

UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA AGRICOLA
MAESTRIA EN CIENCIAS EN PROTECCION VEGETAL**

**IDENTIFICACION DEL AGENTE CAUSAL DE
LA PUDRICION BLANCA DEL MANZANO POR MEDIO
DE LA DETECCION DE FENOL-OXIDASAS**

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
PROTECCION VEGETAL**

P R E S E N T A :

ERNESTO HERNANDEZ MENDIETA

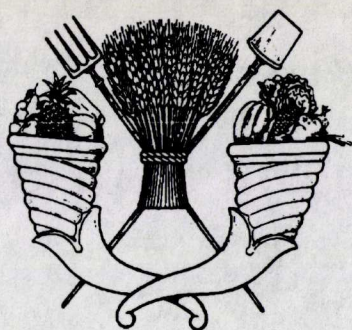
CHAPINGO, MEXICO. NOVIEMBRE DE 1996



**DIRECCION ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES**



**DX 85953
- 15215**



*Esta tesis fue realizada bajo la dirección del
Comité Asesor indicado, ha sido aprobada
por el mismo y aceptada como requisito
parcial para obtener el grado de:*

MAESTRO EN CIENCIAS
EN
PROTECCION VEGETAL

PRESIDENTE

M.C. Cecilio Mendoza Zamora

ASESOR

DR. Hector F. Alvizo Villasana

ASESOR

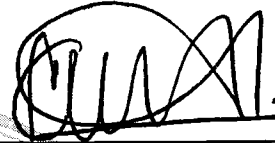
DR. Sebastián Romero Cova

Chapingo, México. Noviembre de 1996

30658

EL JURADO DEL EXAMEN DE GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS EN PROTECCION VEGETAL
ESTUVO CONSTITUIDO POR:

PRESIDENTE



M.C. Cecilio Mendoza Zamora

ASESOR



DR. Hector F. Alvizo Villasana

ASESOR



DR. Sebastián Romero Cova

REPRESENTANTE DE LA
COORDINACION DE POSTGRADO
EN PROTECCION VEGETAL



M.C. Andrés Bolaños Espinoza

REPRESENTANTE DE LA
COORDINACION GENERAL
DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
DE LA UNIV. AUT. CHAPINGO



M.C. Antonio Segura Miranda

Cada uno de los cuales revisó y aprobó la tesis presentada.

Chapingo, México. Noviembre de 1996

Agradecimientos. . .

Al MC. Cecilio Mendoza Zamora por su valioso tiempo invertido en la dirección del presente trabajo, así como al Dr. Sebastián Romero Cova y al Dr. Hector F. Alotzo Villasana por la asesoría al mismo.

Al MC. Antonio Segura Miranda por las sugerencias y asesoría brindada.

Al MC. Andrés Bolaños Espinoza por sus comentarios en la revisión de ésta Tesis.

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Departamento de Parasitología Agrícola, por las facilidades para realizar mis Estudios de Postgrado

A mi madre

María de Jesús Mendieta González

CONTENIDO.

	PAG.
LISTA DE CUADROS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iii
SUMMARY	iv
 I. INTRODUCCION	 1
 II. REVISION DE LITERATURA	 6
2.1. Del cultivo del manzano	6
2.2. De <i>Polyporus versicolor</i> L. ex Fr.	7
2.2.1. Clasificación taxonómica	7
2.2.2. Sinonimia	8
2.2.3. Descripción	8
2.2.4. Hospedantes	9
2.2.5. Daños	10
2.3. El proceso de degradación de la madera	12
2.4. Diferenciación entre la pudrición blanca y pudrición café de la madera	16
2.5. Variación en la madera degradada por hongos de pudrición blanca	20
2.6. Aspectos enzimáticos en la degradación de la madera	23
2.7. Caracterización de <i>Polyporus versicolor</i> L.:Fr. a partir de la reacción de fenol-oxidasas	29
 III. MATERIALES Y METODOS	 34
3.1. Sitio de muestreo	34
3.2. Variedad	35
3.3. Colecta de muestras	35
3.4. Aislamientos	36
3.5. Identificación	38
3.5.1. Por basidiocarpos	38
3.5.2. Por micelio	39
3.5.3. Por su actividad enzimática	39
3.5.3.1. Prueba de fenol-oxidasas	39
3.5.3.1.1. Determinación enzimática en medio de cultivo	39
3.5.3.1.2. Determinación enzimática por medio de espectrofotometría	41

	PAG.
3.5.3.1.2.1. Sustratos y buffer requeridos	41
3.5.3.1.2.2. Extractos	41
3.5.3.1.2.3. Detección de la absorbancia en el espectrofotómetro	42
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	44
4.1. Aislamientos	44
4.2. Síntomas observados en campo	45
4.3. Identificación	47
4.3.1. Por basidiocarpos	47
4.3.2. Por micelio	47
4.3.3. Por su actividad enzimática	48
4.3.3.1. Prueba de fenol-oxidasas en medio de cultivo	48
4.3.3.2. Detección de la absorbancia en el espectrofotómetro	49
V. CONCLUSIONES	61
VI. LITERATURA CITADA	63

LISTA DE CUADROS

CUADRO		PAGINA
1	Diferenciación de la zona de difusión en ácido tánico para hongo que degradan lignina	30
2	Caracterización de grupos para diferenciar especies de hongos que causan pudrición blanca y café en madera	31
3	Resultados obtenidos en las 10 determinaciones de la absorbancia del espectro de luz visible a 465 nm de longitud de onda en Guaiacol.	52
4	Resultados obtenidos en las 10 determinaciones de la absorbancia del espectro de luz visible a 395 nm de longitud de onda en Catecol	53
5	Resultados obtenidos en las 10 determinaciones de la adsorbancia del espectro de luz visible a 525 nm de longitud de onda en 1-naftol	54

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
1	Desarrollo micelial in vitro de <i>Coriolus versicolor</i> (L.:Fr.) Quél	55
2	Síntoma de la corteza papelosa en árboles de manzano ocasionado por <i>Coriolus versicolor</i> (L.:Fr.) Quél	55
3	Desarrollo micelial de <i>Coriolus versicolor</i> (L.:Fr.) Quél en árboles de manzano	56
4	Cáncro desarrollado en ramas de árboles de manzano	56
5	Superficie superior de un basidiocarpo de <i>Coriolus versicolor</i> (L.:Fr.) Quél	57
6	Zonas multicoloreadas y formación de anillos en la parte inferior de los basidiocarpos de <i>Coriolus versicolor</i> (L.:Fr.) Quél	57
7	Zonas multicoloreadas y ondulaciones en basidiocarpos desarrollados de <i>Coriolus versicolor</i> (L.:Fr.) Quél	58
8	Dimensiones promedio de los poros de <i>Coriolus versicolor</i> (L.:Fr.) Quél	58
9	Longitud y diámetro de poros del basidiocarpo de <i>Coriolus versicolor</i> (L.:Fr.) Quél	59
10	Septas y ramas del micelio de <i>Coriolus versicolor</i> (L.:Fr.) Quél	59
11	Desarrollo de nódulos y ramas en micelio de <i>Coriolus versicolor</i> (L.:Fr.) Quél	60
12	Prueba positiva de fenol-oxidasas en medio de cultivo Malta-Agar de <i>Coriolus versicolor</i> (L.:Fr.) Quél	60

RESUMEN.

En nuestro país, el manzano ocupa el quinto lugar en volumen producido entre los frutales con una producción anual a nivel nacional de 500,989 ton. después del aguacate, mango, durazno y limón. Bajo las condiciones en que se produce, al igual que otros frutales, presenta una gama de problemas que limitan su producción. Uno de estos corresponde a la pudrición blanca de raíz y tallo, la cual puede originar la muerte total del árbol. El agente causal a la fecha se desconoce por esta razón, el presente trabajo tuvo como objetivo identificar al agente causal por los métodos convencionales de identificación conocidos (uso de claves para micelio y basidiocarpos), determinación de grupos enzimáticos capaces de diferenciar bajo pruebas específicas de reacción y por medio de la absorbancia al espectro de luz visible en el espectrofotómetro al tipo de pudrición presente así como a la especie causante de ésta. Las características de las cepas aisladas de raíz, tallo y ramas afectadas, así como de basidiocarpos y suelo, con la ayuda de claves, indicaron la presencia de *Coriolus versicolor* (L. ex Fr.), lo cual fue corroborado al someter estas mismas cepas a pruebas de detección de fenol-oxidasas por medio de la reacción en ácido tánico al 0.5% p/v en medio de cultivo Malta-Agar y a la medición de la absorbancia al espectro de luz visible en el espectrofotómetro en substratos de Guayacol, 1-naftol y Catecol. Confirmándose de esta manera que el agente causal de la pudrición blanca de raíz y tallo del manzano es *Coriolus versicolor* (L. ex Fr.).

SUMMARY.

In Mexico, among fruit trees, apple ranks fifth, avocado, mango, peach and lemon being the first ones. In recent years the annual production has increased remarkably, (from 376 000 ton in 1989 up to 500 989 ton in 1994), but as other fruit trees, apple is affected by a number of parasitological problems that limits its productivity. One of such a problems is the white rot of root and trunk, which under certain conditions may kill the whole plant. The causal agent at least in our country is still unknown. For this reason, the present work was undertaken to: indentify the causal agent by conventional methods (keys that use mycelium and basidiocarps as main taxonomical criteria), determination of enzymatic groups for differentiation under specific reaction tests, absorption under visible light spectrum, and rot type. The characteristics of the isolates obtained from diseased roots, trunk and branches as well as from basidiocarps and soil, made it possible come to the conclusion that the fungus *Coriolus versicolor* (L. ex Fries) is responsible of the apple tree white rot. This conclusion was confirmed by submitting the same isolates to test for phenoloxidas detection, reaction of tannic acid (5% w/v) in malt-agar culture medium, and measurement of absorption in the spectrophotometer, using as substrates Guayacol, 1-naphtol and catechol.

I. INTRODUCCION.

De acuerdo al volumen de fruta producida, en nuestro país, el manzano ocupa el quinto lugar entre los frutales, después del aguacate, mango, durazno y limón. La producción de manzana alcanzada en el ciclo 1988-1990 fue de 376,000 ton. incrementándose para el ciclo siguiente (1989-1991) hasta 527,000 ton. La superficie cultivada también se ha estado incrementando, para 1990 se reporta una superficie aproximada de 42,000 has. y para 1991 58,000 (INEGI, 1991; INEGI, 1992); mientras que para 1993, se reporta un incremento aún mayor, siendo este de 59,914 has. con una producción a nivel nacional de 500,989 ton. (INEGI, 1994).

La patología forestal emergió como una ciencia hace aproximadamente un siglo gracias a los estudios de Robert Hartig relacionados con la degradación de la madera en árboles vivos (Shigo and Sharon, 1968). El proceso inicial en la degradación de la madera en árboles vivos se dá principalmente por la infección de un himenomiceto (Boyce, 1961). Sin embargo, en algunas ocasiones es por la generación de daño causado por otros hongos, o bien insectos, ó en su defecto, por daño físico el cual bajo condiciones favorables, constituye la principal puerta

de entrada de himenomicetos que propician la degradación de la madera (Shigo, 1965; Shigo, 1967).

La transformación biológica de la lignina es uno de los procesos más importantes que ocurren en la biósfera. Sin embargo, el por qué y cómo de esta degradación no ha sido estudiada del todo y poco se sabe acerca del papel que juegan las enzimas en este proceso (Leonowicz and Szklarz, 1986). Los cambios que se generan en el proceso de degradación de la madera son producto de una fuerte acción enzimática sobre sus componentes, como lo es la lignina (Wayne, 1965).

Los basidiomicetos que producen pudrición blanca son un grupo muy extenso y diverso que a pesar de tener la característica común de producir un síntoma similar, presentan varios tipos de ataque a la pared celular (Otjen and Blanchette, 1986). Dentro del proceso de degradación de la madera, la actividad enzimática juega un papel importante. Las enzimas que degradan celulosa y hemicelulosa, han sido investigadas por varios años y éstas generalmente se ubican en dos categorías. Algunas celulasas (endocelulasas) dividen la cadena de celulosa en fragmentos de varias longitudes, otras (exocelulasas) actúan al final

de una cadena larga de celulosa y la dividen en unidades simples o dobles de glucosa (celobiosas) (Blanchette, 1982a).

Muchos de los basidiomicetos que producen pudrición blanca generan fenol-oxidasas extracelulares detectables por la formación de color originado por la oxidación de productos fenólicos contenidos en el medio de cultivo. Salvo algunas excepciones, las especies que generan dichas enzimas son hongos que causan pudrición blanca, los cuales descomponen la lignina, celulosa y otros constituyentes de la madera (Kent and Kelman, 1965).

La asociación de la producción de fenol-oxidasas con la capacidad de degradación de la lignina fue enfatizada por Bavendamm (1928) quién utilizó una prueba simple para separar hongos que producen pudrición blanca de aquellos que producen pudrición café, la cual consistió en desarrollar dichos hongos en medio de cultivo a base de malta-agar (MA) conteniendo ácido gálico o ácido tánico al 0.5% del peso-volumen. Se formaron amplias zonas de difusión oscuras alrededor de la colonia micelial, indicando la actividad de la fenol-oxidasa, en los hongos que producían pudrición blanca y no detectándose en aquellos que produjeron pudrición café. Trabajos consecutivos realizados por Davidson *et al.* (1938), Kent y Kelman (1965), y Nobles (1965), entre otros

permitieron el poder diferenciar y especificar comportamientos y características de algunas especies de hongos como fue el caso de *Polyporus versicolor* (L.:Fr) llevando a los investigadores a caracterizar de manera específica a estas especies permitiendo corroborar o afirmar las identificaciones hechas por medio del uso de claves.

Polyporus versicolor L. ex Fr es un hongo de distribución cosmopolita, que ataca generalmente a latifoliadas y en menor grado a coníferas; sin embargo, dentro del primer grupo de plantas se encuentran algunas que son de importancia comercial al hombre como son limón, aguacate, durazno, peral, ciruelo y manzano entre otros, y en este último caso en particular los daños producidos son sumamente devastadores. No obstante, pese a que existen reportes del ataque de *Polyporus versicolor* a árboles de manzano, en México, éste no ha sido del todo corroborado por lo que se realizó el presente trabajo con los siguientes objetivos:

1. Identificar el agente causal de la pudrición blanca de raíz, tallo y ramas del manzano.
2. Describir los daños causados por el agente de la pudrición blanca a árboles de manzano en raíz, tallo y ramas.
3. Determinar la actividad enzimática de las cepas aisladas de árboles de manzano afectados por pudrición blanca en medios de cultivo específicos y caracterizarlas en base reacciones químicas en medio de cultivo, así como medir su absorbancia en el espectro de luz visible.

II. REVISION DE LITERATURA.

2.1. Del cultivo de manzano.

El nuestro país, el manzano ocupa el quinto lugar en volumen producido entre los frutales, después del aguacate, mango, durazno y limón. La producción de manzana alcanzada en el ciclo 1988-1990 fue de 376,000 ton. incrementandose para el ciclo siguiente (1989-1991) hasta 527,000 ton. La superficie cultivada también se ha estado incrementando, pues para 1990 se reporta una superficie aproximada de 42,000 ha. y para 1991 58,000 (INEGI, 1991; INEGI, 1992); mientras que para 1993, se reporta un incremento aún mayor, 59,914 has. con una producción a nivel nacional de 500,989 ton. (INEGI, 1994).

Las condiciones de latitud, altitud y factores geográficos permiten que en Puebla se explote el potencial productivo de los frutales caducifolios. La producción del estado en el sector frutícola se ha intensificado en los últimos años, cultivándose aproximadamente 6,980 has, siendo el municipio de Zacatlán el principal productor con una superficie de 2,405 has en el año de 1992. Algunos otros municipios productores son Teziutlán (1,800 has), Libres (951

has), Tehuacán (764 has), Cholula (703 has) y Huauchinango (316 has) entre otros (INEGI, 1992a).

2.2. De *Polyporus versicolor* L. ex Fr.

2.2.1. Clasificación taxonómica.

De acuerdo a Romero (1988) *Polyporus versicolor* está clasificado taxonómicamente de la siguiente manera:

CLASE: Basidiomycetes

SUBCLASE: Homobasidiomicetidae

ORDEN: Polyporales

FAMILIA: Polyporaceae

GENERO: *Polyporus*

ESPECIE: *Polyporus versicolor* L. ex Fr.

2.2.2. Sinonimias.

Farr *et al.* (1989) reportan las siguientes sinonimías para la especie *Polyporus versicolor*: *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Pilát, *Coriolus versicolor* (L.:Fr) Qué. y *Polystictus versicolor* (L.:Fr.) Fr.

2.2.3. Descripción.

Polyporus versicolor produce hifas diferenciadas con paredes delgadas refractivas, hialinas ó cafés y septadas, con numerosas ramas cortas, rectas ó curvadas y nódulos a los costados de las septas no presentes en todas las hifas y de las cuales se pueden generar estas de 2.5 a 3 μm de diámetro (Nobles, 1965); basidio claviforme, con cuatro esterigmas de 15 a 20 X 4 a 5 μm , con un segmento basal; basidiosporas cilíndricas, ligeramente curvadas, hialinas, lisas, de 5 a 6 X 1.5 a 2 μm (Gilbertson y Ryvarden, 1987). Esporóforo sésil o efusiorreflejado, imbricado, coriáceo y flexible, con la parte superior cubierto por un vello sedoso con estrechas zonas multicoloreadas blancas, azulosas, negruzcas y rojizas; contexto blanquecino delgado; superficie de los poros blanquecino o amarillento (Sepúlveda, 1966; Fergus, 1963); poros angulares de 4 a 5 por mm (Sepulveda, 1966; Gilbertson y Ryvarden, 1987); aunque Miller (1989)

menciona que son de 3 a 5 por mm. Prueba de fenol-oxidasa positiva en ácido tánico (Nobles, 1965; Davidson *et al.*, 1938; Kent y Kelman, 1965).

2.2.3. Hospedantes.

Polyporus versicolor (L.:Fr.) es considerada una especie cosmopolita, poco común en coníferas y ampliamente distribuída en latifoliadas (Miller, 1999); generalmente se encuentra sobre madera muerta, aunque se le ha encontrado atacando a especies de los géneros de *Abies*, *Acer*, *Actinidia*, *Ailanthus*, *Albizia*, *Alnus*, *Arbutus*, *Betula*, *Calocedrus*, *Carpinus*, *Carya*, *Castanea*, *Castanopsis*, *Catalpa*, *Celtis*, *Cercis*, *Cercocarpus*, *Citrus*, *Corylus*, *Crataegus*, *Cupressus*, *Disopyros*, *Eucalyptus*, *Fagus*, *Fraxinus*, *Ginkgo*, *Gleditsia*, *Hydrangea*, *Ilex*, *Juglans*, *Juniperus*, *Kalmia*, *Lagerstroemia*, *Larix*, *Ligustrum*, *Liquidambar*, *Liriodendrom*, *Malus*, *Melia*, *Nyssa*, *Ostrya*, *Oxydendrum*, *Persea*, *Philadelphus*, *Photinia*, *Picea*, *Pinus*, *Platanus*, *Populus*, *Prunus*, *Pseudotsuga*, *Psidium*, *Pyrantha*, *Pyrus*, *Quercus*, *Rhododendron*, *Rhus*, *Salix*, *Sambucus*, *Sassafras*, *Schinus*, *Sequoia*, *Sorbus*, *Syringa*, *Taxodium*, *Thuja*, *Tilia*, *Tsuga*, *Ulmus*, *Umbellularia*, *Vitis* (Farr *et al.*, 1989; Sinclair *et al.*, 1987).

2.2.5. Daños.

Este hongo es considerado como un patógeno oportunista capaz de colonizar y matar árboles que presenten daños en tallo, ramas y raíz, o bien a aquellos que se encuentren bajo estrés por sequía, heladas o altas temperaturas. Causa una pudrición blanca esponjosa, matando áreas del cambium causando canchales y muerte descendente (Sinclair *et al.*, 1987).

Los síntomas en ramas inician con un abultamiento de la corteza y posteriormente esta comienza a romperse, en el interior se observa un cambio de color en la región del cambium el cual toma un color oscuro que se extiende hacia la parte exterior, el follaje resulta ser más escaso y se observa una disminución en la emisión así como en el tamaño de los brotes.

En tallos y cuello, el descortezamiento se hace presente observándose un canchale que los puede rodear, en estados avanzados de daño, se observa la formación de micelio bajo la corteza, la cual es fácilmente desprendible, así como la consistencia de la madera se vuelve esponjosa por la degradación de la lignina y celulosa que se lleva a cabo en su totalidad.

En las raíces, es común observar un descortezamiento y la formación de micelio superficial alrededor de estas.

Otro síntoma común y único del ataque de *Polyporus versicolor* es la formación de líneas oscuras que se distribuyen en la madera. Según Williams *et al.* (1987) *Polyporus versicolor* es la única especie de hongos de pudrición blanca que presenta dos grupos de compatibilidad (cepas dicarióticas y cepas monocarióticas) las cuales al encontrarse en un mismo trozo de madera forman estas líneas de color café de aproximadamente 1 mm de grosor al no poderse mezclar las hifas, debido a la generación de sustancias oxidativas no enzimáticas que causan depolimerización en la madera y que causan la inhibición del crecimiento micelial entre las cepas.

La formación de esporóforos tiene lugar en los meses de verano y continúan formándose hasta principios de otoño (Sinclair *et al.*, 1987).

2.3. El proceso de degradación de la madera.

La patología forestal emergió como una ciencia hace aproximadamente un siglo gracias a Robert Hartig quien inició el estudio de la degradación de la madera en árboles vivos (Shigo and Sharon, 1968).

La descomposición microbiana de la celulosa ha sido estudiada extensivamente desde el punto de vista del producto resultante, la glucosa, la cual es un material fácilmente utilizable por varios microorganismos en la industria de la fermentación; sin embargo, el mecanismo de degradación de la celulosa no ha sido aclarado del todo, debido a que en éste participa la acción de un amplio conjunto de enzimas (Yoshida *et al.*, 1989).

El proceso inicial de la degradación de la madera en árboles vivos se dá principalmente por la infección de un himenomiceto (Boyce, 1961). Sin embargo, en algunas ocasiones es por la generación de daño causado por otros hongos, o bien insectos, ó en su defecto, por daño físico, el cual bajo condiciones favorables, constituye la principal puerta de entrada de himenomicetos que propician la degradación de la madera (Shigo, 1965; Shigo, 1967).

El proceso de degradación de la madera se inicia con su decoloración (Lorenz, 1944; Zycha, 1948), dentro de la cual se pueden encontrar involucrados tanto agentes bióticos como abióticos (Zycha, 1948).

La decoloración de la madera es el principal indicador de un daño serio en el sistema vascular del árbol y ésta puede dividirse por su origen en tres grupos principales:

- a) La decoloración es producto de cambios químicos en la madera originadas por daños ajenos a microorganismos.
- b) Los cambios químicos se dan por el efecto que produce la invasión por microorganismos no himenomicetos.
- c) El ataque de himenomicetos a nivel de raíz, cuello, tallo y ramas es el principal factor de la degradación de la madera (Shigo, 1967).

Desde que la madera ha constituido uno de los materiales más utilizados en el mundo, los esfuerzos por preservar su calidad han sido variados, sobre todo

aquellos encaminados a prevenir y controlar a los agentes bióticos promotores de su degradación (Wayne, 1965).

La transformación biológica de la lignina es uno de los procesos mas importantes que ocurren en la biósfera. Sin embargo, el por qué y como de esta degradación no ha sido estudiada del todo y poco se sabe acerca del papel que juegan las enzimas en este proceso (Leonowicz and Szklarz, 1986).

Los cambios que se generan en el proceso de degradación de la madera son producto de una fuerte acción enzimática sobre los componentes de esta como lo es la lignina (Wayne, 1965).

En la descomposición de la lignina por parte de algunos hongos que producen pudrición blanca, se ha encontrado que al degradar este polímero se genera una excreción de fenol-oxidasa (Leonowicz and Szklarz, 1986), como se presenta en el caso de *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Sporotrichum pulverulentum* y *Fomes annosus*.

Este grupo de hongos pueden ser capaces de degradar todos los componentes de la pared celular; sin embargo, es posible encontrar una gran

variación en el tipo de pudrición que generan, no obstante que el síntoma principal sea una pudrición blanca. La celulosa, la hemicelulosa y la lignina pueden ser degradadas simultáneamente. Cada componente puede ser degradado en un diferente rango uno del otro, o bien, se puede presentar una mayor preferencia por algún componente como puede ocurrir con la lignina y la hemicelulosa (Blanchette, 1984).

Los basidiomicetos que producen pudrición blanca son un grupo muy extenso y diverso que a pesar de tener la característica común de producir un síntoma similar, presentan varios tipos de ataque a la pared celular (Otjen and Blanchette, 1986).

Tanto en pudriciones blancas como cafés y tanto en madera dura como suave, procesos enzimáticos complejos se llevan a cabo por cada uno de los patógenos; no obstante, la diferenciación de éstos puede darse a nivel histológico de acuerdo al desarrollo hifal en las células de la madera (Wayne, 1965).

Esta característica es descrita por Wayne (1965), quien la divide en tres grupos:

1. En ambos tipos de madera y con lo que respecta a ambos tipos de pudrición (blanca ó café), las hifas se distribuyen entre las células en los primeros inicios de la pudrición.
2. En la pudrición blanca de ambas maderas y en la pudrición café de la madera dura, la hifa pasa directamente a través de la pared celular de una célula a otra al perforar ésta los hongos que producen pudrición blanca ó bién a través de las traqueídas para el caso de los hongos que producen pudrición café.
3. La degradación de las paredes celulares generalmente procede del ataque a través de la liberación y dispersión de enzimas extracelulares.

2.4. Diferenciación entre la pudrición blanca y pudrición café de la madera.

Los registros de la degradación de la madera se iniciaron en Europa con los descubrimientos de Robert Hartig poco antes del siglo XX. En 1878, Hartig separó las pudriciones blancas de las pudriciones rojas (ahora conocidas como

putridiones cafés) por el color de la madera degradada (Otjen and Blanchette, 1986).

Falck (1926) fue el primero en mostrar los cambios químicos básicos que acompañan a las pudriciones blancas y cafés. Los hongos que producen pudrición blanca remueven la lignina, hemicelulosa y la celulosa; mientras que los de la pudrición café sólo la celulosa.

Bjorkman *et al.* (1949) separaron el grupo de la pudrición blanca en dos categorías. Algunos hongos de pudrición blanca fueron encontrados removiendo todos los componentes de la pared celular de manera simultánea; mientras que otros fueron encontrados removiendo primero la lignina y hemicelulosa y posteriormente la celulosa. Ellos identificaron a las categorías como pudrición blanca y pudrición corrosiva, respectivamente.

Por su parte, Meier (1955) describe esas diferencias a gran detalle utilizando el microscopio electrónico. El renombró las categorías de la pudrición blanca como pudriciones simultáneas (pudriciones blancas de Bjorkman) y pudriciones blancas (pudriciones corrosivas de Bjorkman).

Hubert (1931) y Boyce (1961) en los Estados Unidos separaron las pudriciones blancas de acuerdo a como las describió Hartig de las pudriciones café y reconocieron los tipos de pudrición blanca. Sin embargo, no hicieron especificaciones sobre la separación de los hongos que degradaron simultáneamente la lignina de las pudriciones simultáneas. Los primeros patólogos forestales sólo utilizaron los síntomas macroscópicos de la degradación de la madera con propósitos de identificación. Como resultado de esto, la degradación de la madera fue categorizada como: pudrición blanca, pudrición moteada, pudrición esponjosa, pudrición fibrosa, etc.

Durante este período, se inician investigaciones detalladas a nivel de campo y laboratorio para describir al máximo los mecanismos de degradación y especificar los síntomas al degradarse la madera por autores como von Schrenk and Spaulding (1909) y Hubert (1924).

Como los aspectos químicos de la degradación de la madera fueron investigados, un pequeño número de hongos fueron seleccionados para hacer las observaciones en laboratorio y éstos comenzaron a ser los modelos para categorizar los tipos de degradación. A través de la mayoría de esos estudios, los mismos organismos fueron utilizados, así por ejemplo, en los Estados Unidos,

Cowling (1961) y Wilcox (1968) caracterizaron los aspectos microscópicos y químicos de la pudrición blanca de la madera utilizando a *Coriolus versicolor* (L.:Fr.) Quél.

Bajo este tipo de estudios se logró caracterizar a las pudriciones de la madera, teniéndose que en Europa, *C. versicolor* produce una degradación simultánea y *Pellinus pini* (Thors:Fr) Pilát causa una delignificación selectiva como se constata en trabajos hechos por Mieir (1955) y Liese (1970).

Las pudriciones blancas se subdividen en fibrosas y esponjosas. Algunas veces, la degradación de la madera es más amarilla ó amarillo café que blanca, pero la degradación de la madera es mucho más fibrosa en apariencia. Los hongos que producen pudrición blanca descomponen la lignina de la lamela media, causando que las células se separen por un material fibroso. Las pudriciones cafés se diferencian fácilmente debido a que los hongos que las producen no descomponen lo suficiente la lamela media para separar las células; esto es importante sobre todo si se sabe que los hongos que producen pudrición café también causan pudriciones de color amarillo y amarillo café (Liese, 1970; Gilbertson, 1980; Manión, 1991)

Existe un tercer tipo de degradación fungosa, a la cual se le llama pudrición esponjosa. Esta es separada de los otros tipos de pudrición por el hecho de que se degrada de manera selectiva sólo una porción de la pared celular. Los hongos que la producen degradan primeramente la celulosa y hemicelulosa en áreas localizadas de la pared celular. Esta degradación ocurre comunmente en maderas que han sido saturadas con agua ó en aquellas que estan directamente en contacto con el suelo. Los hongos que producen esta pudrición pertenecen a la subdivisión Ascomycotina, o bién, son hongos imperfectos; mientras que el resto de las degradaciones son causadas por Hymenomycetes de la subdivisión Basidiomycotina (Liese, 1970; Bodd and Reyner, 1983; Dill and Kraepelin, 1986; Minio, 1991).

2.5. Variación en la madera degradada por hongos de pudrición blanca.

En los ecosistemas naturales, la madera degradada puede tener una gran variación en apariencias macroscópicas y texturas. Una pudrición blanca, una pudrición moteada y una pudrición blanca uniforme son sólo algunos de los tipos de pudrición que pueden observarse. La pudrición blanca usualmente causa una delignificación selectiva en áreas localizadas de madera, aunque también se ha observado una combinación de pudriciones simultáneas y delignificación

selectiva. Otros hongos de pudrición blanca tienen la habilidad de remover la celulosa que queda después de degradar la lignina de la madera (Lewis and Blanchette, 1986).

Los patrones macroscópicos de degradación observados en estados avanzados, resultan de una interacción entre el hongo y su substrato. La anatomía del hospedante y la estructura de la pared celular de varios tipos de células han mostrado factores determinantes en los patrones de la degradación que ocurre, particularmente la cantidad de hongos que generan delignificación selectiva. Algunos hongos que generan dicha delignificación sólo degradan parte de un anillo anual de crecimiento en el árbol; por ejemplo, *Ganoderma tsugae* Murr. preferentemente delignifica las células de la madera nueva de *Tsuga canadensis* (L.) Carr. pero causan una pudrición simultánea en áreas de madera vieja. Por otra parte, *Phellinus pini* ataca preferentemente las células de la madera vieja de *Larix occidentalis* Nutt. e *Inonotus dryophilus* (Berk.) Murr. delignifica selectivamente sólo las células del parénquima axial en roble (*Quercus alba* L.) (Lewis and Blanchette, 1986).

Una observación común de la delignificación selectiva de la madera es que líneas uniseriadas son a menudo removidas completamente. Asimismo, es

probable que los hongos de la pudrición blanca difieran en su habilidad para degradar madera como resultado en la producción de diferentes tipos de enzimas y cómo esas enzimas son capaces de actuar sobre la organización específica de los componentes de la pared celular (Lewis and Blanchette, 1986).

Existen algunas excepciones en las cuales no todos los hongos que delignifican selectivamente la madera son restringidas por algún tipo de célula. Algunos hongos de pudrición blanca son capaces de delignificar la mayoría de los tipos de células de la madera. Las razones para la delignificación localizada por esos hongos varía. *Xylobolus frustulatus* (Pers.:Fr.) Boid. aparentemente es restringido por la acumulación de productos de polimerización durante la descomposición (Otjen and Blanchette, 1984). *Hirschioporus pargamenus* (Fr.) Bond y Sing. produce una cadena de hifas entre los puntos delignificados de la madera y que al formarse inhiben el proceso de delignificación (Otjen, 1985).

Algunos hongos tales como *Ischnoderma resinosum* (Fr.) Karst., pueden causar una delignificación selectiva y una pudrición simultáneas dentro de la misma madera en abedul (*Betula papyrifera* Marsh.) Henningsson *et al.*, (1972) también encontraron que una sola especie de *Peniophora* es capaz de causar dos tipos de ataque a la pared celular en madera de abedul en laboratorio. Las

razones para este tipo de variación en la capacidad de degradar aparentemente incluye más que diferencias en la estructura de la pared celular dentro del hospedante.

Se han encontrado diferencias entre la pudrición blanca y la degradación selectiva de la madera. Altas acumulaciones de oxidasas del manganeso dentro de algunas áreas delignificadas de la madera y los altos valores del pH de la madera delignificada son sólo dos aspectos importantes de la gran cantidad de cambios que ocurren (Blanchette, 1984b).

Cuando los basidiomicetos al momento de penetrar e infectar la madera producen esporóforos, la producción de endocelulasas pueden llegar a incrementarse hasta en un 10% (Wood y Leatham, 1983) y los nutrientes almacenados son transportados a la superficie de la madera al momento en que se producen como un mecanismo de respuesta del árbol (Gruen y Wu, 1972).

2.6. Aspectos enzimáticos en la degradación de la madera.

Otro método de clasificar los tipos de degradación está basado en la química del proceso de degradación y en la modificación de la apariencia de la

madera descompuesta. Algunos hongos llamados hongos de pudrición café, descomponen primeramente los carbohidratos componentes de la madera. La descomposición preferencial de carbohidratos, celulosa y hemicelulosa, originan una coloración café en la lignina, de ahí el nombre de la pudrición. Por otra parte, los hongos de la pudrición blanca, descomponen todos los componentes de la pared celular; sin embargo, ambos pueden atacar la lignina, celulosa o hemicelulosa (Blanchette, 1982b).

Dentro del proceso de degradación de la madera, la actividad enzimática juega un papel importante. Las enzimas que degradan celulosa y hemicelulosa, han sido investigadas por varios años y éstas generalmente se ubican en dos categorías. Algunas celulasas (endocelulasas) dividen la cadena de celulosa en fragmentos de varias longitudes, otras (exocelulasas) actúan al final de una cadena larga de celulosa y la dividen en unidades simples o dobles de glucosa (celobiosas) (Blanchette, 1982a).

Además de las celulasas, algún tipo de agentes de depolimerización no enzimática de la celulosa producidos por hongos han sido detectados, desde que

se sabe que las celulasas también son capaces de penetrar profundamente en las regiones cristalinas de la pared secundaria de la célula. No obstante, este tipo de actividad no enzimática es una característica particular de los hongos que producen pudrición café (Blanchette, 1982a). Asociada con esta enzima está la peroxidasa del manganeso. El funcionamiento de estas dos enzimas requiere de peróxido de hidrógeno, y al mismo tiempo están involucradas en la producción de éste que también es requerido para la degradación de la lignina (Cowling, 1961).

La peroxidasa de la lignina es producida cuando el nitrógeno soluble, carbón o azúfre han sido esencialmente agotados. Bajo estas condiciones, las enzimas son producidas en la punta de la hifa, la cual las libera hacia la pared celular de la madera, iniciándose así la depolimerización de varios componentes de la molécula de lignina. El modo de acción de esta enzima involucra la remoción de un electrón del anillo aromático de la molécula (de la lignina). La inestabilidad del radical aromático espontáneamente rompe la molécula en varios puntos incluyendo los anillos o las uniones entre estos, por ello a la peroxidasa de la lignina se le conoce como una enzima no específica (Cowling, 1961).

Muchos de los basidiomicetos que producen pudrición blanca generan fenol-oxidasas extracelulares detectables por la formación de color originado por

la oxidación de productos fenólicos contenidos en el medio de cultivo. Salvo algunas excepciones, las especies que generan dichas enzimas son hongos que causan pudrición blanca, los cuales descomponen la lignina, celulosa y otros constituyentes de la madera. En contraste, los hongos que originan pudrición café no producen fenol-oxidasas extracelulares y no reducen apreciablemente el contenido de lignina en la madera; sin embargo, dichos hongos sí degradan a la celulosa (Kent and Kelman, 1965).

La asociación de la producción de fenol-oxidasa con la capacidad de degradación de la lignina fue enfatizada por Bavendamm (1928) quién utilizó una prueba simple para separar hongos que producen pudrición blanca de aquellos que producen pudrición café, la cual consistió en desarrollar dichos hongos en medio de cultivo a base de malta-agar (MA) conteniendo ácido gálico ó ácido tánico al 0.5% del peso-volumen. Amplias zonas de difusión oscuras se formaron alrededor del crecimiento, indicando la actividad de la fenol-oxidasa, en los hongos que producían pudrición blanca y no detectándose en aquellos que produjeron pudrición café.

Subsecuentemente, trabajos hechos por Davidson *et al.*, (1938) en los cuales 210 especies de hongos que producían pudrición de madera fueron

evaluados para la reacción de Bavendamm, corroborando así esta prueba. Alrededor del 96% de los hongos que produjeron pudrición blanca mostraron zonas coloreadas y el 80% de los hongos de pudrición café no. Otras pruebas de coloración han sido reportadas utilizando sustancias como tintes (Preston and McLennan, 1948); tirosina, *p*-cresol y Guayacol (Boidin, 1951); 1-naphtol (Higuchi and Kitamura, 1953; Law, 1959); extracto de col roja (Jørgensen and Vajlby, 1953) y extracto de madera de abeto (Etheridge, 1957). Ciertos hongos reaccionaron típicamente en todos esos sustratos excepto en madera de abeto, la cual se utilizó sólo para 18 especies de hongos.

La mayoría de las investigaciones en la formación de color por basidiomicetos que producen pudrición de madera en medios que contienen fenol han sido con propósitos taxonómicos y no enzimáticos.

Las lacasas, oxidasas tipo tirosina y oxidasas del catecol así como las peroxidasas pueden catalizar la oxidación de fenoles simples a quinonas, las cuales son polimerizadas para formar los complejos coloreados (Bendall and Gregory, 1963; Lyr, 1958).

Por su parte, Kent and Kelman (1965) generalizan que el término fenol-oxydasa es utilizado sólo para referirse a cualquier enzima que catalice la

oxidación de compuestos fenólicos en el medio de cultivo teniendo como consecuencia la formación de color.

La correlación entre la capacidad de un hongo a degradar lignina, manifestada por un tipo de degradación de madera y la formación de fenol-oxidasas extracelulares ha sido documentada por autores como Davidson *et al.*, (1938), Fähræus (1949), Lyr (1958) y Nobles (1965).

Los análisis del contenido de lignina de madera degradada por hongos de pudrición blanca han mostrado que ésta es utilizada en su totalidad aunque sólo en pocas especies ha sido evaluada. Incrementos en la concentración de oxígeno se han detectado en mezclas de lignina y fragmentos de hongos de pudrición blanca y en mezclas de lignina y extractos filtrados de hongos (Gottlieb and Geller, 1949; Higushi, *et al.*, 1956; Vliet, 1954). Sin embargo, por su parte Gottlieb y Geller (1949) encontraron que ciertos inhibidores de la fenol-oxidasa no inhiben esta oxidación. El incremento de la cantidad de oxígeno puede estar determinada por inhibidores de compuestos solubles en agua de la lignina.

Higushi *et al.* (1956) también enfatizaron que muchos de los componentes que resultan de la degradación de la madera no solo son resultado de la acción

catalítica de la fenol-oxidasa, ya que durante el proceso de degradación, muchos polímeros son formados. Sin embargo, remarca que las enzimas fenol-oxidasas son las principales responsables de la degradación de la lignina.

2.7. Caracterización de *Polyporus versicolor* (L.:Fr.) a partir de la reacción de fenol-oxidasas.

La actividad enzimáticas ha jugado un papel importante en la determinación de especies que degradan madera. Uno de los primeros trabajos encaminados a la caracterización de especies a partir de la actividad enzimática fueron los realizados por Bavendamm (1928) y Davidson *et al.* (1938), en los cuales estos últimos caracterizan 210 especies de hongos que degradan madera. No obstante para dicha caracterización generaron una clave a partir de la reacción obtenida del desarrollo de las especies estudiadas en medio de cultivo malta-agar con ácido tánico y ácido gálico al 0.5% del peso-volumen del medio, en la cual ubican a dichas especies por zona de difusión en ácido tánico (cuadro 1) y generan 9 grupos de caracterización de especies a partir del crecimiento en ácido tánico y ácido gálico (cuadro 2).

Dentro de las especies caracterizadas se encuentra *Polyporus versicolor* Quel., la cual fue caracterizada a partir de la reacción en ácido tánico al 0.5% en malta-agar, presentando un crecimiento de micelio de 30 a 50 mm en cultivos de dos semanas de edad; presenta una zona de difusión clara a café obscura, extendiéndose a una corta distancia del margen del micelio y no presenta desarrollo en ácido gálico.

Cuadro 1. Diferenciación de la zona de difusión en ácido tánico para hongos que degradan lignina.

–	Negativa. No hay coloración café en el medio de cultivo o alrededor del micelio.
+	Zona de difusión clara o café claro, formada sólo bajo el sitio de inóculo.
++	Zona de difusión clara o café claro, sólo bajo el crecimiento del micelio.
+++	Zona de difusión clara a café obscura, extendiéndose a una corta distancia del margen del micelio.
++++	Zona de difusión café obscura, extendiéndose considerablemente alrededor del micelio.
+++++	Zona de difusión muy intensa, extendiéndose considerablemente alrededor del micelio.

Tomado de Davidson *et al.*, 1938.

Cuadro 2. Caracterización de grupos para diferenciar especies de hongos que causan pudrición blanca y café en madera.

Grupo	Descripción
1	El micelio crece rápidamente, la reacción en ác. tánico es negativa.
2	Buen desarrollo en ác. gálico, diámetro de micelio mucha más grande en ác. tánico.
3	Buen desarrollo en ác. gálico. No hay desarrollo en ác. tánico.
4	No hay desarrollo en ác. gálico y en ác. tánico.
5	No hay desarrollo en ác. gálico, el diámetro del micelio es de 25 mm ó menos en ác. tánico.
6	No hay desarrollo en ác. gálico, diámetro de micelio de 25 - 30 mm de ác. tánico.
7	Diámetro de micelio igual en ambos medios.
8	Poco desarrollo en ác. gálico, buen desarrollo en ác. tánico.
9	Buen desarrollo en ác. gálico, no hay desarrollo en ác. tánico.

Tomado de Davidson *et al.*, 1938.

A partir de estos estudios, otros autores han caracterizado aún más a *Polyporus versicolor* (L.:Fr.). Szklarz *et al.* (1989) reportan a partir de un análisis electroforético que *P. versicolor* tiene la capacidad de degradar un compuesto llamado Vanillylacetona generando un grupo específico de fenol-oxidasas.

Según Mosbach (1963), *P. versicolor* posee dos tipos de fenol-oxidasas, el primero, la forma (A) que tiene una oxidasas de actividad elevada posiblemente adsorbida en intercambios aniónicos; contrariamente, la fenol-oxidasas B, de poca actividad y poca adsorbancia en intercambio aniónico, como la celulosa. La puesta en evidencia de las fenol-oxidasas A y B no son el resultado de artificios, sino que se trata de dos formas de oxidasas producidas de manera independiente por *P. versicolor*, además de que la forma B fue ampliamente detectada en extracto de suelo formando un complejo humo-enzimático. (Mayaudon y Sarkar, 1975).

Por su parte, Roy (1992) al caracterizar cromatográficamente 16 especies de hongos que producen pudrición blanca, reporta que *Polyporus versicolor* resultó ser la única especie que genera como resultado de la actividad en enzimas fenol-oxidasas quelato de manganeso.

Golovleva *et al.*, (1989) encontraron que *Polyporus versicolor* solo es capaz de romper la uniones entre las cadenas de carbono que conforman la molécula de lignina y no afecta bajo ninguna circunstancia las uniones de enlace C-O.

Por otra parte, Kent y Kelman (1965) caracterizan, mediante la medición de la absorbancia utilizando un espectofotómetro y bajo tres sustratos diferentes

(Catecol, Guayacol y 1-naftol) a *Polyporus versicolor* a partir de extractos de madera infectada, medio de cultivo y extracto de suelo. Estos autores encontraron valores promedio de absorbancia de:

Sustrato	Ext. de madera	Ext. de M.C.	Ext. de suelo
Catecol	0.170	0.202	0.041
Guayacol	0.059	0.063	0.001
1-naftol	0.105	0.189	0.008

III. MATERIALES Y METODOS.

3.1. Sitio de Muestreo.

Las diferentes muestras tanto de basidiocarpos, madera, así como de suelo fueron obtenidas de la huerta comercial "ESCUADRON 201", que se encuentra localizada en el municipio de Zacatlán, Puebla, en el cual se cultivan aproximadamente 3100 hectáreas de manzano, cuya furta se destina principalmente a la industria vinícola y refresquera (Lépiz, 1988).

Zacatlán se ubica geográficamente en la parte noroeste-media del Estado de Puebla, entre los 19°50' y 20°18' de latitud norte y 19°55' y 19°12' de longitud oeste; la altitud varía entre 2,045 y 2,200 msnm (Bonilla y Macias, 1994).

La temperatura media anual es de 16° C y la humedad relativa entre 60-65%, presentando 175 días de neblina y 900-1200 mm de precipitación por año; se presentan de 11 a 13 heladas, presentándose en los meses de diciembre a enero y de 3 a 5 granizadas al año. La edafología existente en el municipio pertenece a dos tipos principales de suelo, en el norte, noroeste y centro se

presentan suelos forestales de color café, representando el 30% del municipio, el 70% del territorio está conformado por suelos forestales de color café; estos suelos presentan diferentes características por su origen, edad y uso. En la mayoría de los casos se trata de suelos pesados con gran cantidad de materia orgánica y pH ligeramente ácido (Miranda, 1984; Lépiz, 1990).

3.2. Variedad.

La variedad de manzano que se cultiva en la huerta y de la cual se obtuvieron las muestras fue la var. "Rayada", la cual está injertada sobre patrones de Camoesa blanca y los árboles están plantados bajo una distribución de tres bolillo, con una distancia entre hileras y entre plantas de 6 m.

3.3. Colecta de muestras.

Durante los años de 1994 y 1995 se realizaron muestreos al azar dirigidos, en los cuales se colectaron ramas, trozos de tallos y raíces de árboles que presentaron síntomas de muerte descendente, necrosamientos en ramas y tallos, corteza papelosa en ramas jóvenes, descortezamiento de tallos, raíces necrosadas, crecimiento micelial blanco bajo la corteza de tallos y ramas y presencia de

basidiocarpos; también se colectaron muestras de suelo del área radicular y se describieron los daños observados en campo.

Por otra parte, se colectaron los basidiocarpos que se desarrollaron sobre ramas y tallos.

El material colectado se transportó en bolsas de polietileno para su posterior procesamiento al laboratorio de micología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. En cada uno de los muestreos se tomaron datos de síntomas, parte del árbol afectada, apariencia del árbol, así como de las características de los basidiocarpos encontrados.

3.4. Aislamientos.

Para realizar los aislamientos se utilizó como medio de cultivo Malta-Agar (MA), el cual es ampliamente sugerido para el crecimiento de hongos que degradan madera por autores tales como Kirt y Kelman (1965), Leonowicz, *et al.* (1985), Luard (1985), y Schultz, *et al.* (1991), entre otros, a razón de 20 gr de agar purificado y 15 gr de extracto de malta en 1000 ml de agua destilada y esterilizado en olla de presión a 15 lbs. durante 20 min.

El aislamiento que se hizo de ramas, trozos de tallo, corteza y raíces consistió en obtener pequeños trozos de aproximadamente 0.5 cm de longitud, los cuales fueron lavados perfectamente en agua destilada, posteriormente éstos fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min. y luego se enjuagaron perfectamente para quitar el exceso de cloro con agua destilada estéril. El exceso de agua se eliminó colocando los trozos sobre papel filtro para que se absorbiera la humedad y luego se sembró en cajas de petri de 9 cm de diámetro con medio de cultivo. Cada uno de los aislamientos fueron etiquetados con datos de fecha y parte de la cual se hizo el aislamiento; el crecimiento del hongo se realizó bajo condiciones de laboratorio no controladas.

Para el aislamiento de basidiocarpos, se cortaron pequeños trozos de éste y se lavaron con agua destilada estéril; posteriormente, unos trozos fueron sembrados directamente en el medio de cultivo; mientras que otros se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% midiéndose tres tiempos diferentes de exposición al cloro (30 seg., 60 seg. y 90 seg), esto con el fin de evaluar el tiempo que puede soportar el basidiocarpo en hipoclorito y no perder su viabilidad para así poder obtener un aislamiento lo más puro posible. Después de transcurrido el tiempo en hipoclorito se enjuagaron con agua destilada estéril, se

les quitó el exceso de humedad con papel filtro y se sembraron en el medio de cultivo.

Para los aislamientos de suelo, se pesó 1 gr de suelo y se puso este en una caja de petri, se le agregó hipoclorito de sodio durante 30 seg. y posteriormente se decantó y se enjuagó con agua destilada estéril tres veces; del suelo así tratado se tomó una pequeña muestra y se distribuyó homogéneamente sobre el medio de cultivo.

3.5. Identificación.

3.5.1. Por basidiocarpos.

Para la identificación del hongo problema por medio de basidiocarpos, se utilizaron las claves de géneros ilustrados de hongos que degradan madera de Fergus (1963). Asimismo, se realizaron cortes histológicos para medir la longitud y diámetro del poro, llevándose a cabo un total de 100 mediciones para cada caso; por otra parte, se contabilizó el número de poros por centímetro cuadrado, realizándose 50 conteos.

3.5.2. Por micelio.

En este caso, se realizaron preparaciones fijas en portaobjetos del micelio en crecimiento para observarse al microscopio compuesto y se utilizaron las claves de Nobles (1965) y Gilbertson y Ryvarden (1987).

3.5.3. Por su actividad enzimática.

3.5.3.1. Prueba de fenol-oxidasas.

La prueba de fenol-oxidasas se realizó bajo dos métodos, el primero comprendió la determinación de la acción enzimática en base al cambio de color del medio de cultivo malta-agar más ácidos tánico, siguiendo la metodología expuesta por Davinson *et al.*, 1938; mientras que en el segundo caso, se basó en la detección de enzimas fenol-oxidasas por medio de la detección de la absorbancia en el espectrofotómetro en tres diferentes sustratos bajo el espectro de luz visible.

3.5.3.1.1. Determinación enzimática en medio de cultivo.

Para esta prueba se utilizó la metodología expuesta por Davidson *et al.* (1938). De los aislamientos realizados, se seleccionaron 10 cepas que

presentaron las características de *Polyporus versicolor* L. ex Fr. según la descripción de Nobles (1965) y Gilbertson y Ryvarden (1987) aisladas de las colectas: 1.- basidiocarpo, 2.-raíz, 3.-raíz, 4.-suelo, 5.-corteza de tallo, 6.-rama, 7.-micelio presente en la corteza del tallo, 8.-basidiocarpo, 9.-rama y 10.-corteza de rama. Se preparó medio de cultivo malta-agar mezclado con ácido tánico (MA-AT) a razón de 5 gr de ácido tánico para 1000 ml de malta agar (0.5% peso/volumen). El ácido tánico fue agregado al medio de cultivo cuando este presentó una temperatura de 38 a 40°C posterior a la esterilización para evitar así la descomposición de dicho ácido.

A las 2 semanas de edad, de cada una de las cepas se extrajeron discos de 6 mm de diámetro con un sacabocado y se sembraron en el medio de cultivo MA-AT. Cinco días después se evaluó la reacción presente así como se ubicó a cada una de las cepas dentro de los grupos que describe Davidson *et al.* (1938) en base a características de crecimiento, diámetro de colonia en mm y zona de difusión para diferenciar especies de hongos que producen degradación de madera.

3.5.3.1.2. Determinación enzimática por medio de espectrofotometría.

3.5.3.1.2.1. Sustratos y buffer requeridos.

Se utilizaron los siguientes sustratos a las concentraciones indicadas:

Sustrato	Concentración
1-naftol	6.4 mM
Guayacol	0.001 M
Catecol	40 mM

Por otra parte, se preparó una solución buffer de fosfato de sodio 0.1 M con un p.H. de 5.5.

3.5.3.1.2.2. Extractos.

Se realizaron extractos de crecimiento fungoso en medio de cultivo, de madera y de suelo, siguiendo la metodología expuesta por Kent y Kelman (1965). El inóculo de cada una de las cepas fue incrementado en medio de cultivo MA, después de dos semanas de crecimiento del hongo, se recogió el micelio, se pesaron 5 gramos de éste y se colocó en vasos de precipitado de 100 ml; por cada gramo de micelio se agregaron 10 ml de solución buffer de fosfato de sodio a p.H. de 5.5. La mezcla se agitó por 15 min. a 100 rpm en un agitador

eléctrico y posteriormente se centrifugó a 2000 rpm por 5 min. a 2°C. El extracto fue conservado en tubos de ensayo de 20 ml a 0°C.

La metodología que se realizó en la preparación de los extractos de madera y suelo fue la misma que en el caso anterior. Cabe aclarar que para el caso del extracto de madera estos fueron hechos de raíz, tallo, corteza de tallo y ramas hasta completarse un total de 10 extractos; para suelo, se utilizaron muestras de suelo de 10 puntos representativos de la huerta de estudio. En los tres tipos de extractos se utilizó un testigo el cual tanto para madera como suelo consistió en esterilizar estos a 15 lb de presión por 20 min.; mientras que para el micelio se utilizó solo medio de cultivo sin crecimiento.

3.5.3.1.2.3. Detección de la absorbancia en el espectrofotómetro.

Una vez que se tuvieron preparados los extractos que incluyeron 10 repeticiones de cada uno, se llevó a cabo la medición de la absorbancia en cada uno de los sustratos en un espectrofotómetro Varian Techtron® MOD. 635.

Para el caso del Guayacol y del Catecol, primeramente se mezclaron 1 ml de sustrato con 1 ml de agua destilada esteril y la mezcla se adicionó a 3 ml de

buffer fosfato a pH de 5.5, enseguida se agregó 1 ml del extracto; la absorbancia se midió a 465 nm para Guayacol y 395 nm para Catecol.

Por lo que respecta a la medición de la absorbancia utilizando como sustrato 1-naftol, se mezcló 1 ml de éste en 4 ml de buffer fosfato a pH 5.5 y se agregó 1 ml de extracto, midiéndose la absorbancia a 525 nm. En todos los casos se repitió 10 veces cada evaluación.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1. Aislamientos.

De los aislamientos realizados, se pudo observar el crecimiento micelial en un lapso de 48 hrs. después de la siembra en medio de cultivo malta. Por lo que respecta a los aislamientos de basidiocarpos, al evaluarse tres tiempos de exposición a hipoclorito de sodio al 1%, los trozos expuestos a 30 y 60 segundos germinaron a las 48 hrs y hasta las 96 hrs los expuestos durante 90 segundos.

No obstante, en las colonias de los trozos expuestos a hipoclorito por 30 y 60 segundos, también salieron *Fusarium* spp., *Sordaria* spp. y *Alternaria* spp. así como se detectó la presencia de bacterias, los cuales fueron considerados como contaminantes; mientras que de los trozos expuestos a 90 segundos sólo se desarrolló la especie a estudiar.

Por lo que respecta a los aislamientos de suelo, junto con la especie a estudiar, se desarrollaron hongos actinomicetos, *Fusarium* spp., *Sordaria* spp. y *Chaetomium* spp., así como bacterias, no obstante después de una transferencia fue posible la purificación de la cepa.

En los aislamientos se observó un micelio blanco, de consistencia esponjosa que después de 12 a 15 días llenó la caja de petri de 9 cm de diámetro (Fig. 1), tomando una consistencia compacta y después de 20 días la coloración se tornó ligeramente amarillenta, coincidiendo con lo expuesto por Nobles (1965).

4.2. Síntomas observados en campo.

Los árboles dañados presentan una baja en la producción foliar de las ramas afectadas, éstas se tornan amarillentas, con los bordes necrosados, los brotes reducen su longitud y diámetro y no se observan brotes florales en las ramas afectadas. La corteza tiende a abultarse y romperse, dando un aspecto papeloso (Fig. 2); en la madera se observa en un inicio una decoloración, como un primer efecto de la invasión e infección del patógeno, según lo indica Lorenz (1944) y Zicha (1948) y posteriormente toma una coloración blanquecina. Bajo la corteza es posible observar el crecimiento micelial del hongo (Fig. 3).

En el tallo y cuello este síntoma es muy similar, observándose un cancro cuya longitud puede ser de unos cuantos centímetros hasta invadir todo el tallo y parte de las ramas (Fig. 4). La corteza se desprende fácilmente y tanto ésta como

la madera toman una consistencia esponjosa, ésto debido a la degradación total de la lignina, celulosa y hemicelulosa por el patógeno de acuerdo a lo expuesto por Sinclair *et al.*, (1987), Blanchette (1984) y Otjen y Blanchette (1986).

En el interior de la madera, aunque no de manera general, en todas las partes afectadas del árbol pero no en todos los árboles, se observan líneas de aproximadamente 1 mm de grosor de color negro, las cuales corresponden a factores de incompatibilidad de cepas de *Polyporus versicolor* según lo expone Williams *et al.* (1981).

En las raíces se observa un descortezamiento y un necrosamiento de éstas, así como la presencia de micelio.

Durante los meses de julio, agosto, septiembre y octubre, es observable la formación de esporóforos ó basidiocarpos cuando se presenta una mayor precipitación y las condiciones de humedad son superiores al 80%. Estos se forman sobre la corteza de ramas, tallos y cuello del árbol y sobre las raíces superficiales. En árboles muertos y en trozos de madera que están semienterrados es también fácilmente observable la formación de basidiocarpos.

4.3. Identificación.

4.3.1. Por basidiocarpos.

Los basidiocarpos obtenidos presentaron una consistencia blanda a coriácea de color blanco en la superficie de los poros (Fig. 5) y con zonas multicoloreadas a manera de anillos con tonalidades negruzcas, blancas y ligeramente azulosas, de aspecto veloso (Fig. 6) las cuales en esporocarpos viejos se tornan de color negro. Presentan ligeras ondulaciones en el margen y bajo condiciones de poca humedad éste se dobla hacia el himenio (Fig. 6 y Fig. 7); estas características coinciden con las descritas por Fergus (1963), Nobles (1965) y Sepúlveda (1966) para la especie *Coriolus versicolor* (L.:Fr.) Quél.

Del número de poros por mm se detectaron 5, de forma oval con dimensiones en diámetro de $200\ \mu$ X $173\ \mu$ en promedio (Fig. 8) y una longitud (profundidad) de 600 a $850\ \mu$ (Fig. 9).

4.3.2. Por micelio.

Al observar las preparaciones fijas al microscopio, se observó un micelio de pared delgada, septado, de $3\ \mu$ de diámetro, con numerosas ramas cortas de 2 a $2.5\ \mu$ de longitud, las cuales pueden ser rectas o curvadas (Fig. 10). Donde se

encuentra la septa, en ocasiones, es común encontrar ligeros abultamientos (nódulos) de los cuales se pueden generar las ramas (Fig. 11).

4.3.3. Por su actividad enzimática.

4.3.3.1. Prueba de fenol-oxidasas en medio de cultivo.

Al sembrar en medio de cultivo malta-agar con 0.5% de ácido tánico, los aislamientos de dos semanas de edad, mostraron un cambio de coloración en el medio de cultivo en la zona de crecimiento, extendiéndose hacia la parte externa de la caja de petri (Fig. 12), indicándo con ésto que los aislamientos realizados corresponden en un primer término a un hongo que produce una pudrición blanca de acuerdo con lo que menciona Bavendamm (1928), Davidson *et al.* (1938), Kent y Kelman (1965), Nobles (1965), Sklark *et al.* (1989), entre otros, considerando el cambio de color como una prueba positiva.

Tomando en cuenta el cambio de coloración ó zona de difusión en ácido tánico, está fue de color café oscura, que se extendió a una corta distancia del margen del micelio, presentando un crecimiento micelial de 45 mm en promedio después de 7 días de haberse inoculado, por lo que con estos resultados, las cepas sometidas a la prueba pueden ubicarse en el grupo 6, según concluyen Davidson

y Campbell (1938) al caracterizar a *Coriolus versicolor*, lo que confirma que la especie aislada en cada una de las cepas corresponde a *Coriolus versicolor* (L.:Fr.) Quél.

4.3.3.2. Detección de la absorbancia en el espectrofotómetro.

La determinación de la absorbancia para cada uno de los extractos se midió 10 veces en cada sustrato (Guayacol, Catecol y l-naftol).

En cada uno de los sustratos la actividad de las enzimas fenol-oxidasas fue detectada mediante la absorbancia de una fracción del espectro de luz visible a la longitud de onda indicada por Kent y Kelman (1965) para *Coriolus versicolor* para cada sustrato: 465 nm para Guayacol (cuadro 3), 395 nm para Catecol (cuadro 4) y 525 nm para l-naftol (cuadro 5).

Para cada uno de los extractos la actividad de las fenol-oxidasas fue detectada variando únicamente el valor de la longitud de onda absorbida, detectándose los valores más altos para el caso de los extractos de medio de cultivo para los tres sustratos, seguido de los extractos de madera y finalmente el extracto de suelo.

Esta variación está determinada por la concentración de la enzima, haciendo depender directamente la velocidad de la reacción con el sustrato, de ahí que dicha absorbancia sea detectada en valores diferentes del espectro de luz visible.

Es importante señalar que la detección de una enzima, está directamente relacionada con la especificidad del sustrato hacia ésta; las enzimas fenol-oxidasas tienen la capacidad de oxidar fenoles simples y transformarlos a quinonas y los sustratos utilizados son compuestos fenólicos que tienen la capacidad de retención y activación de dichas enzimas, no obstante, bajo la longitud de onda a la que se detectaron nos indica que cada uno de estos tiene diferente afinidad química (electrónica) por ciertas áreas de la superficie de la enzima, *sitios activos* (Pelczar *et al.* 1994), teniéndose que el Catecol resulta tener una mayor afinidad por retener más rápidamente al complejo enzimático (395 nm del espectro de luz visible) que el Guayacol (465 nm) y que el 1-naftol (525 nm). Esto se explica por el hecho de que las fenol-oxidasas presentan un grupo específico de oxidación del Catecol, según lo indica Bendall y Gregory (1963).

Así pues, de acuerdo a los resultados obtenidos en el espectrofotómetro para la detección de fenol-oxidasas y medición de la absorbancia de la longitud

de honda al espectro de luz visible, estos resultados coinciden definitivamente con los expuestos por Kent y Kelman (1965) para caracterizar a *Coriolus versicolor* (L.:Fr.) Quél, indicando con ésto que, en cada uno de los extractos se detectó la presencia de esta especie.

Por otra parte, el desarrollar técnicas específicas para la detección de grupos enzimáticos únicos en una especie de hongo en particular sea por medio de espectrofotometría, cromatografía o bien electroforesis, puede reducir en gran medida el tiempo de identificación y determinación de dicha especie; sin embargo, para esto se hace necesario conjuntar en primer término los diferentes métodos de identificación para tener la certeza de que los resultados obtenidos por medio de estas técnicas correspondan a la especie que se está estudiando, como fué el caso particular en el cual *Coriolus versicolor* fue caracterizada por medio de tres tipos de identificación: uso de claves para micelio, uso de claves para basicidiocarpos y empleo de la espectrofotometría para la detección de un grupo específico de enzimas que la caracteriza.

Cuadro 3. Resultados obtenidos en las 10 determinaciones de la absorbancia del espectro de luz visible a 465 nm de longitud de onda en Guayacol.

No.	Extracto de madera	Extracto de suelo	Extracto de M.C.
1	0.059	0.001	0.063
2	0.059	0.001	0.063
3	0.059	0.001	0.063
4	0.059	0.001	0.063
5	0.059	0.001	0.063
6	0.059	0.001	0.063
7	0.059	0.001	0.063
8	0.059	0.001	0.063
9	0.059	0.001	0.063
10	0.059	0.001	0.063

M.C.=Medio de cultivo

Cuadro 4. Resultados obtenidos en las 10 determinaciones de la absorbancia del espectro de luz visible a 395 nm de longitud de onda en Catecol.

No.	Extracto de madera	Extracto de suelo	Extracto de M.C.
1	0.170	0.041	0.202
2	0.170	0.041	0.202
3	0.170	0.041	0.202
4	0.170	0.041	0.202
5	0.170	0.041	0.202
6	0.170	0.041	0.202
7	0.170	0.041	0.202
8	0.170	0.041	0.202
9	0.170	0.041	0.202
10	0.170	0.041	0.202

M.C.=Medio de cultivo

Cuadro 5. Resultados obtenidos en las 10 determinaciones de la absorbancia del espectro de luz visible a 525 nm de longitud de onda en 1-naftol.

No.	Extracto de madera	Extracto de suelo	Extracto de M.C.
1	0.105	0.008	0.189
2	0.105	0.008	0.189
3	0.105	0.008	0.189
4	0.105	0.008	0.189
5	0.105	0.008	0.189
6	0.105	0.008	0.189
7	0.105	0.008	0.189
8	0.105	0.008	0.189
9	0.105	0.008	0.189
10	0.105	0.008	0.189

M.C.=Medio de cultivo

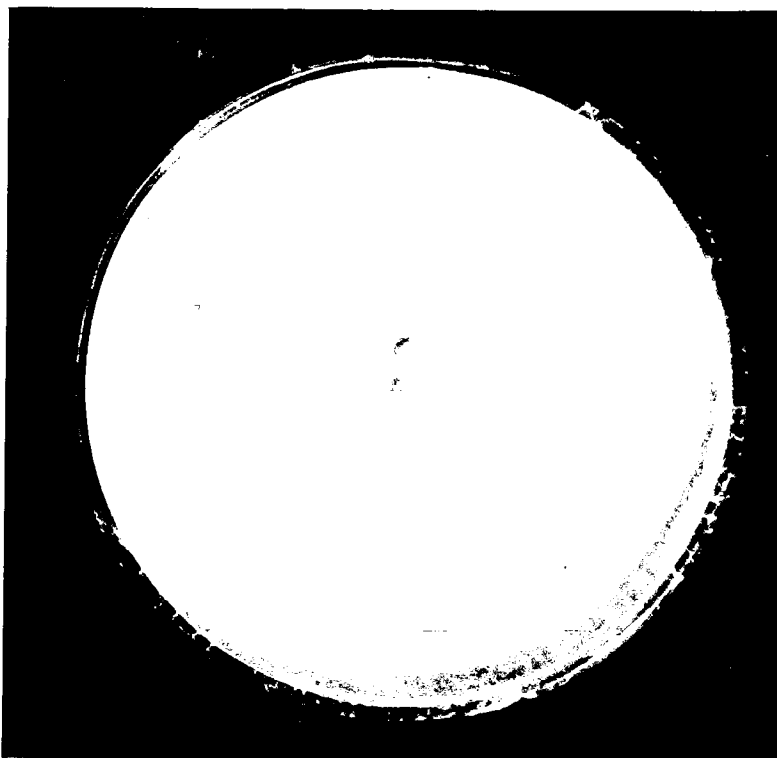


Figura 1. Desarrollo micelial in vitro de *Coriolus versicolor* (L.:Fr.) Quél.



Figura 2. Síntoma de la corteza papelosa en árboles de manzano ocasionado por *Coriolus versicolor* (L.:Fr.) Quél.



**Figura 3. Desarrollo micelial de *Coriolus versicolor* (L.:Fr.)
Quél. en árboles de manzano.**



**Figura 4. Cáncro desarrollado en
ramas de árboles de manzano.**



Figura 5. Superficie de un basidiocarpo de *Coriolus versicolor* (L.:Fr.) Quél



Figura 6. Zonas multicoloreadas y formación de anillos en la parte inferior de los basidiocarpos de *Coriolus versicolor* (L.:Fr.) Quél.



Figura 7. Zonas multicoloreadas y ondulaciones en basidiocarpos desarrollados de *Coriolus versicolor* (L.:Fr.) Quél

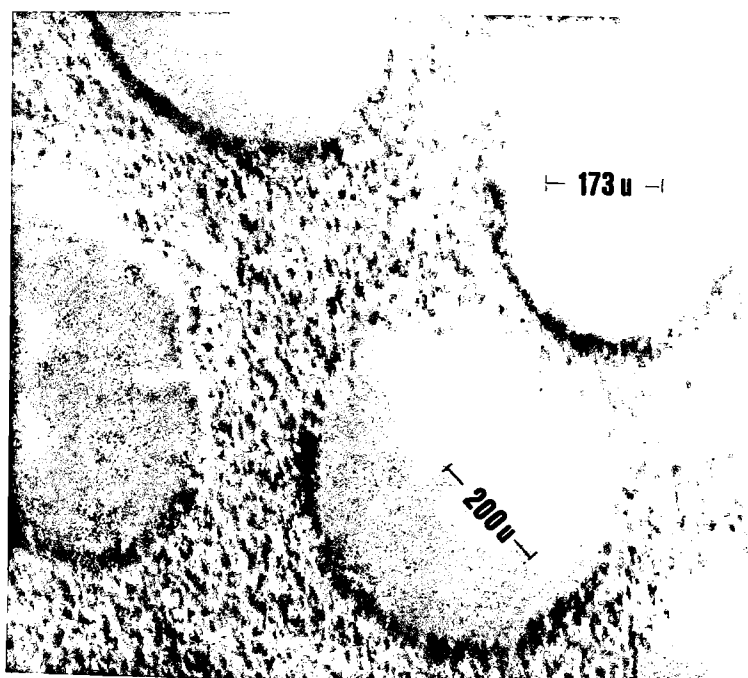


Figura 8. Dimensiones promedio de los poros de *Coriolus versicolor* (L.:Fr.) Quél.



Figura 9. Longitud y diámetro de poros del basidiocarpó de *Coriolus versicolor* (L.:Fr.) Quél

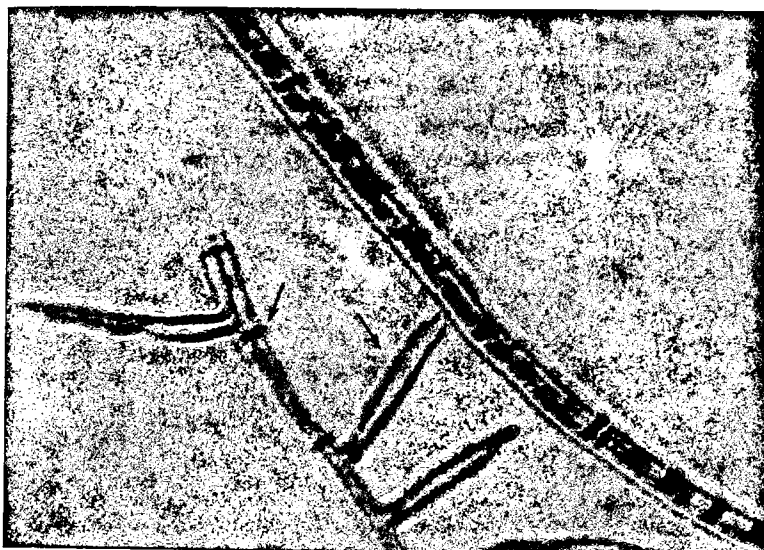


Figura 10. Septas y ramas del micelio de *Coriolus versicolor* (L.:Fr.) Quél.

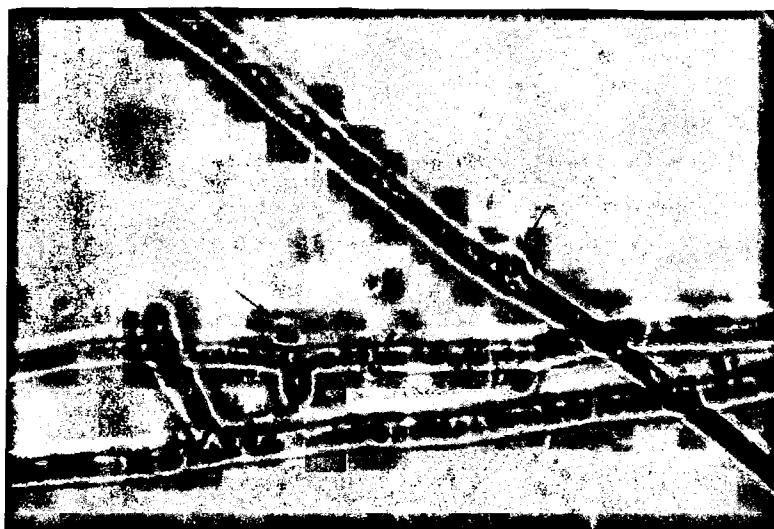


Figura 11. Desarrollo de nódulos y ramas en micelio de *Coriolus versicolor* (L.:Fr.) Quél

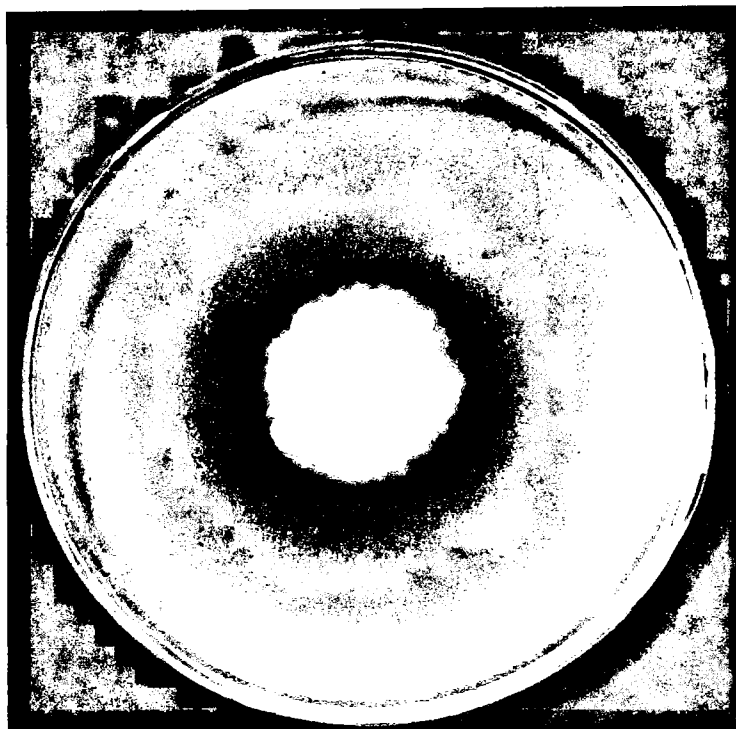


Figura 12. Prueba positiva de fenol-oxidasas en medio de cultivo Malta-Agar de *Coriolus versicolor* (L.:Fr.) Quél.

V. CONCLUSIONES.

1. En base a las características taxonómicas y descripción morfológica de estructuras (basidiocarpos), en Zacatlán, Pue. el hongo que causa una pudrición blanca en árboles de manzano corresponde a *Coriolus versicolor* (L.:Fr) Quél.
2. Todas las cepas aisladas de diferentes partes del árbol y suelo corresponden a *Coriolus versicolor* (L.:Fr) Quél, dando positiva la prueba de fenol-oxidasas en medio de cultivo malta-agar con 0.5% de ácido tánico.
3. *Coriolus versicolor* (L.:Fr) Quél genera enzimas fenol-oxidasas extracelulares como un mecanismo de degradación de la madera.
4. En base a la cuantificación de la absorbancia en Catecol, 1-naftol y Guayacol, en extractos de madera, medio de cultivo y suelo, la especie aislada corresponde a *Coriolus versicolor* (L.:Fr) Quél, comprobando así la identificación por medio de claves para micelio y basidiocarpos, así como la prueba de fenol-oxidasas en medio de cultivo.

5. *Coriolus versicolor* (L.:Fr) Qué! crea un complejo humo-enzimático apartir de enzimas fenol-oxidadas detectadas en extractos de suelo.
6. El uso de técnicas encaminadas a la detección de aspectos específicos en una especie de hongo en particular como lo fue en este caso la detección de fenol-oxidadas apartir de la absorbancia en el espectrofotómetro no sólo ayuda a corrovorar la identificación por medio de claves, sino que permite ahorrar tiempo en el proceso de dicha identificación

VI. LITERATURA CITADA.

- Bavendamm, W. 1928. Über das Vorkommen und den Nachweis von Oxydasen bei holzzerstörenden Pilzen. I. Mitteilung. Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz. 38:257-276.
- Bendall, D.S., and R.P.F. Gregory. 1963. Purification of phenol oxidases. p. 7-24. En: J.B. Pridham. Enzyme chemistry of phenolic compounds. The Macmillan Co., New York.
- Bjorkman, E., O. Samuelson, E. Ringstrom, T. Bergelk, and E. Malm. 1949. decay injuries in spruce forests and their importance for the production of chemical paper pulp and rayon pulp. K. Skogshogskolan Skr. No. 4, Stockholm.
- Blanchette, R.A. 1980. Wood decomposition by *Phellinus (Fomes) pini*: A scanning electron microscopy study. Can. J. Bot. 58:1496-1503.
- Blanchette, R.A. 1982a. Progressive stages of discoloration and decay associated with the canker-rot fungus, *Inonotus obliquus*, in birch. Phytopathology 72:1272-1277.
- Blanchette, R.A. 1982b. Decay and canker formation by *Phellinus pini* in white and balsam fir. Can. J. For. Res. 12:538-544.
- Blanchette, R.A. 1984. Screening wood decayed by white rot fungi for preferential lignin degradation. Appl. Environ. Microbiol. 48:647-653.
- Blanchette, R.A. 1984b. Selective delignification of eastern hemlock by *Ganoderma tsugae*. Phytopathology, 74: 153-160.
- Blanchette, R.A., L. Otjen, M.J. Effland, and W.E. Eslyn. 1985. Changes in structural and chemical components of wood delignified by fungi. Wood Sci. Technol. 19:35-46.

- Blanchette, R.A., L. Orjen and M.C. Carlson. 1987. Lignin Distribution in Cell Walls of Birch Wood Decayed by White Rot Basidiomycetes. *Phytopathology*. 77:684-690.
- Boddy, L., and A.D.M. Rayner. 1983. Origins of decay in living deciduous trees: the role of moisture content and a reappraisal of the expanded concept of tree decay. *New Phytol.* 94:623-641.
- Boidin, J. 1951. Recherche de la tyrosinase et de la laccase chez les Basidiomycetes en culture pure. Milieux différentiels. Intérêt Systématique. *Rev. Mycol.* 16:173-197
- Bonilla Ch., J.E. y P. Macias C. 1994. Manejo Integrado de las enfermedades radicales del manzano (*Mallus pumilla* Mill.) en Zacatlán, Pue. Tesis Profesional. Univ. Aut. Chapingo. Chapingo, México.
- Boyce, J.S. 1961. Forest pathology. 3rd. ed. McGraw-Hill, New York.
- Cowling, E.C. 1961. Comparative biochemistry of the decay of sweetgum sapwood by white-rot and brown-rot fungi. U.S. Dep. Agric. Tech. Bull. No. 1258.
- Cowling, E.C., and W. Brown. 1969. Structural features of cellulosic materials in relation to enzymatic hydrolysis. En: Cellulases and their applications. Adv. Chem. Ser. 95. American Chemical Society, Washintong, D.C. pp. 142-187.
- Davidson, R.W., W.A. Campbell, and Dorothy J. Bleisdell. 1938. Differentiation of wood-decaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. *J. Agr. Res.* 57:683-695.
- Dill, Y., and G. Kraepelin. 1986. Palo podrido: model for extensive delignification of wood by *Ganoderma applanatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:1305-1312.
- Etheridge, D.E. 1957. Differentiation of white and brown rot fungi by an oxidase reaction. *Nature* 179:921-922.

- Farr D., Bills G.F., Chamuris G.P., and A.Y. Rossman. 1989. Fungi on plants and plant products in the United States. APS Press. St. Paul, Minnesota. USA.
- Fähraeus, G. 1949. On the oxidation of phenolic compounds by wood rotting fungi. Ann. Roy. Agr. Coll. Sweden 16:618-629.
- Fähraeus, G. 1953. Induction of laccase formation in *Polyporus versicolor*. p. 130-135. Int. Congr. Microbiol. Rep., Proc. 6th Congr. Rome, 1953.
- Fergus, C.L. 1963. Illustrated Genera of Wood Decay Fungi. Burgess Publishing Company. Pennsylvania. U.S.A.
- Gilbertson, R.L. 1980. Wood-rotting fungi of North America. Mycologia 72:1-49
- Gilbertson R.L. and L. Ryvarden. 1987. North American Polypores. Vol. 2. Fungiflora. Oslo-Norway.
- Golovleva, L.A., N.M. Nyasoedova, B.P. Baskunov and V.I. Shevchenko. 1989. Degradation of model beta-1 and beta-0-4 lignin compounds by the fungi *Panus tigrinus* and *Coriolus versicolor*. Mikrobiologiya 58(2): 256-261 (Abst).
- Henningsson, B., M. Henningsson, and T. Nilsson. 1972. Defibration of wood by the use of a white-rot fungus. Research notes No. 78. Royal College of Forestry. Stockholm.
- Higuchi, T. 1953. Biochemical study of wood-rotting fungi. Studies on the enzymes which cause Bavendamm's reaction. J. Japan. Forestry Soc. 35:77-85.
- Higuchi, T., Y. Kawamura, and Y. Havashi. 1956. Biochemical study of wood rotting fungi. V. Enzymic oxidation of lignin. J. Japan Wood Res. Soc. 2:31-35.
- Hubert, E.E. 1924. Diagnosis of decay in wood. J. Agric. Res. 29:523-567.
- Hubert, E.E. 1931. An outline of forest pathology. John Wiley and Sons. Inc. New York.

- INEGI, 1991. Anuario Estadístico de los Estados Unidos Mexicanos. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. México.
- INEGI, 1992. Anuario Estadístico de los Estados Unidos Mexicanos. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. México.
- INEGI, 1992a. Anuario Estadístico del Estado de Puebla. Inst. Nac. de Est. Geografía e Informática. México.
- INEGI, 1994. El sector Alimentario en México. Comisión Nacional de Alimentación. México.
- Jørgensen, E., and K. Vejlby. 1953. A new polyphenol oxidase test. *Physiol. Plantarum*. 6: 533-543.
- Kent, K.T. and A. Kelman. 1964. Color formation on phenol-containing media as related to lignin breakdown by wood rotting basidiomycetes. *Phytopathology* 54:897-898.
- Kent K.T. and A. Kelman. 1965. Lignin Degradation as Related to the Phenoloxidases of Selected Wood-Decaying Basidiomycetes. *Phytopathology*. 55: 739-745
- Kirk, T.K. 1975. Lignin-degrading enzyme system. *Biotechnol. Bioenz. Symp.* 5:139-150
- Law, Kathleen. 1959. A role of the laccase of wood-rotting fungi. *Physiol. Plantarum*. 12:854-861.
- Lépiz, L.R. 1988. Control químico de la cenicilla *Podosphaera leucotricha* (E y E) Salm. y roña del manzano *Venturia inaequalis* (Wke) Wint. en Zacatlán, Pue. Tesis Profesional. UACH. Departamento de Parasitología Agrícola. Chapingo, México.
- Liese, W. 1970. Ultrastructural aspects of woody tissue disintegration. *Ann. Rev. Phytopathol.* 8:231-257.
- Lorenz, R.C. 1944. Discolorations and decay resulting from increment borings in hardwoods. *J. Forest.* 4237-43

- Lyr, H. 1958. Über den Nachweis von Oxydasen und Perosidasen bei höheren Pilzen und die Bedeutung dieser Enzyme für die Bavendammreaktion. *Planta*. 50:359-370.
- Manion P.D. 1991. Fungi as agents of tree disease wood decay. En: *Tree Disease Concepts*. Second Edit. Prentice-Hall. New Jersey. pp. 225-284
- Mayaudon J. and J.M. Sarkar. 1975. Laccases de *Polyporus versicolor* dans le sol et la litière. *Soil. Biol. Biochem.* 7:31-34.
- Mayer, M.A. 1966. Catechol oxidase. Enzyme liberation from sugar beet chloroplast. *Phytochem.* 5:1297-1301.
- Mieir, H. 1955. Decomposition of the cell wall by wood-destroying fungi and the submicroscopic structure of tracheids of spruce and wood fibers of birch (translation No. 92. Department of the Secretary of State of Canada, February 1956). *Holz Roh Werkst.* 13:323-338.
- Miller, O. 1989. *Mushrooms of north America*. E.P. Dutton & Co. Inc., New York.
- Mosbach, R. 1963. Purification and some properties of laccase from *Polyporus versicolor*. *Biochem. Biophys. Acta* 73:204-212
- Nobles, M.K. 1965. Identification of culture of wood-inhabiting hymenomycetes. *Can. J. Bot.* 43:1097-1139
- Otjen, L. 1985. Variation in wood decay patterns caused by white rot basidiomycetes. M.S. thesis. University of Minnesota. St. Paul. pp. 26-46.
- Otjen, L. 1985. *Xylobolus frustulatus* decay of oak: patterns of selective delignification and subsequent cellulose removal. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:670-676
- Otjen, L., and Blanchette, R.A. 1986. A discussion of microstructural changes in wood during decomposition by white rot basidiomycetes. *Can. J. Bot.* 65:905-913.

- Pelczar, M.J., Reid, R.D. y E.C.S. Chan. 1994. Microbiología. 4ta. Edit. McGrawHill. México.
- Preston, A., and E.I. McLennan. 1948. The use of dyes in media for distinguishing between brown and white wood-rotting fungi in culture. *Ann. Bot.* 7:53-64.
- Romero C.,S. 1988. Hongos fitopatógenos. Patronato Universitario. Univ. Aut. Chapingo. Chapingo, México.
- Scheeffe, T.C. 1936. Progressive effects of *Polyporus versicolor* on the physical and chemical properties of red gum sapwood. U.S.D.A. Tech. Bull. 527.
- Sepúlveda De León, G. 1966. Estudio preliminar sobre la familia Polyporaceae en algunas localidades de la Sierra Madre Oriental en Nuevo León. Tesis. Escuela de Ciencias Biológicas. Universidad de Nuevo León.
- Shigo, A.L. 1965. The pattern of decays and discolorations in northern hardwoods. *Phytopathology* 55:648-652.
- Shigo, A.L. 1967. Successions of organisms in discolorations and decay of wood, p. 237-299. En: *Int. Rev. Forest. Res.* II. Academic Press, New York.
- Shigo, A.L. 1967. The early stages of discoloration and decay in living hardwoods in northeastern United States: A consideration of wound-initiated discoloration and heartwood, 14th Int. Union Forest. Res. Organ. Congr., Munich, Germany, 1967, Proc. 9, Sect. 41:117-133.
- Shigo, A.L. and E.M. Sharon. 1968. Discoloration and Decay in Hardwoods Following Inoculations with Hymenomycetes. *Phytopathology*. 58:1493-1498
- Sinclair, W.A., H.H. Lyon and W.T. Johnson. 1987. Diseases of Trees and Shrubs. Comstock Publishing Associates. Cornell University Press. U.S.A.

- Szklarz, G. and A. Leonowicz. 1986. Cooperation between fungal laccase and glucose oxidase in the degradation of lignin derivatives. *Phytochemistry* 25(11):2537-2539
- Szklarz, G.D., R.K. Antibus, R.L. Sinsabaugh, and A.E. Linkins. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. *Mycologia* 81(2):234-240
- Vliet, W.F. van. 1954. The enzymatic oxidation of lignin. *Biochem. Biophys. Acta.* 15:211-216.
- Wayne, W.W. 1965. Fundamental Characteristics of Wood Decay. *Forest Products Journal.* 15(7):255-259
- Wilcox, W.W. 1968. Changes in wood microstructure through progressive stages of decay. U.S. For. Serv. Res. Pap. FPL-70.
- Williams, E.N.D., N.K. Todd and D.M. Rayner. 1987. Spatial development of populations of *Coriolus versicolor*. *New Phytol.* 89:307-319
- Yoshida, N., Fukushima T., Saho H., Shimosaka M., and M. Okazaki. 1989. Cellulose and Xylan Degrading Enzymes of the Plant Pathogenic Fungus, *Fusarium oxysporum* SUF850. *Agric. Biol. Chem.* 53(7):1829-1836.
- Zycha, H. 1948. Über die Kernbildung und verwandte Vorgänge im Holz der Rotbuche forstwiss. Centralbl. 67:80-109

