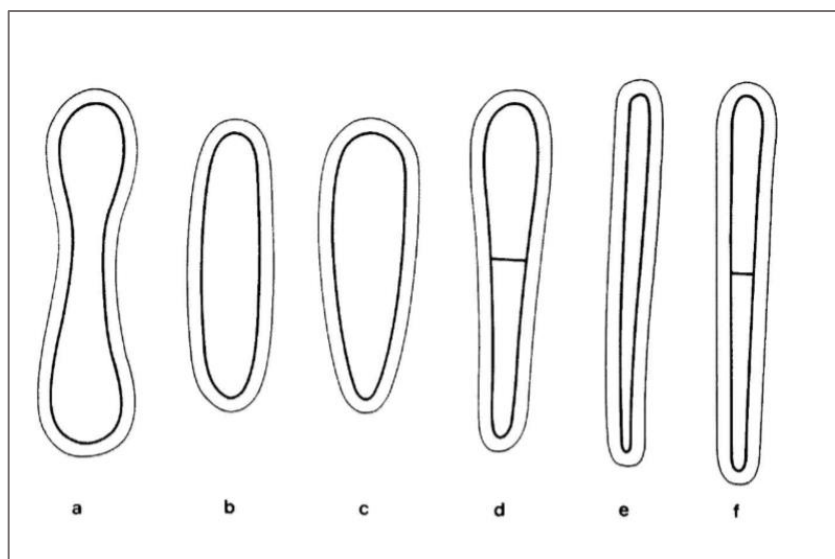


Figura 6. Tipos de ascosporas en las Hypodermataceae. a) Busiforme en *Bifusella*, *Isthmiella*; b) Simétrica en *Melloderma* y *Virgella*; c) Clavado en *Hypodermella* y *Lophodermella*; d) Clavado-septado en *Elytroderma*; e) Filiforme en *Lophodermium* y *Rhytisma*; f) Filiforme-septado en *Lophomerum* (Tomado de Funk, 1985).

Por cada periodo se revisaron las 15 trampas y se hicieron los conteos de ascosporas (Cuadro 3) donde se contaron la banda 2 y 4 de cada unidad de muestreo (portaobjeto con petrolato puro) y después se sumaron los datos obtenidos de cada banda para obtener un solo dato por unidad de muestreo.

Cuadro 3. Número de ascosporas de *Lophodermium* sp. capturadas por trampa.

FECHA/TRAMPA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Total por conteo
22/02/18- 14/03/18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14/03/18-4/04/18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4/04/18-24/04/18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2
24/04/18-14/05/18	0	5	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	11
14/05/18-4/06/18	1	103	8	0	25	6	17	0	0	7	0	2	4	9	4	186
4/06/18-25/06/18	25	21	28	11	19	17	13	66	36	49	56	174	39	118	11	683
25/06/18-16/07/18	31	29	14	20	49	99	3	23	31	49	73	109	17	80	159	786
16/07/18-5/08/18	27	35	21	37	54	39	41	34	33	40	38	13	37	17	61	527
5/08/18-26/08/18	13	12	7	15	12	10	12	7	12	15	16	16	13	11	9	180
26-08/18-16/09/18	7	6	5	10	5	8	8	8	11	5	13	9	8	6	14	123
16/09/18-7/10/18	2	2	5	5	7	2	8	8	10	11	9	7	11	6	3	96
7/10/18-28/10/18	2	2	3	1	0	1	0	1	1	0	0	2	2	1	2	18

De los conteos realizados se pudo observar la fluctuación de ascosporas de *Lophodermium* sp. (Figura 7), donde se apreció que del 22 de febrero al 4 de abril el número de ascosporas fue nulo, ya que no hubo presencia de ascosporas de *Lophodermium*. A partir del 4 de abril en adelante se observó que hubo presencia de ascosporas, sin embargo, del 4 de abril al 14 de mayo en los muestreos realizados el número de ascosporas fue muy bajo (13 ascosporas), comparado con el número de ascosporas en posteriores fechas.

El 14 de mayo comenzó un incremento de la esporulación, de ahí en adelante el número de ascosporas tendió a un aumento, teniendo su máximo incremento del 25 de junio al 16 de julio (786 ascosporas), después del 16 de julio al 28 de octubre disminuyó paulatinamente la presencia de ascosporas.

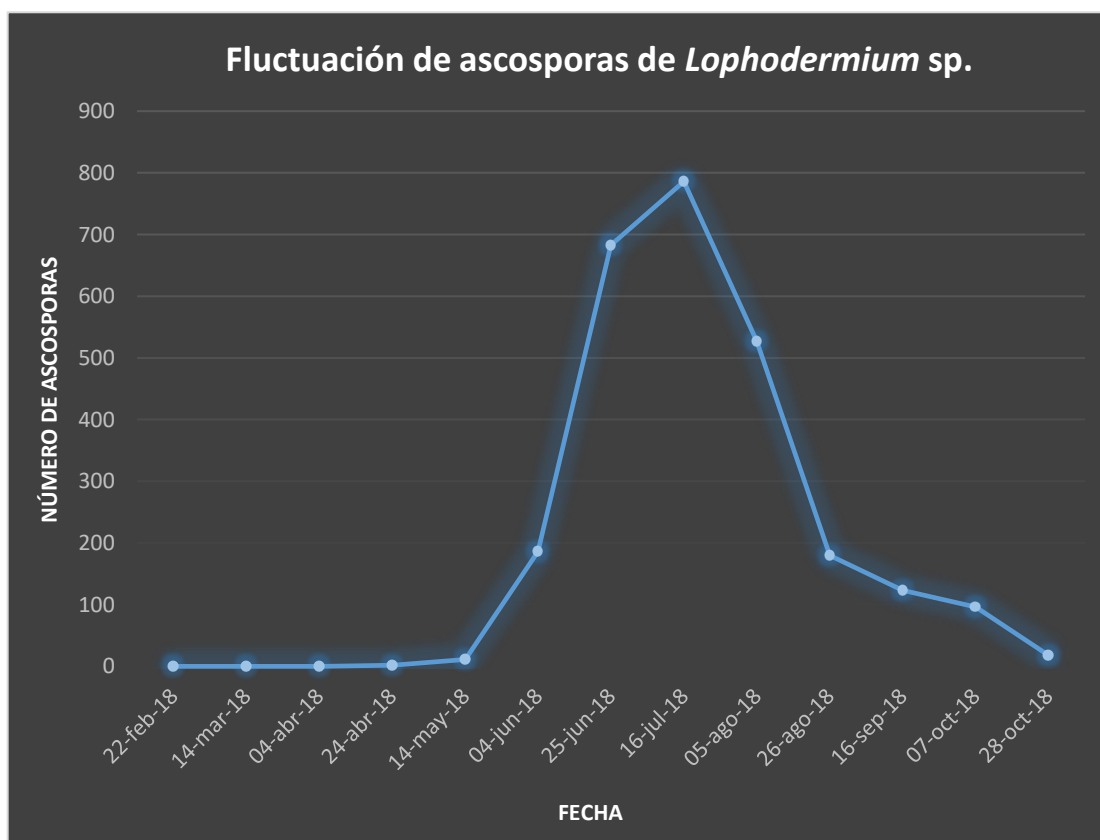


Figura 7. Comportamiento de la esporulación de *Lophodermium* sp. en Zautla, Puebla.

Al tener los conteos de ascosporas en las unidades de muestreo se hizo la estimación del total por cada periodo con sus respectivos intervalos de confianza al 95% (Cuadro 4).

Cuadro 4. Estimación del total por periodo con intervalos de confianza al 95 %

FECHA	Total \hat{y}	Estimación del total	
		Límite inferior	Límite superior
22/02/18- 14/03/18	0	0	0
14/03/18-4/04/18	0	0	0
4/04/18-24/04/18	8	7.679	8.32
24/04/18-14/05/18	44	42.879	45.12
14/05/18-4/06/18	744	725.932	762.067
4/06/18-25/06/18	2732	2689.742	2774.257
25/06/18-16/07/18	3144	3100.887	3187.112
16/07/18-5/08/18	2108	2105.062	2110.937
5/08/18-26/08/18	720	718.719	721.27
26-08/18-16/09/18	492	489.631	494.368
16/09/18-7/10/18	384	381.326	386.673
7/10/18-28/10/18	72	71.26	72.73

A partir de los datos obtenidos de la estimación del total se observó que en los 2 primeros periodos (22 de febrero al 14 de marzo y del 14 marzo al 4 de abril del 2018) como hubo ausencia de ascosporas, los intervalos de confianza al 95% fueron cero, sin embargo, a partir del 4 de abril donde empezó haber la presencia de ascosporas, los intervalos de confianza que se calcularon fueron relativamente muy pequeños, esto es debido a que la varianza de los datos fue pequeña en todos los periodos. Salcedo *et al.* (2011), mencionan que las poblaciones con menor dispersión permiten realizar estimaciones por intervalos más exactas, aunado a esto, nos da una estimación más precisa.

Relación de los factores ambientales con la fluctuación de ascosporas

La enfermedad es, en última instancia, una sincronización de diferentes eventos biológicos afectados por factores ambientales. El entorno incluye factores climáticos, como la humedad y la temperatura, así como otros factores abióticos, como el estado de los nutrientes del suelo y el pH. (Jonàs *et al.* 2013). Agrios (2005), menciona que una enfermedad para que se produzca y se desarrolle óptimamente debe haber una combinación de tres factores: una planta susceptible, un patógeno infeccioso y un medio favorable. En este caso se analizó

como la precipitación y la temperatura pueden influir en la fluctuación de las ascosporas de *Lophodermium*.

Para ver como incide la precipitación y la temperatura se tomaron los datos del Servicio Meteorológico Nacional y del Atlas Climático Digital de México de la Unidad de Informática para las Ciencias Atmosféricas y Ambientales (UNIATMOS) de la UNAM.

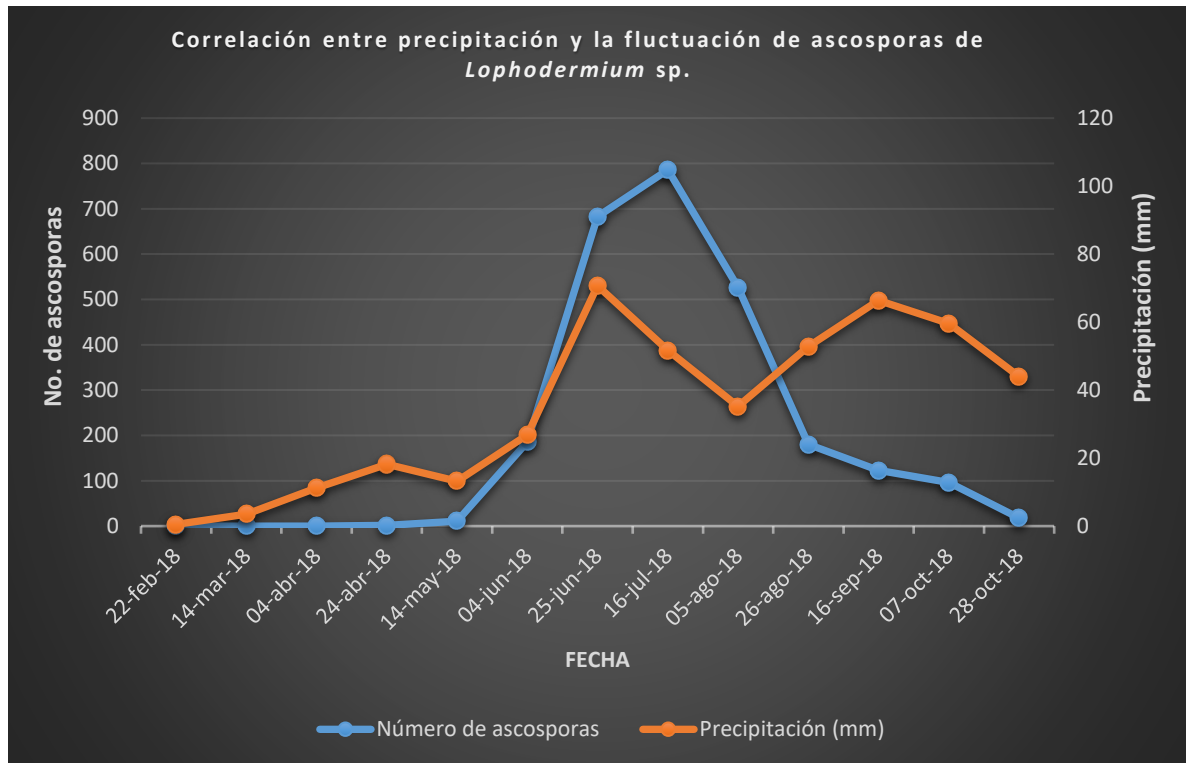


Figura 8. Correlación entre precipitación y la fluctuación de ascosporas de *Lophodermium* sp.

Como se puede observar en la correlación entre precipitación y la fluctuación de ascosporas sp. (Figura 8) hay una estrecha relación, del 22 de febrero al 14 de abril, aunque hubo muy poca precipitación la población de ascosporas estuvo en ceros, sin embargo, a partir del 14 de mayo donde empezó la época de lluvias y la precipitación se mantuvo constante, la población de ascosporas empezó a aumentar. El periodo comprendido del 4 de junio al 25 de junio fue el de mayor precipitación, en la gráfica se puede observar que llega a un cierto pico, y al presentarse esto, posteriormente también en el número de

ascosporas se presenta un pico, por lo que al haber una mayor precipitación también hay un mayor número de ascosporas, aunque en la gráfica también se puede observar que del 26 de agosto al 16 de septiembre hay otro incremento en la precipitación, pero el número de ascosporas no aumenta, esto puede ser debido a que hay otros factores como la temperatura que también incide en el número de ascosporas.

A través de un análisis de la temperatura con la fluctuación de ascosporas (Figura 9) se pudo observar que en el periodo del 24 de abril al 14 de mayo se presentó en promedio la mayor temperatura (16.5 °C), donde coincide también con la precipitación ya que a partir del 14 de mayo hubo un aumento, por lo que el número de ascosporas está relacionado con la temperatura y una abundante precipitación.

Agrios (2005) menciona que, con la llegada de temperaturas altas y condiciones favorables, la mayoría de los patógenos tienen la posibilidad de infectar a las plantas y producir enfermedad, además, que al haber una humedad óptima influye en la liberación de esporas de los esporóforos.

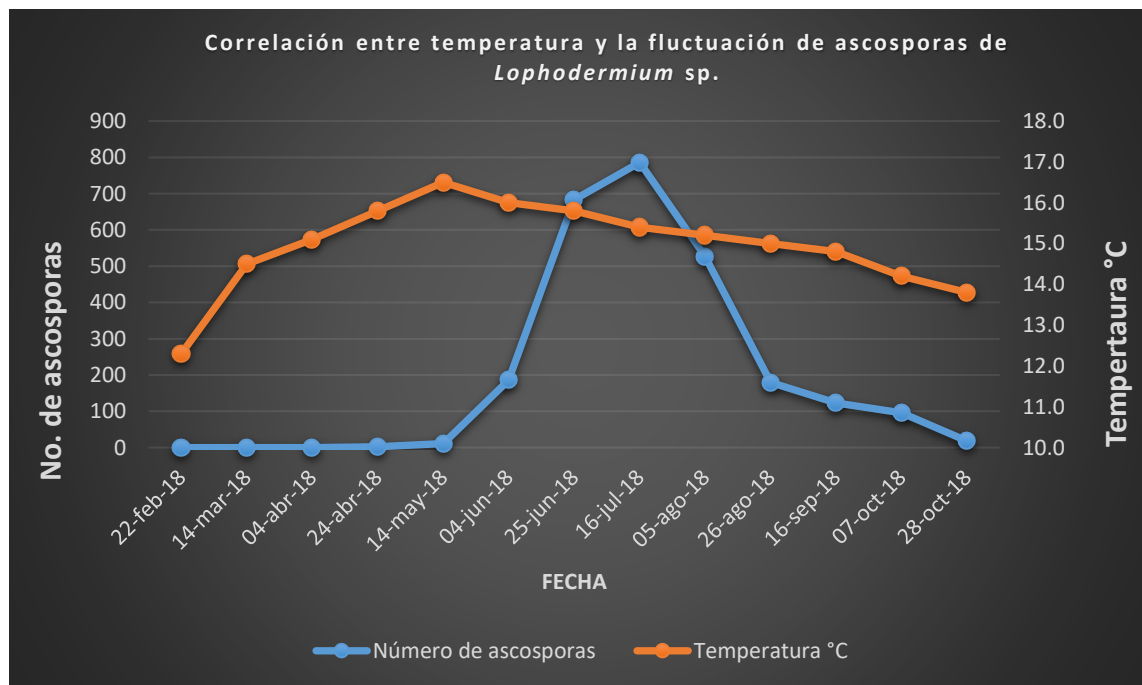


Figura 9. Correlación entre temperatura y la fluctuación de ascosporas de *Lophodermium* sp.

De acuerdo a los datos mostrados, las condiciones idóneas en el área de estudio para que prospere o haya un aumento en la población de ascosporas de *Lophodermium* es a una temperatura que va de los 13.8 °C- 15.8 °C y una precipitación anual de 453.9 mm; en comparación con otros estudios (Cuadro 4), Pérez *et al.* (2016) mencionan que los factores que propician el desarrollo de *Lophodermium* son temperatura (13.6-14.2°C), precipitación (343.2-445 mm) y humedad relativa (75.8-80.2%).

Polmanis *et al.* (2017) mencionan que la precipitación (204-337.5 mm) y la temperatura (14.6-16.0 °C) se correlacionan para que haya una mayor incidencia de *Lophodermium*.

Cuadro 5. Condiciones climáticas donde se ha presentado *Lophodermium*.

ESTUDIO	Temperatura (°C)	Precipitación (mm)	Humedad relativa (%)
Fluctuación de ascosporas de <i>Lophodermium</i> sp. en <i>Pinus oaxacana</i> Mirov. En Zautla, Puebla. ¹	13.8-15.8 °C	453.9 mm	-----
Distribución potencial de <i>Lophodermium</i> spp. en bosques de coníferas, con escenarios de cambio climático. ²	13.6-14.2 °C	343.2-445 mm	75.8-80.2%
Ocurrencia de <i>Lophodermium</i> spp. en pinos jóvenes de Letonia. ³	14.6-16 °C	204-337.5 mm	-----
Distribución de los agentes causantes de <i>Lophodermium</i> en acículas de pino silvestre en Siberia Central. ⁴	18-20.6 °C	147 mm	70-78%

1. Área de estudio; 2. Pérez *et al.* (2016); 3. Polmanis *et al.* (2017); 4. Kuzmina *et al.* (2015).

Kuzmina *et al.* (2015), mencionan que la temperatura (18-20.6°C), precipitación (71-155 mm) y humedad relativa (70-78%) son factores que inciden en la maduración de los histerotecios.

A partir de esto, se observó que los diferentes estudios que se enfocan en ver como se relaciona *Lophodermium* con las condiciones climáticas, en el área

de estudio la temperatura y precipitación están dentro de lo rangos óptimos para su desarrollo y crecimiento e influyen en la liberación de las ascosporas.

Estructuras diferentes de *Lophodermium* encontradas en el conteo de ascosporas

Además del conteo de ascosporas de *Lophodermium* sp., se encontraron otros tipos de esporas (Figura 10) como: *Pestalotiopsis* sp., *Colletotrichum* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Alternaria* sp., *Helminthosporium* sp., *Sphaeropsis sapinae* (Fr.) Dyko & B. Sutton y *Seiridium* sp.

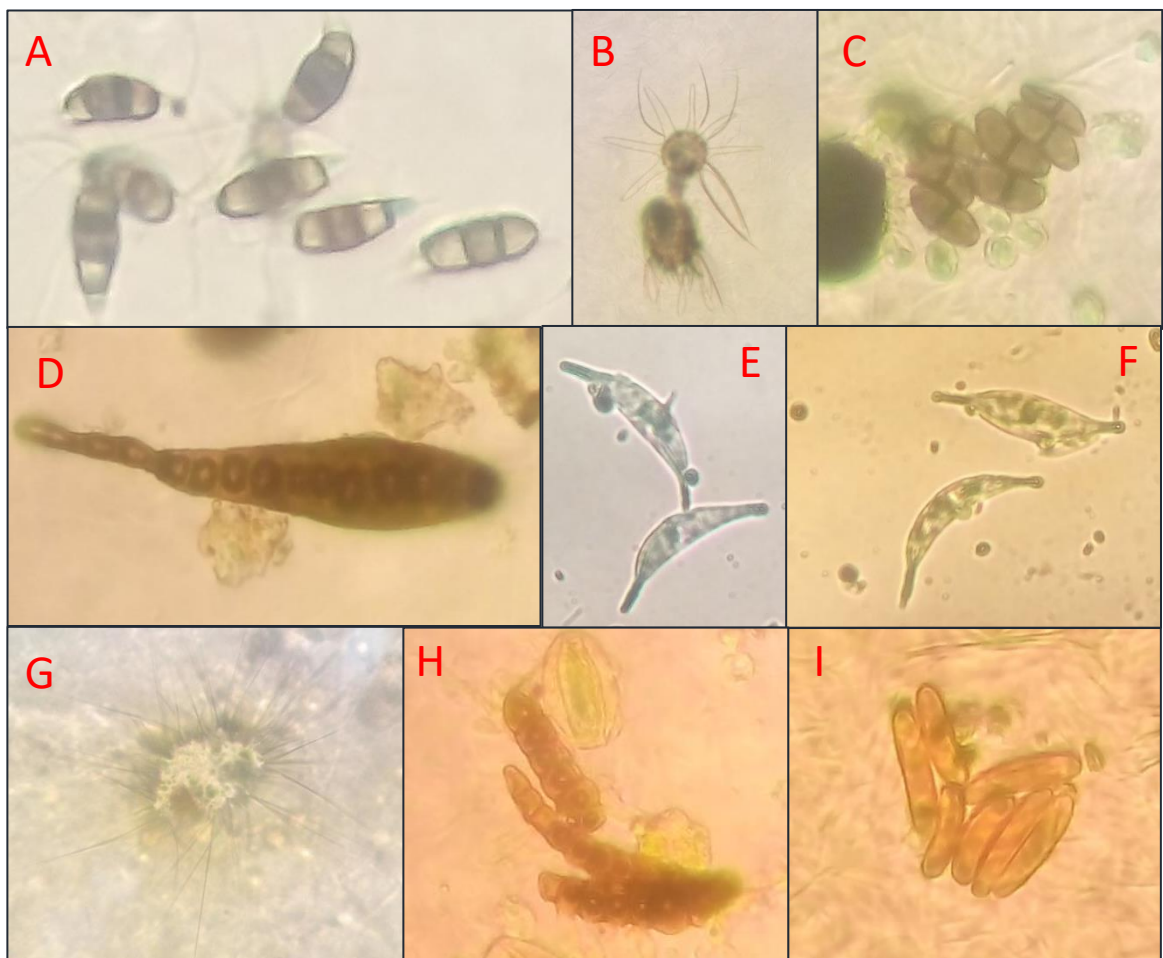


Figura 10. A. *Pestalotiopsis* sp., B y G. *Colletotrichum* sp., C. *Lasiodiplodia* sp., D. *Alternaria* sp., E y F. *Seiridium* sp., H. *Helminthosporium* sp., I. *Sphaeropsis sapinae*.

De las estructuras diferentes a las ascosporas de *Lophodermium* que se encontraron en los conteos, Guba (1961) menciona que el género *Pestalotiopsis* es un patógeno que causa tizón foliar en muchas especies de plantas; Agrios (2005) menciona que *Alternaria*, *Helminthosporium* son hongos imperfectos que producen manchas foliares; Cibrián *et al.* (2007) mencionan que *Colletotrichum* sp. es un patógeno de follaje que ataca a plantas cultivadas, *Lasiodiplodia* y *Alternaria* ocasionan manchas foliares, *Sphaeropsis sapinae* en árboles debilitados ataca las acículas jóvenes y brotes de crecimiento, donde los brotes muertos se tornan de un color café rojizo a gris claro y *Seiridium* produce canchales en tallos y ramas.

Como podemos ver los hongos diferentes a las ascosporas de *Lophodermium*, que se encontraron en los conteos (Figura 10) la mayoría son patógenos oportunistas y están relacionados con las manchas foliares y tizones, por lo que puede ser que estos hongos patógenos junto con *Lophodermium*, además, de otros agentes como el insecto chupador de savia *Ocoaxo* sp. estén asociados, lo que provoca que se presente la declinación forestal en el área de estudio.

3.6 CONCLUSIONES

Se realizó un trampeo para ver la fluctuación de ascosporas de *Lophodermium*, esto se hizo a través de trampas aéreas fungales, las trampas se colocaron del día veintidós de febrero del 2018 hasta el veintiocho de octubre del mismo año, donde cada tres semanas se cambiaron las trampas y el periodo donde se presentó el mayor incremento de ascosporas fue del veinticinco de junio al dieciséis de julio.

La precipitación y la temperatura juegan un papel muy importante en la fluctuación de ascosporas de *Lophodermium*, ya que, al haber una precipitación constante y una temperatura adecuada, esto hace que las ascosporas se liberen y tienda a aumentar el número de ascosporas. La liberación de ascosporas se da después de la precipitación máxima.

3.7 AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Investigación y Posgrado (DGIP) de la Universidad Autónoma Chapingo por el apoyo brindado para la realización de la presente investigación a través del proyecto 18235-C-91.

3.8 REFERENCIAS

- Agrios, G.N. (2005). Plant Pathology. 5th edition. Academic Press, New York. 629 p.
- Cibrián, T. D. 2016. Plan integral estatal de contingencia fitosanitaria para combate a los principales actores que deterioran a las coníferas de Puebla. Universidad Autónoma Chapingo. 153 p.
- Cibrián, T. D., Alvarado, D., y García, D. S. (2007). Enfermedades forestales en México. Forest diseases in México. Universidad Autónoma Chapingo: CONAFOR-SEMARNAT, México; Forestry Service USDA, EUA; NRCAN Forest Service, Canadá y Comisión Forestal de América del Norte, COFAN, FAO. Chapingo, Edo. de Méx., México. 587 p.
- CONAFOR. (2016). Monitoreo terrestre para detección temprana de plagas y enfermedades forestales. Comisión Nacional Forestal y Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. 14 p.
- Cruz, J. (2007). Etiología del tizón suizo (*Phaeocryptopus gaeumannii*) en *Pseudotsuga macrolepis* Flous, como árbol de navidad. Tesis de Maestría en Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. 106 p.
- Funk, A. (1985). Foliar Fungi of Western Trees. Canadian Forestry Service. Pacific Forest Research Centre. Victoria B.C. Canadá. 160 p.
- Gonthier, P. (2013). Infectious Forest Diseases. Ed. by Gonthier, P. & Nicolotti, G. CABI: Wallingford, UK. Pp. xii-xiii.
- Guba, E.F. (1961). Monograph of Monochaetia and Pestalotia. Harvard University Press, Cambridge. 342 p.

- INEGI. (2009). Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos Zautla, Puebla. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Aguascalientes, México. Retrieved from www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/21/21212.pdf
- Jónas, O., Boberg, B.J., Hopkins, M.J.A. & Stenlid, J. (2013). Infectious Forest Diseases. Ed. by Gonthier, P. & Nicolotti, G. CABI: Wallingford, UK. Pp.1-28.
- Kuzmina, N.A., Senashova, V.A., & Kuzmin, S.R. (2015). Distribution of Lophodermium Needle Cast Agents in Scots Pine Stands in Middle Siberia. *Contemporary Problems of Ecology*, 8(7): 909-915. <https://doi.org/10.1134/S1995425515070082>
- Minter, D. W. (1981). Lophodermium on pines. Vol. 147. Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute.70 p.
- Ostrey E., & Nicholls T. (1982). A technique for tramping Fungal Spores. Research Note N C-283. U.S. Department of Agriculture, Forest Service. 4 p.
- Pérez, M. R., Romero, S. E., González, H. A., Pérez, S. E., y Arriola, P. V. (2016). Distribución potencial de Lophodermium spp. en bosques de coníferas, con escenarios de cambio climático. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. Vol. 7 (36): 81-97. <https://doi.org/https://doi.org/10.29298/rmcf.v7i36.61>
- Polmanis, K., Gaitnieks, T., Beļeviča, V., Rungis, D., & Baumane, A. (2017). Occurrence of Lophodermium spp. in young scots pine stands in Latvia. *Research for Rural Development*, 1, pp. 14-20. DOI: 10.22616/rrd.23.2017.002
- Salcedo, A., Sarco, L. A., González, J. y Yañez, G. (2011). Interpretación de intervalos de confianza por docentes en formación. Universidad Central de Venezuela. Centro de Investigaciones Educativas. Pp. 209-229.

- Servicio Meteorológico Nacional. (2018). Normales climatológicas: Santiago Zautla, Puebla. Disponible en: <http://smn.cna.gob.mx/es/informacion-climatologica-ver-estado?estado=pue>.
- Slaughter, G.W. & Rizzo, D.M. (1999). Past forest management promoted root disease in Yosemite Valley. *California Agriculture* 53, 17–24.
- Sturrock, R.N., Frankel, S.J., Brown, A.V., Hennon, P.E., Kliejunas, J.T., Lewis, K.J., Worrall, J.J. & Woods, A.J. (2011). Climate change and forest diseases. *Plant Pathology* 60, 133–149. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2010.02406.x
- Tainter, F.H., & Baker, F.A. (1996). Principles of Forest Pathology. John Wiley, Hoboken. New Jersey. 805 p.
- UNIATMOS. (2018). Atlas Climático Digital de México: Precipitación. Unidad de Informática para las ciencias Atmosféricas y Ambientales. Centro de Ciencias de la Atmosfera. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Disponible en: <http://uniatmos.atmosfera.unam.mx/ACDM/servmapas>.

Capítulo 4. Taxonomic determination of *Lophodermium* in the forest of pino de Zautla, Puebla.

Determinación taxonómica de *Lophodermium* en bosque de pino de Zautla, Puebla.

Edgar Espinosa-Guerrero¹, Omar A. Pérez- Vera^{1*}, David Cibrián-Tovar¹.

¹ Universidad Autónoma Chapingo. División de Ciencias Forestales. Km 38.5 Carretera México- Texcoco. C.P. 56230. Chapingo, Texcoco, Estado de México, México.

* Autor de correspondencia: oalejandrovera@gmail.com, tel.: +52 (551) 614 5446.

4.1 Abstract

Introduction: The forest decline is a major problem at present, since it has been observed in twenty three municipalities of the Sierra Norte and Northeast of Puebla.

Objective: To identify at the species level the pathogen *Lophodermium*, in *Pinus oaxacana* Mirov., in the municipality of Zautla, Puebla, by means of morphological and molecular characterization.

Materials and methods: In the morphological characterization, measurements were made of 50 hysterothecae, 100 ascas and ascospores and the number of epidermal cells at the base of the basal stroma. For the molecular characterization was extracted DNA from the mycelium of the fungus by the CTAB method, the amplification of the region was done through ITS, the sequencing was edited and assembled by the software BioEdit 7.0.5. and it was compared in the GenBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), through the BLAST tool.

Results and discussion: In the morphological part, the hysterothecae measured 600-1165 μm long, ascas 80-135 x 9-18 μm , ascospores 70-100 x 2 μm and 2-5 epidermal cells at the base of the basal stroma. Regarding the molecular part, according to the Genbank the sequences showed a 98.9% similarity with *Lophodermium indianum* Singh & Minter. *L. indianum* gives a new record in Mexico, since it was only reported for Oaxaca in *Pinus hartwegii* Lindl. and Nuevo León in *Pinus greggii* Engelm. Ex Parl.; in the study area it was found in *Pinus oaxacana*.

Conclusion: *L. indianum* is the species that attacks *Pinus oaxacana* in Zautla, Puebla.

Key words: Molecular characterization, swiss blight, taxonomic determination.

4.2 Resumen

Introducción: La declinación forestal es un problema importante en la actualidad, ya que ha sido observado en veintitrés municipios de la Sierra Norte y Nororiental de Puebla.

Objetivo: Identificar a nivel de especie el patógeno *Lophodermium*, en *Pinus Oaxacana* Mirov., en el municipio de Zautla, Puebla, mediante caracterización morfológica y molecular.

Materiales y métodos: En la caracterización morfológica se realizaron mediciones de 50 histerotecios, 100 ascas y ascosporas y el número de células epidérmicas en la base del estroma basal. Para la caracterización molecular se extrajo DNA del micelio del hongo por el método CTAB, la amplificación de la región se hizo a través de ITS, la secuenciación se editó y ensambló mediante el software BioEdit 7.0.5. y se comparó en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), a través de la herramienta BLAST.

Resultados y discusión: En la parte morfológica los histerotecios midieron de 600-1165 μm de largo, ascas de 80-135 x 9-18 μm , ascosporas de 70-100 x 2 μm y 2-5 células epidérmicas en la base del estroma basal, en la parte molecular de acuerdo con el Genbank las secuencias mostraron un 98.9 % de similitud con *Lophodermium indianum* Singh & Minter. *L. indianum* da un nuevo registro en México, ya que solo estaba reportado para Oaxaca en *Pinus hartwegii* Lindl. y Nuevo León en *Pinus greggii* Engelm. Ex Parl., y en el área de estudio se encontró en *Pinus oaxacana*.

Conclusión: *L. indianum* es la especie que ataca a *Pinus oaxacana* en Zautla, Puebla.

Palabras clave: Caracterización molecular, determinación taxonómica, *Lophodermium* sp., Sierra Nororiental.

4.3 INTRODUCCIÓN

La declinación forestal es un problema importante en la actualidad, ya que, de acuerdo con Carnier (1986), es un reflejo que evidencia la acumulación de varias enfermedades causadas por factores abióticos y bióticos, que propician el deterioro gradual del organismo.

En la actualidad, este fenómeno, la declinación forestal, ha sido observado en veintitrés municipios de la Sierra Norte y Nororiental de Puebla, y de acuerdo con la literatura generada en torno a este tema apunta que es ocasionada en mayor efecto por dos agentes causales: el insecto chupador de savia *Ocoaxo* y el hongo patógeno *Lophodermium* (Cibrián, 2016).

Pérez, Romero, González, Pérez y Arriola (2016) mencionan que la incidencia de estos agentes fue considerable en el año 2016, ya que, perjudicó alrededor de 3000 ha en los estados de Puebla, Hidalgo y Tlaxcala. A partir de esto, diversos organismos como la Unión Agroforestal de Puebla A.C., en vinculación con las autoridades que representan el gobierno federal, Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) y Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), llevaron a cabo el Plan de contingencia fitosanitaria para combatir a los principales actores que deterioran a las coníferas de Puebla, sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados se ha reportado muy poca efectividad en las actividades emprendidas y en la actualidad no se tienen resultados satisfactorios. Mueller (1987) señala que algunas especies de *Lophodermium* están relacionadas con eventos de declinación forestal, sin embargo, se ha considerado que estos factores actúan solo sobre árboles predispuestos a su ataque por otros factores.

González (2004) menciona que *Lophodermium* se caracteriza por estar durante todo el ciclo de vida en el género *Pinus* y se presenta en árboles poco desarrollados y débiles, en condiciones ambientales desfavorables puede causar defoliación.

Cibrián (2016) hace referencia que la presencia de estos agentes propicia el deterioro gradual del individuo y la pérdida del vigor del arbolado, lo cual se manifiesta a través de un amplio rango de síntomas lo que incluye: necrosamiento y decoloración del follaje, reducción del crecimiento, disminución del follaje e incluso puede ocasionar la muerte de los árboles.

En este sentido, el presente trabajo se enfoca en la determinación taxonómica del hongo patógeno *Lophodermium* sp., ya que resulta ser un agente causal de diversos problemas que presentan los árboles en su crecimiento, lo cual puede, incluso, ser un factor de muerte de los mismos; debido a esto, el propósito central de esta contribución se orienta a lograr su identificación a nivel de especie, por medio de caracterización morfológica y molecular, a fin de que, posteriormente, se puedan establecer métodos que posibiliten su control de forma efectiva.

4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El área de estudio se localiza en la Sierra Nororiental de Puebla en el municipio de Zautla, situado en las coordenadas geográficas 19° 37' 00" y 19° 49' 00", de latitud Norte y 97° 33' 00" y 97° 47' 00" longitud oeste, con altitud entre los 1700 y 3000 m. La temperatura media oscila de los 12-18 °C, la precipitación media anual es de 600-1100 mm. Los principales climas son templado húmedo con abundantes lluvias en verano C(m), templado subhúmedo con lluvias de verano C(w₂) que es el clima predominante y templado húmedo con lluvias en verano C(m)(f), el 62% de la superficie corresponde a bosque (INEGI,2009).

Sitios de muestreo

Se hicieron recorridos en las áreas afectadas por el hongo patógeno *Lophodermium* sp. en los bosques de pino de Zautla. A partir de esto, se seleccionaron 3 sitios de muestreo, cada sitio de muestreo constó de una superficie de 1000 m².

Colecta

Se obtuvieron muestras de los tres sitios de muestreo de las acículas de *Pinus oaxacana* Mirov. infectadas por *Lophodermium* sp., que es la especie más susceptible y dañada en el área de estudio. Las colectas fueron en diferentes estaciones del año, considerando la estacionalidad y aspectos fenológicos. Las muestras se colectaron en bolsas de papel kraft para evitar que se contaminaran, en cada bolsa se colocó la etiqueta con los datos de campo los cuales fueron: número de sitio, número de árbol, altura, coordenadas geográficas y altitud. Posteriormente se colocaron en refrigeración las muestras, con el fin de conservarlas y reducir al mínimo los riesgos de alteraciones.

Caracterización morfológica

Se seleccionaron las acículas infectadas en el laboratorio de Parasitología Forestal de la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma

Chapingo. De las acículas seleccionadas se realizaron cortes transversales de las estructuras reproductivas (histerotecio) y se prepararon en un portaobjeto con azul de lactofenol; después, de hacer las preparaciones se observaron diferentes características como el color y forma de los histerotecios, color de los labios, número de células epidérmicas en la base del estroma basal, y se realizaron mediciones en 50 histerotecios, 100 ascas y ascosporas.

La medición de los histerotecios, ascas y ascosporas se realizaron en un microscopio a través del software LAS Core V4.6. Las muestras se depositaron en el laboratorio de Parasitología Forestal de la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma Chapingo.

Determinación taxonómica

Para hacer la determinación taxonómica de *Lophodermium* a través de las características morfológicas generadas, se utilizaron las claves de *Lophodermium on Pines* (Minter, 1981).

Caracterización molecular

De los resultados obtenidos de la caracterización morfológica, para poder tener una descripción más completa y verídica se realizó la caracterización molecular y consistió en el aislamiento del patógeno, extracción de DNA, amplificación de secuencias y ensamble de secuencias.

Aislamiento del patógeno

Para el aislamiento se seleccionaron acículas con ascocarpos (histerotecios), se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial al 2% durante un minuto y medio, se lavaron en agua destilada tres veces por 2 minutos en cada lavado, se secaron con papel filtro estéril. Se tomaron los cuerpos reproductivos desinfectados, y a través de una micropipeta se aplicó agua estéril al histerotecio, esto fue con el propósito de proporcionar humedad y que en la hendidura longitudinal se abrieran los labios y se extrajera una masa gelatinosa, la cual, contenía a las ascas y ascosporas; la masa se extrajo con una aguja de disección estéril y se depositó en cajas de Petri con medio de cultivo selectivo extracto

malta-agar al 2%. Las cajas de Petri se incubaron a 25 ± 2 °C por 20 días a 23 ± 2 °C en una incubadora de luz controlada (Prendo, INLC-11, México), para la esporulación del hongo y desarrollo de colonias. Posteriormente, cada aislamiento se purificó en EMA al 2%.

Extracción de DNA

El DNA genómico se extrajo a partir de micelio por el método de CTAB (Martínez, Ramírez, Jiménez, Gallegos y Luna, 2017). El DNA se cuantificó en un Nanodrop (Thermo, USA). De cada una de las muestras se prepararon diluciones a 20 ng para la amplificación de los genes.

Amplificación de secuencias

Para la amplificación de la región ITS se utilizaron los cebadores ITS4 e ITS5 (White, Bruns, Lee y Taylor, 1990). La mezcla de reacción para PCR se preparó en un volumen final de 15 μ L conteniendo: buffer de la enzima 1 x *Taq* DNA polimerasa, 0.8 mM deoxinucleósido trifosfatos (0.2 mM cada uno), 100 ng DNA, 20 pmol de cada iniciador y 2 unidades de *GoTaq* DNA (Promega, USA). Las amplificaciones se realizaron con un ciclo inicial de desnaturalización a 96°C por 2 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación con los iniciadores a 57, durante 1 min, seguido de una extensión final de 5 min a 72°C. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Peltier Thermal Cycler PTC-200 (BIORAD, México), las amplificaciones se verificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% preparado con 1x TAE buffer (Tris Acetate-EDTA) y corrido a 95 V cm^{-3} durante 1 h. El gel se tiñó con Gel red (Biotium, USA) y las bandas se visualizaron en un transiluminador (Infinity 3000 Vilber Lourmat, Germany). Los productos amplificados se purificaron con el kit ExoSAP (Affymetrix, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante, se prepararon para la reacción de secuenciación usando el Bigdye terminator v. 3.1 (Applied Biosystem). Estos productos se secuenciaron en el Applied Biosystems modelo 3130XL (Applied BioSystems, USA), en el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Ensamble de secuencias

Las secuencias de ambas hebras para cada muestra se analizaron, editaron y ensamblaron usando BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999) para crear una secuencia consenso. La secuencia consenso se comparó con las depositadas en GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), por medio del programa BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool) 2.2.19 (Zhang, Schwartz, Wagner y Miller, 2000).

4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el mes de octubre y noviembre se realizaron diferentes colectas en los tres sitios de muestreo (Cuadro 6) de las acículas infectadas por *Lophodermium* en *Pinus oaxacana*, ya que, de acuerdo con Pérez, et al. (2016) en el periodo de septiembre-diciembre *Lophodermium* se encuentra en la etapa de crecimiento y es la época idónea para su colecta.

Cuadro 6. Coordenadas de los sitios de colecta en Zautla, Puebla.

Municipio	Sitio	Hospedante	Altitud	Coordenadas	
				Latitud N	Longitud O
Zautla	1	<i>Pinus oaxacana</i>	2347	19°39'13"	-97°38'5.4"
	2	<i>P. oaxacana</i>	2551	19°38'47.4"	-97°38'29.8"
	3	<i>P. oaxacana</i>	2624	19°38'24"	-97°38'40.1"

Determinación taxonómica

Mediante la caracterización morfológica y molecular se determinó que la especie *Lophodermium indianum* Singh & Minter se encuentra en el municipio de Zautla, Puebla.

Caracterización morfológica

Los ascocarpos (histerotecios) se encontraron en acículas vivas que presentaron un muñón verde y bajo el tejido epidermal de las acículas muertas, estuvieron presentes en todos los lados de la acícula, pero principalmente en el lado adaxial,

tienen forma de elipsoide, miden de 600-1165 x 104-355 μm y son de color negro. En ambiente húmedo se abrieron mediante una hendidura longitudinal, labios de color negro o gris, alrededor de los labios se presentó una coloración gris o negra, línea perimetral de color negro con un contorno claramente marcado, elíptico o ligeramente puntiagudo en cada extremo, y elevado ligeramente en la superficie de la acícula. En un corte transversal se encontraron de dos hasta cinco células epidérmicas en la base del estroma basal, pero predominan tres. Ascas cilíndricas a alargadas, de 80-135 x 9-18 μm de tamaño. Ocho ascosporas presentes en las ascas, hialinas, filiformes y miden 70-100 x 2 μm , rodeadas por paráfisis con puntas ligeramente hinchadas y dobladas. Conidioma ausente. Líneas oscuras demarcatorias en las acículas ocasionalmente presentes.

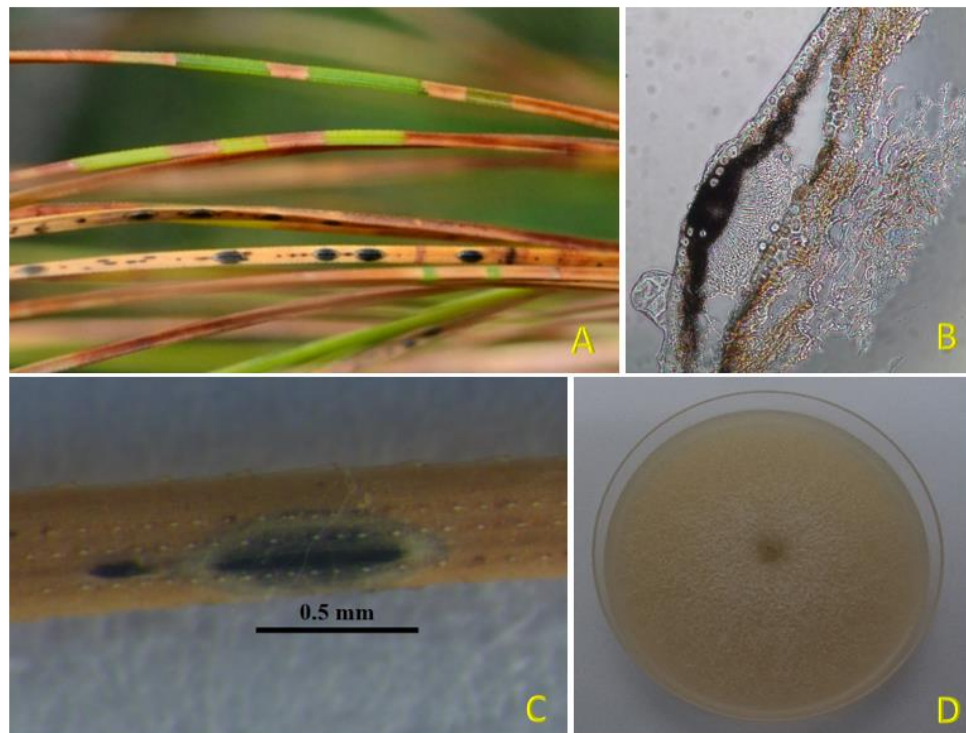


Figura 11. *Lophodermium indianum*. A) Acículas con histerotecios. B) Corte transversal de un histerotecio. C) Histerotecio. D) Colonia del hongo creciendo en MEA.

Características macroscópicas

De los tres sitios de muestreo seleccionados, se escogieron las acículas infectadas por *Lophodermium*, después se desinfectaron y se extrajo la masa de ascas y ascosporas de los cuerpos fructíferos, la masa fue colocada en cajas de Petri con extracto de malta-agar. El crecimiento de la colonia fue lento en los tres sitios de muestreo, se desarrolló a los 11-12 días en las cajas de Petri (fig.12), las colonias en el sitio 1 y 3 presentaron un micelio tabicado, forma circular, una elevación plana y extendida, pigmentación del micelio blanca, textura pulverulenta y crecimiento limitado, en el sitio 2 la colonia presento un micelio tabicado, forma circular-irregular, una elevación plana y extendida, pigmentación del micelio verde olivo-café, textura pulverulenta y crecimiento limitado. De acuerdo con las características observadas hay variedad en cuanto a la pigmentación de la colonia, Minter (1981) menciona que para algunas especies de *Lophodermium* hay variedad en el desarrollo de la colonia, sin embargo, para *L. indianum* no se tiene información.

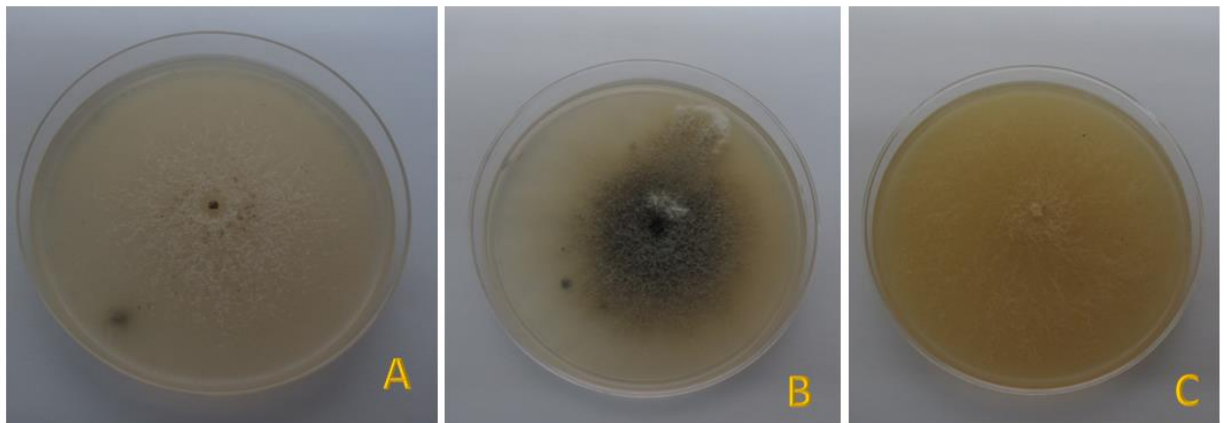


Figura 12. Crecimiento de la colonia en EMA de *Lophodermium indianum*. A) Sitio 1. B) Sitio 2. C) Sitio 3.

Ecología

Lophodermium indianum en Zautla, Puebla se encontró en acículas secundarias y de acuerdo con Minter (1981) es considerado como endófito-saprofita y común en acículas muertas de pino.

Hospedantes

En la zona de estudio se encontró en *Pinus oaxacana*, Minter (1981) reportó que se encuentra en especies del subgénero *Pinus* (*Pinus caribaea* Morelet, *P. glabra* Walter, *P. patula* Schiede Ex Schltdl. & Cham, *P. roxburghii* Sarg., *P. serótina* Michx., *P. taeda* L., *P. thunbergii* Parl).

Análisis de secuencia

Para la amplificación de la región ITS se utilizaron los iniciadores ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') e ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'), se obtuvieron cuatro secuencias de los productos de la PCR del hongo de las acículas en *P. oaxacana*, en Zautla, Puebla (Cuadro 7).

Cuadro 7. Secuencias de los ADNs amplificados con ITS.

<p>> Zautla 1 677 pb</p> <p>GTAGGTAGAGTTTTGCCTACTACAGCGGCCCCCTACCCGGGGCTGCTAGTCTCCCTGCGAGGGCGACACGCTCAA TGTGCGGAGAGCCCTCCCCGAGGCAATCCGCAGTGGCCTGCGCGGCCATTAGAGACTCAATGAGCGTGGGTT CAGCGCGGCTGAGCTTGAGATAGAGCCCGTCCCTGCCGGCAACGGCGGGGGGAAACGGAACCTGCGGAAGGA TCATTACAGAAGAAAGCACGCCTTCGGGCTCATCTTCTCACCCCTTTGTTTACCACACTTAGTTGCCTTGGCGCAC GCGCCAGTGGATCGAAACTCGTGAATCATTGCCGTCTGAGTACTATAACAATAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTC TTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA TCTTTGAACGCACATTGCGCCTCCCGGTATTCCGGGAGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTACAACCCTCAAGCTCT GCTTGGTGTGAGCCCGCCCCGCTTACCCGGGGCTCGCTTCAAATCAGTGGCGGCCGCCGCTCCGACCTTCAGC GCAGTAATGCTCGTCTGCTGGTAGGGAAGGGCGGCAAGGGCCGTCATCCAACCCCCACACACAAGGTTGACCT CGAATCA</p>
<p>> Zautla 2 634 pb</p> <p>CCCCCTACCCGGGGCTGCTAGTCTCCCTGCGAGGGCGACACGCTCAATGTGCGGAGAGCCCTCCCCGAGGCAA TCCGCAGTGGCCTGCGCGGCCATTAGAGACTCAATGAGCGTGGGTTAGCGCGGCTGAGCTTGAGATAGAGCC CGTCCCTGCCGGCAACGGCGGGGGGAAACGGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAAGAAAGCACGCCTTCGG GCTCATCTTCTCACCCCTTTGTTTACCACACTTAGTTGCCTTGGCGCACCCGCGCCAGTGGATCGAAACTCGTGAATC ATTGCCGTCTGAGTACTATAACAATAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTCCCGG TATTCCGGGAGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGAGCCCGCCCCGCTTA CCCGGGGCTCGCTTCAAATCAGTGGCGGCCGCCGCTCCGACCTTCAGCGCAGTAATGCTCGTCTGCTGGTAGGGA AGGGCAGCAAGGGCCGTCATTCAACCCCCACACACAAG</p>
<p>> Zautla 3 648 pb</p> <p>TACTACAGCGGCCCCCTACCCGGGGCTGCTAGTCTCCCTGCGAGGGCGACACGCTCAATGTGCGGAGAGCCCTC CCCCGAGGCAATCCGCAGTGGCCTGCCGGCCATTAGAGACTCAATGAGCGTGGGTTAGCGCGGCTGAGCTT GAGATAGAGCCCGTCCCTGCCGGCAACGGCTGGGGGAAACGGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAAGAAAGC ACGCCTTCGGGCTCCTCTTCTCACCCCTTTGTTTACCACACTTAGTTGCCTTGGCGCACCCGCGCCAGTGGATCGAAA CTCGTGAATCATTGCTGTCTGAGTACTATAACAATAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGAT GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTG</p>

```
CGCCTCCCGGTATTCCGGGAGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGAGCCC  
GCCCCGCTTACCCGGGGCTCGCTTCAAATCAGTGGCGGCCGCGTCCGACCTTCAGCGCAGTAATGCTCGTCG  
CTGGTAGGGAAGGGCAGCAAGGGCCGTCATCCAACCCACACACAAGG
```

> Zautla 4 661 pb

```
CTACTACAGCAGCCCCCTACCCGGGGCTGCTAGTCTCCCTGCGAGGCGACACGCTCAATGTGCGGAGAGCCCT  
CCCCGAGGCAATCCGCAGTGGCCTGCCGGCCATTAGAGACTCAATGAGCGTGGGTTACGCGGGCTGAGCT  
TGAGATAGAGCCCGTCCCTGCCGGCAACGGCTGGGGGGAAACGGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAAGAAAG  
CACGCCCTCGGGCTCCTTCTCACCTTTGTTTACCACACTTAGTTGCCCTTGGCGCACCGCGCCAGTGGATCAAA  
ACTCGTGAATCATTGCCGTCTGAGTACTATAACAATAGTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGA  
TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTG  
CGCCCCCGGTATTCCGGGAGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGAGCCC  
GCCCCGCTTACCCGGGGCTCGCTTCAAATCAGTGGCGGCCGCGTCCGACCTTCAGCGCAGTAATGCTCGTCG  
CTGGTAGGGAAGGGCAGCAAGGGCCGTCATCCAACCCACACACAAGGTTGACCTCGAATCA
```

ACGT= Adenina, Citosina, Guanina, Timina

Los resultados del alineamiento y comparación de las cuatro secuencias obtenidas de cultivos puros se compararon con las depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), por medio del programa BLAST y las secuencias mostraron un 98.9 % de similitud con *Lophodermium indianum* en la adhesión MG877504.1.

Lophodermium indianum es morfológicamente similar a *L. pinastri*. Sin embargo, son varios aspectos que los diferencian, Minter (1981) menciona que son muy similares en apariencia externa debido a las líneas de la zona perimetral, pero se distingue por estar en la parte subhipodérmica y por carecer de una etapa conidial; además, las ascas de *L. indianum* tienen una menor longitud y las parafises en las puntas están ligeramente hinchadas y dobladas, en comparación *L. pinastri* presenta ascas de mayor longitud y las parafises en las puntas son rectas y no están hinchadas; asimismo, *L. indianum* está presente en acículas secundarias y ataca más a pinos duros (Subgénero *Pinus*) y *L. pinastri* está en acículas primarias y secundarias, y ataca a pinos duros y blandos (Subgénero *Pinus* y *Strobus*).

En relación con los datos obtenidos de la caracterización morfológica y la claves de Minter (1981), *L. indianum* tiene similitud con la especie que está en el área de estudio, sin embargo, de acuerdo con lo reportado por Minter (1981) difiere en el tamaño de las ascas en Zautla, Puebla miden 80-135 µm x 9-18 µm, y en la

literatura reportan que mide de 80-130 x 9-12 μm , por lo que habría que analizar, ya que puede ser una adaptación de la especie en el sitio o probablemente se trate de una nueva especie.

Con los resultados obtenidos, se da un nuevo registro de distribución a *L. indianum* en México, ya que de acuerdo con Minter (1981) esta reportado solo para la India, y Ortiz et al. (2003) lo reporto en México, para el estado de Nuevo León y Oaxaca; y en este caso el área de estudio se ubica en el estado de Puebla, por lo cual, da un nuevo lugar de distribución. Esto puede ser a que anteriormente, todas las especies en México se identificaron como *L. pinastri*, pero en la actualidad se reconoce que existen diferentes especies, la mayoría sin identificar (Cibrián, Alvarado y García, 2007).

De acuerdo con las especies hospedantes que se tienen registradas para *L. indianum*, se da un nuevo registro en *Pinus oaxacana*, ya que de acuerdo con Minter (1981) en los hospedantes que reporto no está registrado; y Ortiz et al. (2003) lo reporto en México, para *Pinus greggii* Engelm. ex Parl. y *Pinus hartwegii* Lindl., por lo que *P. oaxacana* es una nueva especie hospedante, y conforme a los registros de Minter (1981) y Ortiz et al. (2003) *L. indianum* es hospedero en pinos duros (Subgénero *Pinus*).

En relación con la información que se generó (Cuadro 8), en el Plan integral estatal de contingencia fitosanitaria para combate a los principales actores que deterioran a las coníferas de Puebla (Cibrián, 2016), se reportó que el insecto chupador de savia Ocoaxo, en el municipio de Zautla, era el que más daño ocasionaba a los árboles (94.667%) y en menor porcentaje era *Lophodermium* (5.333%). La incidencia de *Lophodermium* puede ser debido a que al estar debilitado el árbol este se presenta más rápido. González (2004) menciona que el género *Lophodermium* se presenta en árboles poco desarrollados y débiles; Deckert, Melville y Peterson (2001) señalan que las especies de *Lophodermium* residen como endófitos, dentro del tejido huésped asintomático, por lo que el comportamiento de *L. indianum* y de acuerdo con Minter (1981) es endófito-saprofito y oportunista.

Cuadro 8. Porcentaje de acículas dañadas por tipos de agente causal (tomado de Cabrián, 2016).

Municipio	Daño por Ocoaxo	Daños por Ocoaxo e histerotecios	Daños por histerotecios
Zacatlán de las manzanas	64.992	35.008	1.818
Tetela de Ocampo	75.101	24.899	0.000
Xochiapulco	77.546	22.454	0.000
Aquixtla	79.930	20.070	0.000
Zautla	94.667	5.333	0.000

4.6 CONCLUSIONES

A partir de la caracterización morfológica y molecular se determinó que la especie que está atacando a los bosques de pino de Zautla, Puebla se asemeja con *Lophodermium indianum* Singh & Minter, ya que de acuerdo con el Genbank hubo una similitud del 98.9%, y morfológicamente difiere en el tamaño de las ascas de acuerdo a lo que se ha reportado, por lo que se debe secuenciar otros dos genes más, para corroborar que *L. indianum* es la especie reportada, o de ser una especie diferente revisar si está registrada.

4.7 AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Investigación y Posgrado (DGIP) de la Universidad Autónoma Chapingo por el apoyo brindado para la realización de la presente investigación a través del proyecto 18235-C-91.

Al Dr. Omar Alejandro Pérez Vera y al Dr. David Cibrián Tovar por su colaboración para la realización de este trabajo.

A los compañeros Uriel Marcos Rivera y Jorge Nuñez Peñaloza, por el apoyo en la toma de datos en campo

4.8 LITERATURA CITADA

- Carnier, L. (1986). Decline in Quebec's forests; Assessment of the situation. Service de la Recherche Applique. Ministere del Energie et des Ressources, Quebec.
- Cibrián, T. D. (2016). Plan integral estatal de contingencia fitosanitaria para combate a los principales actores que deterioran a las coníferas de Puebla. Universidad Autónoma Chapingo. 153 p.
- Cibrián, T. D., Alvarado, D., y García, D. S. (2007). Enfermedades forestales en México. Forest diseases in México. Universidad Autónoma Chapingo: CONAFOR-SEMARNAT, México; Forestry Service USDA, EUA; NRCAN Forest Service, Canadá y Comisión Forestal de América del Norte, COFAN, FAO. Chapingo, Edo. de Méx., México. 587 p.
- Deckert, J.R., Melville, H.L. & Peterson R.L. 2001. Structural features of a Lophodermium endophyte during the cryptic life-cycle pase in the foliage of Pinus strobus. *Mycological Research*. 105:991-997. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(08\)61957-7](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(08)61957-7)
- González, 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.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41:95-98.
- INEGI. (2009). Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos Zautla, Puebla. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Aguascalientes, México. Retrieved from www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/21/21212.pdf

- Martínez, C. R., Ramírez, M.R., Jiménez, R.J., Gallegos, V.C. & Luna V.I. (2017). Improved method for genomic DNA extraction for *Opuntia* Mill. (Cactaceae). *Plant Methods*, 13 (1), 82.
- Minter, D. W. (1981). *Lophodermium* on pines. Vol. 147. Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute. 70 p.
- Mueller, D. D. (1987). Natural Dieback in Forest. *Bioscience*, 37 (8): 575-583. doi:10.2307/1310668.
- Ortiz, G.S., Gernandt, S.D., Stone, K.J., Johnston, R.P., Chapela H.I., Salas, L.R., Álvarez, B. E. 2003. Phylogenetics of *Lophodermium* from pine. *Mycologia*, 95 (5), 846-849. doi: 10.2307/3762013.
- Pérez, M. R., Romero, S. E., González, H. A., Pérez, S. E. y Arriola, P. V. (2016). Distribución potencial de *Lophodermium* spp. en bosques de coníferas, con escenarios de cambio climático. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. 7 (36): 81-97.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S. & Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T. (Eds.) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp. 135–322.
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L. y Miller W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7:203-214.

5. CONCLUSIONES GENERALES

De acuerdo con los resultados generados se determinó que la especie que está atacando a los bosques de pino de Zautla, Puebla se asemeja con *Lophodermium indianum* ya que de acuerdo con el Genbank hubo una similitud del 98.9%, y morfológicamente difiere en el tamaño de las ascas en Zautla, Puebla miden 80-135 µm x 9-18 µm, y en la literatura reportan que mide de 80-130 x 9-12 µm, por

lo que habría que analizar, ya que puede ser una adaptación de la especie en el sitio o probablemente se trate de una nueva especie.

A partir de la caracterización morfológica, para *L. indianum* en México se reporta un nuevo lugar de distribución, ya que solo estaba reportado para el estado de Nuevo León y Oaxaca; además en especies hospedantes se da un nuevo registro en *Pinus oaxacana*, ya que estaba reportado para *Pinus greggii* y *Pinus hartwegii*.

La precipitación y la temperatura juegan un papel muy importante en la fluctuación de ascosporas de *Lophodermium*, ya que, al haber una precipitación constante y una temperatura adecuada, esto hace que las ascosporas se liberen y tienda a aumentar el número de ascosporas.

6. APÉNDICES

Apéndice 1. Medición de histerotecios

Histerotecios			
Línea perimetral			
No.	Largo (mm)	Ancho (mm)	Clípeo(mm)
1	0.851	0.218	0.695
2	0.754	0.275	0.405
3	0.600	0.277	0.419
4	1.011	0.242	0.732
5	0.718	0.269	0.482
6	0.917	0.250	0.735
7	0.689	0.241	0.529
8	0.559	0.188	0.508
9	0.818	0.290	0.540
10	1.011	0.308	0.571
11	0.677	0.170	0.445
12	0.957	0.301	0.760
13	0.959	0.281	0.773
14	0.756	0.206	0.542
15	0.770	0.169	0.644
16	0.828	0.160	0.684
17	1.020	0.196	0.882
18	0.993	0.131	0.844
19	0.835	0.147	0.737
20	0.707	0.128	0.651
21	0.920	0.236	0.848

22	0.960	0.214	0.932
23	0.887	0.221	0.793
24	0.917	0.269	0.838
25	0.651	0.213	0.585
26	0.778	0.219	0.642
27	0.914	0.262	0.821
28	0.947	0.245	0.740
29	0.972	0.285	0.795
30	0.882	0.199	0.750
31	0.858	0.208	0.761
32	0.735	0.208	0.622
33	0.881	0.246	0.668
34	0.692	0.250	0.593
35	1.077	0.339	0.803
36	1.115	0.260	0.975
37	0.981	0.336	0.683
38	0.946	0.322	0.813
39	0.966	0.321	0.732
40	0.792	0.256	0.559
41	0.778	0.339	0.545
42	0.934	0.342	0.750
43	1.165	0.355	1.055
44	0.657	0.268	0.535
45	0.935	0.250	0.768
46	0.866	0.152	0.782
47	0.682	0.104	0.608
48	0.828	0.259	0.593
49	0.887	0.315	0.646
50	0.875	0.277	0.714

Apéndice 2. Medición de ascas y ascosporas

No.	ASCAS		ASCOSPORAS	
	Largo(μm)	Ancho(μm)	Largo(μm)	Ancho(μm)
1	132.647	17.637	97.496	1.804
2	110.764	14.803	89.955	2.311
3	125.499	17.733	99.71	2.311
4	82.187	12.805	95.889	2.18
5	93.902	14.566	91.665	2.297
6	102.644	14.559	77.952	2.282
7	97.893	15.555	77.396	2.104
8	86.732	15.83	76.353	2.18
9	123.726	17.105	77.429	2.057
10	126.273	17.637	87.098	2.057
11	115.013	17.217	82.549	2.057
12	102.744	14.116	99.46	2.102
13	100.206	13.012	93.594	2.041

14	106.843	13.763	98.414	2.057
15	112.87	14.265	81.756	2.041
16	84.377	14.548	82.041	1.858
17	101.482	15.23	95.203	2.041
18	125.56	13.611	96.405	2.057
19	118.998	14.458	76.122	2.104
20	128.485	13.012	90.799	2.311
21	95.626	9.362	96.493	2.057
22	88.079	13.837	93.729	2.057
23	99.45	14.677	87.92	2.195
24	107.066	17.308	94.759	2.057
25	103.799	13.233	86.179	1.943
26	96.425	13.884	98.627	1.943
27	97.996	14.821	81.527	1.803
28	94.97	12.755	80.708	1.986
29	109.185	14.964	83.451	2.129
30	97.826	14.526	98.433	2.129
31	107.989	16.423	94.837	2.19
32	94.446	15.425	73.785	1.973
33	82.537	12.054	81.49	1.862
34	102.578	14.217	75.9	2.078
35	81.818	13.895	69.812	2.078
36	85.998	13.037	83.002	2.091
37	87.146	16.652	83.416	1.996
38	80.474	17.099	89.844	1.996
39	83.59	15.895	97.55	1.913
40	98.563	15.226	75.869	1.996
41	102.74	16.912	100.601	2.076
42	84.089	17.737	99.957	2.076
43	91.306	16.127	75.865	1.996
44	94.207	16.179	79.38	2.017
45	98.697	16.981	89.923	2.172
46	79.441	14.442	76.746	2.076
47	96.412	15.974	93.318	2.076
48	91.772	17.096	89.894	2.076
49	87.899	15.69	73.167	1.943
50	81.589	17.371	95.066	1.943
51	101.426	15.074	77.113	1.804
52	101.344	15.116	77.148	2.057
53	94.359	14.693	70.462	2.282
54	79.552	14.523	74.702	2.18

55	88.015	16.843	81.141	1.858
56	93.008	15.6	95.932	2.104
57	87.362	15.189	83.732	1.943
58	92.005	14.723	97.725	2.057
59	83.623	14.66	81.844	2.036
60	89.276	14.734	85.038	2.098
61	84.808	14.723	77.894	2.098
62	81.379	15.446	71.506	1.987
63	97.615	16.663	69.779	2.017
64	80.972	13.525	71.11	2.017
65	80.29	15.982	72.523	2.172
66	85.713	12.913	71.245	1.996
67	125.008	14.865	86.013	2.3
68	106.232	16.687	90.445	2.119
69	121.851	15.484	87.495	1.891
70	107.444	12.427	73.339	2.047
71	85.167	11.178	71.384	2.078
72	81.995	9.227	74.068	1.916
73	103.99	13.207	79.529	2.057
74	81.427	12.546	78.347	1.982
75	123.198	13.003	72.907	2.057
76	134.959	13.733	73.391	2.078
77	80.143	10.676	71.042	1.937
78	121.497	11.975	71.805	2.06
79	106.363	10.976	70.737	2.246
80	103.581	11.554	77.095	2.269
81	89.622	15.867	78.433	2.078
82	94.356	15.641	90.966	2.124
83	80.156	13.534	87.957	2.014
84	93.594	12.992	87.478	1.996
85	99.215	14.265	82.588	2.049
86	101.047	16.85	71.834	2.126
87	116.006	13.718	95.856	2.065
88	118.918	16.962	93.575	2.19
89	88.561	12.402	85.166	2.274
90	87.885	12.937	98.262	2.195
91	89.476	17.806	76.841	1.943
92	89.602	13.702	71.586	1.993
93	91.337	15.183	84.085	2.057
94	106.632	16.868	87.695	2.195
95	89.442	15.715	89.684	2.165

96	97.378	15.991	71.1	1.712
97	110.28	18.775	71.733	2.091
98	94.6	16.649	80.468	2.19
99	75.657	14.03	82.403	1.973
100	85.918	13.718	77.626	2.19

Apéndice 3. Código de muestreo sistemático en el software R

Estimar la media poblacional del muestreo sistemático

N<-60

n<-15

k<-4

Sal1<-c (0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0)

Sal2<-c (0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0)

Sal3<-c (0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1)

Sal4<-c (0,5,1,0,2,0,0,0,0,0,0,0,0,2,1)

Sal5<-c (1,103,8,0,25,6,17,0,0,7,0,2,4,9,4)

Sal6<-c (25,21,28,11,19,17,13,66,36,49,56,174,39,118,11)

Sal7<-c (31,29,14,20,49,99,3,23,31,49,73,109,17,80,159)

Sal8<-c (27,35,21,37,54,39,41,34,33,40,38,13,37,17,61)

Sal9<-c (13,12,7,15,12,10,12,7,12,15,16,16,13,11,9)

Sal10<-c (7,6,5,10,5,8,8,8,11,5,13,9,8,6,14)

Sal11<-c (2,2,5,5,7,2,8,8,10,11,9,7,11,6,3)

Sal12<-c (2,2,3,1,0,1,0,1,1,0,0,2,2,1,2)

Convertido en Matrices

A<-matrix (c (0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0),ncol=5,nrow=3, byrow=TRUE)

B<-matrix (c (0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0),ncol=5,nrow=3, byrow=TRUE)

```

C<-matrix (c (0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1),ncol=5,nrow=3, byrow=TRUE)
D<-matrix (c (0,5,1,0,2,0,0,0,0,0,0,0,0,2,1),ncol=5,nrow=3, byrow=TRUE)
E<-matrix (c (1,103,8,0,25,6,17,0,0,7,0,2,4,9,4),ncol=5,nrow=3, byrow=TRUE)
G<-matrix (c (25,21,28,11,19,17,13,66,36,49,56,174,39,118,11),ncol=5,nrow=3,
byrow=TRUE)
H<-matrix (c (31,29,14,20,49,99,3,23,31,49,73,109,17,80,159),ncol=5,nrow=3,
byrow=TRUE)
I<-matrix (c (27,35,21,37,54,39,41,34,33,40,38,13,37,17,61),ncol=5,nrow=3,
byrow=TRUE)
J<-matrix (c (13,12,7,15,12,10,12,7,12,15,16,16,13,11,9),ncol=5,nrow=3, byrow=
TRUE)
K<-matrix (c (7,6,5,10,5,8,8,8,11,5,13,9,8,6,14),ncol=5,nrow=3, byrow=TRUE)
L<-matrix (c (2,2,5,5,7,2,8,8,10,11,9,7,11,6,3),ncol=5,nrow=3, byrow=TRUE)
M<-matrix (c (2,2,3,1,0,1,0,1,1,0,0,2,2,1,2),ncol=5,nrow=3, byrow=TRUE)

```

```
# Media de la muestra sistemática
```

```

ybar1<-mean(apply(A,2,mean))
ybar2<-mean(apply(B,2,mean))
ybar3<-mean(apply(C,2,mean))
ybar4<-mean(apply(D,2,mean))
ybar5<-mean(apply(E,2,mean))
ybar6<-mean(apply(G,2,mean))
ybar7<-mean(apply(H,2,mean))
ybar8<-mean(apply(I,2,mean))
ybar9<-mean(apply(J,2,mean))
ybar10<-mean(apply(K,2,mean))
ybar11<-mean(apply(L,2,mean))
ybar12<-mean(apply(M,2,mean))

```

```
# Estimador del total
```

```
Tot1<-N*ybar1
```

```
Tot2<-N*ybar2
```

```
Tot3<-N*ybar3
```

```
Tot4<-N*ybar4
```

```
Tot5<-N*ybar5
```

```
Tot6<-N*ybar6
```

```
Tot7<-N*ybar7
```

```
Tot8<-N*ybar8
```

```
Tot9<-N*ybar9
```

```
Tot10<-N*ybar10
```

```
Tot11<-N*ybar11
```

```
Tot12<-N*ybar12
```

```
# Desviación estándar del total estimado
```

```
S_ybar1<-sqrt(sum((apply(A,1,mean)-ybar1)^2)/k)
```

```
S_ybar2<-sqrt(sum((apply(B,1,mean)-ybar2)^2)/k)
```

```
S_ybar3<-sqrt(sum((apply(C,1,mean)-ybar3)^2)/k)
```

```
S_ybar4<-sqrt(sum((apply(D,1,mean)-ybar4)^2)/k)
```

```
S_ybar5<-sqrt(sum((apply(E,1,mean)-ybar5)^2)/k)
```

```
S_ybar6<-sqrt(sum((apply(G,1,mean)-ybar6)^2)/k)
```

```
S_ybar7<-sqrt(sum((apply(H,1,mean)-ybar7)^2)/k)
```

```
S_ybar8<-sqrt(sum((apply(I,1,mean)-ybar8)^2)/k)
```

```
S_ybar9<-sqrt(sum((apply(J,1,mean)-ybar9)^2)/k)
```

```
S_ybar10<-sqrt(sum((apply(K,1,mean)-ybar10)^2)/k)
```

```
S_ybar11<-sqrt(sum((apply(L,1,mean)-ybar11)^2)/k)
```

```
S_ybar12<-sqrt(sum((apply(M,1,mean)-ybar12)^2)/k)
```

Intervalo de confianza al 95% del total

Li1<-Tot1-qnorm(0.975)*S_ybar1

Ls1<-Tot1+qnorm(0.975)*S_ybar1

Li2<-Tot2-qnorm(0.975)*S_ybar2

Ls2<-Tot2+qnorm(0.975)*S_ybar2

Li3<-Tot3-qnorm(0.975)*S_ybar3

Ls3<-Tot3+qnorm(0.975)*S_ybar3

Li4<-Tot4-qnorm(0.975)*S_ybar4

Ls4<-Tot4+qnorm(0.975)*S_ybar4

Li5<-Tot5-qnorm(0.975)*S_ybar5

Ls5<-Tot5+qnorm(0.975)*S_ybar5

Li6<-Tot6-qnorm(0.975)*S_ybar6

Ls6<-Tot6+qnorm(0.975)*S_ybar6

Li7<-Tot7-qnorm(0.975)*S_ybar7

Ls7<-Tot7+qnorm(0.975)*S_ybar7

Li8<-Tot8-qnorm(0.975)*S_ybar8

Ls8<-Tot8+qnorm(0.975)*S_ybar8

Li9<-Tot9-qnorm(0.975)*S_ybar9

Ls9<-Tot9+qnorm(0.975)*S_ybar9

Li10<-Tot10-qnorm(0.975)*S_ybar10

Ls10<-Tot10+qnorm(0.975)*S_ybar10

Li11<-Tot11-qnorm(0.975)*S_ybar11

Ls11<-Tot11+qnorm(0.975)*S_ybar11

Li12<-Tot12-qnorm(0.975)*S_ybar12

Ls12<-Tot12+qnorm(0.975)*S_ybar12