

UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO

DIVISION DE CIENCIAS FORESTALES

**ECOLOGIA QUIMICA Y HONGOS ASOCIADOS
DE *Dendroctonus valens* Le Conte
(COLEOPTERA:SCOLYTIDAE)**



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

TESIS

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

MAESTRO EN CIENCIAS, EN CIENCIAS FORESTALES

PRESENTA:

GABRIELA TERRAZAS SANCHEZ

Junio del 2006

Chapingo, Texcoco, Edo. de México

BIBLIOTECA DIVISION DE CIENCIAS FORESTALES

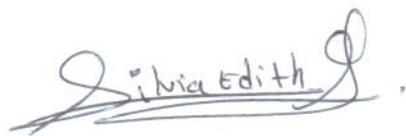
ECOLOGIA QUIMICA Y HONGOS ASOCIADOS DE *Dendroctonus valens*
LeConte (COLEOPTERA: SCOLYTIDAE)

Tesis realizada por Gabriela Terrazas Sánchez bajo la dirección del Comité Asesor indicado. Aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS, EN CIENCIAS FORESTALES


DIRECTOR: M. C. RODOLFO CAMPOS BOLAÑOS


ASESOR: DR. JOSE TULIO MENDEZ MONTIEL


ASESOR: M. C. SILVIA EDITH GARCIA DIAZ


ASESOR: DR. DAVID CIBRIAN TOVAR

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo y a la División de Ciencias Forestales, por haberme permitido seguir forjándome en el largo camino del saber.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico, ya que sin ello no hubiese sido posible alcanzar una etapa más, en mi vida profesional.

Al M. C. Rodolfo Campos Bolaños, por sus excelentes consejos en la dirección del presente trabajo y por la amistad que me brindó durante todo este tiempo.

Al Dr. José Tulio Méndez Montiel por el tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo y el apoyo brindado durante mi estancia en esta institución.

Al M. C. Silvia Edith García Díaz por su paciencia y valiosos conocimientos que depositó en mi para lograr la culminación de este documento.

Al Dr. David Cibrián Tovar por su apoyo para poder culminar con éxito el presente trabajo.

A mis amigos y compañeros Adrian, Boni, Javier y Gricelda que siempre estuvieron dispuestos ayudarme en cada momento.

DEDICATORIA

A mis padres, por sus enseñanzas y consejos, por toda esa confianza que siempre han depositado en mí y que no defraudaré.

A mis hermanos por que siempre conservemos ese ímpetu de estar unidos y no perder esa entereza para lograr lo que nos proponemos.

Dedico este trabajo con todo respeto y amor a mi esposo Alejandro, por que nuestra relación sea un compromiso que nos dé la fuerza para superar las barreras en la vida.

A mis hijos Aldo y el que está por venir, que son para mí, el motor para poder continuar, mi motivo para luchar y mi inspiración para poder soñar.

DATOS BIOGRAFICOS

La autora nació el 25 de octubre de 1977 en Santa Ursula, Texcoco, Estado de México; realizó sus estudios de primaria y secundaria en la misma comunidad. De 1992 a 1995 cursó sus estudios medio superiores en la Escuela Preparatoria de Texcoco. De 1995 al 2000 realizó sus estudios superiores en la División de Ciencias Forestales, de la Universidad Autónoma Chapingo, obteniendo su Título y Cédula Profesional como Ingeniero Forestal en enero del 2001, con el trabajo de tesis: "Diagnóstico y Alternativas de Manejo para la Fauna Silvestre del Parque Estatal Cerro Gordo, Estado de México".

De enero del 2001 a diciembre del mismo año se desempeñó como Técnico Forestal en las oficinas regionales de Texcoco, de la Coordinación General de Conservación Ecológica, de la Secretaría de Ecología del Estado de México.

Del 2003 al 2005, cursó los créditos correspondientes a la Maestría en ciencias en Ciencias Forestales en la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma Chapingo.

RESUMEN

ECOLOGIA QUIMICA Y HONGOS ASOCIADOS DE *Dendroctonus valens* LeConte (COLEOPTERA: SCOLYTIDAE)

TERRAZAS SANCHEZ GABRIELA

Junio del 2006

En el presente trabajo se evaluó la efectividad de atracción de monoterpenos, y se aislaron e identificaron a los hongos asociados a *Dendroctonus valens* en *Pinus leiophylla*, en el ejido de San Francisco Zentlalpan, ubicado en el municipio de Amecameca, Edo. de México. El diseño fue completamente al azar, se utilizaron seis tratamientos, 1) (+)- α -pineno, 2) (-)- α -pineno, 3) (-)- β -pineno, 4) (+)-3-careno, 5) la mezcla ERR (+)- α -pineno, (-)- β -pineno, y (+)-3-careno y 6) el testigo. Se realizó la siembra directa de adultos, larvas y porción de madera de las galerías de *D. valens* en medio de cultivo específico para *Leptographium* spp. (12.5 gr Extracto de Malta + 20 gr Agar + 0.2 gr ciclohexamida + 0.2 gr sulfato de streptomycina y 1000 ml agua esterilizada) y Extracto de Malta Agar (15 gr de Agar + 10 gr de Extracto de Malta) con el objetivo de aislar a los hongos asociados al descortezador, la identificación fue a través de características morfológicas con microscopio compuesto y microscopio de barrido. Los resultados demuestran que el mejor atrayente para *D. valens* fue la mezcla ERR (+) α - pineno, (-) α - pineno y (+) 3 careno, con un total de 41 adultos. Los hongos encontrados asociados a *D. valens* en *P. leiophylla* fueron identificados como *Graphium* spp., y *Leptographium terebrantis*.

Es necesario realizar más estudios en México para conocer esta asociación de *D. valens* y *Leptographium* sp., ya que recientemente esta especie ha causado daños de importancia en plantaciones de pino.

Palabras clave: Descortezadores, monoterpenos y hongos micangiales.

ABSTRACT

CHEMICAL ECOLOGY AND FUNGI ASSOCIATED WITH *Dendroctonus valens* LeConte (COLEOPTERA: SCOLYTIDAE)

TERRAZAS SANCHEZ GABRIELA

Junio del 2006

This research evaluated the effectiveness of monoterpene attraction, as well as isolating and identifying the fungi associated with *Dendroctonus valens* in *Pinus leiophylla*, in San Francisco Zentlalpan, located in Amecameca, in Mexico state. A random design with six treatments was used: 1) (+)- α -pinene, 2) (-) - α - pinene, 3) (-) - β -pinene, 4) (+)-3-carene, 5) the ERR (+)- α -pinene, (-) - β -pinene, and (+)-3-carene mixture, and 6) a control. Adults, larvae and portions of the wood from the galleries of *D. valens* were directly sown in the middle of the specific culture for *Leptographium* spp. (12.5 gr Extract of Malt + 20 gr Agar + 0.2 gr ciclohexamide + 0.2 gr streptomycin sulfate and 1000 ml sterilised water) and Malt Extract Agar (10 gr of Malt Extract +15 gr of Agar) in order to isolate the fungi associated with the bark beetle. Identification was made with a compound microscope and a microscope with a sweeping device to determine morphological characteristics. The results show that *D. valens* exhibited a preference for the ERR (+) α - pinene, (-) α - pinene and (+) 3 carene mixture, with a total of 41 adults. The fungi found to be associated with *D. valens* in *P. leiophylla* were identified as *Graphium* spp. and *Leptographium terebrantis*.

More studies need to be made in Mexico to understand this association of *D. valens* and *Leptographium* sp. since this species has recently caused significant damage in pine plantations.

Words key: Bark beetles, monoterpenes and fungi mycangials.

CONTENIDO

	Página
APROBACION DE LA TESIS DE GRADO.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
DATOS BIOGRAFICOS.....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
CONTENIDO.....	viii
INDICE DE CUADROS.....	xi
INDICE DE FIGURAS.....	xii
INDICE DE ANEXOS.....	xiii
1. INTRODUCCION y OBJETIVOS.....	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1. Descortezadores.....	4
2.1.1. <i>Dendroctonus valens</i> LeConte	4
2.1.2. Estrategia de dispersión de <i>Dendroctonus valens</i> LeConte.....	6
2.2. Hongos micangiales asociados a descortezadores.....	6
2.2.1.. Mecanismo de transporte de los hongos por los descortezadores	6
2.2.2. Grupos de hongos causantes del manchado de la madera.....	7
2.2.2.1. Hongos micangiales asociados a <i>Dendroctonus valens</i>	9
2. 3. Relación entre descortezadores y hongos asociados.....	10

2.3.1. Rango de Interacción potencial entre organismos.....	11
2.3.2. Patogenicidad del hongo manchador y su interacción con el descortezador.....	12
2.3.3. Resistencia del hospedante al descortezador y muerte del mismo..	13
2.4. Especies de hongos asociados a descortezadores reportados en México.....	14
2.5. Las feromonas; una alternativa para la lucha contra las plagas.....	16
2.5.1. Tipos de feromonas.....	16
2.5.2. Aplicaciones de las Feromonas	18
2.5.3. El uso de las Feromonas para el monitoreo de poblaciones de plagas.....	19
3. MATERIALES Y METODOS.....	21
4.1. Ubicación geográfica.....	21
4.2. Descripción y análisis del experimento.....	22
4.3. Diseño experimental.....	23
4.3.1. Análisis Estadístico.....	24
4.4. Identificación de los hongos asociados a <i>D. valens</i>	26
4.4.1. Aislamiento e Identificación.....	27
4.4.2. Preparación de muestras para microscopia de barrido.....	28
5. RESULTADOS Y DISCUSION.....	29
5.1. Monitoreo de <i>Dendroctonus valens</i> con terpenos del hospedante.....	29
5.1.1. Primera Realeatorización.....	29
5.1.2. Segunda Realeatorización.....	30
5.1.3. Tercera Realeatorización.....	30

5.1.4. Cuarta Realeatorización.....	31
5.1.5. Datos Finales.....	32
5.2. Identificación de Hongos Asociados a <i>Dendroctonus valens</i>	36
5.2.1. Descripción de las especies.....	38
5.2.1.1. <i>Graphium</i> sp.	38
5.2.1.2. <i>Leptographium terebrantis</i>	40
6. CONCLUSIONES.....	43
7. LITERATURA CITADA.....	44
8. ANEXOS.....	50

INDICE DE CUADROS

No.		Página
1	Hongos del Género <i>Ophiostoma</i> y sus anamorfos reportados en México	15
2	Bitácora de Obtención y desarrollo de cepas puras.....	37

INDICE DE FIGURAS

No.	Página
1 Ubicación geográfica del sitio de muestreo.....	21
2 Metodología empleada en campo.....	26
3 Respuesta de <i>D. valens</i> a los terpenos, San Francisco Zentlalpan, 19-jun-04	29
4 Respuesta de <i>D. valens</i> a los terpenos, San Francisco Zentlalpan, 3-jul-04.....	30
5 Respuesta de <i>Dendroctonus valens</i> a los terpenos, San Francisco Zentlalpan, 16-jul-04.....	31
6 Respuesta de <i>Dendroctonus valens</i> a los terpenos, San Francisco Zentlalpan, 24-jul-04.....	32
7 Respuesta de <i>Dendroctonus valens</i> a los terpenos.....	33
8 Cinemas y Conidioforos de <i>Graphium</i> sp.	39
9 Desarrollo de la colonia de <i>Graphium</i> sp. en EMA.....	39
10 Imágenes de <i>Leptographium terebrantis</i> tomadas del microscopio Compuesto.....	40
11 Imágenes de <i>Leptographium terebrantis</i> tomadas con el microscopio Electrónico de Barrido.....	41

INDICE DE ANEXOS

No.	Página
1 Características morfológicas de los hongos asociados a <i>Dendroctonus valens</i>	51
2 ANOVA, Análisis estadístico de la respuesta de <i>Dendroctonus valens</i> a los terpenos.....	52
3 Comparación de medias con la prueba de Tukey.....	53

1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

La mayoría de las especies del género *Pinus* son nativas del Hemisferio Norte, y son un componente importante de los ecosistemas templados fríos. Su distribución en Norte América es desde Alaska a Nicaragua (Richardson, 1998).

En México se presentan un gran número de especies del género *Pinus* que son atacadas por los descortezadores del género *Dendroctonus*, que es el principal factor de mortalidad de árboles en bosques de *Pinus* y *Pseudotsugae* en México, (Cibrián *et al.*, 1995).

El descortezador *Dendroctonus valens*, es un descortezador secundario de los pinos de Norte América que ataca a todas las especies de pino (Wood, 1982, Cibrián *et al.*, 1995). El daño de *D. valens* es de poca importancia debido a que secundariamente ataca árboles enfermos, debilitados, estresados, afectados por otros descortezadores, ocoteados y tocones recientes; cuando las poblaciones de insectos son altas pueden atacar árboles verdes que generalmente no son exitosos (Cibrián *et al.*, 1995). Sin embargo, actualmente *D. valens* ha causado daños de importancia (Rappaport *et al.*, 2001). A mediados de los años 1980s *D. valens* fue accidentalmente introducida en China, donde ha causado la muerte de mas de 6 millones de *Pinus tabuliformis* siendo la segunda plaga forestal más dañina en China (Miao *et al.*, 2001).

Descortezadores del género *Dendroctonus* que colonizan coníferas vivas están frecuentemente asociadas con especies de hongos que transportan en sus estructuras especializadas conocidas como micangios o sobre la superficie del cuerpo. Los hongos se benefician de la asociación porque son transportadas a un nuevo hospedero. Los *Dendroctonus* se benefician de la asociación, debido a que se alimentan de las estructuras del hongo o a que el hongo contribuye a la muerte del árbol hospedante a través de la penetración del micelio en los tejidos del hospedante y hace más favorable el nicho ecológico para el desarrollo del descortezador; *D. valens* es una especie vector de hongos del grupo de los ofiostomatoides que tiene algunas especies que son patógenos primarios y muchos otros son agentes causales de manchas en la albura. En *D. valens*, que es una especie altamente tolerante a hospedantes resineros, se asocia al hongo *Leptographium terebrantis* que es altamente patogénico en plántulas, pero que no se ha demostrado su patogenicidad en árboles maduros (Paine *et al.*, 1997).

D. valens, es una especie que raramente mata a sus árboles hospedantes, ésta especie no tiene feromonas de agregación, coloniza la base de los árboles que están debilitados o que presentan daños en la raíz por pudriciones, pero se ha demostrado que es atraído por químicos volátiles (kairomonas) emitidas por los pinos hospedantes. La mayoría de estas kairomonas son monoterpenos isoprenoides, como el α – pineno, β – pineno y 3 careno, que están implicados en la orientación hacia la localización del hospedante. De estos tres

monoterpenos, los dos isómeros ópticos del α – pineno, tienden a presentar un comportamiento activo para *Dendroctonus valens*; por lo que en la presente investigación se plantearán los siguientes objetivos:

- Probar varios atrayentes para *D. valens*, en *Pinus leiophylla*.
- Aislar e Identificar los hongos asociados a *D. valens* en *P. leiophylla*.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. Descortezadores

Los insectos descortezadores del orden Coleoptera, de la familia Scolytidae se alimentan de floema y cambium de las coníferas. En esta familia encontramos al género *Dendroctonus*. En México se reportan 11 especies de este género, varias de ellas son de gran importancia económica, al grado que se les reconoce como las plagas forestales más dañinas del país (Cibrián *et al.*, 1995).

2.1.1. *Dendroctonus valens* LeConte

El adulto es cilíndrico; mide de 5.7 a 10 mm de longitud, es de color rojo claro, o rojo oscuro. Las antenas presentan un mazo antenal simétrico y con una coloración rojiza uniforme.

Es un descortezador secundario que invade los tocones y la porción basal de los árboles que han sido atacados por un descortezador primario. En la parte central de México generalmente presenta dos generaciones al año. El ataque lo inician las hembras en la parte baja de los árboles. En la superficie de la corteza de los árboles atacados se observan grumos de resina que miden hasta 5 cm de longitud. Los huevecillos son oblongos a ovales, blancos opacos y son depositados en grupos de 10 a 40 individuos, siempre en un lado de la galería y son cubiertos por desechos. En diez días las larvas emergen y hacen una galería comunal, amplia a manera de caverna. La duración del estado de larva es de 60 a 100 días dependiendo de las condiciones de la temperatura. Las

larvas construyen una galería individual corta, al final de la cual forman la cámara pupal. Las pupas presentan apéndices libres y miden 9mm de longitud y son de color blanco cremoso (Cibrián *et al.*, 1995).

Rose (1966), menciona una larga lista de especies hospederas, *Pinus arizonica*, *P. chihuahuana*, *P. contorta*, *P. coulteri*, *P. echinata*, *P. edulis*, *P. jeffreyi*, *P. lambertiana*, *P. lawsoni*, *P. leiophylla*, *P. monticola*, *P. murrayana*, *P. oocarpa*, *P. ponderosa*, *P. pseudostrobus*, *P. radiata*, *P. resinosa*, *P. rigida*, *P. rudis*, *P. sabiniana*, *P. sylvestris*, *P. strobioformis*, *P. strobus*, *P. tenuifolia*, *P. virginiana*, *Abies concolor*, *Larix laricina*, *Picea canadensis*, *P. exelsa* y *P. rubens*.

Dendroctonus valens ataca árboles moribundos o tocones verdes. Casi siempre se presentan en la base del árbol y son menos frecuentes hasta el primer metro de altura. Cuando existen grandes poblaciones de insectos pueden atacar árboles verdes sin embargo, es raro que tengan éxito (Cibrian *et al.*, 1995). Es uno de los descortezadores con mayor frecuencia y distribución, es considerado de importancia secundaria, por lo que no se realizan actividades de control. Cuando los insectos llegan atacar a un árbol de alto valor se recomienda una labor quirúrgica, es decir, extraer de manera mecánica a los insectos atacantes (Cibrián *et al.*, 1995).

2.1. 2. Estrategia de Dispersión de *Dendroctonus valens* LeConte

El vuelo es causa de dispersión de las poblaciones y la localización de alimentos y alojamiento. La presencia de alimentos apropiados y alojamiento en cantidades suficientes para sostener a las poblaciones es un factor en la dinámica de población (Rose, 1966).

El vuelo de dispersión de *D. valens* es primeramente para localizar un árbol hospedero, se sabe que *D. valens* tiene atracción por la trementina, esto influye en su selección del árbol. Probablemente el olor de la emanación de la resina producida por el descortezador primario sea la causa de la atracción de *D. valens* (Rose, 1966).

2.2. Hongos micangiales asociados a Descortezadores

2.2.1. Mecanismo de transportación de los hongos por los descortezadores

La asociación que hay entre descortezadores y hongos es compleja. El hongo asociado puede ser transportado internamente o externamente a través de los micangios (Paine *et al*, 1997). Los micangios son estructuras cuticulares cuya función es la de transportar las esporas de los hongos y micelio. *Dendroctonus approximatus*, *D. frontalis*, *D. brevicomis* y *D. adjunctus* poseen estructuras lineales cuticulares con células secretoras al interior del borde del protorax (micangios). Las hembras de *D. frontalis* y *D. brevicomis* han sido relacionadas

en el transporte de especies de basidiomycetes como *Entomocorticium dendroctoni* y *Ceratocystiopsis ranaculosus*. Un ascomyceto no manchador es común en los micangios de *Dendroctonus frontalis* y ha sido relacionado a especies de *Ceratocystiopsis* que también es común en los micangios de *D. brevicomis*. Otro es *Ophiostoma minus*, un ascomycete causante de la mancha azul y *Ophiostoma nigrocarpum* un hongo no manchador ambos aislados de la superficie del cuerpo de los descortezadores (Paine *et al.*, 1997).

Ophiostoma montium y *O. clavigerum* han sido aislados de los micangios de *D. ponderosae* y un hongo manchador ha sido aparentemente relacionado a *O. clavigerum* también ha sido aislado de los micangios de *D. jeffreyi*. Se han hecho aislamientos relacionados a basidiomycetes de las cámaras pupales de los escarabajos y no de los micangios. Las levaduras normalmente se han obtenido de los micangios. Los hongos manchadores como *Ophiostoma ips* y *O. minus* se han obtenido de aislamientos del cuerpo y sistemas de galerías de *D. ponderosae* (Paine *et al.*, 1997).

2.2.2. Grupos de hongos causantes del manchado de la madera

La decoloración o manchado de la madera por hongos se define por el color anormal que adquiere la madera, predominando el color azul debido a que los hongos poseen hifas pigmentadas, las cuales a través de un fenómeno de refracción, la luz pasa sobre las hifas, dando una coloración azulada a la madera. Los hongos cromógenos cambian el color natural de la madera, lo cual

afecta su apariencia estética y por lo tanto reduce el valor de la madera aserrada o del producto terminado (Gil, 2001). Los hongos cromógenos incluyen todos aquellos hongos capaces de producir cambio de coloración en los tejidos de la madera o manchas biológicas, los cuales pertenecen a los Ascomycetes y Deuteromycetes, siendo los géneros más representativos, *Ceratocystis*, *Ophiostoma*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Diplodia*, *Graphium*, *Yormodendrum*, *Trichoderma*, entre otros (Junac, 1988).

Strong *et al.* (1997) mencionan que existen tres grupos de hongos que atacan la madera recién aserrada, estos son: los hongos Ophiostomatoides, que incluyen géneros tales como *Ceratocystis*, *Ophiostoma* y *Ceratocystiopsis*, manchan la madera penetrando sus hifas dentro de los rayos y traqueidas; Las levaduras como *Hormonema dematoides*, *Aureobasidium pullulans*, *Rhinocladiellae atrovirens* y *Phialophora spp.*, causan manchado superficial en la madera y los hongos que causan mohos, tales como *Alternaria alternata*, *Cladosporium sphaerosperum*, *Penicillium spp.* y *Trichoderma sp.*, de los cuales algunos producen abundantes conidios, manchan la superficie de la madera y causan decoloración en la albura.

Respecto a los tipos de manchado Butin (1965), (citado por Gil, 2001), los clasifica dependiendo del tiempo en que aparezcan en la madera: 1) Manchado del fuste (manchado primario), éste se presenta en árboles recién cortados, los ascomicetos y deuteromicetos son los responsables de este manchado,

dispersando sus esporas por escarabajos descortezadores y ambrosiales; 2) Manchado de la madera aserrada (manchado secundario), éste se presenta después del aserrío de las trozas, aquí varios deuteromicetos son los responsables de este tipo de manchado, dispersando sus esporas por medio del viento y 3) Manchado de la madera en uso (manchado terciario), este se presenta sobre madera ya procesada, siendo los principales responsables de este tipo de manchado *Aureobasidium pullulans* y *Clerophoma pithyophyla* .

El género *Ceratocystis*, es causante del azulado o mancha azul en la madera de *Pinus* spp., ocasionando un problema serio para su comercialización. Marmolejo y Butin (1993), reportan 10 especies de hongos, todos causantes del manchado de la madera; *Ophiostoma abietinum*, *O. conicolum*, *O. ips*, *O. minus*, *O. piceae*, *O. piliferum*, *O. Pluriannulata*, *Ceratocystiopsis collifera*, *C. fasciata* y *C. minuta*.

2.2.2.1. Hongos micangiales asociados a *Dendroctonus valens*

Jiménez M. (2003), reportó *Leptographium* sp., asociados a *D. valens* y el desarrollo de peritecios de *Ophiostoma* sp., en *Pinus leiophylla*, en Atlautla, Estado de México.

Marmolejo & Butin (1993), reportan *Ceratocystiopsis collifera* asociado a *D. valens*, en *Pinus teocote*; en el estado de Nuevo León, México.

Zhou, *et al* (2004), reportan en México a *Ceratocystis tubicollis* asociado a *Dendroctonus valens*, en *Pinus teocote*.

Owen, *et al* (1987), realizaron un estudio de patogenicidad de hongos aislados de tres especies de *Dendroctonus*; *D. valens*, *D. brevicomis* y *D. ponderosae*. Ellos mencionan que realizaron inoculaciones en arbolitos de *Pinus ponderosae* con hongos aislados de estas tres especies, donde se menciona que el hongo que aislaron de *D. valens* fue *Leptographium terebrantis*; *Ceratocystis minor* de *D. brevicomis* y *C. clavigera* de *D. ponderosae*. Dicha prueba demostró que el hongo más agresivo fue *L. terebrantis* causando una gran mortandad en los arbolitos en comparación con los hongos obtenidos de las otras dos especies de *Dendroctonus*.

2.3. Relación entre descortezadores y hongos asociados

Las relaciones entre descortezadores y el hongo asociado, con respecto al hospedante que son las coníferas, han sido objeto de intensos estudios y últimas revisiones. A la conclusión que se llega es que el hongo de la mancha azul es el responsable primario de la mortalidad de los árboles atacados por descortezadores; empezando con las observaciones en la madera de los árboles muertos por los descortezadores, estos presentan un manchado, esto quiere decir que los descortezadores son capaces de dispersar a los hongos causantes de la mancha en la madera, raramente se llega a encontrar a un escarabajo que no tenga presencia de hongos, y el hongo manchador puede matar árboles inoculando el hongo y sin la presencia del descortezador. El

paradigma sugiere que aunque los mecanismos no son totalmente comprensibles un árbol es muerto como resultado de acciones simultáneas e interacciones, que más bien son componentes de acciones sucesivas de un vector y un patógeno. Las relaciones entre descortezadores y hongos causantes de la mancha azul han sido descritas como simbióticas o mutualistas (Paine *et al.*, 1997).

2.3.1. Rango de Interacción potencial entre organismos

Los hongos micangiales se ven beneficiados por la asociación con los escarabajos vectores a desplazarse entre los árboles. La fuerte evolución de los micangios sugiere que los escarabajos sólo se benefician de la asociación. Aunque parezca que los hongos micangiales probablemente no sean los responsables de la muerte del árbol, su papel potencial en la reducción de la resistencia del árbol durante la colonización con su escarabajo vector no puede ser ignorado por las larvas de *D. frontalis* y *D. brevicornis* que se alimentan intensivamente en las galerías larvales en el cambium. Sin embargo éstas en sus primeros instares se alimentan de hongos micangiales que tienen un crecimiento ambrosial. Los hongos u otras asociaciones pueden sólo alterar la calidad nutricional en los tejidos del hospedante. Los hongos micangiales, bacterias y levaduras asociados con los micangios, también contribuyen a que haya un sistema de comunicación química en los descortezadores. Microorganismos asociados con *D. ponderosae* y *D. frontalis* han demostrado que son capaces de convertir verbenoles a verbenonos. Las interacciones entre

escarabajos y hongos son complejos, y estas pueden ser positivas o negativas, dependiendo del ecosistema y ciclo de vida (Paine *et al.*, 1997).

2.3.2. Patogenicidad del hongo manchador y su interacción con el descortezador

En 1949 Hetrick, observó árboles muertos por *Dendroctonus frontalis* que carecían de la mancha azul en la madera; el reporte inicialmente no fue tomado en cuenta; sin embargo, estando activa las infestaciones *D. frontalis* ha sido observada una pequeña o nula mancha azul. Esto sugiere que el hongo causante de la mancha azul no era necesario para causar la muerte del árbol o para que el escarabajo se desarrollara bajo estas condiciones; sin embargo, la presencia de otros hongos no manchadores han contribuido a la mortalidad de los árboles (Paine *et al.*, 1997).

Parmeter *et al.*, (1992), sugirieron que la oclusión de los tejidos en la madera temprana no es un factor que determinen los síntomas que se presentan después del ataque de descortezadores. Sin embargo, Hobson *et al.*, (1994), demostraron que la penetración de hongos en los tejidos de la madera, es seguida por la oclusión de los tubos de la madera y concluyen que no hay mutualismo entre escarabajos y hongos manchadores. Los hongos patogénicos débiles están asociados con escarabajos más agresivos; alternativamente *Leptographium terebrantis* es un hongo altamente patogénico y asociado con *D. terebrantis* y *D. valens*, dos especies que raramente causan la muerte de los

árboles y son altamente tolerantes a la resina de los hospedantes. Sin embargo, no se ha demostrado que los hongos causen la muerte de los árboles maduros (Paine *et al.*, 1997).

2.3.3. Resistencia del hospedante al descortezador y la muerte del mismo

Muchas especies de descortezadores tienen una alta efectividad de asociación con hongos patógenos manchadores, pero la probabilidad de que los descortezadores causen la muerte de cualquier árbol en particular es relativamente baja. Obviamente los árboles tienen defensas efectivas contra la colonización sucesiva de los descortezadores. La elaboración de oleoresina y sistema de ductos de resina constituyen la defensa inicial encontrada por los descortezadores, y el proceso de invasión induce cambios bioquímicos y celulares en los tejidos del hospedante que puede intoxicar y aislar a los organismos invasores (Paine *et al.*, 1997).

La habilidad del árbol hospedante a la resistencia de la colonización está en función del vigor del árbol, condiciones del sitio, así como del tamaño de la población del descortezador. A través de estudios de colonización del insecto e inoculación del hongo ha sido claramente demostrado que la resistencia del hospedante es un umbral (expresado en descortezador atacante por unidad de superficie), que está relacionado a las condiciones del hospedante. El concepto umbral de la resistencia del hospedante ha sido entendido como la respuesta al medio ambiente y al estrés biótico. Si el descortezador ataca en densidades

bajas la resistencia y la defensa del árbol no ha sido vencida, los insectos continuarán secretando feromonas, pero la secreción se detiene una vez que la resistencia del hospedante ya está vencida (Paine *et al.*, 1997).

2.4. Especies de hongos asociados a descortezadores reportados en México.

Los descortezadores son vectores comunes de *Ophiostoma* spp. En México *Dendroctonus mexicanus* e *Ips calligraphus* fueron encontrados en algunas especies de pino, como *Pinus maximinoi* y *P. pseudostrobus*, que son hospedantes de ambas especies de insectos, recientemente se obtuvieron muestras de estos insectos y de sus galerías, identificando en total seis especies de *Ophiostoma* spp. asociados a estos, donde se incluye a una nueva especie reportada para México que es *Ophiostoma nigrocarpu* (fig. 1). Esto lo realizaron a través de una técnica muy avanzada que es la secuencia de ADN y análisis filogenética (Zhou *et al.*, 2005).

CUADRO 1. Hongos del género *Ophiostoma* y sus anamorfos reportados en México

ESPECIES DE HONGO	HOSPEDANTE	INSECTO ASOCIADO
<i>O. abietinum</i> Marmolejo & Butin	<i>Abies vejari</i>	<i>Pseudohylesinus</i> sp
<i>O. conicolum</i> Marmolejo & Butin	<i>Pinus cembroides</i>	<i>Conophthorus cembroides</i>
<i>O. hyalothecium</i> Davison	<i>Pinus pseudostrobus</i>	-----
<i>O. ips</i> (Rumbold) Nannfeldt	<i>Pinus teocote</i> <i>Pinus pseudostrobus</i>	<i>Dendroctonus mexicanus</i> <i>ips</i> sp.
<i>O. minus</i> (Hedgcock) H & P. Sydow	<i>Pinus arizonica</i>	-----
<i>O. piceae</i> (Münch) H & P. Sydow	<i>Quercus affinis</i>	-----
<i>O. piliferum</i> (Fries) H & P. Sidow	<i>Pinus hartwegii</i>	-----
<i>O. pluriannulatum</i> (Hedgcock) H & P. Sydow	<i>Quercus affinis</i> <i>Pinus pseudostrobus</i>	-----
^b <i>Ceratocystis tubicollis</i> Olchow & Ried	<i>Pinus teocote</i>	<i>Dendroctonus valens</i>
<i>C. adiposa</i> (Butler) Moreau	Suelo	-----
<i>Cop. Collifera</i> Marmolejo & Butin	<i>Pinus teocote</i> <i>Pinus hartwegii</i>	<i>Dendroctonus valens</i>
<i>Cop. fasciata</i> (Wright & Cain) Upadhyay	<i>Pinus pseudostrobus</i>	<i>Dendroctonus</i> <i>mexicanus</i>
<i>Cop. minuta</i> (Siem) Upadhyay & Kendrick	<i>Pinus pseudostrobus</i>	<i>Dendroctonus</i> <i>mexicanus</i>

FUENTE: Zhou X. *et al.*, 2005.

En el estado de Nuevo León, México, se reportan siete especies de *Ophiostoma* y tres de *Ceratocystiopsis* asociadas al manchado azul de la madera colectadas de siete especies de árboles: *Abies vejari*, *Pinus cembroides*, *P. teocote*, *P. arizonica*, *Quercus affinis*, *Pinus hartwegii* y *P. pseudostrobus*. Las especies reportadas son: *Ophiostoma abietinum*, *O. conicolum*, *O. ips*, *O. minus*, *O. piceae*, *O. piliferum*, *O. pluriannulata*, *Ceratocystiopsis collifera*, *C. fasciata* y *C. minuta* (Marmolejo y Butin, 1993).

2.5. Las Feromonas, una alternativa en la lucha contra las plagas

Los insectos emiten productos químicos orgánicos, los cuales provocan una respuesta en otros individuos de su misma especie o de otra; estos productos se llaman "semioquímicos". Cuando los semioquímicos ejercen su acción sobre individuos de la misma especie se llaman feromonas; cuando los semioquímicos ejercen su efecto sobre individuos de otra especie se llaman alelomonas, si dicho efecto es beneficioso para la especie emisora se llaman alomonas y cuando es perjudicial se llaman kairomonas (Primo, 1991).

2.5.1. Tipos de Feromonas

Primo (1991), describe varios tipos de feromonas:

- a) Feromonas de atracción sexual. Son producidas y emitidas por las hembras, en glándulas situadas en segmentos ventrales. Muchas veces son mezclas de isómeros cis – trans o quirales. Esto indica que se trata de procesos muy sofisticados y muy precisos.

- b) Feromonas de agregación. Estas orientan a machos y hembras de una especie hacia lugares de concentración, alrededor de los individuos emisores; estos lugares son favorables para anidar la colonia o para el ataque a plantas huésped. Esta feromona se encuentra, sobre todo en coleópteros e himenópteros.
- c) Feromonas trazadoras. Se refiere a los insectos que utilizan feromonas para trazar el camino que conduce a una fuente de alimento o al lugar para establecer una nueva colonia.
- d) Feromonas de alarma. Son emitidas cuando un individuo de la especie detecta un peligro y sirven para avisar a sus coespecíficos próximos.
- e) Feromonas disuasorias. Son para ahuyentar a los insectos e inhiben su acercamiento a ciertos objetivos.
- f) Feromonas que inducen cambios fisiológicos permanentes en otros individuos de la misma especie. En los insectos sociales, los individuos especializados emiten sustancias que inducen los cambios fisiológicos y morfológicos que dan lugar a la diferenciación de castas, la atrofia de ovarios, etc.

El empleo de feromonas en la lucha contra plagas ofrece grandes ventajas: actúan específicamente y no afectan a los insectos depredadores; las conocidas actualmente tienen baja toxicidad para animales superiores y no dejan residuos contaminantes; sin embargo, uno de los problemas importantes

es que algunas se alteran con la luz, el calor la humedad o el oxígeno y que otras son caras (Primo,1991).

2.5. 2. Aplicaciones de las Feromonas

Entre las aplicaciones más importantes de las feromonas, Primo (1991), menciona las siguientes:

- Monitoreo de la presencia, intensidad y extensión de una plaga, mediante trampas distribuidas estratégicamente y recuento de los insectos atrapados.
- Capturas en masa, mediante trampas de distintos tipos. En éstas dos la feromona se debe preparar con alguna formulación que garantice una emisión lenta y duradera y se sitúa en el centro de la trampa.
- Atracción de los insectos hacia una superficie donde se contamina con un tóxico, un esterilizante sexual o un microorganismo entomopatógeno.
- Confusión sexual, también llamada disrupción de la cópula o impregnación del aire.

Otra vía de gran interés es el empleo de feromonas, en programas de lucha integrada, junto con agentes biológicos y, a veces, con pequeñas cantidades de tóxicos. Muchas plantas contienen sustancias que son atrayentes de determinadas especies de insectos; se encuentran sobre todo en los aceites esenciales y una gran parte son terpenoides. En algunos casos las propias feromonas emitidas por los insectos, son las mismas sustancias que se

encuentran en las plantas y probablemente las ingieren con los alimentos; en otros casos el insecto transforma los compuestos vegetales metabólicamente o por su flora intestinal, en otros que son sus feromonas específicas. Son más frecuentes los casos de transformación de terpenoides ingeridos. Por otra parte las plantas producen sustancias atrayentes específicas, que contribuyen a relaciones ecológicas planta – insecto resultantes de una evolución común (Primo,1991).

2.5.3. El uso de las Feromonas para el monitoreo de poblaciones de plagas.

La técnica de monitoreo más desarrollada es, por la cantidad de capturas en trampas, en ese momento se detecta la presencia o invasión de la plaga que determina la decisión de realizar el tratamiento con un insecticida u otro medio. Las trampas contienen un emisor de la feromona atrayente, específica de la plaga, éstas, están situadas espaciadamente, para controlar áreas extensas y los insectos capturados se cuentan con intervalos de dos a siete días. La colocación de trampas con feromonas atrayentes, para capturar grandes masas de insectos (CMT), es un método no contaminante que va desarrollándose, mediante experiencias en gran escala, y que, para algunas plagas, ha alcanzado ya un uso extenso. En éste método se han de cumplir ciertas condiciones para el éxito de los tratamientos que son: feromonas correctamente dosificadas, emisores de larga duración, estrategia adaptada a la biología del insecto, no reinfección por áreas vecinas y además un diseño adecuado de las

trampas, que deben ser capaces de atrapar gran número de insectos y ser duraderas y de fácil limpieza (Primo, 1991).

Se pueden usar feromonas sexuales femeninas, que atraen machos y reducen las copulaciones a niveles muy bajos, pero para algunas plagas forestales, se emplean también feromonas de agregación, atrayentes alimentarios, o mezcla de ambos. Hay muchos diseños de trampas, las más usadas son tubos con orificios de fácil entrada y difícil salida, o embudos, en ambos casos, hay un dispositivo para el emisor de feromona y un saco recolector. La CMT sólo se ha aplicado con éxito en pocos casos donde se consigue reducir la población a límites comercialmente tolerables, que permitan convivir con la plaga. Esta técnica ha alcanzado la escala comercial en plagas forestales de Europa y de América (Primo, 1991).

Ips typographus es una plaga muy dañina en los bosques del norte de Europa. En Noruega, se han hecho campañas muy extensas, utilizando una mezcla de ipsdienol, metil-butenol y cis-verbenol. Los machos, son atraídos por terpenos producidos por el árbol y, una vez instalados, emiten feromonas de agregación que, sinérgicamente con los terpenos, atraen a machos y hembras, las galerías que producen se infectan por hongos y el árbol muere. Otras muchas experiencias para CMT se están desarrollando en muchos países y hay grandes posibilidades de que se pueda aplicar este método a otras muchas plagas, con ventajas sobre los insecticidas (Primo, 1991).

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Ubicación Geográfica

La investigación se realizó en el Ejido de San Francisco Zentlalpan, municipio de Ameca Ameca, Estado de México. El sitio donde se estableció el experimento presenta una vegetación de pino – encino, *Pinus leiophylla*, y reforestación con *P. ayacahuite*, *P. greggii*, *P. patula* y *P. pseudostrobus*, presenta una altitud aproximada de 2420 msnm y presenta un ataque por plaga de *Dendroctonus mexicanus*. Está situada, al este del Distrito Federal y en los límites con el estado de Puebla, al pie de las estribaciones del Popocatepetl e Iztaccíhuatl. Su clima es frío y húmedo.



Fig.1: Ubicación geográfica del sitio donde se colocaron las trampas y se realizó la colecta de adultos, larvas y madera de la corteza de galerías de *D. valens*

4.2. Descripción y Análisis del Experimento

El experimento se realizó en dos fases. La primera fue una prueba de varias sustancias atrayentes (kairomonas) utilizando trampas y la segunda consistió en colecta de adultos de *Dendroctonus valens* y material de galerías para identificar los hongos asociados.

Prueba de sustancias atrayentes

Se seleccionaron los semioquímicos con base a reportes de estudios previos con *D. valens* (Erbilgn and Raffa, 2000). Se utilizaron cuatro cebos simples de monoterpenos **(+) - α - pineno**, **(-) - α - pineno**, **(-) - β - pineno**, **(+) - 3 - careno**, mas la combinación de tres compuestos del llamado escarabajo rojo de la resina (ERR) en proporción 1:1:1 de **(+) - α - pineno**, **(-) - β - pineno**, **(+) - 3 - careno** y el testigo sin cebo, realizándose cuatro repeticiones.

Todos los químicos utilizados tuvieron una pureza mayor al 95% y fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis Missouri, USA) y de Phero Tech, Inc. (Delta, BC, Canada). Cada aparato de liberación de los monoterpenos simples consiste de una botella de polietileno de 15 ml (Phero Tech, Delta, BC, Canada) llenado con 8 ml del monoterpeno. El alto costo de los monoterpenos puros, prohíbe su uso para llenar los frascos de 15 ml. Cada frasco contenía 100 mg de BHT (butylhydroxytolueno) (sigma-Aldrich Chemical Co. St Louis Missouri, USA) como antioxidante. Cada químico tenía una liberación constante de 103.4 ± 11.3 mg/día a $20 \pm 4.3^{\circ}\text{C}$ con 6.2 km/hr ± 2.3

velocidad del viento y una duración de 30 días en el campo. La combinación de cebos llamada ERR contenía 15 ml de los tres compuestos, (5ml de cada uno de los tres monoterpenos), mezclado con un estabilizador y antioxidante liberado a una tasa ligeramente alta de 110 mg/ día bajo condiciones similares del ambiente a los anteriores. La tasa ligera, pero inevitable diferencia de la tasa de liberación, puede no tener efecto significativo en nuestra inferencia total, especialmente tomando en cuenta la liberación en el ambiente de monoterpenos por *Pinus leiophylla* en un rodal forestal típico (Schade y Goldstein, 2003).

Los cebos fueron colocados en las trampas multi-embudos tipo Lindgren que son las recomendadas por la empresa (Phero Tech, Inc., Delta, Bc, Canada) para trampear *Dendroctonus valens*. En el bote colector de la trampa se colocó un insecticida en lámina de plástico saturada con 2.2 -diclorovinyl dimetil fosfato (Hercon Vaportape II Insectidal strips, hercon Environmental Co., Emigsville, PA, USA) para prevenir la depredación.

4.3. Diseño Experimental.

El experimento es un Diseño Completamente al Azar, por lo tanto el modelo estadístico que se empleó es el siguiente:

Modelo lineal: $Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$

Y_{ij} = variable respuesta (numero de individuos por tratamiento)

μ = efecto de la media

Ti = Tratamientos (monoterpenos y testigo)

ϵ_{ij} = error experimental

El diseño experimental fue completamente al azar con varias mediciones. Las trampas fueron realeatorizadas durante el muestreo. Se colocaron 30 trampas multi-embudos tipo Lindaren, entre árboles hospedantes en cinco por seis en cuadrícula (mínimo 20 m entre trampas), se empleó el método de Rappaport *et al.* (2001). La colecta de insectos de las trampas se realizó de la misma manera a que se encuentran los intervalos de realeatorización y los escarabajos capturados fueron contados y llevados para etiquetarse y guardar en la colección de insectos de la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma Chapingo.

4.3.1. Análisis Estadístico.

Para evaluar si existen diferencias entre los distintos tratamientos se tomó en cuenta el número de descortezadores colectados por tratamiento en el sitio; para ello se realizó un análisis de varianza, por medio de SAS v.8. con una confiabilidad del 0.05 (95 %), donde la hipótesis a probar es:

Ho: No hay diferencia entre los tratamientos a base de feromonas para la atracción de *D. valens* VS

Ha: Al menos un tratamiento es diferente para la atracción de *D. valens*

Se realizó una comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey. Ambos resultados se pueden observar en anexos 2 y 3.

4.4. Identificación de los hongos asociados a *D. valens*.

En el campo se realizó la siembra directa de diez adultos de *D. valens* que se obtuvieron vivos y se mataron al momento de colocarlos en las cajas de petri que contenían medio específico Extracto de Malta Agar (12.5 gr Extracto de Malta + 20 gr Agar + 0.2 ciclohexamida + 0.2 gr sulfato de streptomycina), para el desarrollo de los hongos y colocarlos en el laboratorio para el desarrollo del hongo. Además se colectaron larvas, adultos y porciones de madera de las galerías para llevar al laboratorio y sembrar en medios específicos (ver Fig. 2).

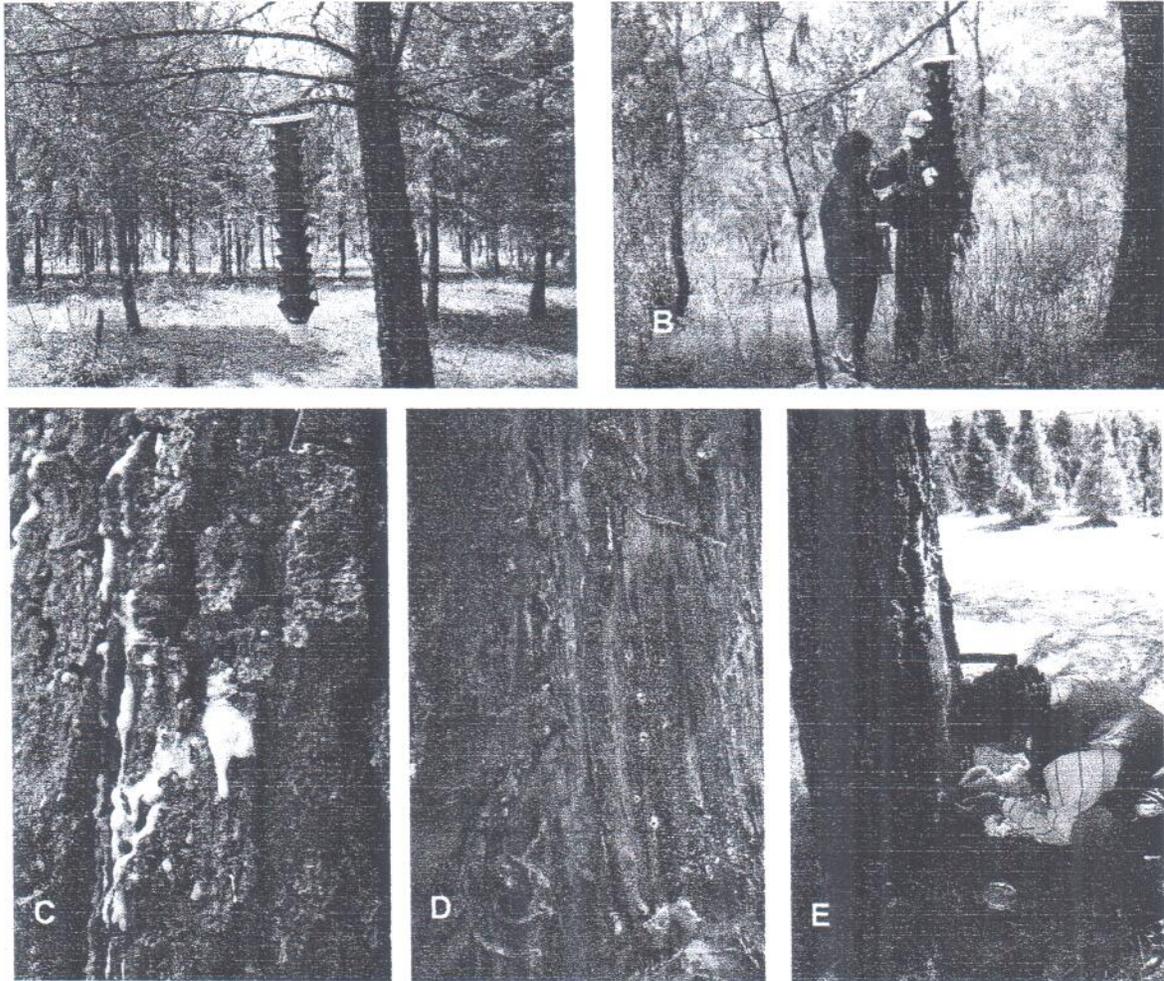


Fig. 2: Metodología empleada en campo; **A.** Trampas multiembudo, tipo Lindaren **B.** Colecta de adultos de las trampas, **C.** Grupos característicos del ataque de *D. valens*, **D.** Galería de *D. valens*, **E.** Colecta y siembra directa de adultos.

4.4.1. Aislamiento e identificación

De las muestras de larvas, adultos y porciones de madera de las galerías que fueron llevadas al laboratorio, se procedió a la desinfección de las mismas, para su posterior siembra en medio de cultivo específico. Las cajas de petri de la siembra directa de adultos se colocaron en el laboratorio en una estufa a temperatura ambiente. Trozos de 1 cm² de madera de las galerías se lavaron con agua destilada estéril tres veces durante 1 minuto y se desinfectaron en Hipoclorito de sodio al 1.5%, durante dos minutos, se lavaron tres veces en agua destilada estéril, se secaron en papel filtro estéril y sembraron en Extracto de Malta Agar (EMA) y se conservaron durante ocho días a temperatura ambiente.

Una vez desarrolladas y esporuladas las colonias del hongo (Cuadro 2), se realizaron preparaciones semi - permanentes y permanentes para observarlas al microscopio compuesto y observar sus características distintivas y mediante las claves obtener su identificación. Es importante denotar que fue necesario el procesamiento de muestras de la cepa de *Leptographium sp.* con la ayuda del microscopio electrónico de barrido para definir características de ramificación y forma de conidios (Silvia Edith García Díaz, 2006 comunicación personal).

4.4.2. Preparación de muestras para microscopia de barrido

Se tomo una muestra del aislamiento de la cepa de *Leptographium* sp. de 0.5 cm de diámetro y se puso en una solución fijadora FAA Gluteraldeido al 3% durante 72 h. Las muestras se lavaron tres veces con agua y una vez con amortiguador de fosfatos (pH= 7.2). Después las muestras fueron deshidratadas con soluciones graduales de alcohol (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, y 100%, las últimas tres soluciones dos veces), durante 15 minutos en cada una de ellas. Posteriormente, las muestras se secaron a punto crítico con CO₂ en una secadora Samdri – 780 A (TOUSIMIS Research Corporation, Rockville, USA) y finalmente, se colocaron en un portamuestras y se recubrieron con oro en una ionizadora de metales JFC – 1100 (JEOL LTD, Tokio, Japón). Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido JSM – 35C (JEOL LTD, Tokio, Japón) en el laboratorio de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados en Montecillo, México (Agradecemos el apoyo y colaboración de la Dra. Rosa María Picaso, Colegio de Postgraduados)

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. Monitoreo de *Dendroctonus valens* con terpenos del hospedante.

El experimento se estableció el 5 de junio del 2004 y concluyó el 24 de julio del mismo año, con 4 realeatorizaciones y toma de datos cada 15 días. A continuación se presentan los resultados de las colectas, las 30 trampas multi-embudos de Lindgren, donde se emplearon cinco tratamientos y un testigo, cada uno con 5 repeticiones. Dichos resultados se presentan para cada realeatorización, haciendo al final un análisis estadístico de los mismos.

5.1.1. Primera Realeatorización.

Como se puede observar en la Fig. 3, el tratamiento que tuvo mayor atracción para *D. valens* fue la mezcla ERR (escarabajo rojo de la resina) con 34 individuos, seguido de (+) 3 careno con 16 adultos. Teniendo un total de 85 adultos en total en la Primera realeatorización.

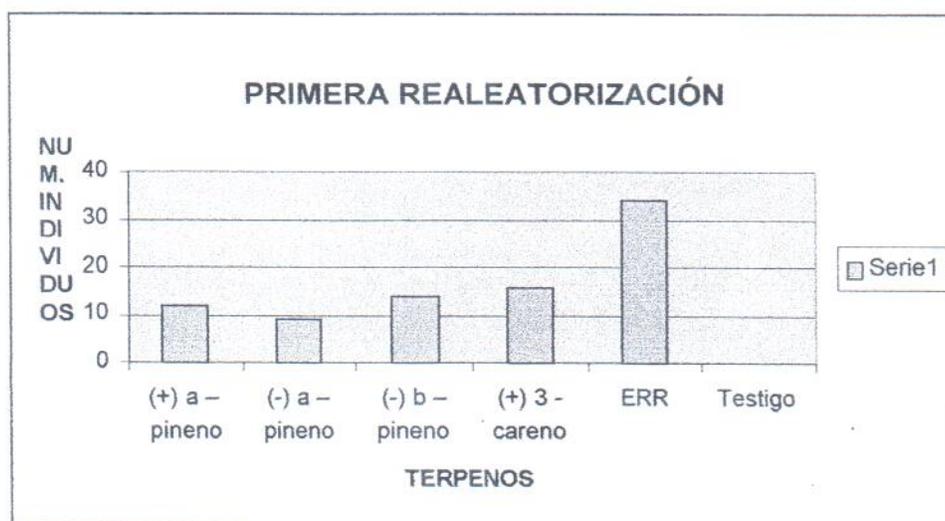


Fig. 3. Respuesta de *D. valens* a los terpenos, San Francisco Zentlalpan, 19-jun-04.

5.1.2. Segunda Realeatorización

En este siguiente cambio se observa en la figura 4 que el tratamiento que atrajo mayor cantidad de adultos fue (+) 3 careno con un total de 8 adultos, seguido de (-) β - pineno con 7 adultos y la mezcla ERR sólo se obtuvieron 5 adultos de *Dendroctonus valens*.



Fig. 4. Respuesta de *D. valens* a los terpenos, San Francisco Zentlalpan, 3-jul-04.

5.1.3. Tercera realeatorización.

Como se observa en la figura 5 el tratamiento con mayor numero de adultos atraídos fue (+) 3 careno con 3 adultos de *D. valens*, seguido de la mezcla ERR y el Testigo, ambos con un adulto; cabe destacar que en esta tercera realeatorización el testigo capturo un adulto que fue el único de todo el experimento. Podemos notar que hay una clara baja en cuanto al número de

adultos atraídos mientras pasa el tiempo; es decir, las feromonas empleadas van perdiendo su efectividad.

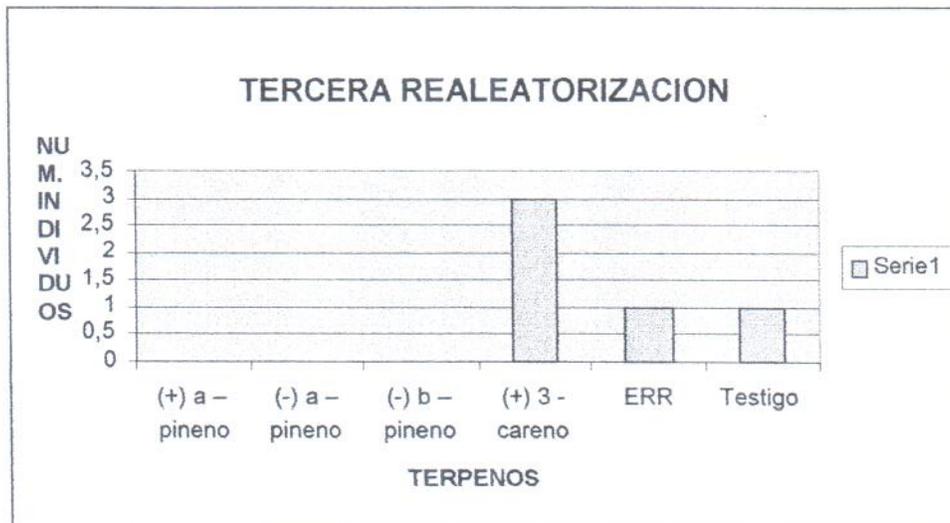


Fig. 5. Respuesta de *Dendroctonus valens* a los terpenos, San Francisco Zentlalpan, 16-jul-04.

5.1.4. Cuarta Realeatorización.

En este caso se observa en la figura 6 que sólo se capturó un adulto con la mezcla ERR ((+) α - pineno, (-) β - pineno y (+) 3 careno) que sigue teniendo poder de atracción.



Fig. 6. Respuesta de *Dendroctonus valens* a los terpenos, San Francisco Zentlalpan, 24-jul-04.

5.1.5. Datos finales

Al finalizar el experimento se sumaron los resultados de las cuatro fechas de captura, como se puede observar en la Figura 7, el tratamiento en el que se obtuvo una mejor atracción fue la mezcla ERR (+) α - pineno, (-) β - pineno y (+) 3 careno con 41 individuos, seguido de (+) 3 careno con 27, (-) β - pineno con 21, (+) α - pineno con 15, (-) α - pineno con 13 y el testigo con 1 individuo; haciendo un total de 118 adultos de *D. valens*.

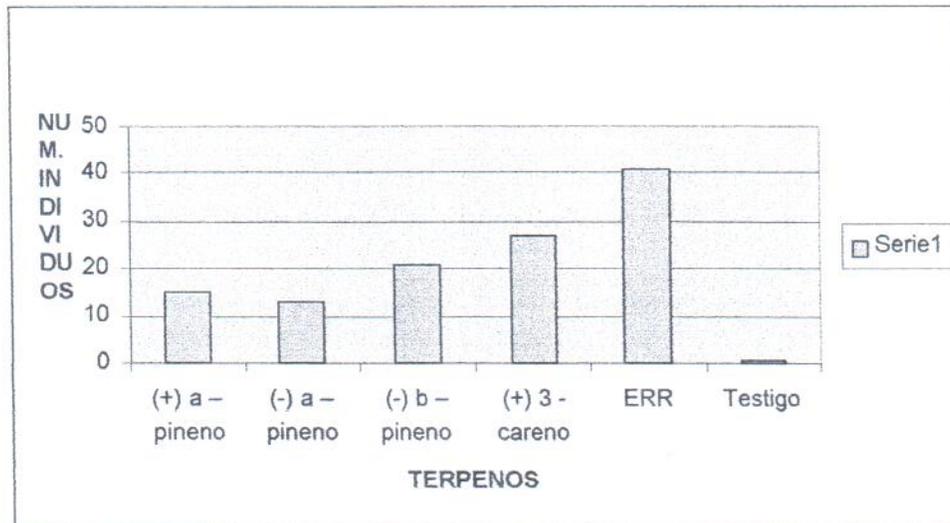


Fig. 7. Respuesta final de *Dendroctonus valens* a los terpenos.

En relación al numero de adultos capturados 118 en total y comparándolo con los resultados obtenidos en China por Sun *et al.* (2004), que fueron de 1430 adultos la diferencia se puede deber a que en China es una plaga primaria que esta matando gran cantidad de pinos, También se puede ver que en relación al numero de capturas en California USA estas fueron mayores en la parte norte (235) pero en las parte centro y sur fueron mas bajas (13 y 46). (Erbilgin *et al* 2006 en prensa).

La mezcla ERR de (+) α - pineno, (-) β - pineno y (+) 3 careno, fue la mas atractiva (41) y en segundo lugar (+) -3 careno (27), estos resultados difieren de los encontrados por Sun *et al*, (2004), en China que reportan al (+) -3 careno como el monoterpeno que mejor atracción presentó (497). Sin embargo, es importante mencionar que el segundo atrayente en tener una respuesta

considerable fue precisamente (+) 3-careno con 27 individuos, tal vez esto se debe a que las condiciones no son las mismas y que en México *Dendroctonus valens* para *Pinus leiophylla* no representa una plaga primaria de alto impacto ecológico y económico.

La diferencia entre este estudio y otros puede resultar de la diferencia en las tasas de liberación de los compuestos, por ejemplo Hobson et al (1993), donde el (+) – 3 careno fue mucho menos atractivo que otros terpenos se debió a las bajas tasas de liberación. En otras palabras el (+) – 3 careno puede ser repelente o inhibidor a altas tasas de liberación en otros estudios con monoterpenos. Esta respuesta diferente en un rango geográfico concuerda con la variación geográfica que presentan otras especies de escolitidos a sus respuesta a las feromonas (Wood, 1982)

El (+) – 3 careno constituye una proporción variable de las resinas de las especies de *Pinus* y otros géneros de coníferas en Norte América (Mirov, 1961; Erbilgin et al 2006).

Los resultados del análisis estadístico para el trapeo con atrayentes fueron los siguientes:

La hipótesis a probar fue:

Ho: No hay diferencia entre los tratamientos para la atracción de *D. valens* VS

Ha: Al menos un tratamiento es diferente

Con una confiabilidad del 95 % con 5, 24 grados de libertad cuyo valor de $\alpha = 2.62$; y $Pr > F (0.0012) < \alpha$ por lo tanto, se rechaza la H_0 , lo que nos indica de que al menos uno de los tratamientos es diferente estadísticamente hablando (Anexo 2).

Realizando una comparación de medias de los tratamientos utilizando la prueba de Tukey, se pretende observar si hay diferencias significativas entre los tratamientos. La prueba de Tukey nos formo tres grupos; en el A están los tratamientos 3, 4 y 5 con medias de tratamientos que va de 4 a 8, en el grupo B están los tratamientos 1, 2, 3 y 4 con una media de 2.6 a 5.4 y en el grupo C están los tratamientos 1, 2, 3, 4 y 6 con una media de 2.6 a 4.4. El tratamiento 5 que es la mezcla ERR (+) α – pineno, (-) α – pineno y (+) 3 careno; tuvo una mayor diferencia con el resto de los tratamientos con una media de 8.2; es decir, es el tratamiento que tuvo un mejor y mayor efecto sobre *Dendroctonus valens* con 41 individuos (Anexo 3).

5.2. Identificación de hongos asociados a *Dendroctonus valens*.

Para la identificación de las especies de hongos asociadas a *Dendroctonus valens*, se hizo mediante características morfológicas y mediciones de conidios (Largo-Ancho), conidióforos (largo-ancho) de 100 preparaciones permanentes y semipermanentes (ANEXO 3). Además el desarrollo, coloración y aspecto de las colonias de hongos. Para la identificación a nivel de especie en *Leptographium*, fue necesario utilizar el microscopio electrónico de barrido para poder observar la forma de los conidios, los anillos y la ramificación de las filalides (Fig. 10).

Es importante señalar que en la actualidad para la identificación de hongos la mejor técnica es la secuencia de ADN y Zhou, et al (2005), en su trabajo aplicó esta técnica y caracterizó a 6 especies de *Ophiostoma* spp. y *Ceratocystiopsis minuta*.

Los hongos asociados a *D. valens*, de acuerdo a sus características morfológicas y mediciones se identificaron como *Graphium* spp y *Leptographium terebrantis*, esta última con el apoyo de imágenes obtenidas del microscopio electrónico de barrido y con el apoyo de las claves de identificación de Barnett y Hunter, (1987) y Jacobs y Wingfield, (2001).

CUADRO 2. Bitácora de obtención y desarrollo de cepas puras.

FECHA	No. CEPAS OBTENIDAS	AISLAMIENTO DEL HONGO ASOCIADO	DESARROLLO DE LA COLONIA OBTENIDA	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	HONGO IDENTIFICADO
Siembra: 3/jul/04 Transferencia: 29/jul/04	5	Insectos Adultos de <i>D. valens</i> .	Se realizó un rayado de la cepa y después de 2 días se torno blanquecina, presentando en 3 días estructuras de conidióforos y conidios.	Los cinemas que presenta son altos y oscuros a negros y redondeados en la parte final que parecen pequeñas burbujas, los conidióforos hialinos se producen en abundancia y los conidios son de forma oblonga (Fig. No.), (Barnett, 1987).	<i>Graphium</i> sp. Fig.3
Siembra: 14/agosto/04 Transferencia: 23/agosto/04	1	Galería de <i>D. valens</i>	En 2 días presentó micelio blanco con 1 cm de diámetro de crecimiento. En 7 días tenía 1.5 cm de diámetro de crec. Ya presentaba micelio de color verde oscuro; en 15 días a temperatura ambiente la colonia presenta un diámetro de crecimiento de 6 cm y estructuras reproductivas (conidióforos y conidios).	Conidióforos mayores de 142 µm, rizoides ausentes. Ramificación tipo B con mas de 2 ramas. Conidios hialinos ovoides con la base truncada y el ápice redondeado 4-5 a 10 µm de largo X 2-3 µm, con 16 mm de crecimiento de la colonia en 8 días.	<i>Leptographium terebrantis</i> Fig. 4 y 5
Siembra: 14/agosto/04 3 Transferencias: 17/agosto/04 De las 3 transf. Se conservaron 2 y se hicieron 4 transf. El 24 y 30 de agosto del 04.	1	Insectos Adultos de <i>D. valens</i>	En 2 días presentó micelio blanco con 1 cm de diámetro de crecimiento. En 7 días tenía 1.5 cm de diámetro de crec. Ya presentaba micelio de color verde oscuro; en 15 días a temperatura ambiente la colonia presenta un diámetro de crecimiento de 6 cm y estructuras reproductivas (conidióforos y conidios).	Conidióforos mayores de 142 µm, rizoides ausentes. Ramificación tipo B con mas de 2 ramas. Conidios hialinos ovoides con la base truncada y el ápice redondeado 4-5 a 10 µm de largo X 2-3 µm, con 16 mm de crecimiento de la colonia en 8 días.	<i>Leptographium terebrantis</i> Fig. 4 y 5

5.2.1. Descripción de Especies:

5.2.1.1. *Graphium* sp.

Presenta cinemas largos, oscuros y redondeados en la parte final que parecen pequeñas burbujas de agua blanquecinas, las cuales son la masa terminal de los conidios hialinos, los conidióforos son hialinos se producen en abundancia y los conidios son de forma oblonga (Fig. 3). Esta especie es considerada como la fase imperfecta de *Ceratocystis* spp. El desarrollo de los conidios es variable en diferentes especies (Barnett y Hunter, 1987).

En la taxonomía de *Graphium* (anamorfo) morfológicamente no se conocen especies representativas y existe una fuerte discusión para separar los grupos de sus teleomorfos (fase sexual). Seifert y Okada (1993), sugieren que *Graphium* debe estar en los hongos Ophiostomatoides.

Wingfield *et al.* (1991) y Mouton *et al.* (1993), mencionan que la identificación de especies de *Graphium* es difícil debido a la ausencia del teleomorfo por que morfológicamente son similares.

Okada (1994), considera como sinónimos a *Graphilbum* Upadhyay & Kendrick, *Pesotum* Crane & Kendrick, *Hyalopesotum* Upadhyay & Kendrick y *Phyalopesotum* Upadhyay & Kendrick.

En la filogenética molecular el análisis de la secuencia DNA, es una forma de identificar con mayor precisión este grupo de hongos (Reynolds and Taylor, 1993).

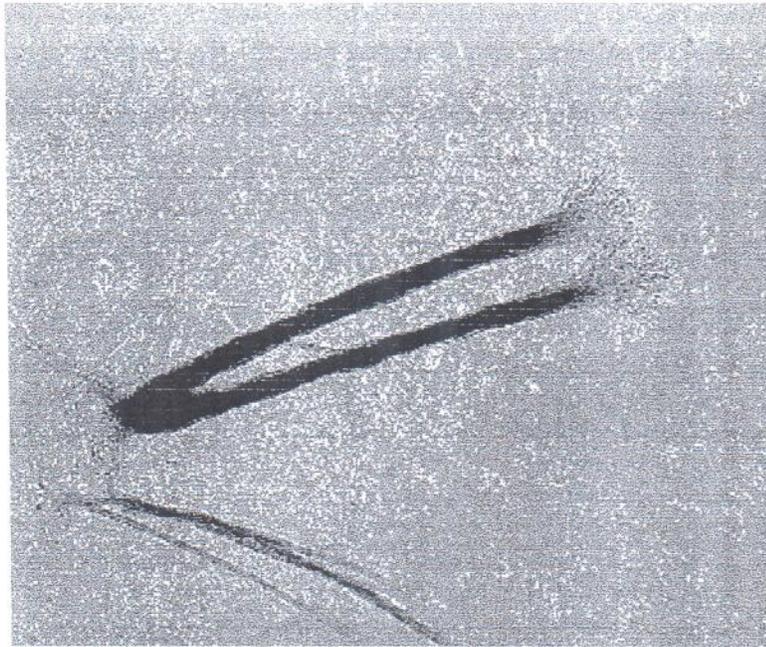


Fig 8. Cinemas y Conidióforos de *Graphium* sp.



Fig 9. Desarrollo de la colonia de *Graphium* sp. en EMA.

5.2.1.2. *Leptographium terebrantis*

Esta especie se reconoció porque presenta las siguientes características:

Conidióforos simples o ramificados, de 142 μm , a 508 μm de largo, rizoides ausentes. Estipite cilíndrico con 4 a 11 septas. Ramificación tipo B con más de 2 ramas. Conidios hialinos ovoides con la base truncada y el ápice redondeado, miden de 4-5 a 10 μm x 2 a 3 μm (Figuras 10 y 11). El desarrollo óptimo es a 25°C en EMA, con un crecimiento de 16 mm de diámetro en 8 días. Esta especie de hongo se asocia con *Dendroctonus frontalis*, *Dendroctonus valens*, *Dendroctonus terebrans*, entre otros (Jacobs y Wingfield, 2001).

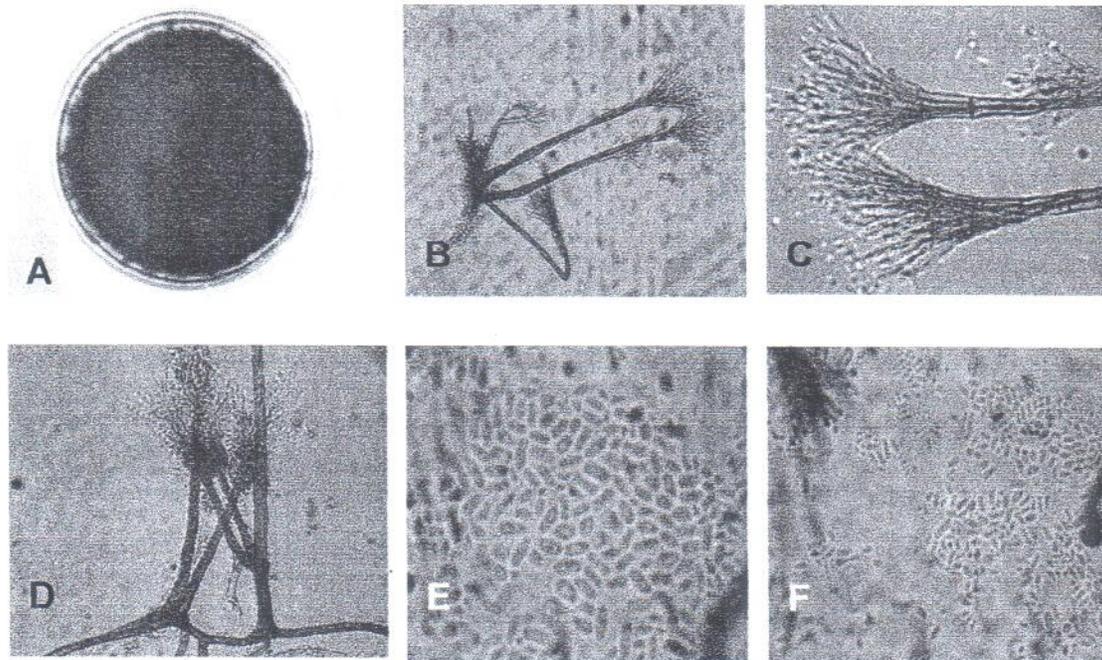


Fig 10. Imágenes de *Leptographium terebrantis* tomadas del microscopio compuesto; **A.** Desarrollo de la colonia; **B.** Conidióforos; **C.** Ramificación secundaria tipo B de los conidióforos; **D.** Ausencia de rizoides y **E y F.** Conidios de *Leptographium terebrantis*.

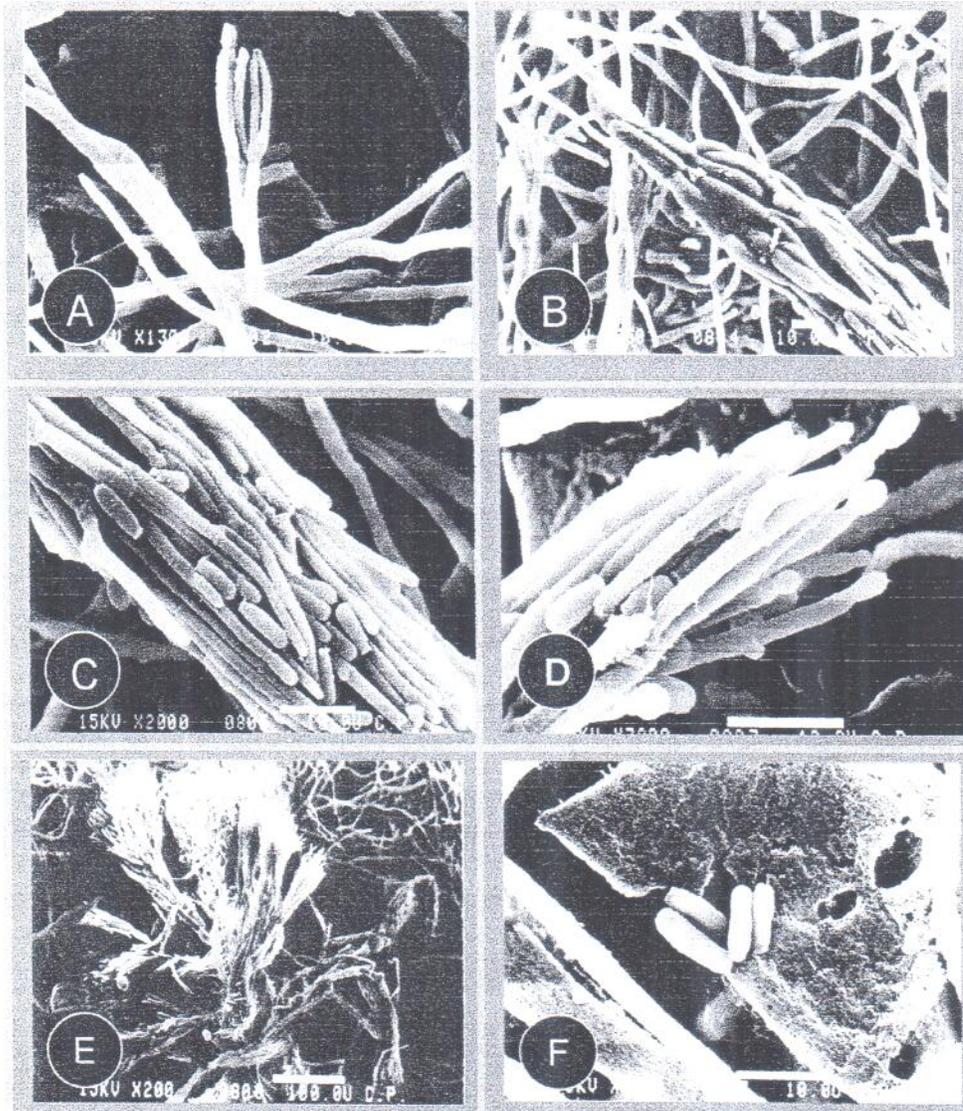


Fig. 11: Imágenes de *Leptographium terebrantis* tomadas con el microscopio electrónico de barrido; **A.** Etapa inicial de formación del conidióforo, **B.** Ramificación primaria Tipo B, **C.** y **D.** Observación de los anillos en los conidióforos y conidios, **E.** Observación de cinemas y **F.** Conidios

Six *et al.* (2003), ellos obtuvieron a *Leptographium terebrantis* asociado a *Dendroctonus adjunctus*, de *Pinus jeffreyi*, en el cual observaron la masa de conidios de color amarillo cremoso. Los conidios fueron de 6-12 μm , mientras que nosotros obtuvimos conidios de 3-9 μm (Anexo 1), lo cual indica una pequeña diferencia, debido a que se emplearon características morfológicas vistas a través de imágenes de microscopio compuesto y microscopio electrónico de barrido (Figuras 10 y 11), además de ser aislado de *Dendroctonus valens* teniendo a *Pinus leiophylla* como hospedante. Por lo que es importante para estudios posteriores emplear metodologías como la secuencia de DNA, y poder confirmar nuestros resultados obtenidos.

En 1987, Owen *et al.*, realizaron un estudio de patogenicidad de hongos aislados de tres especies de *Dendroctonus*; *D. valens*, *Dendroctonus brevicomis* y *Dendroctonus ponderosae*. El hongo que aislaron de *D. valens* fue *Leptographium terebrantis*; *Ceratocystis minor* de *D. brevicomis* y *Ceratocystis clavigera* de *D. ponderosae*. Al realizar inoculaciones en arbolitos de *Pinus ponderosae* demostraron que el más agresivo fue *Leptographium terebrantis* causando una gran mortandad en los arbolitos.

6.CONCLUSIONES

- Se demostró que el semioquímico que tuvo una mayor respuesta por *Dendroctonus valens* fue la mezcla ERR (+) α – pineno, (-) β – pineno y (+) 3 careno con un total de 41 individuos, seguido de (+) 3 careno con 27 individuos.
- El semioquímico que tuvo una menor respuesta, además del testigo fue (-) α – pineno con 13 individuos.
- Los hongos asociados a *D. valens* en *Pinus leiophylla* fueron identificados como *Graphium spp.*, y *Leptographium terebrantis*.
- Cabe señalar que es necesario seguir realizando esta clase de estudios en México ya que aunque *D. valens* no representa una amenaza a nivel ecológico y económico aún, no hay que olvidar que es portador de una especie de hongo altamente patogénico (*L. terebrantis*) que si puede llegar a causar la muerte del árbol y que en otros países como China y E.E. U.U. que ya tiene un fuerte impacto ambiental y económico.

7. LITERATURA CITADA

Barnett H. L. and Barry B. Hunter, 1987. Illustrated Genera of Imperfect fungi. Fourth edition. Macmillan Publishing Company. 211 pp.

Behrendt C. J., Blanchette R. A. and Farrell R. L. 1995. Biological Control of Blue- Stain Fungi in Wood. *Phytopathology* 85: 92 – 97.

Cibrián T. D., Méndez M. T. J., Campos B. R., Harry Y. O. y Flores L. J. 1995. Insectos Forestales de México. Universidad Autónoma Chapingo, Di. Ci. Fo. 453 pp.

Erbiling N. and Raffa K. F., 2000. Opposing effects of host monoterpenes on responses by two sympatric species of bark beetles to their aggregation pheromones. *J. Chem. Ecol.* 26:2527-2548.

Erbiling N., Gillette N. E., Stein J. D., Sun J. H., Owen D. R., Campos Bolaños R., Merrill L. D., Raffa K. F., Mori S., Méndez Montiel T., and Wood D. L. 2006. Response de host volatiles by native and Introduced populations of *Dendroctonus valens* (Coleoptera: Scolytidae) in North America and China. En prensa.

Furniss, R. L. and V. M. Carolin. 1977. Western Forest Insects. U.S. Department of Agriculture Forest Service Miscellaneous Publication No. 1339, 654 pp.

Gil E. L. 2002. Efectividad de siete productos antimancha contra *Ceratocystis* sp. en madera de *Hevea brasiliensis* Muell Arg. (Hule). Tesis UACH. Di. Ci. Fo. 129 pp.

Hetrick L. A., 1949. Some overlooked relationships of the southern pine beetle. J. Econ. Entomol. 42: 466- 69

Hobson, K. R., Parmeter J. R. Jr, Wood D. L. 1994. The role of fungus vectored by *Dendroctonus brevicomis* LeConte (Coleoptera: Scolytidae) in occlusion of ponderosa pine xylem. Can. Entomol 126: 277-82

Jiménez S. M. 2003. Ecología Química de *Dendroctonus valens* LeConte (Coleoptera: Scolytidae) en Atlautla Edo. México. Tesis UACH. Parasitología Agrícola. 43 pp.

Junac. 1998. Manual del grupo andino para preservación de maderas. Junta del Acuerdo de Cartagena. Lima, Perú. Pp 3-25.

Jacobs K. And Wingfield, 2001. *Leptographium* species, Tree Pathogens, Insect associates and agents of blue – stain, edited by the American Phytopathological Society. 207 pp.

Marmolejo J., y Butin H., 1993. Las especies de *Ophiostoma* y *Ceratocystiopsis* (Ascomycetes, Microascales) conocidas de Nuevo León, México. Reporte Científico No. Esp. 13: 155-170.

Miao Z. W., Chou W. M., Huo F. Y., Wang X. L., Fang J. X. and Zhao M. M. 2001. Biology of *Dendroctonus valens* in Shanxi Province. Shanxi Forestry Science and Technology 23: 34-37.

Mirov N. T., 1961. Composition of gum turpentines of pines. USDA Forest Service Tech. Bull. No. 1239.

Mouton M., Wingfield M. J., and Van Wyk P. S. 1993. Conidium development in the synnematosous anamorphs of *Ophiostoma*. Mycotaxon, 46: 371-379.

Okada G. 1994. The genus *Graphium*. J. Antibact. Antifungi. Agents. 22: 45-54.

Owen, D. R., K. Q. Lindahl, Jr., D. L. Wood, and J. R. Parmeter, Jr. 1987. Pathogenicity of fungi isolated from *Dendroctonus valens*, *D. brevicornis*, and *D. ponderosae* to ponderosa pine seedlings. *Phytopathology* 77: 631-636.

Paine T. D., Raffa K. F., Harrington T. C., 1997. Interactions among Scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. *Entomology*. 179 – 206 pp.

Parmeter J. R., Slaughter G. W., Chen M. M., Wood D. L. 1992. Rate and depth of sapwood occlusion following inoculation of pines with bluestain fungi. *For. Sci.* 38: 34-44

Primo E. Y., 1991. *Ecología química. Nuevos métodos de lucha contra insectos.* Ed. Mundi – prensa. 75 – 149 pp.

Rappaport, N.G., D.R. Owen and J.D. Stein. 2001. Interruption of semiochemical-mediated attraction of *Dendroctonus valens* (Coleoptera: Scolytidae) and selected nontarget insects by verbenone. *Environ. Entomol.* 30: 837-841.

Reynolds D. R. and Taylor J. W. 1993. The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. CAB International, Wallingford, U. K.

Rose, W.E., 1966. The biology and ecology of *Dendroctonus valens* Lec., and the biology, ecology, and control of *Dendroctonus frontalis* (=mexicanus) Zimm in Central México (Coleoptera: Scolytidae). Tesis, Escuela Nacional de Agricultura. 1-41 pp.

Richardson D. M. 1998. Ecology and Biogeography of *Pinus*. Cambridge University Press , Cambridge. UK.

Seifert K. A., and Okada G., 1993. *Graphium* anamorphs of *Ophiostoma* species and similar anamorphs of other ascomycetes. In *Ceratocystis and Ophiostoma: taxonomy, ecology and pathology*. Edited by M. J. Wingfield, K. A. Seifert, and J. F. Webber. American Phytopathological Society Press, St. Paul. Minn. Pp. 269-287.

Shade G. W., and Goldstein A. H. 2003. Increase of monoterpene emissions from a pine plantation as a result of mechanical disturbances. *Geophys. Res. Lett.* 30:1380-1383.

Six L. D., Harrington C. T., Steimel J., Douglas M. and Paine T. D. 2003. Genetic relationships among *Leptographium terebrantis* and the mycangial fungi of three western *Dendroctonus* bark beetles. *Mycologia* 95 (5), pp. 781-792.

Strong J., N., J., Webber F. Y R. Eaton A., 1997. Defacement of freshly sawn corsican pine lumber by sapstain and mould fungi and the influence of arthropods. *In: Biology and prevention of sapstain*. Forest Products Society. Madison. Pp. 29-37.

Sun, J.H., N.G. Rappaport, Z. Miao, Le Kang, Z. Zhang and N.G. Rappaport. (submitted to *Environmental Entomology*, July 2002). Red turpentine beetle, *Dendroctonus valens* LeConte (Coleoptera: Scolytidae), response to host semiochemicals in China.

Eingfield M. J. Kendrick B. and Van Wyk P. S. 1991. Analysis of conidium onyogeny in anamorphs of *Ophiostomak*: *Pesotum* and *Phialographium* are synonyms of *Graphium*. *Mycol. Res.* 95:1328-1333.

Wood, D. L. 1982. The role of pheromones, kairomones, and allomones in the host selection and colonization behavior of bark beetles. *Ann. Rev. Entomol.* 27: 411-446.

Zhou X. D., Beer Z. W., Cibrián d., Wingfield B. D., Wingfield M. J., 2004. Characterisation of *Ophiostoma* spp. Associated pine bark beetles from Mexico, including *O. pulvinisporum* sp. nov. 23 pp.

ANEXOS

ANEXO 1. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LOS HONGOS ASOCIADOS A *Dendroctonus valens*

CEPA	FORMA DE CONIDIO	PRESENCIA DE RIZOIDES	TIPO DE RAMIFICACION	LARGO DE CONIDIO Mm		ANCHO DE CONIDIO μm		LARGO DE CINEMA μm			ESPECIE PROBABLE		
				PROM.	MIN.	MAX.	PROM.	MIN.	MAX.	PROM.		MIN.	MAX.
1 y 2	Largos ovoides a oblongos	Presentes	Primaria Tipo A	4.35	2	7	1.96	1	3	1115.680	588.8	1361.44	<i>Graphium sp.</i>
3	Largos ovoides a oblongos	Presentes	Primaria Tipo A	4.53	3	6	2.04	1.5	3	912.82	406.4	1219.2	<i>Graphium sp.</i>
4	Largos ovoides a oblongos	Presentes	Primaria Tipo A	4.17	2.5	5.5	1.83	1	3	1169.013	457.2	2540	<i>Graphium sp.</i>
5	Largos ovoides a oblongos	Presentes	Primaria Tipo A	5	2	7.5	2.19	1	4	1657.53	477.5 ₂	2590	<i>Graphium sp.</i>
6	Largos ovoides a oblongos	No Presentes	Primaria Tipo B	4.55	2	7.5	1.99	1	3	535.88	406.4	711.2	<i>Leptographium terebrantis</i>
7	Largos ovoides a oblongos	No Presentes	Primaria Tipo B	5.21	3	9	2.32	1.5	3.5	530.57	274.2	1574	<i>Leptographium terebrantis</i>

nexo 2. ANOVA, Análisis Estadístico de la respuesta de *Dendroctonus valens* a los terpenos.

```
The SAS System      17:16 Thursday, December 7, 2000   8
                                     The GLM Procedure
Dependent Variable: capturados
Source              DF   Sum of Squares    Mean Square    F Value    Pr >F
Model                5   184.0000000     36.8000000      5.81     0.0012
Error               24   152.0000000      6.3333333
Corrected Total     29   336.0000000
```

Anexo 3. Comparación de Medias con la Prueba de Tukey.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	6.333333
Critical Value of Studentized Range	4.37265
Minimum Significant Difference	4.9213

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	tra
A	8.200	5	5
A			
B A	5.400	5	4
B A			
B A C	4.400	5	3
B C			
B C	3.200	5	1
B C			
B C	2.600	5	2
C			
C			
C			