

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Identificación de Patógenos Asociados a *Pinus johannis* M.-F. Robert en Mazapil,  
Zacatecas.

Por:

**OLGA KARINA GARCÍA GARCÍA**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Identificación de Patógenos Asociados a *Pinus Johannis* M.-F. Robert en Mazapil,  
Zacatecas.

Por:

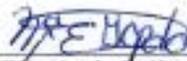
**OLGA KARINA GARCÍA GARCÍA**

TESIS

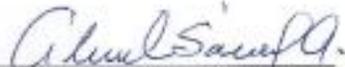
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda  
Asesor Principal



M.C. Abiel Sánchez Arizpe  
Coasesor



Dr. Celestino Flores López  
Coasesor



Dr. Gabriel Sallegos Morales  
Coordinador de la División de Agronomía



Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2019

## AGRADECIMIENTOS

*A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro* mi “*Alma mater*” por haberme abierto sus puertas ya que es una gran institución, por las grandes personas que en ella conocí y sobre todo por prepararme como un profesional y por todo lo que me brindo. Siempre seguirá siendo mi segundo hogar.

*A la Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda* por su dedicación, tiempo y por brindarme sus conocimientos en la elaboración de este trabajo, porque gracias a sus valiosas aportaciones pudo culminarse de una manera satisfactoria. Además, le agradezco todo el apoyo brindado durante la carrera, no solo como profesara si no como persona.

*Al M.C. Abiel Sánchez Arizpe y Dr. Celestino Flores López* por ser asesores en este trabajo, brindarme sus conocimientos y tiempo en la revisión y corrección de este trabajo.

*Al Dr. Epifanio Castro del Ángel* por su apoyo y participación en la revisión del presente trabajo, por las sugerencias y aportes en el mismo.

A todos los maestros de la División de Agronomía en especial al Departamento de Parasitología que influyeron en mi formación académica.

## DEDICATORIA

*A mis padres:*

*José ángel García López*

*y*

*Arminda García Arguello*

Por su apoyo incondicional, su dedicación, por su confianza depositada en mí, por sus sabios consejos, regaños y cariño, también por todo su esfuerzo y sacrificio para poder culminar mis estudios y hacerme poner lo mejor de mí para que se sientan orgullosos de mí.

*A mis hermanas Yanelí y Jacqueline* por compartir momentos alegres y tristes, por brindarme su apoyo incondicional, por motivarme y hacer poner lo mejor de mí para que se sientan orgullosas de mí y ser un gran ejemplo.

*A Valentín Hernández Figueroa* por inspirarme e impulsarme a siempre dar lo mejor de mí, por motivarme a cumplir todas mis metas y por brindarme su apoyo ya que de alguna u otra manera participo en la elaboración de este trabajo.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	iii
DEDICATORIA .....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	v
ÍNDICE DE CUADROS .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 OBJETIVO .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2 HIPÓTESIS .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Los Pinos Piñoneros en México .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2 Estatus Taxonómico de <i>Pinus johannis</i> M.-F. Robert.....</b>	<b>7</b>
<b>2.3 Importancia Ecológica.....</b>	<b>8</b>
<b>2.4 Importancia Social.....</b>	<b>8</b>
<b>2.5 Importancia Económica .....</b>	<b>9</b>
<b>2.6 Distribución .....</b>	<b>10</b>
<b>2.7 Patógenos Asociados a Especies Forestales .....</b>	<b>10</b>
<b>2.8 Genero <i>Fusarium</i> .....</b>	<b>11</b>
<b>2.8.1 Características generales .....</b>	<b>11</b>
<b>2.8.2 Ubicación taxonómica .....</b>	<b>12</b>
<b>2.8.3 Características Morfológicas .....</b>	<b>12</b>

2.9	Genero <i>Alternaria</i> .....	13
2.9.1	Características generales .....	13
2.9.2	Ubicación taxonómica .....	14
2.9.3	Características Morfológicas .....	14
2.10	<i>Trichothecium roseum</i> .....	14
2.10.1	Características generales .....	14
2.10.2	Ubicación taxonómica .....	15
2.10.3	Características Morfológicas .....	15
2.11	Genero <i>Aspergillus</i> .....	16
2.11.1	Características generales .....	16
2.11.2	Ubicación taxonómica .....	16
2.11.3	Características Morfológicas .....	16
2.12	Genero <i>Penicillium</i> .....	17
2.12.1	Características generales .....	17
2.12.2	Ubicación taxonómica .....	17
2.12.3	Características morfológicas .....	17
2.13	Bacterias Fitopatógenas asociadas a especies forestales .....	18
2.13.1	<i>Erwinia amylovora</i> .....	18
2.13.2	Características Generales de <i>E. amylovora</i> .....	19
2.13.3	Síntomas Causados por <i>E. amylovora</i> .....	19
III.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
1.1	Ubicación del Experimento .....	20
1.2	Descripción del Área de Estudio .....	20

<b>1.3</b>	<b>Colecta de Material Vegetal</b> .....	21
<b>1.3.1</b>	<b>Selección de Árboles para la Colecta</b> .....	21
<b>1.3.2</b>	<b>Incidencia y Severidad</b> .....	21
<b>1.3.3</b>	<b>Traslado de Muestras Colectadas</b> .....	22
<b>1.4</b>	<b>Preparación de Medio de cultivo PDA y KB</b> .....	22
<b>1.5</b>	<b>Vaciado de Cajas</b> .....	22
<b>1.6</b>	<b>Siembra de las Muestras de Pino</b> .....	23
<b>1.7</b>	<b>Aislamiento de Microorganismos</b> .....	23
<b>1.8</b>	<b>Purificación de Hongos</b> .....	24
<b>1.9</b>	<b>Incremento de Cepas</b> .....	24
<b>1.10</b>	<b>Preparación de Laminillas</b> .....	24
<b>1.11</b>	<b>Identificación de Hongos</b> .....	24
<b>1.12</b>	<b>Purificación de Bacterias</b> .....	25
<b>1.13</b>	<b>Caracterización Bioquímica de las Bacterias</b> .....	25
<b>1.13.1</b>	<b>Pruebas Bioquímicas Preliminares</b> .....	25
<b>1.13.1.1</b>	<b>Tinción de Gram</b> .....	25
<b>1.13.1.2</b>	<b>Pruebas de Catalasa</b> .....	26
<b>1.13.1.3</b>	<b>Prueba de Oxidasa</b> .....	26
<b>1.13.1.4</b>	<b>Prueba de KOH al 3%</b> .....	27
<b>1.13.2</b>	<b>Pruebas Específicas</b> .....	27
<b>1.13.2.1</b>	<b>Oxido Fermentación (Hugg-Leiffson)</b> .....	27
<b>1.13.2.2</b>	<b>Pruebas de L.O.P.A.T.</b> .....	28
<b>1.14</b>	<b>Pruebas de Patogenicidad</b> .....	29

1.15	Caracterización Molecular .....	30
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.1	Colecta de Material Vegetal .....	31
4.2	Siembra de las Muestras de Pino .....	32
4.3	Identificación de Hongos .....	34
4.4	Caracterización Bioquímica de la Bacteria.....	37
4.5	Pruebas de Patogenicidad.....	38
4.6	Caracterización Molecular .....	40
V.	CONCLUSIONES.....	43
VI.	LITERATURA CITADA .....	44

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Características generales de la población de colecta de <i>Pinus johannis</i> M.-F. ....	21
<b>Cuadro 2.</b> Patógenos encontrados en la siembra de las muestras de <i>Pinus johannis</i> .....	32
<b>Cuadro 3.</b> Resultados de las pruebas bioquímicas en la caracterización de la cepa bacteriana aislada de Las muestras de <i>Pinus johannis</i> . ....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ubicación de Arboles muestreados de <i>Pinus johannis</i> en el norte del estado de Zacatecas (Villa, 2010).....	20
<b>Figura 2.</b> Proceso de siembra de las muestras de <i>Pinus johannis</i> .....	23
<b>Figura 3.</b> Síntomas encontrados en <i>Pinus johannis</i> en Mazapil, Zacatecas, México.....	31
<b>Figura 4.</b> Incidencia de plantas enfermas y sanas en Mazapil, Zacatecas. ....	32
<b>Figura 5.</b> Presencia de conidióforos <i>Aspergillus</i> y <i>Alternaria</i> aislados de muestras de <i>Pinus johannis</i> . ....	34
<b>Figura 6.</b> Conidios bicelures de <i>T. roseum</i> y Microconidias de <i>F. tricinctum</i> , aislados a muestras de <i>P. johannis</i> .....	35
<b>Figura 7.</b> Patógenos identificados asociados a las plantas enfermas de <i>Pinus johannis</i> .....	36
<b>Figura 8.</b> Incidencia de los patógenos presentes en <i>Pinus johannis</i> .....	37
<b>Figura 9.</b> Resultado positivo en la inoculación de los hongos asociados la planta de <i>P. johannis</i> . ....	39
<b>Figura 10.</b> Resultado negativo en la inoculación de los hongos asociados la palnta de <i>P. johannis</i> . ....	39

## RESUMEN

*Pinus johannis* M.-F. Robert es un pino piñonero endémico de México que crece en poblaciones pequeñas y aisladas, están limitadas en los estados de Zacatecas, Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí y Querétaro a altitudes entre 2400 y 2800 msnm. Esta especie se ha visto afectada por agentes patógenos que provocan enfermedades, pudiendo así delimitar su desarrollo ya que los bosques formados por *P. johannis* proveen alimento y hábitat a la fauna local; además, las copas de estos árboles proporcionan sombra a especies herbáceas y arbustivas las cuales tienen más probabilidad de sobrevivir por la mayor disponibilidad de humedad.

El objetivo del presente trabajo fue identificar los patógenos asociados a esta especie de pino. Para la detección de patógenos se sembraron partes enfermas de los árboles como tallo y acículas, se cortaron en pequeñas muestras y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3%, se colocaron de 3-5 muestras en una caja Petri con medio de cultivo PDA, las cajas se llevaron a una estufa para su incubación con una temperatura de 25°C por un periodo de aproximadamente de 5-7 días. Para la identificación de hongos se realizaron montas semipermanentes en porta objetos, para poder observar al microscopio sus estructuras, apoyándose con claves de identificación. Para la identificación de bacterias se utilizó el protocolo de Schaad *et. al.*, 2001. De acuerdo a los patógenos asociados a *Pinus johannis* fueron identificados como *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata*, *Penicillium spp* y los géneros *Trichothecium spp*, *Fusarium spp*. y la presencia de una bacteria del género *Erwinia.spp*.

*Alternaria alternata*, se presentó en mayor incidencia que pueden causar deterioro de la calidad de la semilla y mortandad pre o post-emergencia de plántulas, el de menor incidencia fue *Fusarium tricinctum* aun que está considerado como causante de principales afecciones en viveros y afectando la viabilidad de las semillas. La bacteria identificada en las muestras de pino es de gran importancia en la Fitopatología; los daños son muy graves, ya que puede producir la muerte de la planta afectada en un corto periodo de tiempo. Mediante el análisis BLAST en el GenBank de las secuencias de los genes ribosomales (rDNA), fue posible la

identificación de las dos últimas especies pertenecientes a *Trichothecium roseum* y *Fusarium tricinctum* y a una especie de bacteria; *Erwinia amylovora*.

La inoculación de las cinco cepas de hongos y la bacteria a plántulas de la especie estudiada demostró que éstas son patogénicas a *Pinus johannis*, mediante la presencia de síntomas excepto por *Penicillium spp.* que no presento síntomas.

**Palabras clave:** *Pinus johannis*, patógeno, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria*, *Trichothecium roseum*, *Fusarium tricinctum*, *Erwinia amylov*

## I. INTRODUCCIÓN

La investigación forestal en la actualidad ya no se ocupa exclusivamente de la explotación y el aprovechamiento de los bosques, sino que cada vez adquiere más importancia el análisis conjunto del ecosistema forestal. La investigación forestal se esfuerza por obtener conocimientos generales válidos sobre las múltiples interrelaciones entre los organismos que viven en los ecosistemas forestales y su entorno inorgánico, tratando de orientarse hacia las necesidades de la sociedad (Gadow *et al.*, 2001).

Según el Fondo Mundial para la Vida Silvestre (WWF), del 50 al 80 % de la diversidad biológica del mundo se encuentra en 6 a 12 países tropicales destacando Brasil, Colombia, México, Zaire, Madagascar e Indonesia (Williams-Linera *et al.*, 1992).

La situación biogeográfica excepcional de México como zona de transición es la razón de su riqueza natural conservada y multiplicada por el hecho de que la situación del país en la franja intertropical y su pronunciada orografía determina una gran diversidad de condiciones ambientales favorables, biogeográficamente México es único, ya que los elementos correspondientes a las dos grandes regiones se sobreponen y entrelazan. Esto hace a México el país con mayor diversidad de fanerógamas con aproximadamente 25 000 especies (Williams-Linera *et al.*, 1992).

El conjunto de los bosques de coníferas ocupa cerca de 15% del territorio del país y más de 9/10 de esta superficie corresponde a los de *Pinus* o de *Pinus* y *Quercus*. La gran mayoría de los pinos mexicanos posee una distribución geográfica restringida al territorio de este país y a algunas áreas vecinas y casi todos constituyen elementos dominantes o codominantes en la vegetación actual. Los pinares son comunidades vegetales muy características de México y ocupan vastas superficies de su territorio (Rzedowski, 2006).

De acuerdo con Perry (1991) existen en México 55 especies del género *Pinus*, que con las subespecies, variedades y formas corresponden a 72 taxa del género *Pinus*, este número representa el 76.4 % del total de especies que se reconocen en el mundo.

Los ecosistemas de piñonares, son los más típicos en climas semiáridos, los cuales viven frecuentemente en colindancia con pastizales, matorrales xerófilos o encinares arbustivos y forman amplias ecotonías con estas comunidades vegetales. En México tienen una distribución geográfica restringida y en apariencias no constituyen elementos dominantes en los bosques, sino muy locales (Rzedowski, 2006).

Los métodos de destrucción y perturbación de la vegetación han sido diversos, algunos de ellos de impacto directo y otros indirectos. Entre los primeros, cabe mencionar como principales: el desmonte, el sobrepastoreo, la tala desmedida, los incendios y la explotación selectiva de algunas especies útiles. Los segundos tienen que ver principalmente con la modificación o eliminación del ambiente ecológico necesario para el desarrollo de una determinada comunidad biótica, causando su desaparición automática (Rzedowski, 2006).

El uso inadecuado y muchas veces anárquico de la tierra, que prevalece en grandes extensiones del país, provoca con frecuencia la desaparición innecesaria de la vegetación natural o bien la mantiene a niveles degradados, en el caso de *Pinus johannis* el mayor impacto directo que ha tenido es la minería (Rzedowski, 2006).

*Pinus johannis* es la especie a tratar en este estudio y se encuentra sujeta a protección especial en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Una especie sujeta a protección especial es aquella que se encuentra amenazada por factores que inciden de forma muy negativa en su viabilidad (SEMARNAT, 2003).

*Pinus johannis* es una especie endémica de México que crece en los estados de Zacatecas, Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí y Querétaro a altitudes entre 2400 y 2800 msnm, donde la precipitación promedio anual varía de 300 a 400 mm (Perry, 1991; García y Passini, 1993; Romero *et al.*, 2000).

*Pinus johannis* por encontrarse en poblaciones pequeñas y aisladas se le considera una especie relictas. El hecho que sea pequeñas trae complicaciones genéticas y una de ellas es la endogamia (Mosseler *et al.*, 2000; Flores *et al.*, 1998).

Los hongos y bacterias pueden llegar a causar pérdidas económicas por los perjuicios que causan en la selvicultura y agricultura, también en el campo forestal con frecuencia se han reportado perdidas económicas e importantes debido a enfermedades provocadas por hongos y bacterias ya que los daños pueden reducir el crecimiento, provocar pudrición y deformación e incluso hasta la muerte del árbol (Luko *et al.*, 1991).

El daño que los hongos fitopatógenos ocasionan no solo se refiere a las pérdidas de producción económica, sino también a las pérdidas en la producción biológica, es decir a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedantes atacadas por estos microorganismos (Rodríguez s/n).

## 1.1 OBJETIVO

Identificar microorganismos importantes asociados a la especie de *Pinus johannis*, mediante la siembra en medio de cultivo de las partes enfermas de la planta cómo tallos y acículas.

## 1.2 HIPÓTESIS

Se espera encontrar los géneros *Stemphillum* y *Alternaria*. Causando enfermedad en esta especie forestal.

## 1.3 JUSTIFICACIÓN

*Pinus johannis* es de suma importancia ecológica en nuestro país, ya que esta es una especie que se encuentra amenazada por factores que inciden de forma muy negativa en su viabilidad, además de que crece en poblaciones pequeñas y aisladas. Por ser una especie piñonera las semillas comestibles son objeto de recolección y comercio, además de proveer alimento dan hábitat a la flora local. Cabe destacar que es una especie de pino dioico, ya que las estructuras reproductivas femeninas y masculinas se producen en diferentes individuos Esta especie se encuentra sujeta a protección especial en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, en estatus de riesgo. Esta especie de pino se ha visto afectada por distintas plagas y enfermedades, por lo que se pretende determinar su sanidad.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Los Pinos Piñoneros en México

México es un centro de diversificación de pinos piñoneros (*Pinus* subsecc. *Cembroides* y subsecc. *Nelsoniae*), los cuales habitan en comunidades mono específicas o asociadas que se denominan piñonares. El hábitat que los caracteriza se restringe a las montañas de climas secos en transición con otras comunidades vegetales, como pastizales, matorrales xerófilos y encinares (Rzedowski, 1978). En México, *Pinus cembroides* Zucc. Es la especie principal de piñoneros, por la amplitud de distribución geográfica sobre el altiplano del norte y centro del país y por su importancia económica (Luna *et al.*, 2008).

La situación biogeográfica excepcional de México como zona de transición entre dos grandes regiones la neártica y la neotropical es la razón de su riqueza conservada y multiplicada por el hecho de que la situación del país en la franja intertropical y su pronunciada orografía determina una gran diversidad de condiciones ambientales, biogeográficamente México es único, ya que los elementos correspondientes a las dos grandes regiones se sobreponen y entrelazan. Esto hace a México el país con mayor diversidad de fanerógamas con aproximadamente 25 000 especies (Williams-Linera *et al.*, 1992).

Los pinares en localidades más secas, con frecuencia en contacto o en las cercanías de las zonas áridas, se caracterizan por estar constituidos por especies de hojas cortas, más bien gruesas y rígidas, como los pinos piñoneros (*P. edulis*, *P. quadrifolia*, y sobre todo el más difundido de ellos, *P. cembroides*) que se extienden por las partes secas de las serranías desde los Estados de Hidalgo y Puebla a Chihuahua (Miranda y Hernández, 1963).

El conjunto de los bosques de coníferas ocupa cerca de 15% del territorio del país y más de 9/10 de esta superficie corresponde a los de *Pinus* o de *Pinus* y *Quercus*. La gran mayoría de los pinos mexicanos posee una distribución geográfica restringida al territorio de este país y a algunas áreas vecinas y casi todos constituyen elementos dominantes o codominantes en la vegetación actual. Los pinares son comunidades vegetales muy características de México y ocupan vastas superficies de su territorio (Rzedowski, 2006).

Los pinos piñoneros tienen un alto grado de endemismo en México. Existen 10 taxa endémicas, Estos pinos se encuentran desde Baja California, Baja California Sur, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, hasta Aguascalientes, Guanajuato, Jalisco, Querétaro, Hidalgo, Tlaxcala, Puebla y Veracruz. Algunas con distribución muy restringida, también existen especies con distribución muy amplia, como el *P. cembroides* Zucc., y no tan amplia, como *P. pinceana* las cuales están distribuidas en los estados del norte y centro del país. (Eguiluz, 1987; Farjon *et al.*, 1997; Perry, 1991).

Las diferentes especies de pinos piñoneros producen una gran cantidad de semillas, la mayoría de las cuales cumplen un papel muy importante como estructuras de reproducción y que no son utilizadas por el hombre. Pero algunas especies producen semillas comestibles, las cuales pueden ser consumidas por animales silvestres y por el hombre; sus semillas son conocidas como piñones. La recolección de piñones para consumo humano ha constituido, tradicionalmente, una fuente importante de alimento para diversos grupos humanos de la zona norte del país. Los pinos piñoneros han estado ligados a la historia de grupos humanos, en especial en América (Fonseca, 2003).

*Pinus johannis* M.-F. Robert es una especie endémica de México que crece en poblaciones pequeñas y aisladas de distribución restringida y sus poblaciones están limitadas en los estados de Zacatecas, Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí y Querétaro a altitudes entre

2400 y 2800 msnm, donde la precipitación promedio anual varía de 300 a 400 mm (Perry, 1991; García y Passini, 1993; Romero *et al.*, 2000).

Las comunidades de *Pinus johannis* forman un grupo compacto, pero en la mayoría de los casos se asociaron con las de *Pinus cembroides*, lo que resulta en una alta semejanza florística entre ambas comunidades, principalmente porque ambos piñonares habitan en simpatía (Romero *et al.*, 1996)

*Pinus johannis* es una especie de Pino dioico, arbusto o árbol, de 2 a 3 m de altura, tallos múltiples, rara vez con un solo tronco. Corona baja, densa y redondeada, que se extiende, con ramas que se extienden hacia afuera hasta 3-4 m. Corteza en árboles jóvenes lisos y grises; en los árboles más viejos, ásperos y escamosos. Ramitas de color gris oscuro, áspero. Hojas 3 por fascículo, 3-5 cm de largo (Flores-Rentería *et al.*, 2013).

Estudios realizados determinan que la disposición de los conos de *Pinus johannis* sirvieron para inferir el origen de la evolución de la bisexualidad, debido que un 99% de los individuos de esta especie tuvieron un comportamiento dioico, ya que las estructuras reproductivas femeninas y masculinas se producen en diferentes individuos (García y Passini 1993, Flores-Rentería *et al.*, 2013)

## **2.2 Estatus Taxonómico de *Pinus johannis* M.-F. Robert**

*Pinus johannis*, es una especie perteneciente a la familia *Pinaceae*, fue descrito por Marie-Robert Francoise (M.-F. Robert), en 1978, quien considera a *P. johannis* como una especie independiente y la ubica dentro del grupo cembroides. Actualmente existe una gran controversia con algunos autores en cuanto a la clasificación taxonómica de *P. johannis*.

La propuesta por Farjon y Styles (1997), quienes consideran a *P. johannis* como una variedad de *Pinus cembroides* y lo denominan como *Pinus cembroides* Zuccarini subespecie *cembroides* variedad bicolor.

La propuesta hecha por Robert (1978), quien considera a *P. johannis* como una especie independiente y la ubica dentro del grupo cembroides.

Passini que describió una nueva especie de pino piñonero mexicano *Pinus johannis* (M.-F. Robert, 1978) en una muestra recolectada en Concepción del Oro, Zacatecas. Señalando las principales diferencias que separa a *P. cembroides* de *P. edulis*, *P. culminicola*, *P. monophylla* y *P. johannis* de la otra (Passini, 1994).

Por otra parte, en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001 esta especie está en listada como especie sujeta a protección especial (SEMARNAT, 2003).

### **2.3 Importancia Ecológica**

Muchas veces los bosques de pino se presentan puros, es decir, dominados por una sola especie y sin mayor intervención de otros elementos leñosos (Rzedowski, 2006).

Los bosques formados por *P. johannis* proveen alimento y hábitat a la fauna local; además, las copas de estos árboles proporcionan sombra a especies herbáceas y arbustivas las cuales tienen más probabilidad de sobrevivir por la mayor disponibilidad de humedad (Romero-Manzanares y García-Moya, 2002).

### **2.4 Importancia Social**

En México, los pinos tienen gran importancia ecológica, económica y social. Ofrecen importantes servicios ambientales (agua, oxígeno, recreación, captura de carbono) e influyen en el clima regional (García y González, 2003). Los árboles de *P. johannis* se pueden plantar en las ciudades como árboles ornamentales y en sitios con precipitación baja (Perry, 1991).

La investigación forestal en la actualidad ya no se ocupa exclusivamente de la explotación y el aprovechamiento de los bosques, sino que cada vez adquiere más importancia el análisis conjunto del ecosistema forestal. Independientemente de las aplicaciones actuales, la investigación forestal se esfuerza por obtener conocimientos generales válidos sobre las múltiples interrelaciones entre los organismos que viven en los ecosistemas forestales y su entorno inorgánico (Gadow *et al.*, 2001).

La precisión de la estructura de ecosistemas forestales constituye una condición para tomar decisiones sobre el manejo de estos recursos, tanto en localidades de bajo aprovechamiento como en áreas naturales protegidas, donde pueden observarse procesos de sucesión natural que permiten el establecimiento de rodales tipo como norma de conducción de acciones de manejo (Aguirre *et al.*, 2003).

## **2.5 Importancia Económica**

La extensión de los árboles de pinos en México es todavía muy grande, y además este tipo de vegetación suministra materias primas de gran importancia industrial: madera, pulpa para papel, celulosa, resina y por la relativa rapidez del crecimiento de muchas de sus especies y sobre todo por la extensa área de distribución y buen desarrollo que presentan estos bosques en el país. Estos bosques con mayor razón que otros deben explotarse racionalmente y cuidarse con esmero, pues constituyen un rico patrimonio nacional que tiene que ser conservado (Miranda y Hernández, 1963).

Las semillas comestibles de las especies piñoneras, sobre todo de *P. cembroides*, son objeto de recolección y comercio. El estado de Nuevo León parece ser el principal proveedor de piñones de la República (Rzedowski, 2006).

## **2.6 Distribución**

La distribución de los bosques es uno de los aspectos más importantes del entorno forestal ya que ésta puede ser manejada por la silvicultura, y puede ser un buen indicador de la biodiversidad (Del Río *et al.*, 2003).

Los ecosistemas de piñonares, son los más típicos en climas semiáridos, los cuales viven frecuentemente en colindancia con pastizales, matorrales xerófilos o encinares arbustivos y forman amplias ecotonías con estas comunidades vegetales. En México tienen una distribución geográfica restringida y en apariencias no constituyen elementos dominantes en los bosques, sino muy locales (Rzedowski, 2006).

La situación biogeográfica excepcional de México como zona de transición entre dos grandes regiones la neártica y la neotropical es la razón de su riqueza conservada y multiplicada por el hecho de que la situación del país en la franja intertropical y su pronunciada orografía determina una gran diversidad de condiciones ambientales, biogeográficamente México es único, ya que los elementos correspondientes a las dos grandes regiones se sobreponen y entrelazan. Esto hace a México el país con mayor diversidad de fanerógamas con aproximadamente 25 000 especies (Williams-Linera *et al.*, 1992).

## **2.7 Patógenos Asociados a Especies Forestales**

Las enfermedades constituyen uno de los cuatro factores principales que determinan la dinámica de los ecosistemas forestales junto con las plagas, el fuego y las condiciones climáticas. Los hongos son los principales agentes causantes de enfermedades forestales pudiendo atacar diferentes partes de las plantas afectando su funcionamiento en varias formas, por ejemplo, aquellos hongos que causan defoliación provocan una disminución en la tasa fotosintética; los causantes de canchales debilitan el tronco o reducen el transporte desde

y hacia las raíces; los pudridores de raíz incrementan el riesgo a la caída por viento y reducen la absorción de agua y minerales. Los hongos además de ser importantes patógenos también influyen en la producción forestal cuando interactúan con insectos para producir daños. En los ecosistemas forestales la asociación entre insectos y hongos, es una relación común y ecológicamente importante (Pildain y Errasti, 2011).

Los hongos y bacterias pueden llegar a causar pérdidas económicas en el hombre por los perjuicios que causan en la selvicultura y agricultura. En el campo forestal con frecuencia se han reportado pérdidas económicas e importantes debido a enfermedades provocadas por hongos y bacterias ya que los daños pueden reducir el crecimiento, provocar pudrición y deformación e incluso hasta la muerte del árbol. *Phytium spp.*, *Fusarium spp.* Son de amplia distribución en el suelo los cuales causan el mal del tallo o pudrición de las raíces en muchas especies forestales. (Luko *et al.*, 1991).

Existen muchas enfermedades causadas por hongos en las plantaciones forestales para las cuales se han encontrado medidas de control concretas, pero también otras que siguen sin respuesta o que no son logística o económicamente controlables a gran escala. Para todas ellas, es necesario establecer la identidad de los organismos asociados, su sintomatología y las características del sistema en general (Pildain y Errasti, 2011).

## **2.8 Genero *Fusarium***

### **2.8.1 Características generales**

Los hongos del género *Fusarium* son ascomicetos filamentosos y cosmopolitas, tienen un micelio bien desarrollado, septado y conidióforos característicos, aunque algunas especies tienen un talo unicelular. Son considerados principalmente como hongos de campo (Sumalan *et al.*, 2013), ya que causan un sinnúmero de enfermedades en cultivos. Sus daños

desencadenan en el hospedante una serie de afecciones generalmente de carácter irreversible, originando pérdidas económicas considerables, causando marchitamientos vasculares principalmente en flores y hortalizas anuales (Agrios, 2008; García *et al.*, 2007). Este patógeno causa el denominado chancro resinoso de los pinos, grave enfermedad que ocasiona chancros resinosos y muerte de ramas en pies adultos, junto con pudrición radicular y del cuello de la raíz (“dumping-off”) en viveros, al ser capaz de infectar estructuras vegetativas o reproductivas en diferente estado de maduración, produciendo por tanto síntomas distintos (Merlo *et al.*, 2010).

### **2.8.2 Ubicación taxonómica**

Reino: Fungi

División: Amastigomycota

Subdivisión: Deuteromycotina.

Clase: Deuteromycetes

Subclase: Hyphomycetidae.

Orden: Moniliales.

Familia: Tuberculariaceae.

Género: *Fusarium*

(Alexopoulos y Mims, 1996)

### **2.8.3 Características Morfológicas**

Al microscopio, la fiálide es generalmente fina, con forma de botella; simple o ramificada; cortas o largas; monofialídica (que emergen esporas de un poro de la fiálide) o polifialídica (de varios poros). Los macroconidios presentan forma de medialuna, hialinos y septados.

Para su correcta clasificación es importante el largo, ancho, curvatura, septos, agrupaciones mucoides (esporodocios) y detalles de las células de los extremos (célula apical y pie). Los microconidios, ausentes en algunas especies, poseen variadas formas (fusiformes, ovales, clavadas, entre otras), agrupaciones (estructuras mucoides llamadas "falsas cabezas"), en cadenas largas o cortas; todas observables en el objetivo (40x). Otro tipo de conidios son los microconidios que son similares, pero de menor tamaño que los macroconidios y nunca forman estructuras mucoides. Por último, pueden observarse las clamidosporas características con doble pared gruesa, lisa o rugosa; de manera aislada, en pareja o en grupo (Tapia y Amaro, 2014).

## **2.9 Genero *Alternaria***

### **2.9.1 Características generales**

Es un hongo oportunista que puede causar manchas en las hojas así como pudriciones y decoloraciones en muchas partes de las plantas. Se encuentra dentro de las enfermedades más comunes de las plantas en todo el mundo. En casi todos los casos, este se comporta como un parásito de heridas. La penetración directa y estomatal puede ocurrir o invadir un hospedero que está fisiológicamente o patológicamente debilitado. Afectan principalmente a las hojas, tallos, flores y frutos de plantas anuales, en particular de hortalizas y plantas de ornato entre muchas otras, pero afectan también a ciertas partes de árboles como los cítricos y el manzano, etc. Por lo común, las enfermedades causadas por *Alternaria* aparecen forma de manchas que comienzan con la aparición de unas pequeñas puntaciones castañas rodeadas de un halo clorótico y tizones foliares, pero pueden ocasionar también el ahogamiento de plántulas, pudriciones del cuello, así como pudriciones de los frutos (Agrios, 2008).

## 2.9.2 Ubicación taxonómica

Reino: Fungi

División: Ascomicota

Subdivisión: Pezizomycotina

Clase: Dothideomycetes

Orden: Pleosporales

Familia: Pleosporaceae

Género: *Alternaria*

(Wiltshire, 1933)

## 2.9.3 Características Morfológicas

El patógeno *Alternaria sp.* Tiene un micelio de color oscuro y en los tejidos viejos infectados produce conidióforos cortos, simples y erectos que dan origen a cadenas simples o ramificadas de conidios. Los conidios son grandes, alargados y oscuros, o bien multicelulares y en forma de pera y presentan septas tanto transversales como longitudinales, se desprenden con facilidad y son diseminado por corrientes de aire (Agrios, 2008).

## 2.10 *Trichothecium roseum*

### 2.10.1 Características generales

*Trichothecium roseum* es un hongo saprófito y se encuentra en todo el mundo. Los hábitats conocidos de *T. roseum* incluyen, viveros forestales, bosques, hortalizas, árboles frutales entre otros, en frutas y verduras causan la pudrición rosada. La enfermedad causada por este hongo se caracteriza por el desarrollo de un moho blanco en polvo que eventualmente se vuelve rosa. Aunque el impacto económico de la enfermedad es mínimo, *T. roseum* es

conocido como un productor de micotoxinas. Por lo tanto, es la presencia en vegetales y frutas disminuye la calidad de esos productos alimenticios y causa un riesgo para los consumidores (Bello, 2008).

### **2.10.2 Ubicación taxonómica**

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Subdivisión: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Incertaesedis

Género: *Trichothecium*

Especie: *roseum*

(Howard *et al.*, 1994)

### **2.10.3 Características Morfológicas**

Las colonias de *Trichothecium roseum* son de aspecto plano, granular y polvoriento, crecen inicialmente de color blanco, pero cambian a color rosa o naranja, el género *Trichothecium* se caracteriza principalmente por sus colonias de color rosado. Con la edad los conidióforos son erectos de 200-300µm de longitud, individualmente o en grupos sueltos, hialinos y septados, retrógrados, no se ramifican; a menudo cerca de la base forma cadenas alternas de conidios en el ápice, indistinguibles de las hifas hasta que se producen los conidios son grandes de 12-18 x 8-10µm, lisos, bicelulares (célula basal y apical), hialinos, elipsoidales a piriformes, con una forma oblicua trunca en la base (Barnett y Hunter, 1998)

## **2.11 Genero *Aspergillus***

### **2.11.1 Características generales**

Las especies del género *Aspergillus* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza pudiéndose aislar de una gran variedad de sustratos. Gracias a la facilidad de dispersión de sus conidios y a su pequeño tamaño, éstos pueden permanecer en suspensión en el ambiente durante un largo periodo de tiempo (Abarca, 2000).

### **2.11.2 Ubicación taxonómica**

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Eurotiomycetes

Orden: Eurotiales

Familia: Aspergillaceae

Género: *Aspergillus*

(Gil, 2018)

### **2.11.3 Características Morfológicas**

Conidióforos largos, lisos y rugosos con el ápice hinchado y cubierto parcial o totalmente por una o dos series de esterigmas, la célula basal modificada; conidios hialinos o de colores brillantes, catenulados, globosos, ovales o elípticos, lisos o equinulados. De algunas especies se conoce la fase perfecta, correspondiendo a los géneros *Eurotium*, *Sartorya*, o *Emericella*. La mayoría saprofitos, algunos parásitos benignos de plantas y animales, incluyendo al hombre (Romero, 1994)

## 2.12 Genero *Penicillium*

### 2.12.1 Características generales

El género *Penicillium* son conocidos comúnmente como mohos que se desarrollan sobre los más diversos substratos: granos, paja, cueros, frutas, etc. Su identificación en base a las características morfológicas fue caótica hasta que Pitt (1980) normalizó las condiciones de cultivo y Frisvad (1981) consideró la formación de los metabolitos secundarios en la descripción de las especies. La importancia de estos mohos en la alimentación humana y animal se debe a que, además causar deterioro, producen toxinas (Pitt y Leistner, 1991).

### 2.12.2 Ubicación taxonómica

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Eurotiomycetes

Orden: Eurotiales

Familia: Aspergillaceae

Género: *Penicillium*

(Guevara, 2018)

### 2.12.3 Características morfológicas

*Penicillium* es un hongo filamentoso hialino, saprófito. Macroscópicamente las colonias son normalmente de crecimiento rápido; al principio de color blanco y con el tiempo adquieren color azul, azul verdoso, verde, gris oliva o tonos rosados, con reverso amarillo cremoso. Microscópicamente presenta hifas hialinas septadas. Los conidióforos tienen ramas secundarias, denominadas métalas. Estas son de forma cilíndrica, con paredes lisas y portan de 3 a 6 fiálides en forma de matraz; de las cuales surgen largas cadenas sin ramificar de esporas o conidios formando el penacho o pincel característico del género. El conidióforo

está unido al micelio mediante el estipe. Entre esta y la fiálide pueden aparecer diferentes células. Estas células se presentan agrupadas partiendo de un mismo punto desde el que se originan. (Benitez, 2003).

### **2.13 Bacterias Fitopatógenas asociadas a especies forestales**

Los árboles, como todos los seres vivos, son propensos a ser afectados durante todas las etapas de su desarrollo por diferentes agentes, uno de ellos las bacterias que alteran el desarrollo esperado de los mismos. Inclusive, causas de origen genético o fisiológico. Las plantas enfermas son aquellas cuyo desarrollo fisiológico y morfológico se ha alterado desfavorablemente y en forma progresiva, hasta tal punto, que se producen manifestaciones visibles a tal alteración (Arguedas 2012). El género *Brenneria* agrupa especies bacterianas que ocasionan hoyos en la madera, grietas profundas longitudinales en el tronco, exudado color oscuro marrón con bacterias que fluyen de las grietas de las ramas. El género *Brenneria* fue descrito en 1998 para agrupar a seis especies bacterianas, anteriormente incluidas en el género *Erwinia* (Gonzales *et al.*, 2008).

#### **2.13.1 *Erwinia amylovora***

El género *Erwinia* que recibe su nombre a la memoria del fitopatólogo Erwin F. Smith, se creó inicialmente para agrupar a Enterobacterias asociadas a las plantas Gram negativas, bacilares no formadoras de esporas y móviles. Los miembros de este género incluyen además de enterobacterias saprofitas ecológicamente asociadas a plantas, patógenos oportunistas del hombre y de los animales. Esta bacteria es de muy fácil dispersión y contamina vegetales huéspedes sin mostrar síntomas, por lo que hay que tener el máximo. Los daños que produce son muy graves, provocando la muerte de la planta. Además, la velocidad de progresión de la enfermedad es muy rápida, dependiendo de la cantidad de bacterias y de las condiciones meteorológicas. Las especies del género *Erwinia*, se clasificaron en cuatro grupos basados en la comparación de secuencias del ADN. Quedando *Erwinia amylovora* en el primer grupo,

el cual representa las verdaderas *Erwinias*, que producen necrosis o marchitamiento en las plantas (Brenner 1984).

### **2.13.2 Características Generales de *E. amylovora***

Fue la primera bacteria que se demostró era el agente causal de una enfermedad en plantas, la enfermedad denominada fuego bacteriano, que afecta principalmente a plantas de la familia rosáceas en las que se incluyen los frutales de pera y manzano. Entre las especies forestales susceptibles de ser colonizadas por esta bacteria se citan como más importantes las de los géneros: *Crataegus*, *Sorbus*, *Cotoneaster*, *Malus* y *Eriobotrya*. Las flores y brotes jóvenes son los órganos más sensibles, y donde suelen aparecer los síntomas iniciales. Como síntomas característicos se citan: ennegrecimiento y marchitamiento de las flores, brotes que adquieren una coloración marrón rojiza, y también, las exudaciones típicas bacterianas. Puede ocasionar la muerte del árbol o planta en un plazo variable (Merlo *et al.*, 2010).

### **2.13.3 Síntomas Causados por *E. amylovora***

La infección de *E. amylovora* puede iniciarse en plantas de cualquier edad, incluso ya desde el vivero, ésta penetrar a través de aberturas naturales Normalmente los primeros síntomas se presentan en primavera, durante la floración y brotación, y se localizan con frecuencia en la zona media o baja del árbol. La bacteria se multiplica y la infección avanza en todo el árbol, alcanzando finalmente las ramas. Las hojas pueden ser infectadas a partir del brote en el que están situadas o bien por penetración directa de la bacteria. El síntoma inicialmente visible puede ser un marchitamiento, que puede ir acompañado de manchas necróticas en los márgenes y superficie de las hojas. Las lesiones del brote se van extendiendo y cuando *E. amylovora* ha alcanzado la base de una rama impide su nutrición, produciendo un rápido marchitamiento de todas las hojas del brote. No se produce defoliación y las hojas permanecen secas en el árbol (Palacio y Cambra, 2009).

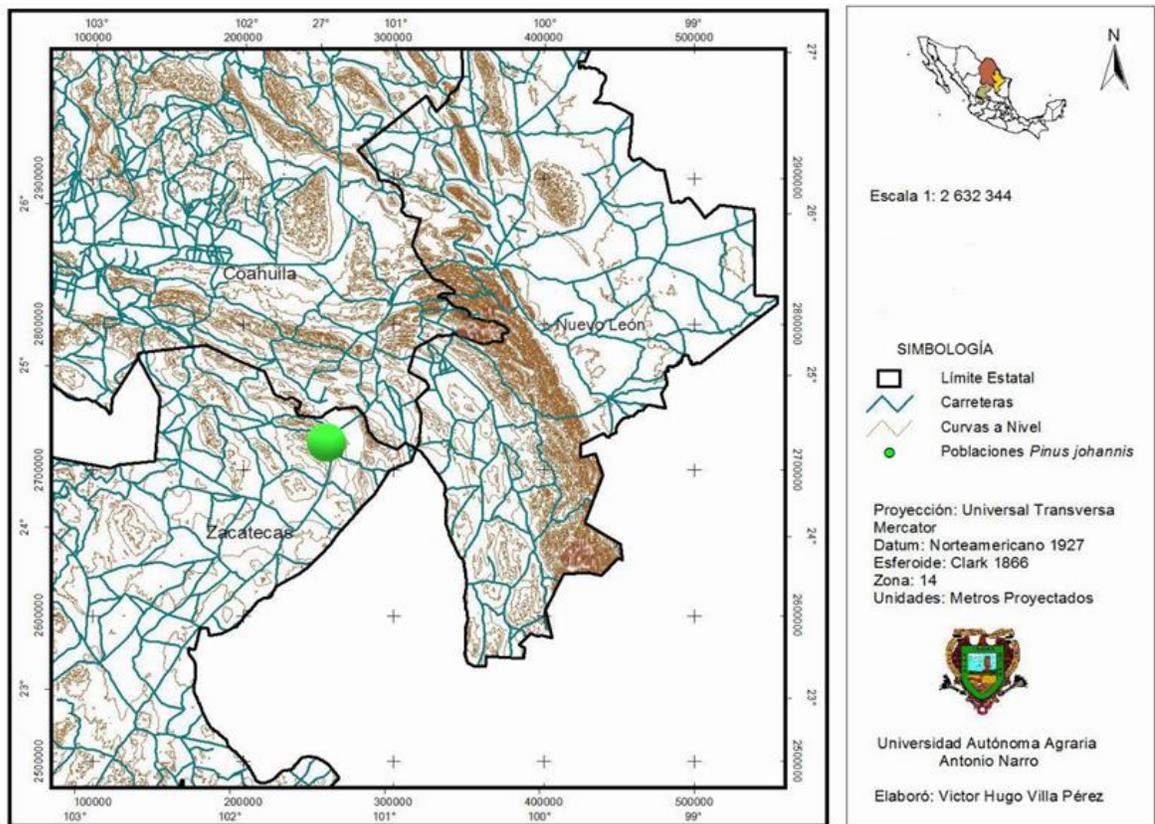
### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1.1 Ubicación del Experimento

Este trabajo de investigación fue llevado a cabo en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología, en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

#### 1.2 Descripción del Área de Estudio

El área de estudio de *Pinus johannis* fue en la localidad Nuevo Salaverna que se encuentra ubicada en el Municipio de Mazapil, Estado de Zacatecas ( $24^{\circ} 38' 52.56''$  N  $101^{\circ} 30' 4.77''$  W). (Figura 1)



**Figura 1.** Ubicación de Arboles muestreados de *Pinus johannis* en el norte del estado de Zacatecas (Villa, 2010).

### 1.3 Colecta de Material Vegetal

#### 1.3.1 Selección de Árboles para la Colecta

La recolección del material vegetal se realizó en Marzo de 2018, se muestrearon 20 árboles cinco en cada punto cardinal de la población, seleccionados al azar. En cada árbol se tomaron 4 muestras de acuerdo a los cuatro puntos cardinales.

Cada una de las muestras se colocó en bolsas de plástico por separado y se identificaron con el nombre de la especie, numero de árbol y la orientación.

#### 1.3.2 Incidencia y Severidad

Se determinó la incidencia de la enfermedad en relación al número total de árboles y se expresó en porcentaje de plantas enfermas, para la severidad se utilizó una escala arbitraria.

Los resultados se registraron en un formato, señalando si hay presencia o no de sintomatología. (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Características generales de la población de colecta de *Pinus johannis* M.-F.

Lugar de muestreo: Mazapil, Zacatecas. Fecha: 4/marzo/2018 Coordenadas: 24° 38' 52.56" N 101° 30 4.77"W Especie: <i>Pinus johannis</i>						
Altura de árbol	INCIDENCIA		SEVERIDAD Escala de daño (%) por ramas en cada orientación			
	No. De árbol	Presencia de síntoma	Norte	sur	este	Oeste

### **1.3.3 Traslado de Muestras Colectadas**

Las muestras ya identificadas fueron trasladadas al laboratorio de fitopatología en el Departamento de Parasitología para mantenerlas en refrigeración para su preservación hasta su procesamiento.

### **1.4 Preparación de Medio de cultivo PDA y KB**

PDA. Se pesaron 17.5 gr de Agar Papa Dextrosa y se aforo con 450 ml de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml. Se Calentó agitando frecuentemente permitiendo que hierva por un minuto, para que el medio se disolviera completamente, después se llevó a la autoclave a 121°C durante 15 minutos para ser esterilizado.

KB. Se pesaron 9 gr de Proteosa Peptona, 0.67 gr de Fosfato de Potasio Dibasico, 0.67 gr de Sulfato de Magnesio, 6.75 gr de Agar, 6.75 gr de Glicerol y se aforo con 450 ml de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml. Se Calentó agitando frecuentemente permitiendo que hierva por un minuto, para que el medio se disolviera completamente, después se llevó a la autoclave a 121°C durante 15 minutos para ser esterilizado.

### **1.5 Vaciado de Cajas**

El medio se llevo a la camara de transferencia para el vaciado en las cajas Petri y evitar contaminacion alguna, se espero un tiempo de 24 horas para que el medio se solidificara.

## 1.6 Siembra de las Muestras de Pino

De las muestras se tomaron agujas y partes del tallo, se cortaron con un bisturí en partes muy pequeñas y se llevaron a una caja Petri para lavarlas. Se desinfectó con cloro al 2% por 1 minuto después se enjuago con agua destilada estéril por 3 minutos para poder eliminar el exceso de cloro, se hizo un segundo lavado, luego fueron colocadas en papel de estraza para que perdieran el exceso de humedad. Se tomaron de 3 a 5 partes de aguja y/o tallo y se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo, las cajas se sellaron con papel film y se identificaron con nombre, fecha, número de árbol y orientación, todo el proceso fue realizado en la cámara de transferencia para evitar contaminación alguna, al final se llevaron a la incubadora a una temperatura de 25°C para el desarrollo de los microorganismos (figura 2).



**Figura 2.** Proceso de siembra de las muestras de *Pinus johannis*.

## 1.7 Aislamiento de Microorganismos

Se separaron los diferentes microorganismos que se presentaron, en este caso hongos y bacterias. Con una aguja de disección flameada y estéril se tomó un aislado de cada uno y se

pasaron a una nueva caja con medio de PDA y KB, las cajas se sellaron e identificaron y se llevaron a la incubadora a una temperatura de 25°C, estas se observaron continuamente.

### **1.8 Purificación de Hongos**

Una vez que las cepas tenían el crecimiento adecuado para realizar su purificación, con un sacabocado flameado y esterilizado, se tomó parte del hongo y se colocó en una nueva caja con medio de PDA, se selló e identificó y se llevó a la incubadora a una temperatura de 25°C.

### **1.9 Incremento de Cepas**

Una vez obtenidas las cepas fueron incrementadas en cajas con medio de PDA, con un sacabocado se tomó parte del hongo y se colocó en el medio, las cajas se sellaron e identificaron y se llevaron a la incubadora a 25°C.

### **1.10 Preparación de Laminillas**

Teniendo cepas puras se hicieron varios mantajes semipermanentes de las diferentes cepas. En portaobjetos se adicionó lactofenol azul, después se colocó una pequeña muestra de micelio y posterior el cubreobjetos, después se sellaron e identificaron para observar en el microscopio compuesto.

### **1.11 Identificación de Hongos**

Las preparaciones de los hongos se llevaron al microscopio compuesto para observar el tipo de micelio y las características distintivas de los diferentes géneros de patógenos esto con

ayuda de las diferentes claves para el proceso de identificación de patógenos, las montas se observaron al microscopio con los objetivos de 10x y 40x. La identificación a nivel de género se realizó utilizando las claves para hongos imperfectos (Barnett y Hunter, 1998), se basó en características de estructuras reproductivas y del micelio. También se consideró la coloración del crecimiento micelial de cada cepa durante una semana.

## **1.12 Purificación de Bacterias**

Una vez teniendo las colonias de bacterias en crecimiento, con un asa bacteriológica estéril se tomó parte de la suspensión bacteriana y se sembró por el método de estría múltiple, en cajas nuevas con medio KB, se selló e identificó y se incubó a 25°C en un periodo de 48 horas, se observó también la forma de la colonia, tamaño, color y consistencia.

## **1.13 Caracterización Bioquímica de las Bacterias**

### **1.13.1 Pruebas Bioquímicas Preliminares**

#### **1.13.1.1 Tinción de Gram**

La prueba permite diferenciar las bacterias mediante coloración en Gram positivas (violeta) y en Gram negativas (rojo). En las gram positivas el colorante se fija fuertemente al peptidoglicano que lo retiene e impide que salga con el decolorante. En las gram negativas el colorante es retenido con menos fuerza al ser más delgada la capa de peptidoglicano. Para la tinción de Gram primeramente se fijó la bacteria en un portaobjetos limpio, posteriormente se adicionó cristal violeta hasta inundar la muestra actuando por 30 segundos, se decantó y lavo, después se agregó lugol por 1 minuto, se decantó y se lavó con alcohol-acetona hasta retirar los excesos del cristal violeta, por último se adicionó el colorante de contraste (safranina) por 1 minuto, se lavo con agua y dejó secar a temperatura ambiente, por último

se observó al microscopio compuesto en el objetivo de 100x para observar el resultado (Gram positiva o negativa).

#### **1.13.1.2 Pruebas de Catalasa**

La prueba de la catalasa es un método rápido y fácil para la diferenciación de *Staphylococcus* (Catalasa positivo) de *Streptococcus* (Catalasa negativos e inmóviles). La catalasa es un enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas (Fernández, *et al.*, 2010). Para realizar la prueba se colocó una gota de peróxido de hidrógeno en un portaobjetos y con un asa bacteriológica se tomó una pequeña muestra de la colonia bacteriana y se dispersó en el peróxido de hidrógeno para ver si formaba burbujas.

#### **1.13.1.3 Prueba de Oxidasa**

Sirve para detectar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular originando agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. Por lo general, el sistema citocromo oxidasa sólo se encuentra en las bacterias aerobias y algunas anaerobias facultativas. Asimismo, la presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa, ya que ésta degrada el peróxido de hidrógeno que se produce como consecuencia de la reducción del oxígeno (Bou *et al.*, 2011). Para realizar la prueba se colocó un trozo de papel de filtro estéril, luego con un asa de platino estéril se depositó sobre el papel una pequeña concentración bacteriana y se añadió una gota del reactivo de oxidasa, se esperó a observar una coloración morada en un lapso no mayor a 10 segundos para ver si el resultado era positivo o de lo contrario este era negativo.

#### **1.13.1.4 Prueba de KOH al 3%**

El objetivo de realizar esta prueba es para ratificar los resultados de la tinción de Gram. La prueba consistió en colocar sobre una laminilla una gota de KOH al 3 %, después con el asa se adicionó una muestra de la colonia bacteriana, se mezclaron con movimientos giratorios durante 1 a 3 minutos y se observó si al separar el asa de la mezcla se formaba una hebra viscosa, la cual indicaba que la prueba fue positiva e indica que se trata de bacterias Gram negativas (Lagunas y Vega, 2013).

### **1.13.2 Pruebas Específicas**

#### **1.13.2.1 Oxido Fermentación (Hugg-Leiffson)**

Mediante esta prueba se determina si la utilización de los hidratos de carbono por parte de un microorganismo se realiza por vía oxidativa proceso aeróbico, donde hay presencia de oxígeno o por vía fermentativa proceso anaeróbico, ausencia de oxígeno (Bou *et al.*, 2011). Para la prueba se utilizó el agar OF, que se elaboró con 0.5 gr de Peptona, 1.25 gr de NCl, 0.0075 gr de Agar, estos se vaciaron en un matraz de Erlenmeyer de 500ml, se aforo con 250 ml de agua, se agregaron 0.0003 gr de azul de Bromitimol y se llevó a esterilizar a la autoclave a una temperatura de 121°C por 15 minutos. Se esperó a que estuviera a una temperatura ambiente para agregar 5 gr de Glucosa, esto ya se realizó en la cámara de transferencia. Después de 24 horas se llenaron 5 tubos de ensaye con 5 ml del medio a cada uno para realizar la inoculación. Con un asa tomamos parte de la bacteria e inoculamos por picadura en 4 de los tubos, dejando un testigo para observar los cambios que se presentaran. En 2 de los 4 tubos se le agrego 5 ml de aceite mineral.

### 1.13.2.2 Pruebas de L.O.P.A.T.

**Levana:** Utilizando un asa bacteriológica se sembró la bacteria por estría cruzada sobre la superficie del medio para la producción de levana, luego se incubo a una temperatura de 28°C en un periodo de 24-48 horas. Después del periodo de incubación se determinó la elevación y consistencia de la colonia bacteriana. Para los resultados se consideró; que si la colonia era mucoide o pulvinada la prueba era positiva y si no esta se consideraba negativa.

**Oxidasa:** Se colocó un trozo de papel de filtro estéril, luego con un asa de platino estéril se depositó sobre el papel una pequeña concentración bacteriana y se añadió una gota del reactivo de oxidasa, se esperó a observar una coloración morada en un lapso no mayor a 10 segundos para indicar un resultado positivo o bien negativo.

**Peptolisis de papa:** Para esta prueba se tomaron cortes de papa ya desinfectados con cloro al 2%. Los cortes se colocaron en cajas de vidrio con papel de estraza previamente esterilizadas y se hicieron pequeñas heridas a cada uno de estos para la inoculación. Con un asa bacteriológica se tomó una pequeña muestra de la bacteria y se inoculo por vía herida, las cajas se llevaron a la incubadora a una temperatura de 25°C, para observar si había presencia de la bacteria.

**Arginina:** La deshidrolasa de arginina es una enzima que se encuentra presente en especies del género *Pseudomonas*. El complejo enzimático está compuesto por las enzimas arginina desaminasa y la cetrolina ureidos la primera metaboliza la arginina a centrolina y la segunda transforma la citrolina en ornitina (Schaad *et al.*, 2001). Para la prueba, a partir del cultivo bacteriano se inoculo dos de tres tubos con medio de cultivo dejando uno como testigo, luego de eso se introdujo el asa previamente flameada al tubo testigo, después se adiciono 1 ml aproximadamente de aceite mineral a cada uno de los tubos y se incubaron a 28°C durante 72 horas.

**Tabaco:** La prueba de hipersensibilidad en una planta no huésped, en este caso la planta de tabaco. Consistió en la inoculación del mesófilo de una hoja de una planta con el objetivo de conocer si la bacteria inoculada es o no una bacteria fitopatógena. En primer lugar, con una aguja se pinchó la hoja de lado a lado y con la bacteria se hizo una suspensión bacteriana para después sin la aguja se inyectó a presión la suspensión bacteriana en la hoja quedando el mesófilo inoculado. Si la prueba resulta ser positiva, se produce una reacción de hipersensibilidad y la zona inoculada se necrosa rápidamente en un periodo de 24 a 48 horas, indicando que la bacteria inoculada es patógena de otra planta.

#### **1.14 Pruebas de Patogenicidad**

Inocular el microorganismo aislado en una planta sana de igual especie de la que fue aislado, esperar la reacción de la planta, si reproduce los síntomas entonces el hongo inoculado es el causante de ellos. A esto se le conoce como los postulados de Koch.

Para comprobar la patogenicidad de los hongos, estos se inocularon en partes vegetativas (ramas) de *Pino johannis*. La inoculación debe imitar la forma más probable de infección natural, en este caso fue mediante aspersión en ramas utilizando atomizadores, de esta manera la suspensión entra a través de los estomas a los espacios intercelulares

Las soluciones utilizadas se compararon por el método de colorimetría, con la escala de Mac Farland, quedando así una solución concentrada del patógeno de  $1 \times 10^6$ . Después de la aspersión las ramas se mantuvieron en cámara húmeda hasta la aparición de síntomas.

## 1.15 Caracterización Molecular

Se ha comprobado que para las determinaciones a nivel de género y especie el estudio de la secuencia del ADN ribosomal (ADNr) es muy apropiado porque esta molécula contiene regiones muy conservadas y regiones muy variables. Por tanto, los ensayos pueden ser diseñados para dar información a diferentes niveles filogenéticos en particular género y especie y que se ha demostrado que es muy similar al elaborado en base a las características fenotípicas. (Axelsson, 2004, Torriani *et al.*, 1999).

Las cepas de los hongos identificados morfológicamente como *Fusarium spp.* *Trichotecium spp.* y la bacteria, se sembraron en PDA y se mantuvieron a una temperatura de 28°C durante 72 horas. La extracción del ADN se realizó a partir del micelio de cada hongo. La amplificación de la región espaciadora transcrita interna 1 a 2 (ITS 1 A ITS 2) de los genes ribosomales (ADNr) se realizó mediante el uso de los indicadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White, *et al.*, 1990.). Los productos fueron secuenciadas con el método de dideoxinucleótidos marcados en el secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Todo lo anterior fue realizado en el Instituto Potosino De Investigación Científica y Tecnológica, A.C. (IPICYT), San Luis Potosí, México. Las secuencias obtenidas fueron sometidas a un análisis BLAST8 Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Colecta de Material Vegetal

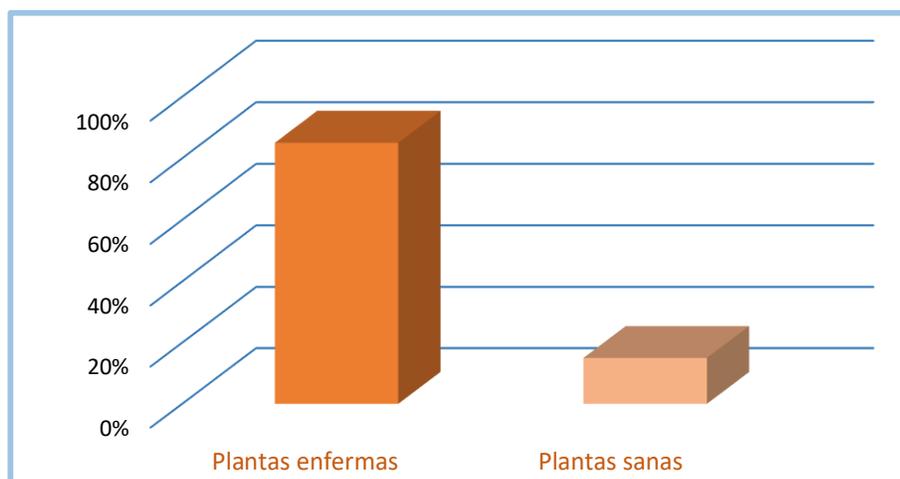
Del muestreo para la colecta del material vegetal de *Pinus johannis* se observaron los siguientes síntomas: Tizones, acículas con manchas cloróticas amarillentas, bandas castaño-rojizas sobre las acículas, ramas secas, tejidos necrosados, secreción de resina. Estos síntomas se presentaron en la mayor parte de las plantas muestreadas (Figura 3).

García (2009) menciona que el daño en acículas, amarillamiento del follaje y muerte de diferentes especies de pinos, está asociado a factores bióticos y abióticos. Por otra parte, Osorio (2007) encontró que en plantaciones de pino de diferentes edades el follaje mostraba síntomas variables que iban desde el color verde normal, hasta un color amarillo. También menciona que se observaron en el envés de las acículas numerosas estructuras globosas, muy pequeñas, de color negro, alineadas a lo largo de las bandas estomáticas, las que en conjunto daban un aspecto negruzco y en casos más extremos, la copa de los árboles presentaba defoliación, permaneciendo sólo las acículas del último período vegetativo.



**Figura 3.** Síntomas encontrados en *Pinus johannis* en Mazapil, Zacatecas, México.

La incidencia del total de 20 plantas de *Pinus johannis* muestreadas en Mazapil, fue la siguiente: 17 plantas enfermas representando el 85% y 3 plantas sin presencia de enfermedad representando el 15% del total de las plantas (Figura 4).



**Figura 4.** Incidencia de plantas enfermas y sanas en Mazapil, Zacatecas.

#### 4.2 Siembra de las Muestras de Pino

Los patógenos encontrados en la siembra de las partes vegetativas corresponden principalmente a hongos afectando a *Pinus johannis* y también la presencia de una bacteria (cuadro 2). Ya que algunos hongos se presentan con mayor incidencia que otros.

**Cuadro 2.** Patógenos encontrados en la siembra de las muestras de *Pinus johannis*.

No. Árbol	Patógeno encontrado
1	No hubo desarrollo
2	<i>Alternaria alternata</i>
3	<i>Alternaria alternata</i>
4	<i>Alternaria alternata</i>

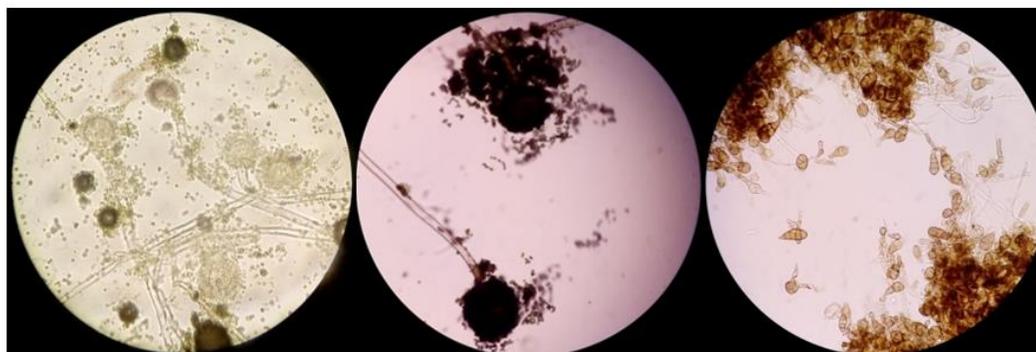
5	<i>Alternaria alternata</i> <i>Aspergillus niger</i>
6	<i>Aspergillus flavus</i>
7	<i>Alternaria alternata</i>
8	<i>Erwinia amylovila</i>
9	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Aspergillus flavus</i>
10	<i>Trichotecium roseum</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Penicillium</i>
11	No hubo desarrollo
12	<i>Alternaria alternata</i>
13	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Alternaria alternata</i>
14	<i>Alternaria alternata</i>
15	<i>Alternaria alternata</i> <i>Penicillium</i>
16	No hubo desarrollo
17	<i>Alternaria alternata</i>
18	<i>Trichotecium roseum</i> , <i>Alternaria alternata</i>
19	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Fusarium tricinctum</i>
20	<i>Alternaria alternata</i>

*Penicillium spp.* Se puede presentar debido a los excesos de humedad ya que algunas muestras que se colectaron, no presentaban síntomas tan elevados y estas aún permanecían verdes y a la hora de la colecta no hubo ningún proceso de desinfección por lo cual este patógeno se podría favorecer para reproducirse de manera más rápida. En el caso de *Fusarium* y *Aspergillus*, Guerra *et al* (2004) menciona en su reporte sobre los principales hongos que afectan a *Pinus tropicalis*, que las principales afectaciones en semillas de pinos son causadas por el género *Aspergillus* y en viveros el género *Fusarium*. Dependiendo de su ubicación, los hongos transmitidos por la semilla pueden en general, clasificarse en dos grupos: llevados externamente en la semilla que incluye especies de *Fusarium*, *Rhizopus* y *Trichothecium*. No son usualmente específicas al huésped y pueden abarcar más de una especie. Algunos de los hongos bien conocidos llevados internamente en la semilla incluyen especies de *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*. Estos pueden causar deterioro de la calidad de la semilla y mortandad pre o post-emergencia de plántulas.

En el caso de la bacteria *Erwinia amylovora* ha sido reportada como responsable del fuego bacteriano, una enfermedad de suma importancia y grave que pueden padecer los frutales de pepita (peral, manzano y membrillero), y varias especies leñosas ornamentales o silvestres. Los daños son muy graves, ya que puede producir la muerte de la planta afectada en un corto periodo de tiempo. El riesgo se ve agravado por la gran facilidad de dispersión de la enfermedad (Palacio y Cambra, 2009).

### 4.3 Identificación de Hongos

Se identificó morfológicamente los hongos *Alternaria*, *Aspergillus* y *Penicillium* los cuales se encontraban más presentes en la mayoría de las muestras (Figura 5), se procedió a su identificación a nivel género de acuerdo a las claves (Barnett & Hunter, 1998).



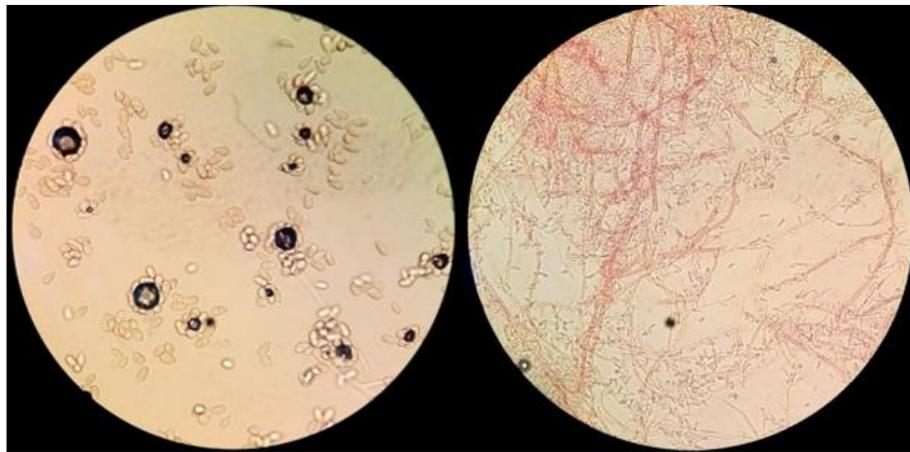
**Figura 5.** Presencia de conidióforos *Aspergillus* y *Alternaria* aislados de muestras de *Pinus johannis*.

De acuerdo con Blancas (2007), estos hongos son los contaminantes más comunes e importantes de las semillas almacenadas ya que la humedad favorece su crecimiento debido a que pueden presentarse en todas partes y crecen en condiciones más secas de las que pueden soportar otros hongos de campo. *Aspergillus* y *Penicillium* Pueden invadir las semillas directamente, *Aspergillus* puede producir toxinas como aflatoxina y ocratoxina, mientras

*Penicillium*: Acido penicílico. Los hongos de almacenamiento pueden infestar el grano en el campo.

A demás se identificaron los siguientes hongos patógenos: *Fusarium tricinctum* y *Trichotecium roseum* que fueron aislados de las semillas y partes vegetativas de *Pinus johannis* (Figura 6). Los ejemplos más comunes de hongos de campo son: *Fusarium* y *Alternaria*. *Fusarium* puede producir las toxinas: DON, monliformina, fumonisinas y depositarlas en las semillas (Blancas 2007).

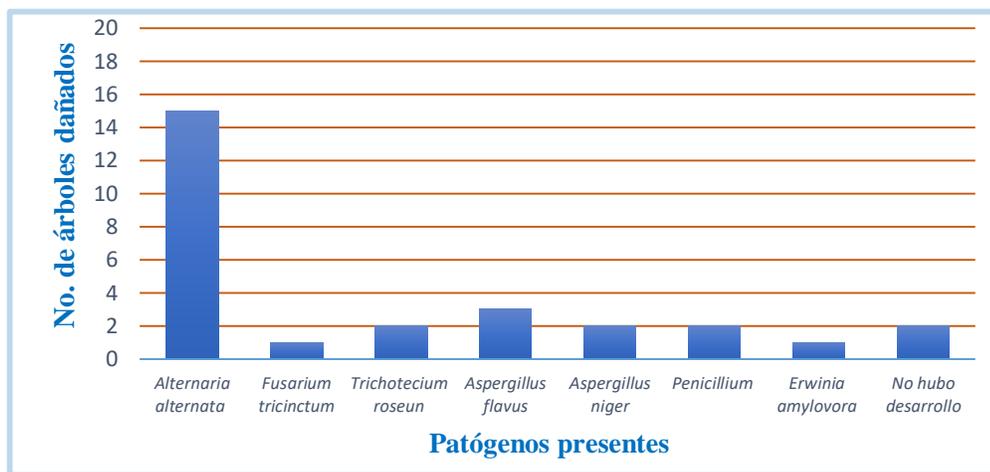
Leonor *et al* (2016) menciona en su artículo que identificaron: *Trichothecium sp.* A pesar de ser considerado como hongo saprofito se ha encontrado que, bajo condiciones favorables, es capaz de invadir tejido de la semilla y matar las plántulas de algunas especies de pinos. Es uno de los hongos causantes de damping off en plántulas de *Pinus oocarpa*, se encontró además *Fusariumn spp.* Estas especies son causantes de deterioro de semillas, debilitamiento y muerte de plántulas.



**Figura 6.** Conidios bicelures de *T. roseum* y Microconidias de *F. tricinctum*, aislados a muestras de *P. johannis*

De acuerdos con los resultados se identificaron cinco especies de hongos presentes en plantas de *Pinus johannis* los cuales fueron: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium tricinctum*, *Trichotecium roseum*, *Alterneria alternata*, *penicillium* y la presencia de una bacteria *Erwinia amylovora*. (Figura 7).

Guerra *et al* (2004) menciona que entre los patógenos asociados a las semillas, viveros, plantaciones y madera se incluyen a las bacterias, virus y hongos. Estos últimos son los más frecuentes y de mayor importancia para las especies de coníferas. La mayoría de las semillas de la especie de coníferas son propensas al ataque de estos patógenos, aunque algunas veces su patogenicidad ha sido muy debatida debido a que se pueden desarrollar sobre la superficie de las semillas y otros pueden causar infecciones internas, en su mayoría a veces pueden ser considerados saprofitos.



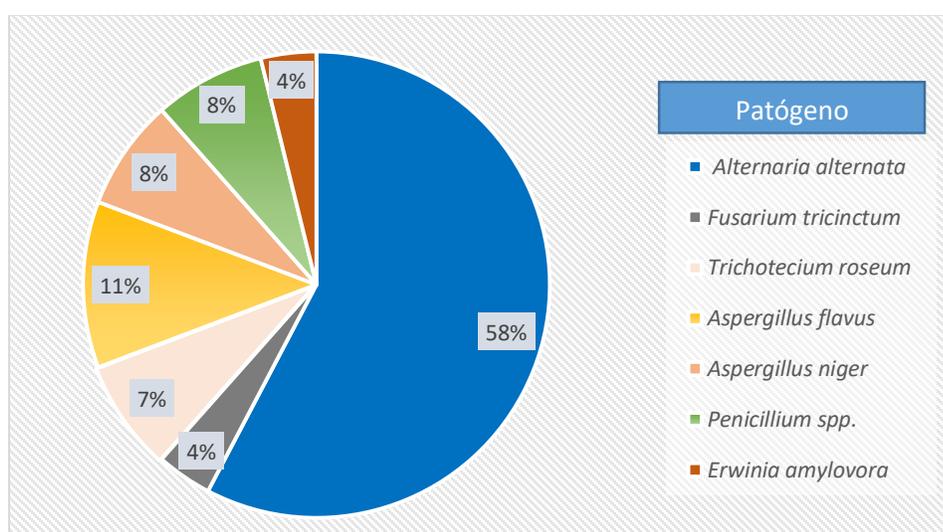
**Figura 7.** Patógenos identificados asociados a las plantas enfermas de *Pinus johannis*

De acuerdo a los resultados de la gráfica, los patógenos con mayor incidencia en las plantas de *Pinus johannis* fueron las del género *Alternaria*, con un 58% (Figura 8).

Monciváis y José (2018). Estudiaron la distribución vertical de hongos en siete tipos de hojas de *Pinus arizonica*, *P. cembroides* y *P. pseudostrobus* mediante los métodos de aislamiento en medio de cultivo en caja de Petri (método indirecto) y con el uso de cámaras húmedas (método directo) durante un año. En el cual *Pestalotia stevensonii* y *Rhizosphaera kalkhoffii* fueron las especies más abundantes; mientras que, *Alternaria alternata* y *Ceuthospora sp* resultaron las más frecuentes.

De los patógenos importantes en semillas forestales específicas en las del género *Pinus* la incidencia que se presentó fue de un 11 % para *Fusarium tricinctum* (Figura 8).

Leonor *et al* (2016) identificó la presencia de los hongos *Fusarium spp.* y *Trichothecium sp.* Principalmente en semilla ennegrecida, en *Pinus douglasiana* Martínez. Las semillas clasificadas con mayor grado de manchado, presentaron daño severo en la cubierta, y a nivel de endospermo.



**Figura 8.** Incidencia de los patógenos presentes en *Pinus johannis*

#### 4.4 Caracterización Bioquímica de la Bacteria

Se identificó la cepa bacteriana de acuerdo al manual de (Schaad *et al.*, 2001). en las muestras colectadas de la población de *P. johannis*. Se determinó de acuerdo a la respuesta en las diferentes pruebas que se trataba del género *Erwinia* (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Resultados de las pruebas bioquímicas en la caracterización de la cepa bacteriana aislada de Las muestras de *Pinus johannis*.

<b>Pruebas preliminares</b>	<b>Literatura</b>	<b>Cepa</b>
Tinción de Gram	(-)	(-)
Catalasa	(+)	(+)
Oxidasa	(+)	(-)
KOH	(+)	(+)
Oxido fermentacion	(+) (-)	(+)
Levana	(-)	(-)
Peptolisis de papa	(-)	(-)
Arginina	(-)	(-)
Tabaco	(+)	(-)

De acuerdo a los resultados obtenidos y comparandolos con Schaad, *et al.* (2001) *Erwinia amilovora* es un bacilo Gram (-), no aprovecha levana y arginina, positivas las pruebas Catalasa, Hugg-Leiffenson, y son negativas a las pruebas Oxidasa, Proteolisis de papa y la hipersensibilidad de Tabaco. Esto nos ayudó a corroborar que la bacteria del genero *Erwinia*.

#### **4.5 Pruebas de Patogenicidad**

De los patogenos que se presentaron como asociados a *P. johannis* se inocularon los seis hongos, teniendo como resultado la presencia de sintomas en las partes vegetativas (ramas) de *Pinus johannis*, la respuesta que se tuvo fueron despues de 8 dias de haber sido inoculados, se presentaron los siguientes sintomas necrosamiento, strangulamiento de las aciculas, y amarillamiento de las hojas, a medida que transcurre el tiempo (Figura 9 y 10).



**Figura 9.** Resultado positivo en la inoculación de los hongos asociados la planta de *P. johannis*.



**Figura 10.** Resultado negativo en la inoculación de los hongos asociados la planta de *P. johannis*.

De la prueba de patogenicidad de los hongos los síntomas se presentaron a los 8 días después de la inoculación excepto para *Penicillium* que no presentó síntomas. Se vieron más notorios los del hongo *Alternaria*, también se inoculó *Fusarium* en semillas de *P. johannis* y hubo presencia de micelio.

García *et al* (2013) menciona que diez días después de la inoculación con la suspensión de conidios de *A. alternata* se presentan manchas circulares necróticas a manera de anillos y halo amarillento y necrosaron el tejido totalmente.

#### 4.6 Caracterización Molecular

Las cepas miembros de los géneros *Trichothecium*, *Fusarium* y *Erwinia* fueron identificadas morfológicamente en base a las claves de (Barnett y Hunter 1998 y Schaad *et al* 2001) Para llegar a su identificación a nivel de especie, las muestras fueron secuenciadas con el método de didesoxinucleótidos marcados en el secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) para obtener la cadena de nucleótidos de cada una de las cepas. Mediante el análisis BLAST las secuencias de estos hongos mostraron elevados porcentajes de cobertura y similitud con especies de los géneros identificados.

La comparación en el BLAST de la secuencia:

```
CGTTAAGGTCATACTCCCAACCCTTTGTGACCTTACCTACCGTTGCTTCCG  
CGGACCGCCCCGGGCGCTGCGTGCCCCGGACCCAAGGCGCCCGCCGGGGACCA  
CACGAACCCTGTTTAACAAACATGTGTATCCTCTGAGCGAGCCGAAAGGCAAC  
AAAACAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAG  
AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG  
AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGA  
GCGTCATTTCAACCCTCGGGCCCCCCCCCTTTTCCCCTCGCGGGGGAGGGGGCGG  
GCCCGGCGTTGGGGCCCAGGCGTCCTCCAAGGGCGCCTGTCCCCGAAACCCAG  
TGGCGGCCTCGCCGCTGCCTCCTCCGCGTACGACTAGAAACCTCGCGACCCAA  
AGGCCGCGCGCGGTCCGCCGTAACAAACGGAACCTTTAGTTCAGTTGACCTTGG
```

AACATGTTTTGTTACCTCTATAATGATCCCTCATCAGTATCACCTAGAAAA.

Mostró 96.46 % de similaridad con la secuencia de *Trichothecium roseum*. (NCBI).

La secuencia:

CAGAGTCACTCCAACCTCTGTGACATACCTTAATGTTGCCTCGGCGGATCAGCC  
CGCGCCCCGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCAAACTCTAATGTTTCT  
TATTGTAACCTTCTGAGTAAAACAAACAAATAAATCAAACCTTTCAACAACGGA  
TCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAGAATGCGATAAGTAATGTG  
AATTGCAAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCTGG  
TATTCCGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCGGGT  
TTGGTGTGGGGATCGGCTCTGCCCTTCTGGGCGGGGCGCCCCGAAATACAT  
TGCGGTCTCGCTGCAGCCTCATTGCGTACTAGCTAACACCTCGCAACTGGAA  
CGCGGCGCGGCCATGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCA  
GGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCCTATCAGTAAACCGGAGGAA. Mostró  
98.46 % de similaridad con la secuencia de *Fusarium tricinctum* (NCBI).

La secuencia:

GGATGGATATCGGATACTGGGCGTAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCAG  
ATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAGGCTAG  
AGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT  
CTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAG  
GTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT  
AAACGATGTGACTTGGAGGCTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAAC  
GCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAA  
TTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGC  
GAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATCCACGAATTCGGCAGAGATGCCCTAGT  
GCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTG  
AAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCG  
ATTCGGTCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGG

GGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACA  
ATGGCGCATACAAAGAGAAGCGAACTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAG  
TGCGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCG  
CTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCCTTGTACC  
ACCCGGCCCCGTCAG. Mostró 98.58 % de similaridad con la secuencia de *Erwinia  
amylovora* (NCBI)

Esto confirmó los resultados de la identificación morfológica del género ya identificado.

## V. CONCLUSIONES

Se aislaron siete patógenos en plantas de *Pinus johannis* de los cuales *Fusarium tricinctum*, *Alternaria alternata*, *Trichotecium roseum* son los que principalmente están asociados con las enfermedades en pino.

Estos hongos son agentes causales de la muerte descendente de *Pinus johannis* siendo *Alternaria alternata* el que presentó una mayor incidencia con el 58% seguido de *Aspergillus flavus* con un 11%.

Los hongos *Aspergillus* y *Penicillium* son de gran importancia en semillas almacenadas.

Se aisló a la bacteria *Erwinia mylovora* que es de gran importancia en la Fitopatología ya que los daños que causa son muy graves, afectando principalmente a plantas de la familia rosáceas, sin embargo, en las pruebas de inoculación resultó ser patogénica a *Pinus johannis*.

## VI. LITERATURA CITADA

- Abarca, M. L. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol*, 17(3), S79-84.
- AGRIOS, G.N. (2008). *Fitopatología*. Reimpresión de la 2ª ed. México: Limusa. 856p.
- Aguirre Calderón, Ó. A., Jiménez Pérez, J., Kramer, H., & Akça, A. (2003). Análisis estructural de ecosistemas forestales en el Cerro del Potosí, Nuevo León, México. *Ciencia UANL*, 6(2).
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., y Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. 4th Ed. John Wiley and Sons, New York. 869p.
- Arguedas-Gamboa, M. (2012). Clasificación de síntomas de enfermedades forestales. Segunda parte. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 5(15), pág. 77-83. Disponible en: <https://revistas.tec.ac.cr/index.php/kuru/article/view/421>
- Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 139, 1-66.
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi* 4th ed. The American Phytopathological Society. Minnesota. USA.
- Bello, G. D. (2008). First report of *Trichothecium roseum* causing postharvest fruit rot of tomato in Argentina. *Australasian Plant Disease Notes*, 3(1), 103-104. Disponible en: <https://doi.org/10.1071/DN08041>
- Benitez E. M. (2003) Estudio de especies micotoxigenicas del genero *Penicillium*: *Penicillium verrucosum*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. pp: 15-18.
- Blancas, M. B. (2007). Manejo de granos en almacenamiento, causas de deterioro y prevención.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 29(8), 601-608.

- Brenner, D. J. (1984). Family I, Enterobacteriaceae. Pags. 408-420. Vol I. In: Krieg, N.R.A., Holt, J.G. (Eds.). Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, USA. ISBN: 0-683-04102-8.
- Del Río, M., F. Montes, I. Cañellas y G. Montero. (2003). Revisión: Índices de diversidad estructural en masas forestales. Investigaciones Agrarias: Sistemas y Recursos Forestales 12(1): 159-176.
- Eguiluz, T. (1987). Evolución de los pinos piñoneros mexicanos. In Passini, MF, D. Cibrián y T. Eguiluz (comp.). II Simposio Nacional Sobre Pinos Piñoneros. Centre Études Mexicaines et Centraméricaines-Centro de Genética Forestal AC-Universidad Autónoma de Chapingo. México, DF (pp. 83-89).
- Farjon, A. y B. T. Styles. (1997). *Pinus* (Pinaceae). Flora neotropica monograph 75 Organization for Flora Neotropica, The New York Botanical Garden. New York. U.S.A. 291 p.
- Fernández Olmos Ana., García de la Fuente Celia., Sáez Nieto Juan Antonio & Valdezate Ramos Sylvia. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, 29(8), 601-608.
- Flores-Rentería, Lluvia, F. Molina-Freaner, AV Whipple, CA Gehring y CA Domínguez. (2013). Estabilidad sexual en el casi dioico *Pinus johannis* (Pinaceae). American Journal of Botany 100 (3): 602–612. doi: 10.3732 / ajb.1200068.
- Fonseca, J. RM (2003). De piñas y piñones. Rev. Ciencia Forestal en México, 69(1), 64-65.
- Frisvad JC. 1981. Physiological criteria and mycotoxin production as aids in identification of common asymmetric Penicillia. Applied and Environmental Microbiology 45: 68-579.
- Gadow, K. v., Real, P., Álvarez González, J.G., (2001): Modelización del Crecimiento y la evolución de bosques. IUFRO World Series Vol. 12: 242 p.
- García A., A., y M.-F. Passini. (1993). Distribución y ecología de *Pinus johannis* M.-F. Robert. Phytologia 74: 125-127

- García León, E., Leyva Mir, S. G., Villaseñor Mir, H. E., Rodríguez García, M. F., & Tovar Pedraza, J. M. (2013). Identificación e incidencia de tres hongos fitopatógenos, de reporte nuevo, en avena (*Avena sativa* L.) en la meseta central de México. *Agrociencia*, 47(8), 815-827.
- García Valle, A. L. (2009). Estudio del comportamiento de enfermedades en bosques de pino (*Pinus oocarpa* Schiede ex Schltdl), en el municipio de San Fernando en Nueva Segovia (Doctoral dissertation, Universidad Nacional Agraria, UNA).
- García, A. A., & González, M. S. (2003). Pináceas de Durango. Instituto de Ecología. AC Comisión Nacional Forestal. México.
- García, J. M. D., Shagarodsky, T., Fresneda, J. A., Fundora, Y. H., & González, J. (2007). Caracterización de especies del género *Fusarium* en el cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum*) en las provincias ciudad Habana y la Habana. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 32(11), 63-66.
- Gil, M. (2018). *Aspergillus flavus*: características, taxonomía, morfología, enfermedades.
- Gonzales Biosca Elena, Pérez Laorga Arias Eduardo, Águila Clares Begoña, Catala Senet José Francisco, Delgado Santander Ricardo Gonzales Abolafio, López Gonzales María Milagros. (2008). Distribución de *Brenneria spp.* En la comunidad Valenciana y especies forestales a las que afecta. *Sociedad Española de Ciencias Forestales*. Valencia España. 6p.
- Guerra, C., Cruz, H., Vila, I., Duarte, Á., & López, M. O. (2004). Principales hongos que afectan a *Pinus Tropicalis* Morelet en Cuba. *Fitosanidad*, 8(2), 9-12.
- Guevara Suárez, M. I. (2018) Taxonomía y filogenia de aislados clínicos y ambientales de *penicillium* y *talaromyces* (Doctoral dissertation, Universitat Rovira i Virgili).
- Howard RJ, Garland JA, Seaman WL (Eds) (1994) 'Diseases and pests of vegetable crops in Canada.'(The Canadian Phytopathological Society and the Entomological Society of Canada).
- Lagunas, S., & Vega, F. L. (2013). Manual de Prácticas de Laboratorio de Bacteriología y Micología. Toluca, Mexico: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.

- Leonor M., Avendaño López, A., Quintana Camargo, M.´ y Padilla Garcia J. (2016). Asociación del grado de manchado y deterioro de semilla en *Pinus douglasiana* Martínez. Naturales y Agropecuarias, 3(6), 6-10.
- López, C. F., Aguilar, S. A., Manzo, S. V., & Oviedo, E. H. C. 1998. Potencial y eficiencia de semillas en tres poblaciones naturales de *Pinus johannis* m. F. Robert Seed potential and efficiency in three natural populations of *Pinus johannis* M. F. Robert.
- Luko Hilje Q., Carlos Araya F., Félix Scorza R., Manuel Víquez. 1991. Plagas y En fermedades forestales en América. CATIE. Turrialba, Costa Rica p98.
- Luna-Cavazos, M., Romero-Manzanares, A., & García-Moya, E. (2008). Afinidades en la flora genérica de piñonares del norte y centro de México: un análisis fenético. Revista mexicana de biodiversidad, 79(2), 449-458.
- Manzanares, A. R., & Moya, E. G. (2002). Estabilidad y elasticidad de la composición florística de los piñonares de San Luis Potosí, México. Agrociencia, 36(2), 243-254.
- Merlo, J. S., Domingo, S. A., de Negociado, J., de Protección, S., Rural, D., & de Comunidades, J. (2010). La sanidad forestal en Castilla-La Mancha. Foresta, (47), 112-121.
- Miranda, F., & Hernández, E. (1963). Los tipos de vegetación de México y su clasificación. Botanical Sciences, (28), 29-179.
- Monciváis, M., & José, G. (2018). Distribución vertical de hongos en hojas de tres especies de pinos en Nuevo León, México. Revista mexicana de ciencias forestales, 9(50), 379-399. Disponible en: <https://doi.org/10.29298/rmcf.v9i50.253>
- Mosseler, A., J. E. Major, J. D. Simpson, B. Daigle, K. Lange, Y. S. Park, K. H. Johnsen, y O.P. Rajora. (2000). Indicators of population viability in red spruce, *Picea rubens*. I. Reproductive traits and fecundity. Canadian Journal of Botany 78:928-940.
- NCBI; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Olmos, A. F., de la Fuente, C. G., Nieto, J. A. S., & Ramos, S. V. (2010). Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica, 5-9. Disponible en:

<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>

- Osorio, M. (2007). Detección del hongo defoliador *Phaeocryptopus gaeumannii* en plantaciones de *Pseudotsuga menziesii* de Valdivia, Chile. *Bosque (Valdivia)*, 28(1), 69-74.
- Palacio Bielsa, A., & Cambra Alvarez, M. A. (2009). El Fuego Bacteriano de las rosáceas (*Erwinia amylovora*).
- Passini, M. F. (1994). Synonymie entre *Pinus discolor* Bailey & Hawksworth et *Pinus johannis* M.-F. Robert. *Acta botanica gallica*, 141(3), 387-388. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/12538078.1994.10515172>
- Perry, J., P. (1991). *The pines of Mexico and Central America*. Timber Press. Portland, Oregon, U.S.A. 231 p.
- Pildain, M. B., & de Errasti, A. (2011). Hongos patógenos de pinos en la Patagonia y su asociación con plagas entomológicas. Serie técnica “Manejo integrado de plagas forestales.
- Pitt JI, Leistner L. 1991. Toxigenic *Penicillium* species. pp. 81-99 en: *Mycotoxins and Animal Foods*. Smith JE, Henderson RS, editores. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- Pitt JI. 1980. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London.
- Robert, M. F. 1978. Un nouveau pin pignon mexicain: *Pinus johannis* M.-F. Robert. *Adansonia*. Serie 2. 18 (3): 365-373.
- Rodríguez Guzmán Ma. Del Pilar s/n. Biodiversidad delos hongos fitopatogenos del suelo de México. Instituto de Fitosanidad Colegio de Postgraduados. Montecillos Chapingo, Edo. De México, México.
- Romero Cova Sebastián. (1994). *Hongos Fitopatogenos*. Universidad Autónoma Chapingo. Edo. De México, México.
- Romero, A., M. Luna, E. García, and M. F. Passini. (2000). Phenetic analysis of the Mexican midland pinyon pines, *Pinus cembroides* and *Pinus johannis*. *Bot. J. Linn. Soc.* 133: 181-194.

- Romero, M. A., E. Garcia M. y M-F Passini. (1996). *Pinus cenbroides* s. I y *Pinus johannis* del Altiplano Mexicano: una síntesis. Acta Botánica Gallica 143(7):681-693.
- Rzedowski, J., & Huerta, L. (1978). Vegetación de México editorial limusa. México, DF.
- Rzedowski, J., (2006). Vegetación de México. 1ra. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, 504 pp.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria (No. Ed. 3). American Phytopathological Society (APS Press).
- SEMARNAT. 2003. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001, Protección ambiental especies nativas de México de flora y fauna silvestre – categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio – lista de especies en riesgo. D. O. F. 23 de abril de 2003. México. 153 p. [En línea]. 25 de febrero de 2010. Disponible en: <http://www.semarnat.gob.mx/gestionambiental/forestalysuelos/Pages/anuariosforestales.aspx>
- Sumalan, R. M., Alexa, E., & Poiana, M. A. (2013). Assessment of inhibitory potential of essential oils on natural mycoflora and *Fusarium* mycotoxins production in wheat. Chemistry Central Journal, 7(1), 32.
- Tapia, C., & Amaro, J. (2014). Género *Fusarium*. Revista chilena de infectología, 31(1), 85-86. Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0716-10182014000100012&script=sci\\_arttext&tlng=en](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0716-10182014000100012&script=sci_arttext&tlng=en)
- Torriani, S., Zapparoli, G., & Dellaglio, F. (1999). Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus and *L. delbrueckii* subsp. lactis. Appl. Environ. Microbiol. 65(10), 4351-4356.
- Villa Pérez Victor H. (2010). Producción de Semillas e Indicadores Reproductivos de *Pinus johannis* M.-F. Robert en el Noreste de México. (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. p 11.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. L. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications, 18(1), 315-322.

Williams-Linera G., G. Halffter y E. Ezcurra. (1992). Estado de la biodiversidad en México. In: La diversidad biológica de Iberoamerica I. Copilador Gonzalo Halffter. Acta Zoológica Mexicana, volumen especial. CYTED-D, Instituto de Ecología, A.C., Secretaría de Desarrollo Social. Xalapa, Ver., México. pp. 285-312.

Wiltshire, S. P. (1933). The foundation species of *Alternaria* and *Macrosporium*. Transactions of the British Mycological Society, 18(2), 135-IN3.