



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DIVISIÓN DE CIENCIAS FORESTALES

**CANCROS DEL CEDRO BLANCO (*Cupressus lusitanica* Mill)
POR *Seiridium unicorne* (Cooke & Ellis) Sutton y
Pestalotiopsis funerea (Desm.) Steyaert**

TESIS

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

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN CIENCIAS FORESTALES**

PRESENTA:

ALEJANDRO ROMERO LÓPEZ

**Chapingo, Texcoco, Edo. de México
Diciembre de 2006**



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
D.EPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



**CANCROS DEL CEDRO BLANCO (*Cupressus lusitanica* Mill)
POR *Seiridium unicorne* (Cooke & Ellis) Sutton y
Pestalotiopsis funerea (Desm.) Steyaert**

Tesis realizada por **Alejandro Romero López** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

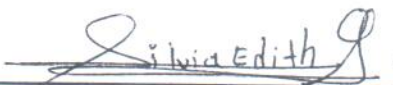
MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

DIRECTOR:



DR. DAVID CIBRIÁN TOVAR

ASESOR:



M. en C. SILVIA EDITH GARCÍA DÍAZ

ASESOR:



DR. JOSÉ TULIO MÉNDEZ MONTIEL

Chapingo, Texcoco; Estado de México
Diciembre de 2006

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a la Universidad Autónoma Chapingo y a la División de Ciencias Forestales; instituciones que contribuyeron para la realización de mis estudios de postgrado y de este trabajo de investigación.

Especialmente, a los integrantes del Comité Asesor: Dr. David Cibrián Tovar, M. en C. Silvia E. García Díaz, Dr. José Tulio Méndez Montiel; por su disposición para dirigir y revisar todo el proceso de investigación.

Por su valioso apoyo, al personal Técnico que labora en el Área de Patología Forestal de la DICIFO y compañeros Óscar Trejo y Bonifacio Don Juan.

DEDICATORIA

A mi esposa Blanca e hijos Heidy y David, mi inspiración; a mis padres Martha y Fernando y hermanas Georgina y Blanca, por su aliento.

A todas las personas que en algún momento y de alguna manera apoyaron mis estudios de postgrado.

A la memoria de mi hermano.

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor es nativo (16 de septiembre de 1974) de San Mateo Ixtacalco, Cuautitlán; México. Realizó estudios básicos en el mismo municipio.

En 1989-1992 realizó estudios a nivel Medio Superior en el Centro de Estudios Científicos y Tecnológicos "Miguel Othón de Mendizábal", del Instituto Politécnico Nacional. Para después ingresar, en 1992, a la Universidad Autónoma Chapingo y cursar la licenciatura en la División de Ciencias Forestales, obteniendo el Título de Ingeniero Forestal con Orientación en Silvicultura.

De 1997 a 1998 laboró en la prestación de Servicios Técnicos Forestales en la zona centro-norte del estado de Veracruz; En el periodo de 1999-2000, en la asesoría a Organizaciones no Gubernamentales y en 2000-2003 en el Área de Protección Ambiental de la Comisión Federal de Electricidad, Residencia Regional Sureste.

De enero de 2004 a diciembre de 2005 cursó los créditos de la Maestría en Ciencias Forestales, de la Universidad Autónoma Chapingo, con el tutoraje del Dr. David Cibrián Tovar.

Socio fundador y presidente de la empresa CAMEF, S. C., en 2006; actualmente presta Servicios Técnicos en Manejo Forestal e Impacto Ambiental.

CANCROS DEL CEDRO BLANCO (*Cupressus lusitanica* Mill) POR *Seiridium unicorne* (Cooke & Ellis) Sutton Y *Pestalotiopsis funerea* (Desm.) Steyaert.

CANKERS OF MEXICAN CYPRESS (*Cupressus lusitanica* Mill) BY *Seiridium unicorne* (Cooke & Ellis) Sutton AND *Pestalotiopsis funerea* (Desm.) Steyaert.

Alejandro Romero López¹ David Cibrián Tovar²

RESUMEN

Se aislaron dos hongos patógenos (*Seiridium unicorne* y *Pestalotiopsis funerea*) de ramillas moribundas, con los cuales se realizaron pruebas de patogenicidad en arbolitos de *Cupressus lusitanica*, probando dos métodos de inoculación: por inserción y por punción. Se evaluó el porcentaje de plantas infectadas, analizando la patogenicidad de los hongos; mediante un análisis de varianza y comparación de medias de tratamientos. Ambos hongos mostraron ser patógenos, y el método más eficaz de inoculación resultó ser por punción. Los síntomas provocados por *Seiridium unicorne* y *Pestalotiopsis funerea* mostraron un comportamiento similar y corresponden a un cancro; aunque estos hongos se siguen considerando como patógenos débiles en *C. lusitanica*.

Palabras claves: patogenicidad, *Cupressus lusitanica*, *Seiridium unicorne*, *Pestalotiopsis funerea*.

ABSTRACT

Two pathogens was isolated (*Seiridium unicorne* and *Pestalotiopsis funerea*) from dying branchelets for pathogenity tests in young trees of *Cupressus lusitanica* in order of testing two inoculation methods: by insertion and stngs. Percentage of infected plantas was evaluated, analyzing the pahogenicity of fungi, with analysis of variance and means comparison of treatment. Both fungi showed pathogenicity, and the stings were the best method of inoculation. The *Seiridium unicorne* and *Pestalotiopsis funerea* symptoms showed a similar behavior; corresponding to a canker; although this fungi still are considered as weak pathogens on *C. lusitanica*..

Key words: pathogenicity, *Cupressus lusitanica*, *Seiridium unicorne*, *Pestalotiopsis funerea*.

¹ Tesista

² Director de Tesis

CONTENIDO

	Página
1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	3
2.1. Objetivo general.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. Revisión de literatura.....	4
3.1. Cedro blanco (<i>Cupressus lusitanica</i> Mill).....	4
3.1.1. Clasificación taxonómica.....	4
3.1.2. Descripción botánica	4
3.1.3. Distribución.....	6
3.1.4. Estatus de protección.....	7
3.1.5. Uso en dasonomía urbana.....	7
3.2. Cancros por <i>Seiridium</i> Nees en el género <i>Cupressus</i>	8
3.2.1. Taxonomía.....	8
3.2.2. Teleomorfos.....	10
3.2.3. Importancia y distribución.....	10
3.2.4. Hospedantes.....	11
3.2.5. Diagnósis.....	12
3.2.6. Desarrollo de la enfermedad.....	13
3.2.7. Manejo.....	15
3.3. Cancros por <i>Pestalotiopsis funerea</i> (Desm.) Steyaert. en <i>Cupressus</i>	17
3.3.1. Taxonomía.....	17
3.3.2. Teleomorfos.....	17
3.3.3. Importancia y distribución.....	17
3.3.4. Hospedantes.....	18
3.3.5. Diagnósis.....	19
3.3.6. Desarrollo de la enfermedad.....	21
3.3.7. Manejo.....	22

4. Materiales y métodos.....	23
4.1. Descripción del área de estudio.....	23
4.2. Colecta de material vegetativo.....	24
4.3. Descripción de la sintomatología.....	24
4.4. Procesamiento del material vegetativo.....	24
4.5. Procedimiento de aislamiento y purificación de la cepa.....	25
4.5.1. Elaboración de preparaciones.....	29
4.6. Pruebas de patogenicidad.....	29
4.6.1. Métodos de inoculación.....	30
4.7. Toma de datos.....	33
4.7.1. Descripción de los síntomas y signos.....	33
4.7.2. Elaboración de preparaciones.....	34
4.8. Reaislamiento del hongo inoculado.....	34
4.9. Comparación de síntomas.....	35
4.10. Diseño experimental	35
4.11. Identificación del agente causal	35
5. Resultados y discusión.....	38
5.1. Diagnóstico.....	38
5.1.1. Sintomatología en campo y características microscópicas de <i>Seiridium</i>	38
5.1.2. Sintomatología en campo y características microscópicas de <i>Pestalotiopsis</i>	41
5.2. Aislamiento de los patógenos.....	43
5.2.1. Desarrollo de las colonias de <i>Seiridium</i>	43
5.2.1. Desarrollo de las colonias de <i>Pestalotiopsis</i>	45
5.3. Pruebas de patogenicidad.....	47
5.3.1. Sintomatología	47
5.3.1.1. Sintomatología en arbolitos tratados con PDA puro.....	47
5.3.1.2. Sintomatología en arbolitos inoculados con <i>Seiridium</i>	48
5.3.1.3. Sintomatología en arbolitos inoculados con <i>Pestalotiopsis</i>	49

5.3.2. Reaislamientos.....	52
5.4. Análisis estadístico.....	53
5.5. Identificación del Agente Causal.....	56
5.5.1. Medición de conidios de <i>Seiridium</i>	56
5.5.2. Medición de conidios de <i>Pestalotiopsis</i>	58
6. Conclusiones.....	62
7. Bibliografía.....	63
Anexos.....	68

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Número de tratamientos y repeticiones para las pruebas de patogenicidad en arbolitos de <i>Cupressus lusitanica</i>	36
Cuadro 2. Características morfológicas de las colonias obtenidas de reaislamientos de <i>Seiridium</i> en <i>Cupressus lusitanica</i>	52
Cuadro 3. Características morfológicas de las colonias obtenidas de reaislamientos de <i>Pestalotiopsis</i> en <i>Cupressus lusitanica</i>	52
Cuadro 4. Porcentaje de plantas infectadas en cada tratamiento aplicado en la inoculación en <i>Cupressus lusitanica</i> . Chapingo, México; 2006.....	53
Cuadro 5. Análisis de varianza para el porcentaje de infección de <i>Cupressus lusitanica</i> , infectados con <i>Seiridium unicorne</i> y <i>Pestalotiopsis funerea</i>	54
Cuadro 6. Comparación de medias con la prueba de Tukey para el porcentaje de infección de <i>Cupressus lusitanica</i> , infectados con <i>Seiridium unicorne</i> y <i>Pestalotiopsis funerea</i>	54
Cuadro 7. Dimensiones de los conidios de <i>Seiridium</i> obtenidos de <i>Cupressus lusitanica</i> en diferentes etapas en Chapingo, México.....	58
Cuadro 8. Dimensiones de los conidios de <i>Pestalotiopsis</i> obtenidos de <i>Cupressus lusitanica</i> en diferentes etapas en Chapingo, México.....	59

NDICE DE FIGURAS

Figura1. Punción en la corteza de la rama para inoculación.....	31
Figura 2. Incisión en la corteza de la rama para inoculación por inserción.....	31
Figura 3. Condiciones y sintomatología de <i>Seiridium</i> en condiciones de campo.....	40
Figura 4. Condiciones y sintomatología de <i>Pestalotiopsis</i> en condiciones de campo.	42
Figura 5. Estructuras microscópicas de <i>Seiridium</i> y <i>Pestalotiopsis</i>	43
Figura 6. Desarrollo de la colonia de <i>Seiridium</i> sp. obtenido de <i>Cupressus lusitanica</i>	45
Figura 7. Desarrollo de la colonia de <i>Pestalotiopsis</i> sp. obtenido de <i>Cupressus lusitanica</i>	46
Figura 8. Sintomatología de las plantas de <i>Cupressus lusitanica</i> inoculadas en el tallo.	50
Figura 9. Sintomatología de las plantas de <i>Cupressus lusitanica</i> inoculadas en el tallo con <i>Seiridium</i> y <i>Pestalotiopsis</i>	51

1. INTRODUCCIÓN

En las áreas arboladas urbanas de México, el cedro blanco (*Cupressus lusitanica* Mill) es una de las especies empleadas con mayor frecuencia en ciudades con climas templados y fríos. Este árbol posee ventajas como una buena adaptabilidad a los suelos y buen crecimiento, que junto con su carácter estético, lo han convertido en un árbol exitoso en estos escenarios. Sin embargo, bajo las condiciones propias del entorno urbano, el escaso manejo del arbolado y con la continua agresividad de agentes patógenos, el árbol llega a ser susceptible al ataque de ciertas plagas y enfermedades. Se ha observado una condición sanitaria en cedros blancos plantados en zonas urbanas y periurbanas; en muchos de los árboles se presentan síntomas típicos de los canchros, enfermedad causante de una muerte progresiva de ramillas y ramas que, en algunos casos, termina con un daño en gran parte del árbol. Esta situación, observada en árboles sobremaduros o que crecen en situaciones de sitio desfavorables, sumada al ataque de otros organismos, ha provocado la muerte de algunos individuos.

A nivel mundial se tienen reportes de canchros ocasionando daños de diferentes magnitudes en especies del género *Cupressus*; sin embargo en México no se ha generado la información en cantidad suficiente para determinar específicamente los patógenos causantes de canchros asociados a los cipreses que se emplean en plantaciones urbanas o que se encuentran de manera natural en este país. En varias partes del mundo, se mencionan canchros producidos por el género *Seiridium* Nees, principalmente de las especies *S. unicornis* (Cooke et Ell.) Sutton,

S. cardinale (Wagener) Sutton & Gibson y *S. cupressi* (Guba) atacando árboles del género *Cupressus*; aunque también se tienen reportes de *Seiridium* ocasionando enfermedades en *Chamaecyparis*, *Juniperus*, *Platycladus*, *Calocedrus*, *Taxodium*, *Thuja* y *Cryptomeria* (Sinclair y Lyon, 2005); incluso se han obtenido aislamientos de *Sequoia*, *Tsuga* (Funk, 1981) y *Eucalyptus* (Barnes et al., 2001). Otro hongo patógeno formador de canchros en cupresáceas es *Pestalotiopsis* spp, cuya distribución se ha extendido ampliamente en el mundo, frecuentemente en asociación con otros hongos en árboles enfermos (Funk, 1981).

En México existe el riesgo en árboles que viven en ambientes urbanos, éstos pueden ser infectados por estos hongos formadores de canchros. Los cedros se distribuyen de manera natural en gran parte del país y las poblaciones naturales también pueden ser atacadas si se presentan condiciones ambientales desfavorables para los árboles. Lo anterior adquiere importancia debido a que *Cupressus lusitanica* Mill. es una especie protegida por la legislación ambiental mexicana.

La frecuencia de esta sintomatología justificó la realización de esta investigación con el objetivo identificar los Agentes Causales de estas enfermedades y conocer su patogenicidad en *Cupressus lusitanica* Mill., una especie de gran importancia ecológica y ornamental. Con la generación de estos conocimientos, se tendrán las condiciones para realizar propuestas sustentadas de manejo de la enfermedad y de esta manera, revertir un proceso potencial de declinación en el cedro blanco, ya sea en las áreas urbanas o en zonas donde se distribuye de manera natural.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Identificar a los Agentes patógenos que causan canchros en árboles de *Cupressus lusitanica* Mill.

2.2. Objetivos específicos

Aislar a los patógenos de árboles enfermos de *Cupressus lusitanica* Mill., procedentes del área de influencia de la Universidad Autónoma Chapingo.

Realizar pruebas de patogenicidad con los hongos aislados en *Cupressus lusitanica* Mill, probando dos métodos de inoculación (punción e inserción).

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Cedro blanco (*Cupressus lusitanica* Mill)

3.1.1. Clasificación taxonómica

Reino Plantae

División Espermatofita

Subdivisión Gimnospermae

Orden Coniferales

Familia Cupressaceae

Género y especie: *Cupressus lusitanica* Mill.

Sinonimias: *Cupressus lindleyi* Klotzsch ex Endl., *Cupressus lusitanica* Mill. [var.] *lindleyi* (Endl.) Carr., *Cupressus benthamii* Mill. var. *lindleyi* (Endl.) Masters

3.1.2. Descripción botánica

La descripción de la especie se basó en el trabajo realizado por Belmonte (2001), acerca del estado del conocimiento de esta especie en México. *Cupressus lusitanica* Mill. es un árbol de 10 a 30 metros de altura (hasta 40 m), presenta una corteza grisácea fibrosa, dividida en placas irregulares y angostas, su espesor varía de 10 a 25 mm.

Hojas: las de las últimas ramillas son largamente ovadas, agudas, imbricadas con el ápice ligeramente separado, en ocasiones brevemente mucronulado, miden de 1.5 a 2 mm de largo por 1 mm de ancho con borde blanquizco; dorso convexo o levemente deprimido, con una glándula pequeña, oval, situada en la región cercana a la parte media, a veces casi invisible. Las hojas de los ejes son ovales o rómbicas, acuminadas y agudas; miden de 2.5 a 3 mm de largo y llevan una glándula angosta situada hacia el ápice.

Ramas: son extendidas o ligeramente ascendentes, que forman una copa cónica, especialmente en los árboles jóvenes. Las ramillas primarias son de color moreno rojizo oscuro algo violáceo, con la superficie lisa y a veces cenicienta.

Inflorescencias masculinas: son terminales de forma oval, de color amarillento, de casi 4 mm de largo, en la parte terminal de las ramillas; estos conos están formados por 14 a 16 escamas anchamente ovadas o casi suborbiculares, de 2 mm de ancho, con el borde eroso y abrigan cada una, excepto las apicales, 4 saquitos de polen.

Frutos: son globosos y se ven frecuentemente en las axilas de las ramillas secundarias y, a veces, en las primarias; están formados por 6-8 escamas, vagamente subcuadrangulares, gruesas y rugosas son solitarios pero próximos, de modo que suelen aparecer en conjuntos de seis o más; se encuentran insertados sobre pedúnculos de 5 a 8 mm y miden de 12 a 15 mm de diámetro, a

veces hasta 20 (abiertos). Las brácteas son salientes y agudas, visibles sobre todo en frutos tiernos.

Semillas: presentan forma subtriangular, son oblongas, aplastadas, de color castaño amarillento, con ala marginal bien distinta. Hay alrededor de 70 semillas por cono, miden unos 4 mm de largo por 2.5 mm de ancho.

Fenología: follaje perennifolio, floración de febrero a abril, fructificación en otoño e invierno, polinización anemófila, regeneración regularmente por semillas, presenta una dispersión anemócora, la producción de conos se inicia entre los 2 y 5 años, especie de rápido crecimiento, vive de 40 a 60 años de plantación.

3.1.3. Distribución

De manera natural, crece en la asociación vegetal del bosque de coníferas, bosque de encino y bosque mesófilo de montaña, en altitudes de los 1,400 a los 3,300 mnsn y con una temperatura media de 21.6° C. Dentro del género *Cupressus* en México, *Cupressus lusitanica* es la especie de más amplia distribución que se extiende desde Chihuahua y Sonora y, después hacia el sur, comprendiendo los Estados de Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Michoacán, Jalisco, Nayarit, Guanajuato, México, Guerrero, Veracruz, Puebla, Oaxaca y Chiapas, y después más allá, hasta Guatemala (McVaugh, 1992).

3.1.4. Estatus de protección

Aunque es una especie frecuentemente cultivada con fines ornamentales o ecológicos, las poblaciones naturales de la especie, dentro de los bosques mesófilos, se han visto afectadas por la intensa perturbación a la que se ven sometidos estos ecosistemas. Es una especie *Sujeta a protección especial*, según la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001.

3.1.5. Uso en dasonomía urbana

El cedro blanco o ciprés mexicano es de las especies más utilizadas, gracias a su rápido crecimiento; en el ambiente urbano se desarrolla bastante bien, en suelos que no presentan estructura, con poca riqueza, poco profundos y con drenaje deficiente. En el Bosque de Chapultepec, por ejemplo, los géneros con mayor frecuencia encontrados son *Cupressus*, *Taxodium*, *Fraxinus* y *Ligustrum*. A nivel de especies, las más frecuentes son *Cupressus lindleyi*, *Taxodium mucronatum*, *Fraxinus americana*, *Ligustrum japonicum* y *Ligustrum lucidum* Tovar (1982). En cuanto al arbolado en las calles de Ciudad de México, las cinco especies más abundantes son *Fraxinus uhdei*, *Ligustrum lucidum*, *Erythrina coralloides*, *Salix bonplandiana* y *Cupressus lindleyi* López-Moreno y Díaz-Betancourt (1991). Chacalo (1991) en un estudio realizado en la Delegación Miguel Hidalgo, de la Ciudad de México, encuentra 24 especies en 231 árboles registrados, las especies más abundantes fueron *Erythrina coralloides*, *Fraxinus uhdei*, *Cupressus sempervirens*, *Jacaranda mimosifolia*, *Cupressus benthamii*, *C. lindleyi*, *Ficus*

elastica y *Ligustrum lucidum*; asimismo, menciona que el género *Cupressus* es el género que tiene menos problemas y que parece ser ideal para las calles, tanto por su talla como por su ramificación.

Específicamente en la Universidad Autónoma Chapingo, un inventario dasonómico realizado por Gutiérrez (1997) mostró que *Cupressus lusitanica* es la segunda especie más frecuente en el Campus, solamente después de *Fraxinus uhdei*.

3.2. Cancros por *Seiridium* Nees en el género *Cupressus*

3.2.1. Taxonomía

El género *Seiridium* (Coelomycetes: Melanconiales) se ubica en la familia Melanconiaceae, caracterizada por presentar los conidióforos agrupados dentro de un estroma delgado sumergido o acérvulo (Kiffer y Morelet, 1999).

Los cancros en las cupresáceas por *Seiridium* son causados por al menos tres especies que se presentan alrededor del mundo: *S. cardinale*, *S. cupressi* y *S. unicornis* (Sinclair y Lyon, 2005).

Swart (1973) citado por Funk (1985) considera a *Seiridium cardinale* (Wagener) Sutton & Gibson (= *Coryneum cardinale* Wagener) como una variante de *Monochaetia unicornis*, posteriormente transfiere *Monochaetia unicornis* a

Seiridium unicorne (Cooke et Ell.) Sutton debido a que el género *Monochaetia* es caracterizado por conidios con cuatro septos.

La taxonomía de los agentes causales del cancro en cipreses ha sido objeto de un considerable debate. Guba y Boesewinkel citados por Barnes *et al.* (2001) diferencian las tres especies de *Seiridium* asociados con canchros en los cipreses basándose en la presencia o ausencia de apéndices conidiales, y en el ángulo de estas estructuras en relación al eje principal de los conidios. Aunque *S. cardinale* es distinto, teniendo conidios sin apéndices o muy cortos, *S. cupressi* tiene apéndices que siguen la curvatura del conidio. Los apéndices de *S. unicorne* están en ángulos rectos con el eje principal del conidio. Otros taxónomos consideran que el ángulo que forman los apéndices es insuficiente para separar las especies y por lo tanto, sugieren que *S. cupressi* and *S. unicorne* representan una sola especie.

Se realizaron estudios basados en DNA ribosomal para resolver el debate taxonómico y deducir relaciones filogenéticas; sin embargo, la variación de las secuencias usando esos genes falló para distinguir las tres especies de *Seiridium* asociadas con los canchros de cipreses y algunos autores llegaron a concluir que una especie morfológicamente variable causaba esta enfermedad; sin embargo la caracterización de las especies de *Seiridium* basada en secuencias de β -tubulina e histona realizada por Barnes *et al.* (2001), mostraron que son tres especies de *Seiridium* las responsables de estas serias enfermedades, soportando las investigaciones bioquímicas y morfológicas basadas en el ángulo de los apéndices

y en la producción de toxinas, considerando a *S. cardinale*, *S. unicorn* y *S. cupressi* como distintos taxas. En este mismo estudio, concluyen que *S. unicorn* y *S. cupressi* son virtualmente indistinguibles basándose en la morfología, también que *S. unicorn* es ligeramente diferente de *S. eucalypti* y probablemente representen una sinonimia.

3.2.2. Teleomorfos

El estado sexual de *S. cupressi* es *Lepteutypa cupressi* (Xilariales, Amphispheariaceae), *S. cardinale* tiene un estado perfecto no descrito, observado solamente en California; mientras que el estado sexual de *S. unicorn* no se conoce (Sinclair y Lyon, 2005).

3.2.3. Importancia y distribución

Estos hongos (*Seiridium* spp) han causado severos daños en África, Japón, la región Mediterránea, Nueva Zelanda y en el oeste de los Estados Unidos; *Seiridium cardinale* es la más agresiva de las tres (Tuset e Hinarejos, 1995), comenzó destruyendo poblaciones de *Cupressus macrocarpa* y *C. sempervirens* en California en la década de 1920, y de ahí se transportó globalmente, después comenzó a devastar *C. sempervirens* plantados en la región Mediterránea; *S. unicorn*, también distribuido a nivel mundial en regiones templadas, causa daños notables en varias especies de cupresáceas en Japón y Nueva Zelanda y daños esporádicos en el centro-sur y sureste de los Estados Unidos; *S. cupressi* ha

causado daños principalmente en el este de África y Nueva Zelanda, en varias especies de *Cupressus* (Sinclair y Lyon, 2005).

En Costa Rica, se reporta afectando *C. lusitanica*; en Guatemala provoca la muerte en árboles de 13-15 años de edad (CATIE, 1991).

3.2.4. Hospedantes

El género *Seiridium* ataca no solamente a la familia cupressaceae, sino a otras como la taxodiaceae o la myrtaceae; del género *Cupressus*, se ha reportado *S. unicorn* en *Cupressus arizonica*, *C. sempervirens* (Tisserat y Barnes, 1991); así como en *C. lusitanica* y *C. macrocarpa* (Barnes et al., 2001); *S. cardinale* se reporta en *C. sempervirens* (Barnes et al., 2001), que es una especie altamente susceptible (Tuset e Hinarejos, 1995), en *C. macrocarpa*, ocasionando los daños más severos (Scharpf, 1993; Tuset e Hinarejos, 1995). Finalmente, *S. cupressi* ha encontrado en *C. sempervirens* y otras especies del mismo género (Barnes et al., 2001).

Sinclair y Lyon (2005) agrupan las especies de *Cupressus* por clases de susceptibilidad: las más susceptibles son *C. macrocarpa*, *C. sempervirens* y *Cupressocyparis leylandii*; *Cupressus arizonica*, *C. goveniana* y *C. lusitanica*, son dañadas por cepas de patógenos que prevalecen en algunas regiones; mientras que las especies que ocasionalmente se infectan en la naturaleza o que son

relativamente resistentes en pruebas incluyen *Cupressus bakeri*, *C. forbesii*, *C. macnabiana*, *C. goveniana* subsp. *pygmaea* y *C. torulosa* (Sinclair y Lyon, 2005).

3.2.5. Diagnosis

Los canchros pueden definirse como lesiones localizadas (áreas muertas) en los tejidos del cambium y la corteza que se extiende desde la herida; asociados generalmente a heridas o algún tipo de daño mecánico (Tattar, 1989).

Seiridium cardinale ataca los troncos jóvenes, ramas y estróbilos inmaduros; los síntomas inician con pequeñas emisiones de resina, si se elimina la corteza de estas zonas, se observa un ligero oscurecimiento de los tejidos corticales, poco tiempo después, la necrosis aparece en el exterior, acompañada de resina; esta área necrótica se va ensanchando en sentido transversal y especialmente, en el sentido longitudinal, para formar un típico cancro no muy perceptible en los primeros estadios, más tarde, los tejidos afectados se deprimen y se fisuran hasta dejar ver el leño; la reacción de los tejidos corticales dan lugar a un crecimiento hipertrófico e hiperplásico. Si la necrosis de los tejidos corticales alcanza la circunferencia completa de la rama o del tallo, la parte por encima de la zona afectada empieza a perder el color verde, apareciendo tonalidades amarillentas (color paja); más tarde, toda la rama o la parte de la copa se seca; también se producen defoliaciones, quedando desnuda la rama, que se torna de un color ceniciento (Tuset e Hinarejos, 1995).

Los árboles pequeños afectados de manera agresiva pueden morir dentro de un año. Los árboles mayores pueden entrar en declinación durante varios años, por el efecto acumulativo de múltiples canchros. La muerte es apresurada por la deficiencia de agua y a veces por insectos, notablemente por especies de *Phloeosinus* (descortezadores), que atacan árboles debilitados (Sinclair y Lyon, 2005).

Los signos en las tres especies son similares, los cuerpos fructíferos (de forma intermedia entre picnidios y acérvulos) que se desarrollan en los canchros, aparecen como pústulas negras dispersas de 0.3-1.5 mm de diámetro que rompen a través de la superficie de la corteza y abren ampliamente durante un clima húmedo. Los conidios se exudan mientras la corteza esté mojada, éstos están divididos en seis celdas y miden 17-37 x 6-10 m; la razón longitud/ancho es de 2.5-3 en *S. cardinale*, 4-8 en *S. cupressi*, y 3.2-3.9 en *S. unicorni*. Las celdas apicales son puntiagudas e incoloras; las cuatro celdas centrales son de color café olivo a café oscuro. Los conidios de *S. cupressi* y *S. unicorni* tienen apéndices incoloros en cada extremo (Sinclair y Lyon, 2005).

3.2.6. Desarrollo de la enfermedad

Los hongos que causan canchros usualmente son parásitos facultativos, generalmente se les encuentra creciendo como saprófito sobre la corteza de árboles vivos y en ramas muertas, tanto en el árbol como en el suelo, una lesión es el evento clave en la formación de un cancro; con la lesión presente y un

hospedante en condiciones de susceptibilidad, el hongo puede invadir la corteza saludable y producir un cancro. Una secuencia típica del desarrollo de un cancro es como sigue (Tattar, 1989): el patógeno ingresa al hospedante a través de una herida, invade y comienza a matar la corteza sana, usualmente durante un periodo de dormancia; el hospedante intenta limitar la invasión del patógeno mediante la formación de una capa callosa en el límite del tejido infectado; el patógeno invade el tejido calloso durante el siguiente periodo de dormancia; el hospedante forma un nuevo callo. Los dos últimos pasos pueden repetirse cada año durante toda la vida del hospedante, la forma del cancro resultante será determinada por la velocidad de movimiento del patógeno y de la cantidad de callo formado.

En el caso de *Seiridium cardinale*, sólo cuando la humedad alrededor del tallo y de las ramas del ciprés se encuentra por encima del 80% y la temperatura supera los 22° C, se inicia el proceso de infección (Tuset e Hinarejos, 1995).

Según Graniti (1998), muchas infecciones comienzan por salpicadura de gotas que llevan conidios durante la temporada de lluvias, las ramillas de 1- 4 cm en diámetro son las primeras infectadas y después sirven como fuentes de conidios y permiten que la enfermedad se disperse a otras ramas y al fuste. El parásito coloniza la corteza y el floema. Entra al hospedante directamente por heridas y es incapaz de penetrar a directamente la pared peridérmica secundaria; crece dentro de la corteza y floema secundario, con penetración ocasional al cambium, rayos medulares y capas superficiales de la albura. En el frente de avance del crecimiento hifal se forman y liberan metabolitos tóxicos, los cuales generan la

muerte de las células que en conjunto crean las áreas necrosadas (Woodward, 1992).

La producción de picnidios y conidios ocurre varias semanas después de muerta la rama, si prevalece un clima benigno y húmedo. El desarrollo de los picnidios se interrumpe durante un clima cálido y seco. Los conidios son dispersados localmente con el salpicamiento o arrastrados por el agua, los de *S. cardinale* son capaces de sobrevivir varias semanas sobre el follaje expuesto de los cipreses y por más de un año en condiciones secas y protegidas (Sinclair y Lyon, 2005).

3.2.7. Manejo

De acuerdo con Tuset e Hinarejos (1995), estas medidas tienen como misión la eliminación de las fuentes de infección (inóculo). Aquellos cipreses muertos o gravemente enfermos por el cancro, que se presentan solos o en grupos pequeños (focos de infección), deben ser cortados y posteriormente quemados (erradicación); esto reduce considerablemente la cantidad de inóculo y es necesario si se quiere mantener una zona o plantación exenta de la enfermedad durante un tiempo prudencial (varios años).

En los cipreses donde se observen los primeros síntomas de la enfermedad o el desarrollo del cancro todavía no ha causado daños graves, es conveniente eliminar toda el área de la corteza afectada, así como cortar las ramas que muestran síntomas de deshidratación (color café claro). Esta cirugía debe suprimir

todos los tejidos necrosados hasta alcanzar los sanos, inmediatamente después, la herida debe ser tratada con una solución de benomil o carbendazim al 0.15% de producto comercial, tratamiento que puede repetirse de los 10 a 15 días. Esta técnica necesita de personal especializado por lo tanto, únicamente se puede emplear en jardinería y en cipreses de alto valor. Estos fungicidas detienen el desarrollo de este hongo en los primeros estadios de la infección y colonización de los tejidos corticales del ciprés. Por ello, tanto el benomil como el carbendazim solos o mezclados con otros fungicidas, deben ser aplicados en primavera cuando se observan los primeros exudados gomosos y continuar las aplicaciones durante el inicio del verano. Posteriormente en otoño, si la resina sigue fluyendo, se pueden realizar una o dos aplicaciones más. El tratamiento debe ser a todo el ramaje, insistiendo en las áreas o zonas de infección (Torres, 1998).

En zonas comerciales o residenciales, un apropiado establecimiento y cuidado son la mejor defensa contra *Seiridium*; plantar cipreses en suelos sueltos y enriquecidos para fomentar el vigor del árbol. Evitar riegos excesivos y estrés por el calor para mantener cipreses saludables. Para minimizar la pérdida de humedad, y la competencia por agua con otras especies como los pastos, agregar *mulch* en un área de varios piés alrededor, más allá del límite de las ramas más bajas. Tener cuidado especial con los árboles localizados cerca de vialidades, áreas pavimentadas o edificios que reflejen el calor y proveer una adecuada irrigación durante los periodos de sequía. Los materiales producto de las podas sanitarias deben ser quemados y desinfectar las herramientas con alcohol o cloro (Martínez *et al.*, 2003).

3.3. Cancros por *Pestalotiopsis funerea* (Desm.) Steyaert. en *Cupressus*

3.3.1. Taxonomía

Pestalotiopsis funerea (Coelomycetes: Melanconiales) también se ubica en la familia Melanconiaceae, caracterizada por presentar los conidióforos agrupados dentro de un estroma delgado sumergido o acérvulo (Kiffer y Morelet, 1999).

La mayoría de las especies de *Pestalotiopsis* fueron anteriormente clasificadas como *Pestalotia*, sin embargo la reclasificación fue incompleta y muchos hongos deberían ser reclasificados (Sinclair y Lyon, 2005; Nag Raj, 1985 (a,b,c)).

3.3.2. Teleomorfos

En Estados Unidos y Canadá, se presentan más de 50 especies de *Pestalotiopsis* y de los pocos estados perfectos que se conocen, se pueden mencionar a los géneros *Broomella* y *Pestalosphaeria* (Xylariales; Amphisphaeriaceae), (Sinclair y Lyon, 2005).

3.3.3. Importancia y distribución

Las especies del género *Pestalotopsis* están asociadas frecuentemente con varias enfermedades, incluyendo cancros; estos hongos tienen muchos hospedantes y pueden encontrarse fructificando en tejidos muertos o pueden estar creciendo en

partes de plantas enfermas o aparentemente sanas. Generalmente colonizan tejidos que se han hecho susceptibles por la sobremadurez, daños por otros patógenos o insectos, nevadas u otros daños. *P. funerea* es un patógeno comprobado, se presenta a nivel mundial, habitando principalmente en gimnospermas; ha sido asociada también con *Damping off*, pudrición del cuello y la raíz de plántulas, tizones, muerte descendente de ramillas y canchros en el tronco (Sinclair y Lyon, 2005). *P. funerea* es un hongo habitual de muchas especies del género *Cupressus*. Puede afectar a plantas adultas, pero su mayor incidencia se produce en la etapa joven de las mismas; la actividad parasitaria la desarrolla casi exclusivamente en las hojas y las ramitas. *P. funerea*, exceptuando los casos directamente influenciados por los factores predisponentes, muestra en los países mediterráneos, en general, el comportamiento de un típico parásito de debilidad con un desarrollo poco perjudicial para las plantaciones de cipreses. En los viveros, los riegos frecuentes y por aspersión, que mantienen en estos establecimientos una humedad atmosférica elevada, provocan la diseminación de los conidios de este hongo y su infección (Tuset e Hinarejos, 1995).

3.3.4. Hospedantes

Pestalotiopsis funerea es un hongo habitual de muchas especies del género *Cupressus*; en condiciones parecidas, los conidios de *P. funerea* germinan más fácilmente en los tejidos foliares de *C. sempervirens*, que en los de *C. arizonica* y *C. glabra*; esto explicaría porqué la primera especie mencionada se comporta como un huésped habitual de este hongo (Tuset e Hinarejos, 1995).

Las especies de *Pestalotiopsis* se asocian con plantas en tres niveles de interacción: algunas son endófitas, residiendo en hojas y corteza aparentemente saludables; algunas son patógenos; y muchas colonizan partes de plantas muriendo e recientemente muertas. Algunas especies tienen los tres roles en sucesión. *P. funerea*, un endófito y patógeno de muchas gimnospermas, es un ejemplo. Los géneros hospedantes incluyen *Araucaria*, *Calocedrus*, *Cedrus*, *Chamaecyparis*, *Cryptomeria*, *XCupressocyparis*, *Cupressus*, *Ginkgo*, *Juniperus*, *Picea*, *Pinus*, *Pseudotsuga*, *Sequoia*, *Taxus*, *Thuja* y *Tsuga*. El comportamiento oportunista de *Pestalotia* y *Pestalotiopsis* causa cientos de enfermedades en las plantas (Sinclair y Lyon, 2005).

3.3.5. Diagnosis

Pestalotiopsis funerea es encontrada usualmente en plantas estresadas o dañadas por otros agentes o condiciones ambientales. La parte vegetativa aérea se presenta empobrecida de ramaje y de hojas. El ciprés atacado detiene su crecimiento, prácticamente monopódico, perdiendo su esbeltez característica y adquiere un aspecto más ramificado. Las hojas y las ramillas comienzan a perder el color verde, apareciendo tonalidades amarillentas. Mas tarde toda la rama y la parte terminal del tallo se deshidratan, marchitan y finalmente se secan, dando lugar a una disminución del área foliar de la planta. No hay formación del típico cancro en las ramas y en el tallo, ni exudados de resina y áreas de la corteza necrótica. En la corteza de las ramillas, ramas y tallo, así como en las hojas secas

después de algunas semanas aparecen las fructificaciones esporíferas de este hongo (Tuset e Hinarejos, 1995).

Las especies de *Pestalotiopsis* producen en cuerpos fructíferos que se desarrollan debajo de la epidermis de las hojas, tallos, frutos y algunas partes florales. Los cuerpos fructíferos varían con la especie y pueden ser acervulares o picnidiales y la mayoría miden 75-35 μm de diámetro. Cuando se humedece el tejido de la planta que contiene los cuerpos fructíferos, las masas de conidios en una matriz pegajosa rompen la epidermis y empujan hacia arriba, como pequeñas gotas negras brillantes; bajo condiciones más secas, como pequeñas lengüetas negras en forma de cuerno (cirros) que pueden alcanzar longitudes de 2 mm. Cuando se presenta la humedad por lluvia o rocío, la matriz de conidios se disuelve y una película de esporas se propaga fuera, alrededor del cuerpo fructífero. Las esporas son dispersadas por el salpicamiento, por el agua corriente y presumiblemente también por insectos (Sinclair y Lyon, 2005).

Los conidióforos son hialinos, ramificados, de hasta 24 μm de longitud y 1.5-3 μm de anchura. Se forman a partir de la capa interna superior del estroma basal y de las paredes del conidioma. Las células conidiógenas son hialinas, cilíndricas, holoblásticas, ampuliformes, de dimensiones 6-14 x 1.5-2 μm . Los conidios son fusiformes oblongos, rectos o ligeramente curvados, lisos, un poco constreñidos en los tabiques, de 20-31 x 7-9 μm . Poseen cuatro tabiques y cinco celdas. Las tres celdas interiores son de color marrón oscuro y las de los finales hialinas. La

célula apical es cónica y es portadora en su extremo de un número variable de cilios (4 ó 5), de 8-19 x 0.7-1 μm ; la basal es truncada y posee insertado centralmente un apéndice endógeno de 2-4 μm de longitud. En PDA, *P. funerea* produce un denso micelio blanco que crece entre 2 y 3 cm/día a 22-25° C y está formado por hifas hialinas y tabicadas, 1-3.2 μm de anchura y distancia entre tabiques 7-15 μm ; en este medio, los conidiomas acervulares se producen a partir de los 20-25 días y, generalmente, no son muy numerosos (Tuset e Hinarejos, 1995).

3.3.6. Desarrollo de la enfermedad

Para la infección, este hongo necesita casi ineludiblemente tejidos debilitados; la germinación de los conidios se ve favorecida cuando las hojas o los parénquimas corticales de las ramitas se encuentran parcialmente deshidratados. Si la humedad del ambiente es superior al 70% y la temperatura es de 18-27° C, los conidios de *P. funerea* germinan y los tubos germinativos que no forman comúnmente apresorios, a través de las discontinuidades existentes en la cutícula, roturas, fisuras o heridas de la epidermis y la peridermis, penetran en los parénquimas foliares o corticales, causando la infección. La colonización de estos tejidos es rápida, provocando la deshidratación y, en pocos días, un número considerable de conidiomas acervulares son formados en la superficie de los mismos. Tejidos parcialmente deshidratados y una humedad atmosférica elevada son los requisitos para el desarrollo de *P. funerea*; por ello, tiempo húmedo por lluvias o nieblas, condiciones de invernadero o riegos por aspersión favorecen la

expansión de este hongo, así como su capacidad patógena (Tuset e Hinarejos, 1995).

3.3.7. Manejo

Al comportarse *Pestalotiopsis funerea* como un parásito de debilidad, su control se consigue siempre colocando siempre a los cipreses en las mejores condiciones cultivo. En árboles que muestran un estado de buen vigor, la incidencia de este hongo no se produce o es insignificante. Por ello, las prácticas culturales bien hechas son suficientes para mantener los cipreses exentos del ataque de este parásito. La presencia de *P. funerea* puede llegar a niveles preocupantes cuando exista una alta humedad ambiental, en estos casos, es recomendable realizar dos o tres tratamientos en primavera y verano con una mezcla de benomilo 50% al 0.1-0.2% o carbendazim 50% al 0.1-0.2% y oxiclورو de cobre 50% al 0.2-0.3% o mancozeb 80% al 0.15-0.2%. Estas aplicaciones de fungicidas, mojando bien todo el ramaje de los cipreses, si van acompañados de una reducción o supresión del riego por aspersión, mantienen al árbol sin la presencia activa del hongo (Tuset e Hinarejos, 1995).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Descripción del área de estudio

Las muestras de material enfermo corresponden a la especie *Cupressus lusitanica* Mill, colectadas de árboles enfermos ubicados en el Campus de la Universidad Autónoma Chapingo; el aislamiento, cultivo, purificación de cepas e identificación de los patógenos se realizó en el Laboratorio de Patología Forestal; mientras que la etapa de inoculación se realizó en el invernadero; ambas instalaciones pertenecen a la División de Ciencias Forestales, en la Universidad Autónoma Chapingo.

El área de estudio se localiza entre las coordenadas geográficas 98° 53' de Longitud Oeste y 19° 30' de Latitud Norte, a una altitud de 2 240 metros. El clima de esta zona corresponde, según la clasificación de Köppen, modificada por García, al tipo C (W₀) (w)b(i)'g, clasificado como templado subhúmedo con lluvias en verano y poca variación térmica. La temperatura máxima promedio es de 23.5° C, la mínima promedio es de 6.3° C y la media anual de 17.1° C (Martínez, 2000). Es importante mencionar que por su ubicación cercana a las ciudades de Texcoco y zona conurbada de la Ciudad de México, los árboles del campus universitario reciben los efectos de un ambiente urbano, principalmente en lo referente a la contaminación del aire; además de estar sujetos al manejo (podas, riegos) y al maltrato humano, así como a condiciones de sitio propias de un ambiente urbano, como la composición, contaminación y compactación del suelo.

4.2. Colecta de material vegetativo

El material vegetativo identificado como enfermo se cortó del árbol con el empleo de pinzas o garrocha, generalmente se colectaron solamente ramillas. Este material se introdujo a bolsas de polietileno para ser trasladado al laboratorio de la División de Ciencias Forestales, en la Universidad Autónoma Chapingo. Cada bolsa con material enfermo se identificó anotando el sitio de colecta, el hospedante, la parte del árbol de la cual fue obtenida la muestra, la fecha de colecta, las condiciones generales del árbol y las condiciones del sitio. Una vez en el laboratorio, las muestras que no se procesaron inmediatamente se conservaron en refrigeración, a una temperatura no mayor a los 5° C.

4.3. Descripción de la sintomatología

En los lugares de la colecta de material enfermo, se describieron y fotografiaron los síntomas característicos que presentaron los individuos afectados, a nivel de ramillas, ramas y árboles completos.

4.4. Procesamiento del material vegetativo

El material colectado se procesó para obtener el aislamiento del hongo, siguiendo las técnicas descritas más adelante. El resto de las muestras se utilizó para hacer cortes de las estructuras y elaborar preparaciones microscópicas temporales que se observarán al microscopio. Para la realización de las preparaciones, se

realizaron cortes manuales, finos de aproximadamente 50 μm , estos fueron colocados en un portaobjetos con glicerina deshidratada y azul de metileno como colorante, con la ayuda de un mechero con alcohol se calentaron para aclarar y ablandar el tejido, bajo el estereoscopio se seleccionaron los mejores cortes, estos se colocaron en un portaobjetos con un anillo de cera de 1 cm de diámetro, en el interior se colocó una gota de glicerina deshidratada y azul de metileno, una vez realizada la operación con la ayuda de dos alfileres entomológicos se liberaron los cuerpos fructíferos, encima de la cera se colocó el cubreobjetos y se pasó sobre fuego lento, con la finalidad de derretir la cera y así la preparación quedó sellada; esto facilita su manejo y su preservación. En el microscopio compuesto a 10x, 20x y 40x se realizaron las observaciones de las características morfológicas del patógeno.

4.5. Procedimiento de aislamiento y purificación de la cepa

Todo el material colectado fue observado al microscopio estereoscópico para localizar lesiones y buscar cuidadosamente los signos de los patógenos.

- A) En algunas ramas se eliminó la corteza y donde se encontraba la interfase vivo/muerto se tomaron pequeños pedazos de material vegetal.
- B) En las ramillas muertas donde existían los cuerpos fructíferos del hongo, se sembraron conidios directamente al medio de cultivo.

Para el caso del inciso A, el procedimiento para su aislamiento y purificación fue el siguiente:

- a) Se cortó material vegetal en porciones cuadradas de aproximadamente 0.25 cm de lado, las cuales fueron lavadas en tres cajas Petri con agua destilada estéril, pasando de una en una.
- b) Estos mismos pedazos de material vegetal se pasaron a una caja Petri previamente esterilizada, conteniendo una solución desinfectante de hipoclorito de sodio al 1.5%, durante 3 minutos.
- c) El siguiente paso fue pasarlas a tres cajas consecutivas que contenían agua destilada estéril con la finalidad de ser enjuagados.
- d) Las porciones de material vegetal fueron colocados en papel filtro previamente esterilizado, para eliminar el exceso de agua.
- e) Con la ayuda de una aguja de disección se realizó la siembra de los tejidos enfermos en Papa-Dextrosa-Agar (PDA).
- f) Cada caja Petri sembrada se selló con parafilm para evitar posible contaminación por otros hongos y ácaros, se etiquetaron con los siguientes datos: nombre del hongo, medio de cultivo, fecha de siembra y hospedante.

- g) Las cajas donde se siembra se colocan en la estufa a una temperatura de 26° C y se realizaron observaciones cada 24 horas.
- h) Cuando se presentó el crecimiento micelial alrededor de las porciones de material vegetativo sembrados, se transfirió micelio libre de contaminantes y/o bacterias a nuevas cajas con medio de cultivo puro, con la finalidad de purificar las colonias.
- i) Una vez obtenida la colonia pura, se transfirieron porciones pequeñas de crecimiento micelial a tubos de ensaye, que contenían medio de cultivo PDA inclinado. Los tubos, se depositaron en un vaso de precipitado, el cual se mantuvo tapado con una bolsa de polietileno para evitar contaminación, este vaso se colocó en la estufa a una temperatura de 26° C y una vez que el crecimiento micelial cubrió la superficie del medio de cultivo en el tubo, se agregó aceite mineral esterilizado para conservarlos en el cepario del Laboratorio de Patología Forestal de la DICIFO.

Para el caso del inciso B, el aislamiento y purificación se realizaron de la manera siguiente:

- a) Las ramillas muertas donde se observaron cuerpos fructíferos, se lavaron con agua corriente.

- b) En condiciones de asepsia y con la ayuda de una aguja de disección se realizó la siembra de los cuerpos fructíferos en medio de cultivo Agua-Agar (PDA), que contenía 3 gotas de ácido láctico por cada medio litro, ya que el ácido láctico inhibe el crecimiento de bacterias.
- c) Cada caja Petri sembrada se selló con parafilm para evitar posible contaminación por otros hongos y ácaros, se etiquetaron con los siguientes datos: nombre del hongo, medio de cultivo, procedencia y fecha de siembra.
- d) Las cajas donde se sembraron los conidios se colocaron en la estufa a una temperatura de 26° C y se realizaron observaciones cada 24 horas.
- e) Cuando se presentó el crecimiento micelial alrededor de los cuerpos fructíferos sembrados, se tomó micelio libre de contaminantes y/o bacterias y se transfirió a nuevas cajas con medio de cultivo puro.
- f) Una vez obtenida la colonia pura, se transfirieron porciones pequeñas de crecimiento micelial a tubos de ensaye, con medio de cultivo PDA inclinado, para su preservación.
- g) Estos tubos, se depositaron en un vaso de precipitado tapado con una bolsa de polietileno para evitar contaminación, este vaso se colocó en la estufa a una temperatura de 26° C y una vez que el crecimiento micelial

cubrió la superficie del medio de cultivo en el tubo, se agregó aceite mineral esterilizado para conservarlos.

En ambos procedimientos, se conservaron en cajas Petri los posibles patógenos, para realizar las pruebas de patogenicidad y así cumplir con los postulados de Koch.

4.5.1. Elaboración de preparaciones

De las estructuras que fructificaron en las cajas Petri, se realizaron preparaciones temporales y permanentes con la finalidad de observar las características y realizar las mediciones para su identificación.

4.6. Pruebas de patogenicidad

Para estas pruebas fue necesario la inoculación del hongo en árboles de *Cupressus lusitanica* sanos, con la finalidad de conocer el comportamiento de la enfermedad, se inocularon con dos cepas (*Seiridium* sp y *Pestalotiopsis* sp) y un testigo; las cepas se obtuvieron en el proceso de aislamiento y purificación.

Los arbolitos inoculados se obtuvieron del Vivero Forestal de Coyoacán, D.F., de la especie *Cupressus lusitanica*, de una altura promedio de 1.50 m, libres de plagas y enfermedades.

4.6.1. Métodos de inoculación

La parte inoculada fue el tallo principal. La metodología para la inoculación se describe a continuación:

Con la ayuda de un sacabocado de 0.6 cm de diámetro se hicieron discos en las cajas Petri que contenían PDA puro, PDA con micelio sin estructuras para *Seiridium* y PDA con micelio con estructuras en el caso de *Pestalotopsis*, las cuales corresponden a los siguientes tratamientos:

- a) Se practicaron dos métodos de inoculación el primero fue por punción. Una vez obtenido el disco de PDA con micelio de las cajas, éste se colocó (en un medio aséptico) sobre la superficie limpia del tallo; con la ayuda de la aguja de una jeringa para insulina se realizaron varias punciones sobre el disco, procurando llegar hasta el cámbium. Con esta acción se provocó la invasión del tejido micelial y /o de las estructuras fructíferas al interior del tejido del arbolito, para facilitar la infección. El disco se cubre con una gasa estéril húmeda.
- b) El otro método de inoculación fue por inserción. Con la ayuda de una navaja desinfectada al contacto con la flama del mechero de alcohol se realiza una incisión de aproximadamente 0.8x0.8 cm en la forma que aparece en la figura 2, hasta dejar a la vista la epidermis.

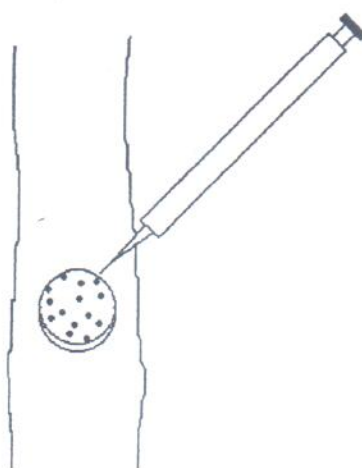


Figura1. Punción en la corteza de la rama para inoculación

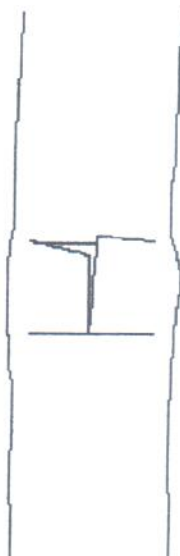


Figura 2. Incisión en la corteza de la rama para inoculación por inserción.

Una vez realizada la incisión y separando los dos extremos se coloca con la ayuda de una aguja de disección estéril el disco de acuerdo al tratamiento, éste se cubre con la corteza. La herida se cubre con una gasa estéril húmeda.

En ambos métodos y con la finalidad de proporcionar humedad al inóculo se realizaron las siguientes acciones:

- c) Con la ayuda de un atomizador se le agrega agua destilada estéril a la gasa.
- d) La gasa húmeda se cubre con papel Parafilm.
- e) Sobre el papel Parafilm se colocan dos porciones de algodón húmedo, uno a cada extremo del mismo, y se cubre con papel Parafilm.
- f) Con el atomizador que contenía el agua destilada estéril se rocía un trozo de polietileno transparente y se coloca alrededor del tallo cubriendo totalmente la zona inoculada, atándolo arriba y abajo con hilo para sellarlo y evitar la pérdida de humedad.

Ya que Romero (1993) menciona que el factor temperatura es uno de los factores que más afectan el crecimiento y esporulación de los hongos; en general, los hongos crecen normalmente entre los 25 y 32° C; y además que requieren de una humedad alta para la colonización y esporulación, se decidió llevar a cabo la siguiente acción:

- g) Las plantas inoculadas se colocaron dentro de un compartimento dentro del invernadero anexo a la División de Ciencias Forestales. Manteniendo la

humedad relativa en un promedio de 60% con la ayuda de un humidificador y a una temperatura promedio de 24° C, con la ayuda de tres calentadores eléctricos y controlada automáticamente.

- h) La bolsa de polietileno se retiró cada tercer día, con la ayuda del atomizador se le agrega agua destilada estéril a la gasa que cubría la herida con inóculo y se cubrió nuevamente la gasa con papel parafilm.
- i) La gasa húmeda se retiró a los 8 días, tiempo estimado para que ocurriera la infección.
- j) Los arbolitos permanecieron en un ambiente con temperatura y humedad controlados durante 80 días, realizándose observaciones cada tercer día después de retirar las gasas húmedas y cada semana durante el tercer mes. Los riegos a los arbolitos se proporcionaron 2 veces por semana.

4.7. Toma de datos

Se procedió a la toma de datos, resaltando lo siguiente:

4.7.1. Descripción de los síntomas y signos

Se anota la fecha de evaluación, tratamiento, repetición, longitud de la lesión (en largo y ancho) y observaciones donde se describan los signos, síntomas y eventos

importantes de la enfermedad que se vayan presentando a través del tiempo de evaluación: tales como cambios de coloración de la corteza y follaje, presencia y desarrollo de cuerpos fructíferos, muerte de ramas, etc.

4.7.2. Elaboración de preparaciones

Una vez que las plántulas inoculadas mostraron signos, se procedió a realizar preparaciones siguiendo la misma metodología que para las muestras inicialmente colectadas, descrita en el punto 4.4.

4.8. Reaislamiento del hongo inoculado

Una vez que se presenten los síntomas y signos del cancro inoculado, se procedió a realizar el reaislamiento del hongo; para esto se siguió la metodología descrita en el inciso A del punto 4.5 para los aislamientos originales. Durante el reaislamiento, se registraron los eventos más representativos como son: aspecto de la colonia, coloración del micelio, tiempo en el que produce los cuerpos fructíferos y tamaño de la colonia. La colonia obtenida en los reaislamientos se compara con la cepa original.

4.9. Comparación de síntomas

Una vez obtenidos los síntomas que registraron las plántulas inoculadas, se procedió a compararlas con las presentes en los árboles afectados en campo, y los descritos en la revisión de literatura.

4.10. Diseño experimental

Para la identificación del agente causal, se compararon los resultados obtenidos en el aislamiento y purificación, reisolamiento, elaboración de preparaciones y medición de estructuras con los descritos en la revisión de literatura de libros especializados en este hongo.

4.11. Identificación del agente causal

Para la realización de las pruebas de patogenicidad se establecieron 6 tratamientos, con 3 repeticiones para cada uno de ellos, cada repetición (unidad experimental) constó de tres arbolitos, a las cuales se les determinó el porcentaje de infección por la inoculación; de manera que se tuvieron 36 plantas inoculadas y 18 testigos, resultando un total de 54 arbolitos tratados. Los tratamientos obtenidos de las 6 diferentes combinaciones se muestran en el cuadro 1.

Los tratamientos se manejaron en un arreglo factorial de 2x3 en un diseño completamente al azar, los factores considerados fueron:

a) Primer factor: cepas (tres niveles)

b) Segundo factor: método de inoculación (dos niveles)

Cuadro 1. Número de tratamientos y repeticiones para las pruebas de patogenicidad en arbolitos de *Cupressus lusitanica*.

Cepa	Método de inoculación	Número del tratamiento	Siglas del Tratamiento	Repeticiones
<i>Seiridium</i>	Inserción	01	SI	3
	Punción	02	SP	3
<i>Pestalotiopsis</i>	Inserción	03	PI	3
	Punción	04	PP	3
Testigo	Inserción	05	TI	3
	Punción	06	TP	3

Lo que caracteriza a este tipo de diseño son los tratamientos que surgen a partir de todas las combinaciones que es posible formar con los diferentes niveles de los factores en estudio (Rebolledo, 2002). Esto permitió obtener resultados de cada una de los factores de manera individual y además obtener el efecto de la interacción entre los factores estudiados. La ventaja de este experimento factorial es que el efecto de cada factor se estima con la misma precisión que se obtendría si todo el experimento se dedicara a ese solo factor (Santizo, 2004).

La asignación de los diferentes tratamientos a cada una de las unidades experimentales fue completamente al azar.

El análisis estadístico de los datos registrados en la conclusión del experimento se realizó con el empleo del paquete estadístico SAS (versión 8.1). La variable medida en las pruebas fue el porcentaje de plantas infectadas por tratamiento. Como los resultados obtenidos se expresaron en porcentaje, fue necesario usar la técnica de transformación angular, que permite expresar un conjunto de observaciones que no se distribuyen de manera normal a una escala en la cual se alcanza la normalidad. Una vez transformados los datos se procedió a realizar el análisis de varianza y la prueba de comparaciones múltiples de medias por el método de Tukey ($\alpha = 0.05$).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Diagnósis

5.1.1. Sintomatología en campo y características microscópicas de *Seiridium*

Los árboles donde se colectaron las muestras se caracterizaron por estar en dos condiciones de sitio diferentes: los primeros, árboles en la periferia del Campus Universitario, en etapa de sobremadurez, con buena captación de luz y espaciamientos grandes, pero en condiciones de sitio difíciles como suelos compactados y sin riegos; los segundos, árboles jóvenes en las áreas verdes dentro del Campus Universitario compitiendo con otros por espacio y luz, creciendo sobre suelos no compactados y a los cuales se les aplican riegos, aunque no de manera frecuente (figura 3).

La sintomatología observada en estos árboles se describe a continuación y se ilustra en la figura 3.

- a) Ramillas (de un centímetro de diámetro o menores) con un color rojizo o parduzco, defoliadas o con hojas secas que permanecen en la ramilla. Esta situación se presenta en pequeñas áreas localizadas principalmente en la parte baja de la copa.

- b) Ramillas muertas a partir de la zona afectada por el hongo, en algunas, las hojas permanecen en la ramilla y adquieren un color rojizo por debajo de la zona afectada, es posible observar hojas verdes.
- c) En algunos casos se observa la formación de un cancro, donde la zona lesionada se agrieta de manera longitudinal; también se observó el desprendimiento de corteza enferma, sobre la cual se desarrollan estructuras fructíferas del hongo.

Sobre la corteza desprendida se observaron pequeños puntos negros de forma oval, mismos que rompen la epidermis, dando la apariencia de cráter romboide. Sobre la superficie de las escamas muertas también se observaron estas estructuras oscuras (acérvulos). Las preparaciones microscópicas temporales y permanentes se realizaron del material vegetativo que presentó estructuras reproductivas del hongo *Seiridium* sp. y sus características microscópicas son las siguientes (figura 5): Acérvulos color café oscuro, solitarios, subepidérmicos o subperidérmicos que en la superficie dan la apariencia de cráteres color negro; sus dimensiones promedio de 0.4 mm; los conidios son fusiformes, oblongos, rectos o ligeramente curvados, lisos; longitud promedio de 26.89 μm y ancho promedio de 8.97 μm . Poseen cinco divisiones, las cuatro células interiores son de color marrón oscuro y las dos finales son hialinas. La célula apical es cónica y termina con un apéndice, la basal es truncada y posee insertado centralmente un apéndice endógeno (figura 5). Las características de los conidios coinciden con los reportados en Sinclair, Lyon y Johnson, 2005 y Tuset e Hinarejos, 1995.

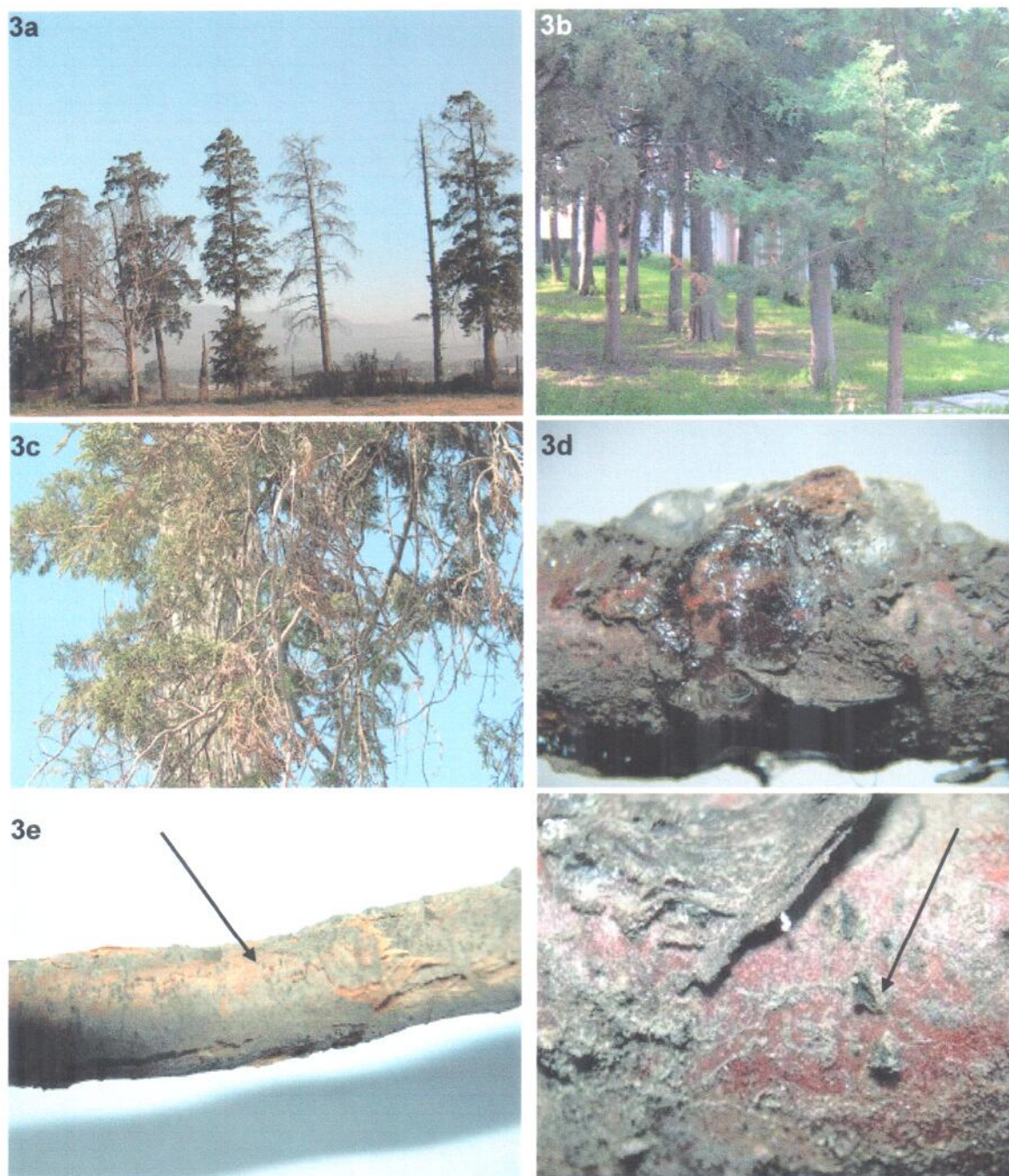


Figura 3. Condiciones y sintomatología de *Seiridium* en condiciones de campo. a. Árboles sobremaduros en suelos compactados. b. Árboles jóvenes con problemas de espaciamiento. c. Áreas secas en la parte baja de la copa. d. Presencia de resinación en la parte afectada. e. Agrietamiento y emisión de estructuras reproductivas. f. Presencia de acérvulos en las ramillas.

5.1.2. Sintomatología en campo y características microscópicas de *Pestalotiopsis*

Los árboles donde se colectaron las muestras se caracterizaron por estar en dos condiciones de sitio aparentemente en buen estado. Son árboles ubicados dentro del Campus Universitario, en etapas juveniles, con aplicación de riegos pero en espaciamientos densos. La sintomatología observada en estos árboles se describe a continuación y se ilustra en la figura 4:

- a) Ramillas (de un centímetro de diámetro o menores) con un color rojizo o parduzco, defoliadas o con hojas secas que permanecen en la ramilla y que adquieren tonos pardos. Esta situación se presenta en pequeñas áreas localizadas principalmente en la parte baja de la copa, en condiciones de escasez de luz.
- b) Ramillas muertas parcialmente, ya que también se observan escamas y ramillas completamente verdes.

En las ramillas colectadas se observaron escamas secas o parcialmente secas, aún con turgencia; ambas presentaron cuerpos fructíferos oscuros en la superficie (acérvulos), en formas ovales y abultadas, algunas rompiendo la epidermis para dar la apariencia de cráter longitudinal. Las preparaciones microscópicas temporales y permanentes se realizaron del material vegetativo que presentó estructuras reproductivas del hongo *Pestalotiopsis* sp., también se observaron

acérvulos color café oscuro, solitarios, subepidérmicos o subperidérmicos que en la superficie dan la apariencia de cráteres color negro; sus dimensiones promedian 0.45 mm; los conidios son fusiformes oblongos, rectos o ligeramente curvados, lisos, con longitud promedio de 30.66 μm y ancho promedio de 6.81 μm ; poseen cuatro tabiques y cinco células. Las tres células interiores son de color marrón oscuro y las de los finales hialinas. La célula apical es cónica y se observan en su extremo de un número variable de cilios (4 ó 5). Las características de los conidios (figura 5) coinciden con los reportados en Tuset e Hinarejos (1995).

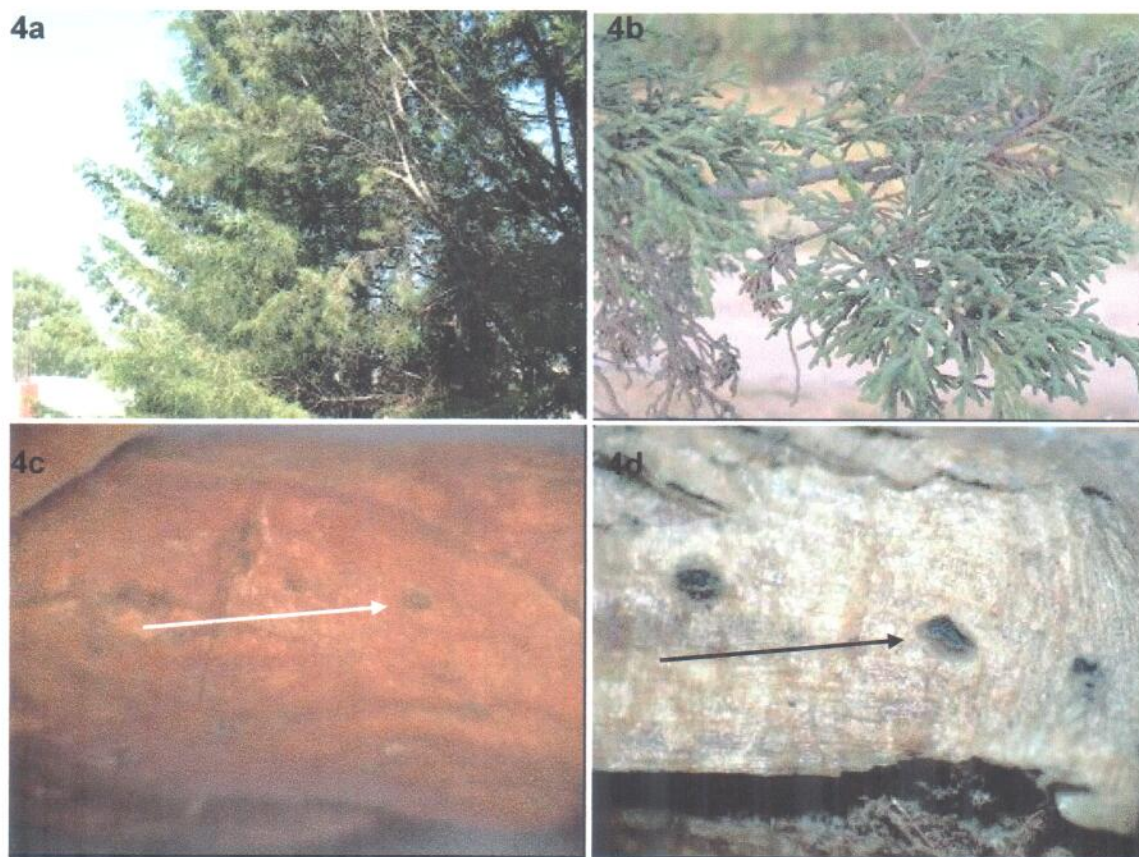


Figura 4. Condiciones y sintomatología de *Pestalotiopsis* en condiciones de campo. a. Árboles jóvenes plantados con poco espaciamiento. b. Rama con ramillas y escamas secas. c y d. Escamas con estructuras reproductivas (acérvulos) en la superficie.

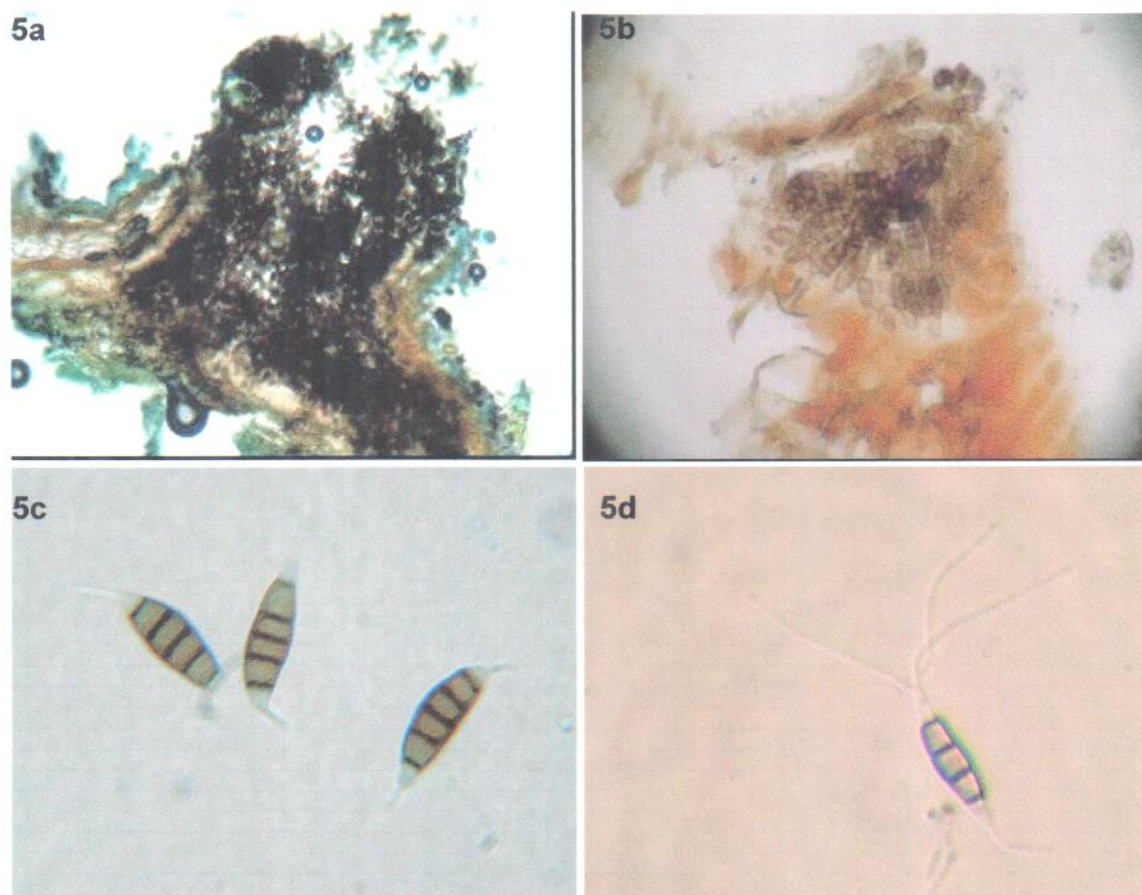


Figura 5. Estructuras microscópicas de *Seiridium* y *Pestalotiopsis*. a. Corte microscópico de un acérvulo de *Seiridium*. b. Corte microscópico de un acérvulo de *Pestalotiopsis*. c. Conidios de *Seiridium*. d. Conidios de *Pestalotiopsis* mostrando los apéndices apicales.

5.2. Aislamiento de los patógenos

5.2.1. Desarrollo de las colonias de *Seiridium*

El desarrollo de la colonia en las dos metodologías de siembra fue muy similar, por lo que se describe una sola.

A los tres días después de la siembra se observó un crecimiento miceliar blanco, superficial, que procedían de las aglomeraciones de conidios o del tejido vegetal, posterior a esto se procedió a realizar la transferencia de los extremos de este crecimiento a otra caja Petri con PDA puro.

Al segundo día de haber realizado la transferencia se observó un crecimiento miceliar color blanco-amarillento, uniforme, superficial, en forma de círculo, muy fino y delgado. A los catorce días, el crecimiento miceliar continuó con el mismo patrón de crecimiento, manteniendo un color blanco en el centro, pero un color beige-melón alrededor del mismo; y el crecimiento miceliar nuevo era de un color blanco, y no mantuvo una forma definida, con diámetros de 6.3 cm en promedio y de aspecto aterciopelado. A las tres semanas el color predominante de la colonia fue beige oscuro, formándose en el borde un anillo oscuro delgado, el crecimiento continuó, manteniendo una forma aproximada a un círculo (figura 6). A las cuatro semanas se observó que la colonia poseía un color melón en el centro. El crecimiento continuó de manera irregular, aunque el patrón general era en forma de círculo; sobre el micelio se observaron pequeños puntos negros, los cuales, al realizar las preparaciones, se observó que se trataba de los conidios, estos se presentaron principalmente en los $\frac{3}{4}$ de crecimiento.

La descripción de las colonias obtenidas coincide con la que se realizó en la revisión de literatura, con algunas variaciones leves en cuanto a los días en que suceden algunos eventos como la emisión de estructuras reproductivas.



Figura 6. Desarrollo de la colonia de *Seiridium* sp. obtenido de *Cupressus lusitanica*.

5.2.1. Desarrollo de las colonias de *Pestalotiopsis*

Después de tres días de la siembra se observó un crecimiento micelial blanco, superficial, que comenzaba del tejido infectado o de los grupos de conidios sembrados. Una vez que se observó este proceso, se procedió a realizar transferencias para la obtención de la cepa pura, tomando micelio de los extremos de este crecimiento a otra caja Petri con PDA puro. Al tercer día de haber realizado la transferencia se observó un crecimiento micelial color blanco sucio, uniforme, superficial, en forma de círculo, muy fino y delgado, de aspecto algodónoso. A los siete días, el crecimiento micelial continuó con el mismo patrón de crecimiento, manteniendo un color blanco claro en el centro, pero un color blanco sucio alrededor del mismo; a los 14 días el crecimiento micelial nuevo era

de un color blanco, manteniendo una forma circular, con un diámetro de 6.6 cm en promedio. A los 20 días el color predominante de la colonia seguía siendo blanco sucio, formándose en el borde un anillo pardo, el crecimiento continuó manteniendo una forma mas o menos regular, alcanzando diámetros de 9.1 cm. El crecimiento continuó de manera regular; a los 28-30 días sobre el micelio se observaron pequeños puntos negros, ubicados en cualquier parte del micelio, sin llegar a ser abundantes, éstos se observaron al microscopio, identificándolos como masas de conidios, estos se presentaron cuando la colonia casi abarcaba la totalidad de la caja Petri (figura 7).



Figura 7. Desarrollo de la colonia de *Pestalotiopsis* sp. obtenida de *Cupressus lusitanica*.

5.3. Pruebas de patogenicidad

5.3.1. Sintomatología

5.3.1.1. Sintomatología en arbolitos tratados con PDA puro

a) Plantas tratadas con el método de inserción: una vez que se retiró la gasa, la cual mantenía unida a la corteza con el tallo, el disco insertado de PDA comenzó a deshidratarse lentamente y se observó un proceso de desprendimiento parcial y un secamiento lentamente de esta corteza, que al ser cortada dejó de ser funcional en el sentido longitudinal. Sin embargo, el secamiento parcial se mantuvo localizado en la "ventana" abierta para la inserción. En algunos casos, se desprendió totalmente la corteza cortada y se comenzó a formar una callosidad, con la que el árbol comenzó a compartimentar la lesión. Los arbolitos mantuvieron el follaje verde.

b) Plantas tratadas con el método de punción: los arbolitos no mostraron alguna evidencia adicional de lesiones, además de las realizadas con la aguja. Al desprender la gasa húmeda, los discos de PDA se deshidrataron y solamente quedaron marcados en el sitio de punción. Los arbolitos respondieron favorablemente a la lesión provocada, y las lesiones no lograron aumentar en tamaño (figura 8). Todos los arbolitos permanecieron con el follaje verde.

5.3.1.2. Sintomatología en arbolitos inoculados con *Seiridium*

a) Plantas tratadas con el método de inserción: en la mayoría de las plantas (excepto en dos, donde no se observaron daños por el hongo), a los 15 días se presentó una invasión rápida en los tejidos desprendidos, tornándolo de un color cobrizo y posteriormente de color café, secándolo. A los 30 días, los tejidos vecinos también se tornaron de color cobrizo, de ahí en adelante, el avance del síntoma sucedió lentamente de manera longitudinal principalmente, hasta alcanzar, como máximo 2.8 cm de longitud. Sobre la corteza desprendida, se observó la aparición a los 40 días, de estructuras acervulares oscuras, llenas de conidios de *Seiridium*. Todos los arbolitos permanecieron con el follaje verde.

b) Plantas tratadas con el método de punción: a los 15 días de la inoculación, se observaron pequeñas lesiones en los sitios donde se realizaron las punciones con la aguja; éstas fueron creciendo lentamente en tamaño hasta alcanzarse unas con otras. Después de un mes, se notó una mancha formada por la agrupación de las punciones y se observó la muerte de los tejidos de la corteza, que para entonces ya habían adquirido un color café. La corteza ubicada por debajo y arriba del tejido muerto se tornó de un color rojizo, para después constreñirse. Este daño creció de manera longitudinal lentamente hasta alcanzar un máximo de 3.7 cm de largo al final de las observaciones. Sobre la superficie afectada, comenzaron a aparecer a los 45 días, estructuras escasas de color oscuro (figura 9) que se identificaron en el microscopio como acérvulos. Todos los arbolitos permanecieron con el follaje verde.

5.3.1.3. Sintomatología en arbolitos inoculados con *Pestalotiopsis*

a) Plantas tratadas con el método de inserción: una vez que se retiró la gasa húmeda, se separó la corteza cortada del tallo. Después adquirió un color rojizo y finalmente se seco, desprendiéndose totalmente. Un mes después de la inoculación el tejido adyacente a la zona de inoculación fue adquiriendo un color cobrizo, esta mancha continuó creciendo hasta que finalmente alcanzó 5.1 cm, lo que habla de el éxito del hongo en la invasión del tejido del cambium y corteza interna. Los arbolitos que conservaron la corteza cortada, presentaron sobre ésta, estructuras acervulares oscuras (figura 9) que vistas al microscopio mediante cortes, contenían conidios. Todos los arbolitos permanecieron con el follaje verde.

b) Plantas tratadas con el método de punción: A los 15 días de la inoculación, los puntos de penetración del hongo fueron creciendo hasta unirse entre ellos, posteriormente, a los 30 días, el área inoculada fue alimento del hongo, pudiéndose observar una oquedad en dicha zona. Posteriormente en los tejidos cercanos a la zona de inoculación se comenzó a extender el hongo, que se hizo visible con una coloración cobriza que formó un mancha creciendo en sentido longitudinal, alcanzando al final del experimento los 5.1 cm de longitud. A los 50 días en promedio, se observó la aparición de estructuras oscuras a lo largo de la zona infectada de la corteza, que correspondían a acérvulos con conidios. Los arbolitos permanecieron con el follaje verde, excepto un individuo, en el cual el hongo invadió de manera circundante al tallo a lo largo de varios centímetros, en

este caso el árbol murió, comenzando la desecación en la punta, pero permanecieron las ramillas muertas en el tallo (figura 9).



Figura 8. Sintomatología de las plantas de *Cupressus lusitanica* inoculadas en el tallo. a y b. Lesiones provocadas en los testigos tratados por inserción y punción, sin daño por hongos. c. Inserción con *Seiridium* mostrando constricción de la corteza y muerte del tejido d. Daños por *Seiridium*, la corteza se constriñe y el hongo invade tejidos vecinos. e y f. Invasión de *Pestalotiopsis* por inserción y punción, en sentido longitudinal sobre la corteza.

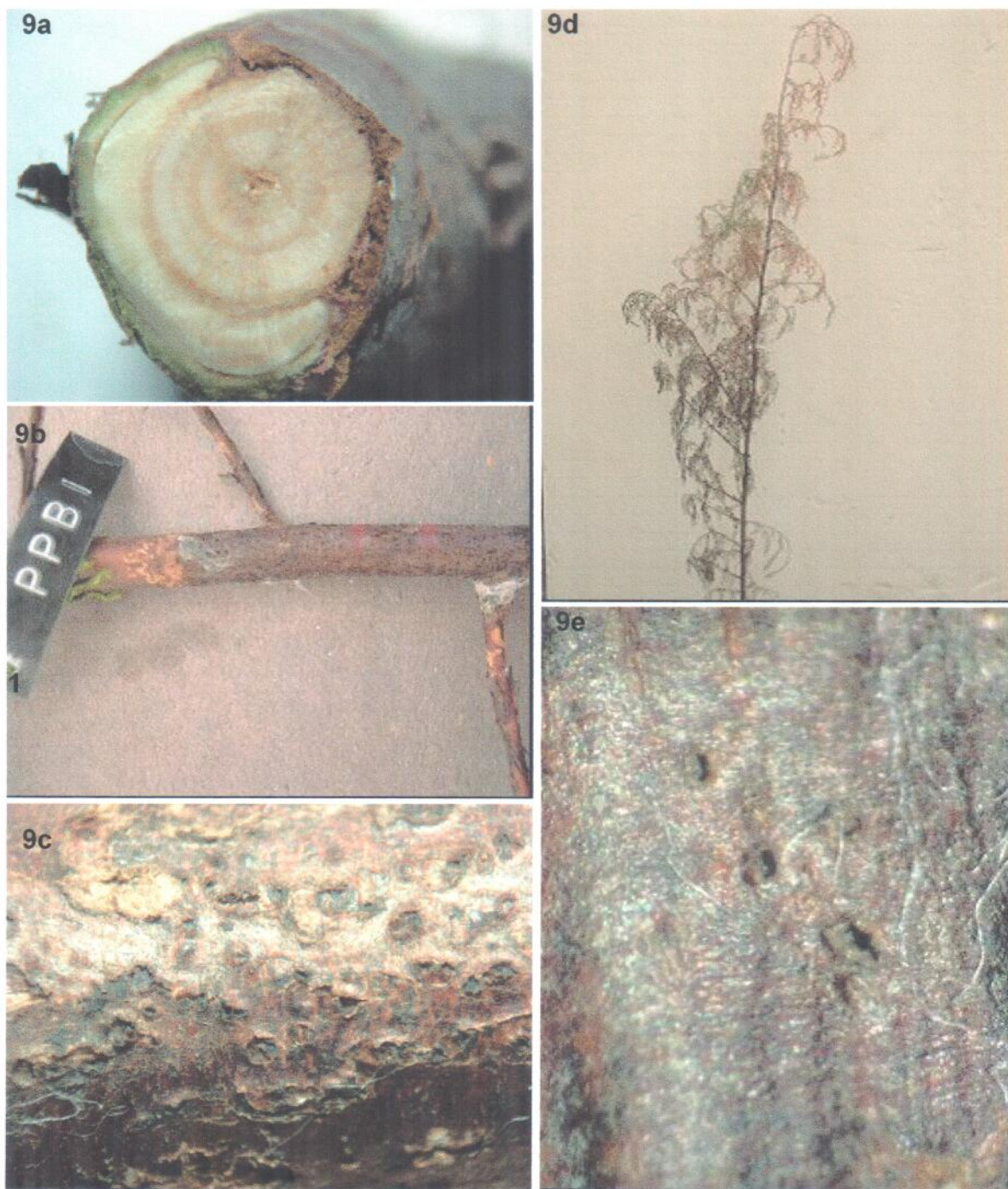


Figura 9. Sintomatología de las plantas de *Cupressus lusitanica* inoculadas en el tallo con *Seiridium* y *Pestalotiopsis*. a. Corte transversal que muestra la invasión de *Seiridium* en corteza y cámbium. b. Infección circundante por parte de *Pestalotiopsis*. c. Acérvulos de *Pestalotiopsis* sobre la corteza. d. Acérvulos escasos de *Seiridium* sobre la corteza.

5.3.2. Reaislamientos

Se hicieron reaislamientos de todos los tratamientos llevados a cabo, en éstos se logro obtener los hongos *Seiridium* y *Pestalotiopsis* con las mismas características que presentaba el cultivo original. En los cuadros 2 y 3 se muestran las características de las colonias obtenidas. Las características que presentaron las colonias en los reaislamientos coinciden con los que presentó en el aislamiento original y el color de la colonia lo cual indica que se trata de los mismos hongos inoculados.

Aunque los arbolitos tratados con PDA puro no presentaron sintomatología propia de alguna enfermedad, se tomaron algunas muestras de tejido adyacente al área tratada, sin obtener hongos en el cultivo.

Cuadro 2. Características morfológicas de las colonias obtenidas de reaislamientos de *Seiridium* en *Cupressus lusitanica*

Características morfológicas	Características de los reaislamientos
Aspecto de la colonia	Aterciopelado
Coloración del micelio	Gris-beige
Presencia de conidios	En acérvulos dispersos
Tamaño de la colonia	Cubre la caja Petri

Cuadro 3. Características morfológicas de las colonias obtenidas de reaislamientos de *Pestalotiopsis* en *Cupressus lusitanica*.

Características morfológicas	Características de los reaislamientos
Aspecto de la colonia	Algodonoso
Coloración del micelio	Blanco sucio
Presencia de conidios	En acérvulos dispersos
Tamaño de la colonia	Cubre la caja Petri

Como puede observarse, la descripción de las colonias sigue un comportamiento muy semejante al descrito cuando se desarrolló la colonia proveniente de los aislamientos originales.

5.4. Análisis estadístico

Al analizar los seis tratamientos se observó la presencia de la infección en la mayoría de las plantas inoculadas con las dos cepas de hongos. Los resultados se muestran en el cuadro 4, donde se presenta el porcentaje de infección por cada tratamiento.

El análisis estadístico de los resultados de las pruebas de patogenicidad se realizó con el empleo del programa SAS, versión 8.1. Los resultados del análisis se presentan en los cuadros 5 y 6.

Cuadro 4. Porcentaje de plantas infectadas en cada tratamiento aplicado en la inoculación en *Cupressus lusitanica*. Chapingo, México; 2006.

Tratamiento	Siglas	Porcentaje de infección (promedio)
01 (<i>Seiridium</i> inoculado por inserción)	SI	66.67
02 (<i>Seiridium</i> inoculado por punción)	SP	77.78
03 (<i>Pestalotiopsis</i> inoculado por inserción)	PI	88.89
04 (<i>Pestalotiopsis</i> inoculado por punción)	PP	100.00
05 (Testigo: PDA inoculado por inserción)	TI	0.00
06 (Testigo: PDA inoculado por punción)	TP	0.00

El análisis de varianza realizado para evaluar el porcentaje de infección de *Seiridium* y *Pestalotiopsis* en árboles de *Cupressus lusitanica*, mostró que hay diferencias significativas en cuanto a la efectividad de los tratamientos aplicados (cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza para el porcentaje de infección de *Cupressus lusitanica*, infectados con *Seiridium* y *Pestalotiopsis*.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Sumas de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > F
Modelo	5	7.01271149	1.40254230	33.33	<0.0001
Error	12	0.50502900	0.04208575		
Total	17	7.51774049			

De acuerdo con los resultados que se muestran en el cuadro 5, se observa que los tratamientos que presentan una variación significativa a un nivel del 5%. Del cálculo de las medias de tratamientos se deduce que la aplicación de PDA puro (sin hongos) no ocasionó infecciones en los arbolitos de *Cupressus lusitanica*.

Cuadro 6. Comparación de medias con la prueba de Tukey para el porcentaje de infección de *Cupressus lusitanica*, infectados con *Seiridium* y *Pestalotiopsis*.

Agrupación de Tukey	Media	N	Tratamiento
B	A	3	4
	A		
	A	3	3
	A		
	A	3	2
		3	1
	C	3	5
	C		
	C	3	6

Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes

En cuanto a la comparación de medias de tratamientos, en el anexo se muestran los resultados al correr el programa en SAS, del cual se desprenden los siguientes resultados:

a) Efectos simples

- Los arbolitos presentaron mayor porcentaje de infección al ser inoculados con *Pestalotiopsis* (94.45%) que con *Seiridium* (72.22%) y no mostraron infección al ser tratados con PDA puro.
- Los arbolitos presentaron mayor porcentaje de infección al ser inoculados con el método de punción (88.89%) que con el método de inserción (77.78%).

Con base en las observaciones realizadas y para las dos cepas, se infiere que el método de inserción fue menos efectivo debido al corte que se realiza de manera transversal, lo que ocasiona que el tejido sano quede aislado relativamente del tejido inoculado, aunque el hongo mostró que pudo invadir los tejidos vecinos hacia abajo y hacia arriba mediante los tejidos conductores del cambium.

b) Efectos combinados

- Los arbolitos tratados con PDA puro no mostraron evidencias de infección, independientemente del método de inoculación realizado.

- El porcentaje más elevado de arbolitos infectados se obtuvo inoculando *Pestalotiopsis* con el método de punción (100.00%).
- De las dos cepas de hongos, el menor porcentaje de arbolitos infectados se observó cuando se inoculó *Seiridium* con el método de inserción (66.67%).

Finalmente, todos los tratamientos donde se inoculó un *Seiridium* mostraron diferencias significativas de infección en comparación a los arbolitos que se trataron con PDA puro.

De manera similar, todos los tratamientos donde se inoculó un *Pestalotiopsis* también mostraron diferencias significativas de infección en comparación a los arbolitos que se trataron con PDA puro.

Con base en lo anterior, se cuenta con los elementos para establecer que las dos cepas utilizadas (*Seiridium* y *Pestalotiopsis*) son patogénicas al ser inoculadas en *Cupressus lusitanica*.

5.5. Identificación del Agente Causal

5.5.1. Medición de conidios de *Seiridium*

Se realizó la medición de conidios en el microscopio, con el objetivo de 40x; las preparaciones para realizar las mediciones se obtuvieron del material original, del

aislamiento, del material inoculado y de los reaislamientos. El número de conidios medidos en cada ocasión fue de 100, las mediciones se presentan en los anexos 2 al 5 y el resumen se presenta en el cuadro 7.

Tomando en cuenta su distribución a nivel mundial y la descripción que para esta especie hacen Barnes *et al.* (2001) y Tisserat (1991), considerando también los resultados obtenidos en este trabajo, así como la presencia de un apéndice apical que forma un ángulo aproximadamente recto con el eje del conidio, y el tamaño de éste apéndice; además de estar reportado para *Cupressus lusitanica* por Barnes *et al.* (2001) y soportado en el hecho de que existen tres especies distintas las que ocasionan enfermedades conocidas como canchros del ciprés y que la morfología sigue siendo, de acuerdo a estos últimos autores, una manera de diferenciar las tres especies se concluyó que se trata de la especie *Seiridium unicorne* (Cooke & Ellis) Sutton ; lo cual se corroboró con las ilustraciones encontradas en el trabajo de Barnes *et al.* (2001) y Sinclair y Lyon (2005) al compararlas con las fotografías de conidios obtenidos en este trabajo.

Cuadro 7. Dimensiones de los conidios de *Seiridium* obtenidos de *Cupressus lusitanica* en diferentes etapas en Chapingo, México.

Procedencia de los conidios	Valores	Dimensiones (µm)	
		Largo	Ancho
Material de campo	Máximo	38.40	10.24
	Mínimo	21.76	6.40
	Promedio	26.89	8.97
Aislamiento original	Máximo	37.12	10.24
	Mínimo	21.76	6.40
	Promedio	26.57	8.95
Plantas inoculadas	Máximo	37.12	10.24
	Mínimo	21.76	6.40
	Promedio	26.37	8.79
Reaislamientos	Máximo	37.12	10.24
	Mínimo	21.76	6.40
	Promedio	27.03	9.04

5.5.2. Medición de conidios de *Pestalotiopsis*

De la misma manera, se realizó la medición de conidios en el microscopio, con el objetivo de 40x; las preparaciones para realizar las mediciones se obtuvieron del material original, de l aislamiento, del material inoculado y de los reaislamientos. El número de conidios medidos en cada ocasión fue de 100, las mediciones se presentan en los anexos 6 al 9 y el resumen se presenta en el cuadro 8.

De la misma manera, considerando los resultados aquí obtenidos, la amplia distribución que tiene *Pestalotiopsis funerea* (Desm.) Steyaert, su comportamiento oportunista y sus características morfológicas descritas por Tuset e Hinarejos (1995), se determinó que se trata de esta especie, la cual también fue comparada

con ilustraciones de la literatura antes mencionada. Una característica distintiva que ayudó a determinar la especie fue el número de cilios en el apéndice apical.

Cuadro 8. Dimensiones de los conidios de *Pestalotiopsis* obtenidos de *Cupressus lusitanica* en diferentes etapas en Chapingo, México.

Procedencia de los conidios	Valores	Dimensiones (µm)	
		Largo	Ancho
Material de campo	Máximo	37.12	6.40
	Mínimo	23.04	6.4
	Promedio	30.66	6.81
Aislamiento original	Máximo	34.56	7.68
	Mínimo	25.60	6.40
	Promedio	28.92	6.45
Plantas inoculadas	Máximo	34.56	8.96
	Mínimo	25.60	8.96
	Promedio	31.56	6.99
Reaislamientos	Máximo	37.12	6.40
	Mínimo	23.04	8.96
	Promedio	28.75	7.33

Las características morfológicas de los patógenos obtenidos de las plantas inoculadas de *Cupressus lusitanica*, así como los signos que presentaron los hongos coinciden con lo que reporta la bibliografía; se produjo la muerte de la corteza, un avance longitudinal y la emisión de acérvulos con conidios, para cada una de las especies. Lo anterior señala a *Seiridium unicorne* y *Pestalotiopsis funerea* como agentes patógenos de *Cupressus lusitanica*.

El crecimiento de la enfermedad en sentido longitudinal se explica con el hecho de que los tejidos conductores oponen menor resistencia a la invasión del micelio, el cual encuentra una barrera más fuerte al invadir el sentido transversal y más

resistencia aún cuando pretende invadir los tejidos de manera radial, pues inmediatamente se localizan estructuras lignificadas que forman parte del xilema. Aunque las dos cepas mostraron ser patogénicas bajo condiciones controladas (favorables a los hongos) parece ser que tanto *Seiridium unicorne* como *Pestalotiopsis funerea* son patógenos débiles en *Cupressus lusitanica*, debido a:

- Solo se encontraron estos dos hongos causando enfermedades en árboles que se desarrollan en condiciones desfavorables;
- La alta frecuencia con que se encontraron estas dos especies creciendo de manera saprófita en escamas muertas de *Cupressus lusitanica*, aún sobre ramas vivas, junto con otros hongos de los géneros *Phoma* y *Alternaria*.

La anterior aseveración concuerda con lo que mencionan Sinclair y Lyon (2005), al considerar a *Cupressus lusitanica*, dentro de su género como una especie que solo es afectada en algunas regiones por *Seiridium*; mencionan también que *S. cardinale* es la especie más agresiva de las tres referidas en este estudio (las otras son *S. unicorne* y *S. cupressi*) y por Tuset e Hinarejos (1995), que establecen que las especies mas susceptibles a *Seiridium* (mencionan a *S. cardinale*) son *C. macrocarpa* y *C. sempervirens*; situación que se corroboró personalmente durante las colectas, al encontrar árboles de *C. sempervirens* infectados por *Seiridium*, formando verdaderos canchales con emisión profusa de resina.

En cuanto a *Pestalotiopsis funerea*, se concuerda con lo que establecen Sinclair y Lyon (2005) y Funk (1985), que lo definen como un hongo que generalmente se encuentra en plantas dañadas por otros agentes o por las condiciones ambientales. Asimismo, Tuset e Hinarejos (1995) y lo mencionan como un hongo común del tejido foliar debilitado en los cipreses, con el comportamiento típico de un parásito de debilidad, con un desarrollo poco perjudicial para los cipreses.

Al considerarse *Seiridium unicorne* y *Pestalotiopsis funerea* como parásitos de debilidad, el manejo de estas enfermedades en arbolado urbano se debe realizar en el sentido de mantener a los árboles en buenas condiciones de crecimiento, es aquí donde cobran importancia las prácticas arborícolas, que deberán corregir situaciones desfavorables como suelos compactados, problemas de espaciamiento en las plantaciones, sobredensidad de copa, carencia o exceso de humedad en el suelo y la presencia de plagas, sí como evitar la mala realización de podas y las lesiones en las ramas. Cabe mencionar que según la ISA (1999), la mayoría de los problemas de salud de los árboles (de 70 a 90 %) son resultados de condiciones culturales y ambientales adversas tales como la compactación del suelo, sequía, fluctuaciones de humedad, temperaturas extremas, daños mecánicos o una inapropiada selección de especies.

6. CONCLUSIONES

Los aislamientos y purificaciones de los dos hongos se realizaron de manera exitosa en el medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), logrando el establecimiento y desarrollo de cada hongo en condiciones de laboratorio.

Los agentes patógenos aislados, inoculados y reaislados resultaron ser de patogenicidad en *Cupressus lusitanica*.

El método de punción resultó ser más efectivo que el método por inserción en las pruebas de patogenicidad.

Los Agentes Causales de los canchros estudiados corresponden a las especies *Seiridium unicorne* y *Pestalotiopsis funerea*.

Pestalotiopsis funerea mostró mayor patogenicidad que *Seiridium unicorne*.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. 2002. Fitopatología. 2ª. ed. México. UTEHA. 838 p.
- Barnes, I., Roux, J., Wingfield, M. J., Coetzee, M. P. A., and Wingfield, B. D. 2001. Characterization of *Seiridium* spp. associated with cypress canker based on β -tubulin and histone sequences. Plant Dis. 85:317-321.
- Belmonte, V. G. 2001. Estado del conocimiento de *Cupressus lindleyi* Klotzsch. Tesis de Licenciatura. Chapingo, México. Universidad Autónoma Chapingo. 200 p.
- CATIE. 1991. Plagas y enfermedades forestales en América Central. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 260 p.
- Chacalo, H. A. 1991. El arbolado urbano de la Zona metropolitana de la Ciudad de México: Aplicación de un método de inventario de árboles urbanos sobre algunas calles de la Delegación Miguel Hidalgo de la Ciudad de México. UAM. México. 388 p.
- Funk, A. 1981. Parasitic microfungi of western trees. Canadian Forest Service Publ. BC-X-222. Canada. 190 p.

- Funk, A. 1985. Foliar fungi of western trees. Canadian Forest Service Publ BC-X-265. Canada. 159 p.
- Graniti, Antonio. 1998. Cypress canker: A Pandemic in Progress. *Annu.Rev. Phytopathol.* 36:91-114.
- Gutiérrez, H. J. F. 1997. Inventario dasonómico urbano de los árboles del Campus de la Universidad Autónoma Chapingo. Tesis de Licenciatura. Chapingo, México. Universidad Autónoma Chapingo. 105 p.
- ISA (Internacional Society of Arboriculture). 1999. Manual de Arboricultura. ISA-UAM. México. 188 p.
- Kiffer, E., M. Morelet. The deuteromycetes; Mitosporic fungi, Classification and Generic keys. Science Publishers Inc. U.S.A. 273 p.
- McVaugh, R. 1992. Flora Novo-Galiciana; vol. 17. Gymnosperms and Pteridophytes. University of Michigan Herbarium. U.S.A.
- Martínez A., J. W. Woodward, M. Pearce. 2003. Diseases of Leyland Cypress in the Landscape. Cooperative Extension Service; The University of Georgia College of Agricultural and Environmental Sciences. Bulletin 1229. En línea <http://pubs.caes.uga.edu/caespubs/pubcd/B1229.htm>. Consultado el 10 de diciembre de 2006.

- Martínez, R. A. 2000. *Fusarium oxysporum* Schl. como agente causal del estrangulamiento de tallo de *Pseudotsuga macrolepis* Flous y *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* Shaw. en plantas de vivero. Tesis profesional. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. 89 p.
- Naj Raj, T. R. 1985a. Redisposals and redescrptions in the *Monochaetia-Seiridium*, *Pestalotia-Pestalotiopsis* Complexes I. Mycotaxon XXII:January-march. pp. 43-51.
- Naj Raj, T. R. 1985b. Redisposals and redescrptions in the *Monochaetia-Seiridium*, *Pestalotia-Pestalotiopsis* Complexes VIII. Mycotaxon XXXII:July-september. pp. 121-132.
- Naj Raj, T. R. 1985c. Redisposals and redescrptions in the *Monochaetia-Seiridium*, *Pestalotia-Pestalotiopsis* Complexes II. Mycotaxon XXII:January-march. pp. 52-63.
- NOM-059-SEMARNAT-2001 Protección Ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres- Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo.
- Rebolledo, R. H. H. 2002. Manual SAS por computadora: análisis estadístico de datos experimentales. Trillas. México. 208 p.

- Romero, C. S. 1993. Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 347 p.
- Santizo, R. J. A. 2004. Apuntes del curso de diseños experimentales. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México (inédito).
- Scharpf, R. F., tech. coord.. 1993. Diseases of Pacific Coast Conifers. Agric. Handb. 521. Washington, DC: U. S. Department of Agriculture, Forest Service. 199 p.
- Sinclair W. A., H. H. Lyon. 2005. Diseases of trees and shrubs. 2nd. edition. Cornell University Press. New York, USA. 660 p.
- Tattar, T. A. 1989. Diseases of shade trees, Revised edition. Academic Press, Inc. USA. 391 p.
- Torres Juan J., 1998. Patología Forestal. 2ª Edición. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 273 p.
- Tovar de T, L. 1982. Estudio descriptivo de los árboles y arbustos más comunes del Bosque de Chapultepec. Tesis de Licenciatura. México, D. F. Universidad Nacional Autónoma de México. p. 140-141.

Tisserat, N. A., Nus, A., and Barnes, L. W. 1991. A canker disease of the Cupressaceae in Kansas and Texas caused by *Seiridium unicorne*. Plant Dis. 75:138-140.

Tuset B., J. J. y C. Hinarejos M. 1995. Enfermedades del ciprés. Ediciones Mundi-Prensa. España. 70 p.

Woodward, S., 1992. Responses of *Cupressus* and *Chamaecypariss* callus tissues to inoculations with *Seiridium cardinale*. Eur. J. For. Path. 27: 13-21.

ANEXOS

Anexo 1. Programa corrido en SAS v.8.1 para el análisis de varianza y comparación de medias de los tratamientos aplicados a los arbolitos de *Cupressus lusitanica* en Chapingo, México.

```
data caneros;
input trat rep infec;
infec=arsin(sqrt(infec/100));
cards;
1 1 66.67
1 2 66.67
1 3 66.67
2 1 66.67
2 2 100
2 3 66.67
3 1 66.67
3 2 100
3 3 100
4 1 100
4 2 100
4 3 100
5 1 0
5 2 0
5 3 0
6 1 0
6 2 0
6 3 0
;
proc print;
proc glm;
class trat;
model infec=trat;
means Trat/Tukey;
run;
```

Obs	trat	rep	infec
1	1	1	0.95535
2	1	2	0.95535
3	1	3	0.95535
4	2	1	0.95535
5	2	2	1.57080
6	2	3	0.95535
7	3	1	0.95535
8	3	2	1.57080
9	3	3	1.57080
10	4	1	1.57080
11	4	2	1.57080
12	4	3	1.57080
13	5	1	0.00000
14	5	2	0.00000
15	5	3	0.00000
16	6	1	0.00000
17	6	2	0.00000
18	6	3	0.00000

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
trat	6	1 2 3 4 5 6

Number of observations 18

The GLM Procedure

Dependent Variable: infec

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	7.01271149	1.40254230	33.33	<.0001
Error	12	0.50502900	0.04208575		
Corrected Total	17	7.51774049			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	infec Mean
0.932822	24.36295	0.205148	0.842049

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	5	7.01271149	1.40254230	33.33	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	5	7.01271149	1.40254230	33.33	<.0001

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for infec

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type

II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	12
Error Mean Square	0.042086
Critical Value of Studentized Range	4.74775
Minimum Significant Difference	0.5623

Means with the same letter are not significantly different.

<u>Tukey Grouping</u>		<u>Mean</u>	<u>N</u>	<u>trat</u>
A		1.5708	3	4
A				
B A		1.3656	3	3
B A				
B A		1.1605	3	2
B				
B		0.9554	3	1
C		0.0000	3	5
C				
C		0.0000	3	6

Anexo 2. Medidas de los conidios de *Seiridium* obtenidos del material original.

No.	Largo (µm)	Ancho (µm)
1	25.6	10.24
2	28.16	8.96
3	26.88	8.96
4	24.32	7.68
5	26.88	8.96
6	26.88	10.24
7	29.44	8.96
8	28.16	8.96
9	26.88	8.96
10	28.16	8.96
11	26.88	10.24
12	24.32	8.96
13	23.04	8.96
14	26.88	8.96
15	26.88	7.68
16	26.88	8.96
17	32.00	8.96
18	26.88	8.96
19	21.76	8.96
20	26.88	6.40
21	26.88	8.96
22	32.00	8.96
23	26.88	8.96
24	26.88	8.96
25	26.88	10.24
26	24.32	7.68
27	24.32	8.96
28	26.88	8.96
29	23.04	7.68
30	28.16	8.96
31	26.88	8.96
32	24.32	10.24
33	26.88	8.96
34	28.16	8.96

No.	Largo (µm)	Ancho (µm)
35	38.40	8.96
36	25.60	6.40
37	26.88	8.96
38	26.88	8.96
39	26.88	8.96
40	26.88	8.96
41	26.88	7.68
42	26.88	8.96
43	26.88	10.24
44	32.00	8.96
45	32.00	8.96
46	26.88	7.68
47	26.88	10.24
48	26.88	8.96
49	24.32	8.96
50	23.04	8.96
51	26.88	10.24
52	26.88	8.96
53	32.00	8.96
54	26.88	8.96
55	23.04	6.40
56	24.32	8.96
57	33.28	8.96
58	26.88	8.96
59	26.88	8.96
60	25.6	8.96
61	23.04	7.68
62	26.88	10.24
63	26.88	8.96
64	26.88	10.24
65	28.16	8.96
66	26.88	8.96
67	26.88	8.96
68	29.44	8.96

No.	Largo (µm)	Ancho (µm)
69	33.28	8.96
70	24.32	8.96
71	26.88	8.96
72	26.88	10.24
73	25.60	6.40
74	28.16	8.96
75	26.88	8.96
76	26.88	8.96
77	26.88	8.96
78	26.88	10.24
79	25.6	10.24
80	28.16	8.96
81	26.88	8.96
82	25.6	10.24
83	26.88	8.96
84	24.32	8.96
85	23.04	10.24
86	21.76	6.40
87	28.16	10.24
88	26.88	8.96
89	28.16	8.96
90	26.88	10.24
91	24.32	8.96
92	26.88	8.96
93	26.88	8.96
94	29.44	10.24
95	26.88	8.96
96	26.88	8.96
97	26.88	7.68
98	23.04	10.24
99	26.88	8.96
100	28.16	8.96

Anexo 3. Medidas de los conidios de *Seiridium* obtenidos de aislamientos originales.

No.	Largo (μm)	Ancho (μm)
1	28.16	10.24
2	26.88	8.96
3	24.32	10.24
4	26.88	8.96
5	26.88	8.96
6	23.04	8.96
7	26.88	8.96
8	26.88	8.96
9	26.88	10.24
10	23.04	8.96
11	26.88	8.96
12	28.16	8.96
13	28.16	7.68
14	26.88	8.96
15	26.88	10.24
16	26.88	8.96
17	26.88	8.96
18	26.88	7.68
19	26.88	10.24
20	26.88	8.96
21	32.00	8.96
22	32.00	8.96
23	26.88	8.96
24	26.88	8.96
25	26.88	8.96
26	24.32	7.68
27	24.32	8.96
28	26.88	8.96
29	23.04	10.24
30	28.16	8.96
31	26.88	8.96
32	24.32	10.24
33	28.16	8.96
34	28.16	8.96

No.	Largo (μm)	Ancho (μm)
35	37.12	8.96
36	26.88	6.40
37	25.60	8.96
38	26.88	8.96
39	24.32	8.96
40	23.04	8.96
41	21.76	7.68
42	28.16	8.96
43	26.88	8.96
44	26.88	10.24
45	24.32	6.40
46	23.04	8.96
47	26.88	8.96
48	26.88	8.96
49	24.32	10.24
50	23.04	8.96
51	26.88	10.24
52	26.88	8.96
53	28.16	8.96
54	26.88	8.96
55	23.04	6.40
56	24.32	8.96
57	33.28	10.24
58	26.88	8.96
59	26.88	8.96
60	25.60	8.96
61	26.88	7.68
62	26.88	10.24
63	32.00	8.96
64	26.88	8.96
65	21.76	8.96
66	26.88	8.96
67	26.88	8.96
68	32.00	8.96

No.	Largo (μm)	Ancho (μm)
69	26.88	8.96
70	26.88	8.96
71	23.04	8.96
72	26.88	10.24
73	25.60	8.96
74	23.04	8.96
75	28.16	8.96
76	23.04	7.68
77	26.88	8.96
78	26.88	8.96
79	25.60	8.96
80	28.16	8.96
81	26.88	6.40
82	26.88	8.96
83	28.16	8.96
84	26.88	8.96
85	26.88	8.96
86	23.04	8.96
87	33.28	8.96
88	24.32	8.96
89	26.88	10.24
90	26.88	7.68
91	25.60	8.96
92	23.04	8.96
93	26.88	10.24
94	24.32	8.96
95	26.88	8.96
96	28.16	7.68
97	23.04	8.96
98	28.16	8.96
99	26.88	8.96
100	28.16	8.96

Anexo 4. Medidas de los conidios de *Seiridium* obtenidos del material inoculado.

No.	Largo (μm)	Ancho (μm)
1	26.88	8.96
2	26.88	8.96
3	23.04	8.96
4	26.88	8.96
5	25.60	6.40
6	23.04	8.96
7	28.16	8.96
8	23.04	8.96
9	26.88	10.24
10	26.88	8.96
11	25.60	8.96
12	28.16	8.96
13	26.88	8.96
14	26.88	8.96
15	28.16	7.68
16	26.88	8.96
17	26.88	7.68
18	24.32	8.96
19	26.88	8.96
20	26.88	8.96
21	26.88	7.68
22	26.88	8.96
23	26.88	8.96
24	26.88	7.68
25	23.04	8.96
26	26.88	6.40
27	26.88	8.96
28	26.88	8.96
29	23.04	8.96
30	28.16	10.24
31	26.88	8.96
32	24.32	8.96
33	26.88	8.96
34	28.16	10.24

No.	Largo (μm)	Ancho (μm)
35	26.88	8.96
36	26.88	8.96
37	26.88	8.96
38	26.88	6.40
39	26.88	8.96
40	26.88	10.24
41	26.88	8.96
42	26.88	8.96
43	24.32	8.96
44	23.04	8.96
45	26.88	8.96
46	26.88	8.96
47	24.32	8.96
48	26.88	10.24
49	24.32	6.40
50	23.04	7.68
51	26.88	8.96
52	26.88	8.96
53	32.00	8.96
54	26.88	10.24
55	23.04	10.24
56	24.32	6.40
57	33.28	10.24
58	26.88	8.96
59	26.88	8.96
60	25.60	10.24
61	23.04	10.24
62	26.88	8.96
63	26.88	10.24
64	26.88	8.96
65	28.16	8.96
66	26.88	8.96
67	26.88	8.96
68	29.44	8.96

No.	Largo (μm)	Ancho (μm)
69	33.28	8.96
70	24.32	7.68
71	26.88	8.96
72	26.88	8.96
73	25.60	8.96
74	23.04	10.24
75	26.88	8.96
76	26.88	8.96
77	26.88	8.96
78	26.88	7.68
79	25.60	8.96
80	28.16	8.96
81	24.32	8.96
82	23.04	8.96
83	26.88	8.96
84	26.88	7.68
85	24.32	10.24
86	21.76	7.68
87	28.16	8.96
88	26.88	8.96
89	28.16	8.96
90	26.88	8.96
91	23.04	6.40
92	26.88	7.68
93	26.88	8.96
94	25.60	6.40
95	28.16	8.96
96	26.88	8.96
97	26.88	8.96
98	23.04	8.96
99	26.88	6.40
100	28.16	8.96

Anexo 5. Medidas de los conidios de *Seiridium* obtenidos de los reisolamientos.

No.	Largo (µm)	Ancho (µm)
1	24.32	8.96
2	33.28	10.24
3	26.88	8.96
4	29.44	8.96
5	25.60	8.96
6	26.88	7.68
7	26.88	10.24
8	32.00	8.96
9	26.88	8.96
10	21.76	8.96
11	26.88	8.96
12	26.88	10.24
13	32.00	8.96
14	26.88	8.96
15	26.88	8.96
16	23.04	8.96
17	26.88	10.24
18	25.60	8.96
19	23.04	8.96
20	28.16	8.96
21	29.44	7.68
22	26.88	8.96
23	26.88	8.96
24	25.60	8.96
25	29.44	8.96
26	26.88	6.40
27	29.44	8.96
28	28.16	8.96
29	26.88	8.96
30	26.88	8.96
31	26.88	8.96
32	24.32	10.24
33	26.88	10.24
34	28.16	8.96

No.	Largo (µm)	Ancho (µm)
35	37.12	8.96
36	25.60	8.96
37	26.88	6.40
38	26.88	8.96
39	26.88	8.96
40	26.88	8.96
41	26.88	8.96
42	26.88	7.68
43	28.16	8.96
44	26.88	10.24
45	25.60	10.24
46	26.88	8.96
47	24.32	8.96
48	29.44	10.24
49	29.44	6.40
50	28.16	8.96
51	26.88	10.24
52	28.16	8.96
53	32.00	8.96
54	26.88	8.96
55	23.04	8.96
56	24.32	6.40
57	33.28	8.96
58	26.88	8.96
59	26.88	8.96
60	25.60	8.96
61	23.04	8.96
62	26.88	10.24
63	26.88	10.24
64	26.88	8.96
65	29.44	10.24
66	26.88	10.24
67	26.88	8.96
68	29.44	8.96

No.	Largo (µm)	Ancho (µm)
69	33.28	8.96
70	24.32	8.96
71	26.88	8.96
72	24.32	8.96
73	26.88	8.96
74	28.16	10.24
75	26.88	8.96
76	26.88	8.96
77	26.88	8.96
78	26.88	6.40
79	26.88	8.96
80	26.88	10.24
81	26.88	8.96
82	25.60	8.96
83	26.88	10.24
84	24.32	8.96
85	23.04	8.96
86	26.88	10.24
87	25.60	8.96
88	23.04	8.96
89	28.16	10.24
90	23.04	7.68
91	26.88	8.96
92	26.88	8.96
93	26.88	8.96
94	29.44	8.96
95	26.88	10.24
96	26.88	8.96
97	26.88	8.96
98	23.04	7.68
99	26.88	10.24
100	28.16	8.96

Anexo 6. Medidas de los conidios de *Pestalotiopsis* obtenidos del material original.

No.	Largo (µm)	Ancho (µm)
1	25.60	7.68
2	28.16	6.40
3	26.88	6.40
4	32.00	7.68
5	26.88	5.12
6	34.56	5.12
7	29.44	5.12
8	28.16	6.40
9	33.28	5.12
10	28.16	6.40
11	26.88	5.12
12	29.44	6.40
13	29.44	6.40
14	33.28	8.96
15	33.28	7.68
16	26.88	6.40
17	32.00	8.96
18	26.88	6.40
19	32.00	8.96
20	34.56	6.40
21	34.56	8.96
22	32.00	5.12
23	26.88	8.96
24	34.56	6.40
25	26.88	6.40
26	32.00	7.68
27	32.00	8.96
28	26.88	5.12
29	29.44	7.68
30	28.16	8.96
31	26.88	5.12
32	29.44	6.40
33	26.88	8.96
34	28.16	5.12

No.	Largo (µm)	Ancho (µm)
35	37.12	6.40
36	25.60	6.40
37	33.28	5.12
38	26.88	8.96
39	32.00	6.40
40	32.00	5.12
41	32.00	7.68
42	32.00	6.40
43	26.88	7.68
44	32.00	6.40
45	32.00	8.96
46	34.56	7.68
47	32.00	6.40
48	34.56	8.96
49	33.28	8.96
50	29.44	5.12
51	34.56	5.12
52	26.88	6.40
53	32.00	6.40
54	26.88	8.96
55	23.04	6.40
56	33.28	6.40
57	33.28	6.40
58	26.88	5.12
59	34.56	6.40
60	25.60	6.40
61	29.44	7.68
62	32.00	7.68
63	26.88	6.40
64	32.00	6.40
65	34.56	6.40
66	34.56	6.40
67	34.56	8.96
68	29.44	6.40

No.	Largo (µm)	Ancho (µm)
69	33.28	8.96
70	29.44	6.40
71	26.88	5.12
72	26.88	6.40
73	25.60	6.40
74	28.16	8.96
75	34.56	6.40
76	32.00	6.40
77	34.56	5.12
78	34.56	8.96
79	25.60	8.96
80	28.16	8.96
81	26.88	8.96
82	33.28	8.96
83	34.56	6.40
84	33.28	6.40
85	33.28	6.40
86	29.44	6.40
87	28.16	7.68
88	34.56	6.40
89	34.56	8.96
90	34.56	6.40
91	32.00	6.40
92	34.56	5.12
93	34.56	5.12
94	29.44	6.40
95	34.56	5.12
96	29.44	5.12
97	34.56	5.12
98	23.04	6.40
99	34.56	5.12
100	28.16	5.12

Anexo 7. Medidas de los conidios de *Pestalotiopsis* obtenidos de aislamientos originales.

No.	Largo (μm)	Ancho (μm)
1	28.16	8.96
2	32.00	5.12
3	34.56	5.12
4	29.44	5.12
5	28.16	8.96
6	28.16	6.40
7	34.56	5.12
8	28.16	6.40
9	29.44	6.40
10	26.88	5.12
11	26.88	6.40
12	25.60	6.40
13	28.16	8.96
14	32.00	5.12
15	26.88	6.40
16	34.56	7.68
17	25.60	6.40
18	26.88	5.12
19	34.56	5.12
20	28.16	8.96
21	26.88	8.96
22	29.44	5.12
23	28.16	5.12
24	26.88	8.96
25	29.44	6.40
26	26.88	5.12
27	29.44	5.12
28	25.60	5.12
29	26.88	6.40
30	29.44	6.40
31	26.88	6.40
32	26.88	6.40
33	25.60	5.12
34	33.28	6.40

No.	Largo (μm)	Ancho (μm)
35	26.88	7.68
36	34.56	6.40
37	34.56	7.68
38	34.56	7.68
39	29.44	6.40
40	26.88	6.40
41	26.88	5.12
42	25.60	6.40
43	25.60	6.40
44	29.44	5.12
45	29.44	6.40
46	33.28	8.96
47	29.44	6.40
48	26.88	6.40
49	26.88	5.12
50	25.60	5.12
51	28.16	5.12
52	25.60	6.40
53	34.56	6.40
54	28.16	8.96
55	28.16	8.96
56	28.16	6.40
57	28.16	5.12
58	34.56	7.68
59	28.16	8.96
60	28.16	8.96
61	28.16	6.40
62	34.56	5.12
63	29.44	6.40
64	28.16	5.12
65	28.16	6.40
66	28.16	5.12
67	28.16	5.12
68	34.56	5.12

No.	Largo (μm)	Ancho (μm)
69	29.44	6.40
70	28.16	5.12
71	28.16	5.12
72	28.16	8.96
73	28.16	6.40
74	28.16	7.68
75	28.16	6.40
76	25.60	6.40
77	28.16	7.68
78	28.16	7.68
79	34.56	7.68
80	26.88	5.12
81	29.44	6.40
82	25.60	6.40
83	29.44	6.40
84	33.28	8.96
85	29.44	5.12
86	26.88	5.12
87	26.88	6.40
88	25.60	6.40
89	28.16	8.96
90	25.60	5.12
91	32.00	6.40
92	28.16	5.12
93	28.16	5.12
94	25.60	6.40
95	28.16	5.12
96	32.00	5.12
97	26.88	6.40
98	34.56	7.68
99	28.16	5.12
100	28.16	8.96

Anexo 8. Medidas de los conidios de *Pestalotiopsis* obtenidos del material inoculado.

No.	Largo (µm)	Ancho (µm)
1	34.56	6.40
2	28.16	8.96
3	34.56	6.40
4	32.00	6.40
5	32.00	5.12
6	34.56	8.96
7	25.60	8.96
8	32.00	8.96
9	32.00	8.96
10	32.00	8.96
11	34.56	6.40
12	33.28	6.40
13	33.28	6.40
14	29.44	6.40
15	28.16	7.68
16	32.00	6.40
17	34.56	8.96
18	34.56	6.40
19	32.00	6.40
20	28.16	8.96
21	32.00	6.40
22	34.56	6.40
23	34.56	6.40
24	28.16	7.68
25	32.00	6.40
26	32.00	8.96
27	32.00	8.96
28	34.56	8.96
29	32.00	6.40
30	32.00	8.96
31	28.16	7.68
32	28.16	8.96
33	28.16	6.40
34	32.00	7.68

No.	Largo (µm)	Ancho (µm)
35	28.16	6.40
36	32.00	6.40
37	32.00	8.96
38	34.56	6.40
39	32.00	5.12
40	29.44	6.40
41	34.56	5.12
42	32.00	6.40
43	32.00	5.12
44	29.44	5.12
45	34.56	5.12
46	29.44	6.40
47	28.16	5.12
48	32.00	5.12
49	28.16	8.96
50	28.16	6.40
51	32.00	7.68
52	28.16	6.40
53	34.56	5.12
54	34.56	5.12
55	32.00	6.40
56	34.56	5.12
57	32.00	5.12
58	34.56	5.12
59	34.56	6.40
60	34.56	6.40
61	34.56	7.68
62	32.00	7.68
63	32.00	8.96
64	28.16	6.40
65	28.16	6.40
66	34.56	5.12
67	32.00	6.40
68	29.44	6.40

No.	Largo (µm)	Ancho (µm)
69	34.56	5.12
70	34.56	6.40
71	25.60	6.40
72	28.16	8.96
73	32.00	5.12
74	32.00	6.40
75	34.56	7.68
76	32.00	6.40
77	28.16	8.96
78	29.44	8.96
79	28.16	6.40
80	34.56	8.96
81	32.00	5.12
82	28.16	8.96
83	28.16	6.40
84	34.56	6.40
85	34.56	6.40
86	28.16	7.68
87	28.16	6.40
88	32.00	8.96
89	34.56	8.96
90	34.56	8.96
91	29.44	6.40
92	28.16	8.96
93	32.00	7.68
94	34.56	8.96
95	26.88	6.40
96	32.00	6.40
97	32.00	6.40
98	32.00	6.40
99	32.00	8.96
100	32.00	5.12

Anexo 9. Medidas de los conidios de *Pestalotiopsis* obtenidos de reaislamientos.

No.	Largo (μm)	Ancho (μm)
1	25.60	8.96
2	33.28	8.96
3	26.88	7.68
4	28.16	6.40
5	26.88	8.96
6	28.16	8.96
7	29.44	8.96
8	28.16	6.40
9	33.28	8.96
10	28.16	5.12
11	28.16	8.96
12	28.16	6.40
13	29.44	6.40
14	28.16	7.68
15	33.28	8.96
16	26.88	6.40
17	28.16	7.68
18	28.16	8.96
19	32.00	7.68
20	34.56	7.68
21	29.44	5.12
22	28.16	8.96
23	28.16	6.40
24	34.56	5.12
25	28.16	6.40
26	28.16	5.12
27	28.16	8.96
28	26.88	5.12
29	32.00	8.96
30	28.16	8.96
31	32.00	5.12
32	26.88	6.40
33	28.16	8.96
34	34.56	5.12

No.	Largo (μm)	Ancho (μm)
35	26.88	8.96
36	28.16	6.40
37	28.16	8.96
38	26.88	8.96
39	29.44	6.40
40	28.16	5.12
41	26.88	8.96
42	29.44	6.40
43	26.88	5.12
44	28.16	6.40
45	37.12	6.40
46	28.16	6.40
47	28.16	7.68
48	28.16	6.40
49	28.16	7.68
50	26.88	6.40
51	28.16	6.40
52	25.60	8.96
53	28.16	6.40
54	28.16	6.40
55	26.88	6.40
56	28.16	6.40
57	25.60	8.96
58	28.16	8.96
59	26.88	6.40
60	33.28	7.68
61	29.44	6.40
62	26.88	6.40
63	26.88	6.40
64	28.16	7.68
65	28.16	6.40
66	28.16	7.68
67	28.16	7.68
68	28.16	8.96

No.	Largo (μm)	Ancho (μm)
69	33.28	7.68
70	29.44	6.40
71	28.16	8.96
72	28.16	8.96
73	28.16	6.40
74	28.16	5.12
75	32.00	6.40
76	28.16	8.96
77	28.16	8.96
78	28.16	6.40
79	34.56	6.40
80	34.56	6.40
81	28.16	7.68
82	28.16	6.40
83	28.16	8.96
84	28.16	8.96
85	28.16	8.96
86	29.44	6.40
87	28.16	8.96
88	28.16	7.68
89	28.16	8.96
90	28.16	6.40
91	28.16	7.68
92	28.16	6.40
93	26.88	6.40
94	28.16	7.68
95	26.88	7.68
96	23.04	8.96
97	28.16	6.40
98	28.16	6.40
99	28.16	6.40
100	28.16	8.96