

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Identificación del Agente Causal del Tizón de *Juniperus monosperma*
(Engelmann) Sargent, Silva en la Región de los Lirios, Mpio. de Arteaga, Coahuila.

Por:

SELENIFLOR VELÁZQUEZ MORALES

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México.

Junio de 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Identificación del Agente Causal del Tizón de *Juniperus monosperma*
(Engelmann) Sargent, Silva en la Región de los Lirios, Mpio. de Arteaga, Coahuila.

Por:

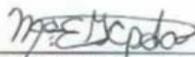
SELENI FLOR VELÁZQUEZ MORALES

TESIS

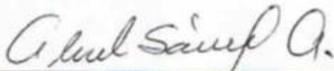
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobada por el Comité de Asesoría:



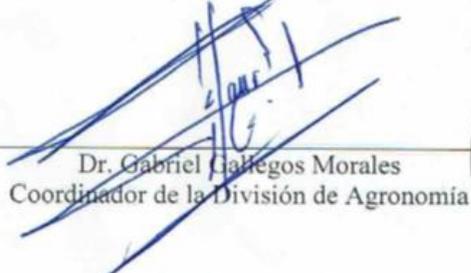
Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda
Asesor Principal



M. C. Abiel Sánchez Arizpe
Coasesor



Dr. Epifanio Castro del Ángel
Coasesor



Dr. Gabriel Callegos Morales
Coordinador de la División de Agronomía



Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Junio de 2019

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por darme la vida y haberme permitido terminar satisfactoriamente una meta más en mi vida.

A mi “**Alma Terra Mater**” **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por cobijarme en su seno, por darme la oportunidad de disfrutar momentos de aprendizaje en sus aulas y haberme formado profesionalmente, siempre estaré orgulloso llevando en mi corazón su escudo y colores.

Agradezco a los profesores que formaron parte y guiaron la elaboración es este documento.

Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda quien ha sabido guiar mis pasos hacia el conocimiento y ha sembrado en mi vocación de servir y ser cada día mejor en todos los aspectos. Por el apoyo, opiniones y comentarios muy orientados.

M.C. Abiel Sánchez Arizpe por brindarme de su valioso apoyo y tiempo en la realización de este trabajo.

Ing. Sergio Braham Sabag por su asesoría en este trabajo e identificación de la especie de *Juniperus*.

Dr. Epifanio Castro del Ángel por ayudarme en la revisión y corrección de este trabajo.

A **todos los profesores** del departamento de Parasitología por haber brindado su conocimiento y poder formarme una nueva visión.

DEDICATORIA

A mis padres

Héctor Ovilio Velázquez Santizo y Patricia Morales De León

A las personas más maravillosas, los arquitectos de mi vida con mucho cariño y amor les dedico este logro.

Es difícil describir en unas líneas lo que siento, porque ya no estás en cuerpo, pero tu espíritu está con nosotros, conmigo. Han pasado años desde que nací, desde ese momento e incluso antes de eso, ya estabas buscando maneras de ofrecerme lo mejor, Muchas gracias padre. Gracias mamá por guiar mis pasos, por ser madre y padre al mismo tiempo, mis valores morales y superaciones se lo debo a usted, esto será la mejor de sus herencias que agradeceré eternamente.

A mis hermanos

Con los que compartí en la infancia adversidades felices y seguimos explorando todos los rincones de nuestra alegría.

Rosember, Yoni Daniel, esposa e hijos, Yesenia y esposo, Héctor Ovilio.

A mis abuelos

Por sus sabios consejos que desde pequeña me inculcaron al bien.

Leocadio Velázquez García y Rogelia Santizo Velázquez

Heriberto Morales Roblero y Catalina De León

A mis tíos

Efrén Gonzales, Roselia Morales, Jeremías Velázquez.

Amigos (as)

Esteban Olivares, Amayrani Arroyo, Karina Garcia, Nicolas Gonzales.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA	ii
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	viii
LINTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBJETIVO.....	3
1.2 HIPÓTESIS	3
1.3 JUSTIFICACIÓN	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Importancia social y económica de <i>Juniperus monosperma</i>	4
2.2 Descripción morfológica de la especie según (Sergio <i>et al.</i> 1994).	4
2.2.1 Árbol o arbusto	4
2.2.2 Corteza.....	4
2.2.3 Hojas	5
2.2.4 Cono femenino	5
2.3 Distribución.....	5
2.4 Usos:.....	5
Como ornamental urbano.	5
2.5 Clasificación Taxonómica.....	6
2.6 Patógenos asociados a <i>Juniperus monosperma</i>.	6
2.7 <i>Alternaria sp.</i>.....	6
2.7.1 Características del género <i>Alternaria</i> Nees ex Fr.....	7
2.7.2 Clasificación Taxonómica	7
2.7.3 Síntomas:	8
2.8 <i>Aspergillus</i>.....	8
2.8.1 Características del género <i>Aspergillus</i>	9
2.8.2 Clasificación taxonómica de <i>Aspergillus</i> según Alexopoulos y Mims, (1979).....	9
2.9 <i>Rosellinia sp.</i>.....	10
2.9.1 Características.....	10

2.9.2 Síntomas	10
2.9.2.1 Síntomas registrados en plantas de rosa	10
2.9.3 Control.....	11
2.9.4 Ciclo de vida.....	11
2.9.5 Clasificación Taxonómica	12
2.10 <i>Xanthomonas campestris</i> tizón apical bacteriano	12
2.10.1 Etiología y sintomatología.....	12
2.10.2 Síntomas	12
2.10.3 Ciclo de la enfermedad:.....	13
2.11. <i>Erwinia psidii</i>	13
2.11.1 Daños	13
2.12 Enfermedades causadas por factores abióticos	13
2.12.1 Agentes del medio normal.....	14
2.12.2 Agentes del medio anormal.....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 Ubicación del experimento	15
3.2 Descripción del Área de Estudio.....	15
3.3 Metodología	16
3.3.1 Etapa de campo.....	16
3.3.1.1 Muestreo de enfermedades	16
3.3.1.2 Selección de árboles para la colecta de muestras	16
3.3.2 Etapa de laboratorio Para Hongos fitopatógenos.	17
3.3.2.1 Preparación de Medios de cultivo PDA y Agar Nutritivo	17
3.3.2.2 Vaciados de cajas.....	17
3.3.2.3 Aislamiento de hongos:	17
3.3.2.4 Purificación:.....	17
3.3.2.5 Incremento de Cepas.....	17
3.3.2.6 Identificación de Hongos a nivel especie.	18
3.3.3 Pruebas de patogenicidad	19
3.3.3.1 Inoculación de Hongos en <i>Juniperus monosperma</i>	19
3.3.4 Etapa de laboratorio para Bacterias fitopatógenas.....	20
3.3.4.1 Aislamiento de bacterias.	20
3.3.4.2 Resiembra en medios de cultivo.	20

3.3.4.3 Pruebas bioquímicas generales.	20
3.3.4.4 Tinción de Gram	20
3.3.4.5 Pruebas de catalasa	21
3.3.4.6 Pruebas de la oxidasa	21
3.3.4.7 Prueba de hidróxido de potasio al 3% (KOH).	22
3.3.4.8 Prueba del O/F (Oxidación - Fermentación) de Hugh-Leifson.	22
3.3.4.9 Producción de Inodol	23
3.3.4.10 Medio CVP	23
3.3.4.11 Crecimiento 36 °C	24
3.3.4.12 Tolerancia al cloruro de sodio	24
3.3.4.13 Pectolisis de la papa	24
3.3.4.14 Prueba de la Arginina	25
3.3.4.15 Medios de Y.D.C.A	25
3.3.4.16 Pruebas de patogenicidad en Bacterias.	25
3.3.5 Identificación Molecular	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1 Aislamiento e identificación microorganismos:	27
4.2 Incidencia de los patógenos sobre <i>Juniperus monosperma</i>	28
4.3 Incidencia de Patógenos asociados a <i>Juniperus monosperma</i>	30
4.4 Pruebas Bioquímicas de confirmación.	32
4.5 Pruebas de patogenicidad.....	34
5. CONCLUSIÓN	34
6. LITERATURA CITADA.....	36

ÍNDICE DE CUADROS

	Pagina
Cuadro 1. Géneros de microorganismos fitopatógenos encontrados en las muestras de <i>Juniperus monosperma</i>	29
Cuadro 2. Resultados de las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de la cepa bacteriana aislada de <i>Juniperus monosperma</i> , UAAAN 2019.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1 Microfotografía de los conidios de <i>Alternaria</i>	7
Figura 2 Esquema de los conidios de los grupos de especies de <i>Alternaria</i>	8
Figura 3 Síntomas aéreos ocasionado por <i>Roselia necatrix</i> en planta de rosal.....	11
Figura 4 Ubicación y distribución de Arboles muestreados en el Los Lirios, Mpio. de Arteaga Coahuila	15
Figura 5 Aislamiento e identificación de hongos, UAAAN 2019.....	18
Figura 6: Prueba de patogenicidad fúngica, UAAAN 2019.....	19
Figura 7 Árbol y semilla de <i>J. monosperma</i> , procedente del Municipio de Artiaga, Coahuila.....	27
Figura 8 Hongos aislados de <i>Juniperus</i> en el departamento de parasitología.....	28
Figura 9 Incidencia de patógenos en <i>Juniperus monosperma</i> , UAAAN 2019.....	30
Figura 10 Severidad de patógenos en <i>Juniperus monosperma</i> , UAAAN 2019.....	31
Figura 11 Bacilos Gram- positivos.....	33
Figura 12 Reacción negativa para la prueba de oxidasa y positiva para catalasa, UAAAN 2019.....	33
Figura 13 Resultado positivo de las pruebas de patogenicidad en <i>Juniperus monosperma</i> , UAAAN 2019.....	34

RESUMEN

Por sus características maderables, en ciertas regiones *Juniperus monosperma* constituye fuente de madera para construir, para postes y muebles, a pesar de que no alcanzan grandes diámetros o tamaños muy altos. La misma especie se ha utilizado para tratar problemas reumáticos, infecciones renales y para inhibir el desarrollo de algunos virus, como los que causan el herpes y el catarro; también se recomienda para tratar problemas de falta de menstruación –amenorrea (Fonseca, *et al.*, 2006).

En el presente trabajo se aislaron hongos y bacterias fitopatógenas, el objetivo de esta investigación fue identificar los microorganismos patógenos responsables del tizón de *Juniperus monosperma*, para conocer la presencia de estos se realizaron 2 recolectas para la obtención del material botánico mediante un muestreo completamente al azar en región de los Lirios Coahuila, todas las muestras se trasladaron al laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología Agrícola de la UAAAN, Buenavista, Saltillo, donde se procedió hacer la siembra en medios de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), aislamiento e identificación. La identificación de cada patógenos se hizo con ayuda de secuenciación molecular y las claves de Barnett y Hunter (1972), Agrios (1988) y Romero (1993).

Posteriormente se hizo la inoculación de microorganismos, en el caso de los hongos fueron inoculados en *Juniperus monosperma*, donde se utilizaron charolas de plásticos con papel filtro húmedo y un tallo del mismo a la cual se atomizo con una suspensión de esporas.

En el caso de la inoculación bacteriana se hicieron suspensiones bacterianas tomando como referencia el estándar N° 1 de la escala propuesta por Mc Farland (1.2×10^6 UFC/ml). Las plantas fueron infiltradas con 3 ml de la suspensión en la nervadura central de la lámina foliar de la hoja, con ayuda de una jeringa esterilizada. (La planta inoculada fue la maravilla).

La población fúngica encontrada pertenece a los siguientes géneros: *Alternaria*, *Aspergillus* y *Roselinea*, siendo *Alternaria* el género con mayor incidencia, sin embargo, de las pruebas obtenidas las bacterias no resultaron fitopatógenas.

Palabras claves: Patógeno, inoculación, microorganismos, *Juniperus monosperma*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Roselinea*.

I. INTRODUCCIÓN

El segundo género más diverso de coníferas en el mundo, después de *Pinus* que tiene alrededor de cien especies, es *Juniperus* con sus sesenta y siete especies y veintiocho variedades distribuidas por todo el mundo (Fonseca, 2006).

En México existen 12 especies nativas, seis variedades y tres formas del género *Juniperus*, las cuales varían en su aspecto, siendo casi rastreras hasta árboles de 20 metros o más en altura. El diámetro del tallo es de unos cuantos centímetros hasta más de un metro (Martínez, 1963).

Johnson (2002) menciona que el *Juniperus monosperma*, conocido como el cedro de una semilla o “One-seed juniper”, es común en praderas y zonas de pino-junipero a través de Nuevo México y al Sureste y Centro Norte de Arizona, al Sur de Colorado, al Oeste de Texas y Oeste de Oklahoma.

Al igual que otros árboles forestales y plantas cultivadas, el *Juniperus monosperma* puede ser afectado por factores bióticos y abióticos.

Las bacterias al igual que los hongos, tienen la capacidad de elaborar y liberar compuestos de tipo secundario. En el caso particular de bacterias fitopatógenas, cuyo metabolismo y capacidad de producción ha sido apenas investigada, se tienen reportes de la producción de sustancias denominadas factores de virulencia y de invasión como las fitotoxinas, fitohormonas, exopolisacáridos y sideróforos, productos del metabolismo secundario que en ocasiones son nocivas para las plantas y activas a muy bajas concentraciones. Entre los mecanismos de acción conocidos hasta el momento está, la alteración de la permeabilidad celular y la inactivación o inhibición de enzimas que inducen una deficiencia en el crecimiento de las plantas (Brackett, 1999).

Sphaeropsis sp. causaban muerte regresiva en árboles, cáncer en el tronco, ramas y raíces. (Cedeño *et al.*, 2001).

INIFAP (2006) En Campo Experimental Saltillo, y la CONAFOR en los últimos años, realizaron estudios para hacer un diagnóstico fitosanitario en bosques de coníferas en el estado

de Coahuila. Como resultado de estos estudios se detectaron cerca de 25,000 has. de bosques afectados por diferentes problemas fitosanitarios, dentro de los cuales destacaron los muérdagos de los géneros *Arceuthobium* y *Phoradendron*. Estas plantas parásitas causan un daño ecológico irreversible que puede provocar un conflicto e inestabilidad social, por lo que se debe asegurar la continuidad de este complejo ecosistema que representa un factor de gran importancia para todos los habitantes del área circunvecina como fuente de recreación ecoturística. En dichos estudios, se reportan afectaciones por muérdago en más de 7,000 ha de bosques de Coahuila. Se detectó también que las principales especies de hospederos y plantas parásitas fueron *Pinus rudis* infestado por *Arceuthobium vajinatum*, *Abies vejarii* por *A. abietis-religiosae*, *Pseudotsuga flahaulti* infestado por *A. douglasii*, *Cupressus arizonica* y *Juniperus monosperma* atacado por *Phoradendron boleanum*.

Zavaleta (2008), en su tesis encontró para la Sierra de Arteaga una incidencia de 40% a 100% de *Phoradendron* spp. En *Quercus*, *Cupressus* y *Juniperus* con un gradiente de dispersión de 0.8598.

Por ello, es necesario el establecimiento de reglas su correcto manejo, considerando las diferentes facetas de su papel ambiental: la conservación de los recursos edáficos, hidrológicos y de la biodiversidad, la producción de madera y otros productos y, que las prácticas de manejo se deriven de consideraciones para básicas de los fundamentos ecológicos, de las técnicas dasonómicas y de una correcta orientación de la economía (Beltrán, 1964; Mallén, 2005).

1.1 OBJETIVO

Identificar al agente causal del tizón del *Juniperus monosperma* en la región de los Lirios, Municipio de Arteaga, Coahuila.

1.2 HIPÓTESIS

Se espera encontrar *Sphaeropsis* y el hongo *Lirula macrospora* asociados al tizón en el cedro.

1.3 JUSTIFICACIÓN

Existen muchas enfermedades infecciosas causadas por agentes patógenos bióticos y abióticos, que se desarrollan a lo largo del tiempo por la intervención de estos agentes patógenos con un ambiente favorable y plantas hospedadoras susceptibles 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.

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia social y económica de *Juniperus monosperma*

El género *Juniperus monosperma* tiene un papel importante desde el punto de vista ecológico, porque es un género que presenta resistencia al clima y a la degradación, coloniza en lugares casi solitarios y es hábitat de fauna de zona con altitudes extremas (Gómez, 1995). Asimismo, su amplia distribución se debe a que sus semillas carnosas son transportadas por las aves. (García *et al.*, 2004), y en el ámbito industrial, específicamente en la industria cosmética, se utiliza en algunos países como Estados Unidos, Canadá, Francia, Inglaterra y China. También se usa en las industrias farmacéutica, Mueblera y artesanal; en el medio rural, para postes o leña (Anderson y Crelling, 1995 y Rodríguez y Huerta, 1995). No obstante, la diversidad de funciones y el alto potencial de aprovechamiento de los recursos forestales, en México su sobreexplotación se observa como una enorme pérdida de la cubierta forestal (entre 75 mil y 1.98 millones de hectáreas anuales) y con ello la degradación del ambiente (SEMARNAT, 2002).

2.2 Descripción morfológica de la especie según (Sergio *et al.* 1994).

2.2.1 Árbol o arbusto

El árbol puede medir de 10 a 18 m de alto, tronco ramificado cerca de la base, de 35 a 75 cm de diámetro.

2.2.2 Corteza

Fibrosa dividida en tiras o placas longitudinales, de color gris-ceniciento, copa abierta e irregular, últimas ramillas numerosas y apretadas, que forman un follaje áspero, algo denso, de color verde, levemente amarillento.

2.2.3 Hojas

Opuestas alternadas, predominando las ternadas, desiguales, ovadas a anchamente ovadas, no imbricadas, de 1 a 2 mm de largo por 0.7 mm de ancho, ápice obtuso, cortamente acuminado, a veces extendido, con una glándula oval pequeña debajo de la parte media, las de los ejes son oval-lanceoladas, acuminadas o agudas, de 2 a 3 mm de largo; cono masculino formado por 8 a 12 escamas ovadas, cortamente acuminadas.

2.2.4 Cono femenino

Ovoide o subgloboso, de 4 a 6(8) mm de diámetro, moreno-violáceo o algo rojizo, con tinte blanco-azuloso; semillas 1 a 2(3), ovoides, ligeramente comprimidas, a veces con un ligero reborde marginal y con uno a siete canales longitudinales, de 5 a 6 mm de largo por 4 a 5 mm de ancho, de color castaño.

2.3 Distribución

Tirmenstein (1999) comenta que el cedro caimán o “*alligator juniper*” (*Juniperus deppeana*) se hibridiza con el cedro de una sola semilla (*Juniperus monosperma*) desde el centro de México a través del suroeste y Sureste de Colorado. Se distribuye como especie desde el Oeste de Texas hasta el Noroeste de Nuevo México y es más abundante desde la parte central al Norte de Arizona cerca de Flagstaff. También se extiende hacia el Sur avanzando al Norte y centro de México donde se reporta como ampliamente distribuido.

2.4 Usos:

Como ornamental urbano.

Muy resistente a los suelos calizos, los frutos y el follaje son comidos por la fauna silvestre. A los *Juniperus* se les considera en general dentro de los Estados Unidos como una de las coníferas más atractivas (Guillén, 1975).

2.5 Clasificación Taxonómica

Sargent 1896 menciona la siguiente clasificación taxonómica:

Reino: Plantae

Filo: Traqueofita

Clase: Pinopsida

Orden: Pinales

Familia: Cupressaceae

Género: *Juniperus*

Especie: *Monosperma*.

2.6 Patógenos asociados a *Juniperus monosperma*.

Los hongos son un importante agente infeccioso en las plantas, ya que más del 70% de las principales enfermedades de los cultivos son causadas por hongos (Agrios, 2005; Larrañagal *et al.*, 2012)

2.7 *Alternaria sp.*

Muchas especies son saprotrofos, patógenos de plantas o patógenos de cultivos. Las especies de hongos patógenos del género *Alternaria* causan enfermedades de Varias plantas de cultivo y están presentes en todos los continentes. (Chase, 2005; Perello y Sisterna, 2006). Ellos también Infectan plantas ornamentales y árboles frutales y arbustos. (Windham, 2008; Kakalikova *et al.*, 2009; Pegg *et al.*, 2014, Andersen *et al.*, 2015).

Kurzawińska *et al.*, (2015). han indicado que *Alternaria sp.* puede infectar las hojas, los tallos, las flores, los frutos y las raíces de plantas ornamentales.

Según Nadziakiewicz *et al.*, (2018). *Alternaria alternata*: el principal agente causal de los síntomas de la enfermedad en enebro, rosa, tejo y arándano azul.

2.7.1 Características del género *Alternaria* Nees ex Fr

El género *Alternaria* fue descrito por primera vez en 1817 por Nees. Es un hongo perteneciente al grupo de los *Hyphomycetes* dematiáceos, cuyos conidios pigmentados y septados de modo muriforme se desarrollan sobre el ápice de conidióforos característicos.

2.7.2 Clasificación Taxonómica

Según Simmons 2007 la clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Dothideomycetes

Sub clase: Pleosporomycetidae

Orden: Pleosporales

Familia: Pleosporaceae

Género: *Alternaria*

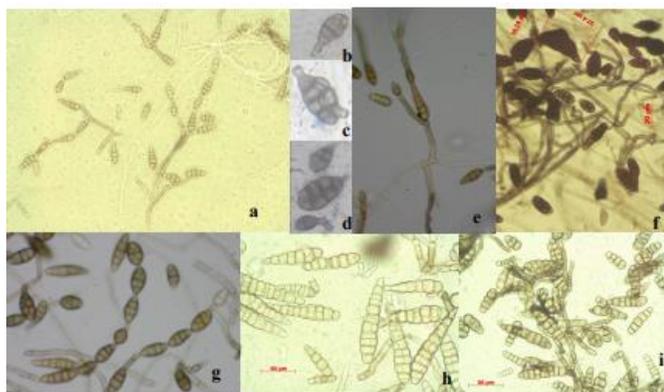


Figura 1: Microfotografía de los conidios de *Alternaria*. (Magnificación 400x). a, *A. infectoria*, b, c, d: *A. alternata*, f: *A. triticina*, g: *A. tenuissima*, h: *A. brassicae*, i: *A. brassicicola*. Fuente: Simmons 2007.

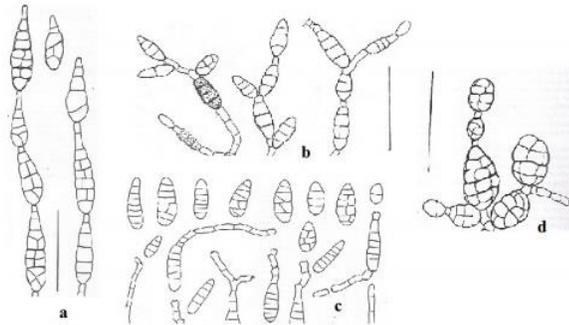


Figura 2: Esquema de los conidios de los grupos de especies de *Alternaria*:

a) *A. tenuissima*, b) *A. arborescens*, c) *A. infectoria* y d) *A. alternata* (Barras: 50 μ m).

Fuente: Simmons 2007.

2.7.3 Síntomas:

Puntos marrones pequeños al inicio que desarrollan halos amarillos. Las lesiones se expanden en formas circulares o irregulares que pueden cubrir gran parte de las hojas. Las hojas muy afectadas se caen (Reséndiz *et al.*, 2018).

2.8 *Aspergillus*

En semillas se encuentran ocho géneros de hongos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Memnoniella*, *Rhizophus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Trichoderma* y *Monilia* [Mittal *et al.*, 1990, Mathur, 1984].

Duarte *et al.* (1986) han hecho referencia a la germinación errática que poseen las semillas de esta especie que, según Samek (1970), es aproximadamente de un 40%, y que puede estar determinada por la incidencia de hongos sobre ellas.

2.8.1 Características del género *Aspergillus*

Aspergillus es un hongo filamentoso, hialino, saprofito, perteneciente al filo Ascomycota. Se encuentra formado por hifas hialinas septadas y pueden tener reproducción sexual (con formaciones de ascosporas en el interior de ascas) y asexual (Con formaciones de conidios). Las diferentes especies se diferencian en tamaño, tasa de crecimiento, textura (aterciopelada, granular, algodosa) y color de la colonia:

Verde- amarillento (*A. flavus*), (*A. niger*), marrón (*A. terreus*). La coloración aparece casi siempre en todas las estructuras aéreas, tanto en el micelio como en las cabezas conidiales. *Aspergillus* es uno de los principales hongos productores de micotoxinas. Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos y secretados por el hongo durante el proceso de degradación de la materia orgánica, como mecanismo de defensa frente a otros microorganismos (INSHT, 2012).

2.8.2 Clasificación taxonómica de *Aspergillus* según Alexopoulos y Mims, (1979).

Reino: *Fungi*

División: Amastigomycota

Clase. Eutoromycetes

Subclase: Hiphomycetidae

Orden: Moniliales

Familia: Moniliacea

Género: *Aspergillus*

2.9 *Rosellinia* sp.

2.9.1 Características

Rosellinia sp. es un parásito facultativo con un amplio rango de hospedantes (García *et al.*, 2005). Se ha reportado su daño en alrededor de 170 especies en 63 géneros y 30 familias (Khan, 1959). Ataca a un gran número de especies leñosas y semileñosas, aunque se ha encontrado en bulbos y rizomas (Pérez-Jiménez, 2006), pero principalmente árboles frutales, forestales y plantas ornamentales (Fresa, 1975; Streets, 1979).

2.9.2 Síntomas

La enfermedad se presenta en manchones, sobre todo en zonas del terreno con exceso de humedad. En el suelo se pueden observar las raíces invadidas por micelio blanco algodonoso que se torna negro conforme envejece (Fresa, 1975; Simons, 1997). En la parte aérea, las plantas presentan follaje escaso, además de muerte de ramas; las hojas muertas pueden permanecer adheridas a las ramas durante mucho tiempo (Romero-Cova, 1993).

2.9.2.1 Síntomas registrados en plantas de rosal

La enfermedad se presenta en manchones y avanza en línea recta en las camas de cultivo. Inicialmente, la planta comienza a mostrar marchitez y la muerte se presenta en poco tiempo. En otros casos, conforme avanza la enfermedad las plantas presentan follaje pequeño y escaso, el cual se vuelve clorótico y se marchita hasta llegar a la muerte. Sin embargo, éstas conservan sus hojas por algún tiempo, mostrando un color anaranjado brillante. Es común encontrar plantas con algunos tallos muertos y otros, en apariencia, en buen estado (Figura 1a y 1b).



Figura 3. Síntomas aéreos ocasionado por *Roselia necatrix* en planta de rosa; 1b. Avance de la enfermedad en camas de cultivo. 1c. Cordones miceliales que envuelven a las raíces; 1d. Micelio raquetado proveniente de raíces enfermas (40x); 1e. Desarrollo micelial en condiciones de laboratorio (100x) (García *et al.*, 2005).

2.9.3 Control

El control químico de *Rosellinia necatrix* se basa en tratamientos de esterilización de suelo (Ruano–Rosa *et al.*, 2007; García *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 1992) mediante aplicaciones preventivas de bromuro de metilo (Fresa, 1975), o en aplicaciones de fungicidas en cuanto aparecen los primeros síntomas de la enfermedad (Tamayo, 2007). En México los fungicidas químicos más utilizados para el control de *Rosellinia necatrix* son quintozeno, benomilo, fluazinam y tiofanato metílico (Mendoza, 2002).

Varios autores como Aránzazu (1996), Mendoza *et al.* (2002), Cazorla *et al.* (2006) mencionan que el uso de antagonistas, principalmente de los géneros *Trichoderma sp.* y *Pseudomonas sp.*, es el método más prometedor para el combate de *Rosellinia sp.*

2.9.4 Ciclo de vida

El patógeno se mantiene de una campaña a otra en el suelo y/o en la superficie de los tubérculos en su forma de esclerocios. También se mantiene como micelio en residuos de tejidos de raíces y tallos afectados. Los esclerocios germinan en condiciones favorables de humedad del suelo, luego las hifas invaden la superficie del tubérculo semilla y afectan también a los brotes y tallos de la planta. Posteriormente, el micelio cubre la superficie de las raíces, estolones y tubérculos de las nuevas plantas. Los esclerocios se forman debajo de esta capa miceliana y de esta manera el ciclo se repite (Martínez, 2012).

2.9.5 Clasificación Taxonómica

Clasificación taxonómica de *Rosellinea* de acuerdo a (Martínez, 2012).

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Clase: Ascomycetes

subclase: Sordariomycetidae

Orden: Xylariales

Familia: Xylariaceae

Género: *Rosellinia*

2.10 *Xanthomonas campestris* tizón apical bacteriano

2.10.1 Etiología y sintomatología.

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en eucalipto en 1974, donde se identificó a *Xanthomonas campestris* pv. *eucalypti* (Truman) Dye como el agente causal del tizón apical bacteriano afectando a *Corymbia citriodora* (Hook). Los síntomas fueron descritos como muerte de las zonas distales de las ramas, que avanza hacia toda la rama, muriendo las hojas, y provocando la caída de las mismas. En epidemias severas, los árboles quedaban completamente defoliados (Truman 1974).

2.10.2 Síntomas

El inicio de la enfermedad se da en las hojas donde se observan pequeñas manchas, que a menudo se unen para formar lesiones más grandes localizadas principalmente sobre la nervadura principal. Esta necrosis se continúa hacia los pecíolos, provocando la abscisión prematura de las hojas y luego se continúa hasta los tallos. Con el avance de la enfermedad, los árboles quedan con los ápices de crecimiento con apariencia de quemados, dando origen al nombre vulgar de la enfermedad “tizón apical” por su semejanza a la madera quemada.

En algunos casos además puede observarse un levantamiento de la corteza a modo de ampollas, tanto en hojas como en tallos tiernos, que al lisarse exudan un líquido turbio, que corresponde a la zooglea bacteriana (Coutinho *et al.*, 2002).

2.10.3 Ciclo de la enfermedad:

Las bacterias invernan sobre las semillas contaminadas durante la extracción, en los restos de las plantas infectadas que nacen sobre el suelo y en malas hierbas y otras plantas hospedantes. Son diseminados por el viento, la lluvia y por contacto y penetran en las hojas a través de las estomas y heridas y en los frutos a través de estas últimas. (Agrios, 1987).

2.11. *Erwinia psidii*

Se la ha observado principalmente en plantaciones jóvenes de eucaliptos, de 6 a 24 meses de edad (Coutinho *et al.* 2011). Existen algunos estudios epidemiológicos de *E. psidii* en *Psidium guajava* L. (guayaba), que demuestran la capacidad de la bacteria de sobrevivir en restos de vegetales infectados, en el suelo y/o asociada a hospederos secundarios. Esta bacteria puede ingresar a la planta a través de aberturas naturales y/o por heridas causadas por herramientas, viento, o granizo. Durante períodos secos y fríos la incidencia de la enfermedad disminuye, favoreciéndose con alta temperatura y humedad relativa. A su vez, existen evidencias de que los niveles de infección aumentan ante un exceso de fertilización nitrogenada (Junqueira 2000).

2.11.1 Daños

Para el caso de *E. psidii*, se han observado incidencias de casi el 100 % de las plantas en determinados sitios y épocas del año, resultando en la pérdida de la dominancia apical y reducción del crecimiento (Coutinho *et al.* 2011, Arriel *et al.* 2014). Sin embargo, en la mayoría de los casos, la recuperación de los árboles es relativamente rápida, debido al rápido crecimiento y al desarrollo de yemas axilares que prontamente retoman la dominancia apical (Coutinho *et al.* 2011).

2.12 Enfermedades causadas por factores abióticos

Mencionan Gibson y Quinard (1985) que son agentes no vivientes (abióticos) que pueden ser causas primarias en enfermedades de árboles o que actúan de forma predisponentes del ataque de patógenos débiles estos pueden separarse en dos secciones:

2.12.1 Agentes del medio normal

Escasez o exceso de agua: la sobrecarga de agua, en condiciones de sitios pobremente drenados puede dar lugar a la sofocación de las raíces y a la muerte de las raíces absorbentes, los árboles muertos o moribundos por esta causa, se encuentran en manchas, con los árboles recientemente muertos en la periferia, estos manchones no se continúan extendiendo al término del secado del terreno. La falta o carencia del agua, o sequía, puede dar lugar a daños directamente cuando la precipitación pluvial es insuficiente y hay suelos de buen drenaje. Gibson y Quinard (1985).

2.12.2 Agentes del medio anormal

Contaminación industrial

Los humos industriales, los desechos industriales vertidos a los ríos y el amontonamiento y enterramiento de desechos químicos nocivos, pueden dar lugar a daños en los árboles y pueden causar decoloraciones y necrosis foliares. Gibson y Quinard (1985).

Herbicidas

Causan disturbios del crecimiento de los árboles y efectos físicos similares a los síntomas de infecciones por virus. Gibson y Quinard (1985).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del experimento

El trabajo de investigación se llevó a cabo en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en el laboratorio de Parasitología Molecular, ubicado en el departamento de Parasitología. y en el campo experimental de la misma universidad ubicado en los Lirios.

3.2 Descripción del Área de Estudio

El estudio se realizó en las instalaciones del Campo Agrícola Experimental Sierra de Arteaga (Los Lirios), Coahuila., México, perteneciente a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. El Ejido “Los Lirios” Municipio de Arteaga, Coahuila, se encuentra a 42 km de la ciudad de Saltillo, por la carretera 57 (tramo Saltillo-Matehuala), con la ubicación geográfica a las coordenadas geográficas 25° 23' de latitud norte y 100° 37' de longitud oeste.



Figura 4. Árbol y semilla de *J. monosperma*, procedente del Municipio de Artiaga, Coahuila.

3.3 Metodología

El trabajo se realizó en dos etapas:

- Etapa de campo, se llevó a cabo en el mes de febrero de 2018 y noviembre del mismo año
- Etapa de laboratorio, se realizó en los meses de febrero-diciembre de 2018.

3.3.1 Etapa de campo

El trabajo de campo se llevó a cabo en el campo experimental de la UAAAN en la región de los Lirios, Coahuila.

3.3.1.1 Muestreo de enfermedades

Con la finalidad de encontrar al agente causal del tizón en el árbol *Juniperus monosperma* se decidió muestrear los lotes ya establecidos.

3.3.1.2 Selección de árboles para la colecta de muestras

Se realizaron dos muestreos aleatorios dirigidos completamente al azar, para que el muestreo fuese representativo u homogéneo se dividió el área de la investigación en cuatro cuadrantes (norte, sur, este, oeste), para que se cubriera toda el área a investigar.

Se seleccionaron 10 árboles al azar, numerados en orden creciente (1, 2, 3...10), y observando cuidadosamente se evaluaron las siguientes variables: Incidencia, severidad, altura y orientación de cada árbol.

De acuerdo a esto se colectaron las muestras con partes afectadas, ejemplo: corteza, ramas, entre otras y se colocaron en bolsas de plásticos. Se etiquetaron junto con los datos correspondientes, tales como:

no. de árbol muestreado, % de severidad e incidencia, y orientación. De igual manera se tomaron fotos para su documentación. y se llevaron al laboratorio de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, para ser procesadas, utilizando los siguientes métodos para su identificación.

3.3.2 Etapa de laboratorio Para Hongos fitopatógenos.

3.3.2.1 Preparación de Medios de cultivo PDA y Agar Nutritivo

Se pesaron 11.7 gr de Agar Papa Dextrosa (PDA) y 11.5 de Agar bacteriológico para cada uno de los matraces Erlenmeyer de 250 ml y se aforo a 300 ml con agua destilada estéril y se llevó a una autoclave para ser esterilizado a 121° c por 15 min.

3.3.2.2 Vaciados de cajas

Se realizó en una cámara de transferencia para evitar ciertos contaminantes, se dejó 24 horas para que el medio se solidificara.

Siguiendo las metodologías de Morales (1991) Y Gómez-Nava (1970) las muestras o material colectado, se procesó de la siguiente manera.

3.3.2.3 Aislamiento de hongos:

Se tomaron muestras de tejido con partes enfermas y se cortaron en porciones pequeñas de 0.5 cm, luego se sumergieron en hipoclorito de sodio al 3 % durante 2 minutos para desinfectar los; se lavaron con agua destilada estéril para posteriormente escurrir los tejidos en papel filtro y se ubicaron con una pinza esterilizada (pasada por una llama, hasta quedar al rojo vivo) en un medio de cultivo específico para hongos llamado PDA (Papa Dextrosa Agar), se procedió a sellar las cajas Petri con cinta transparente (kleen pack) para evitar contaminación, después fueron llevadas a la incubadora a una temperatura de 25 y 27 ° C , finalmente fueron observados diariamente.

3.3.2.4 Purificación:

La cepa del hongo que se desarrolló, fue realizada en provenientes del aislado de la etapa anterior mediante la técnica de resiembra sucesiva en el medio de cultivo PDA. Las cajas Petri fueron colocadas en incubación a 20°c., durante 5 días.

3.3.2.5 Incremento de Cepas

Al tener las cepas puras de los hongos se hicieron resiembras, con ayuda de un sacabocados estéril se colocó una porción del micelio del hongo en el centro de la caja Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA) dejando a una incubación de 25 a 27 ° C.

3.3.2.6 Identificación de Hongos a nivel género.

Con una aguja de disección se tomó una muestra del patógeno a identificar. Se coloca en un portaobjetos con una gota de lactofenol y se cubre delicadamente con un cubreobjetos, (Figura 5). Se procede a ver en un microscopio compuesto con el objetivo de 10x para localizar la estructura del hongo, después con el objetivo 40x, para una mejor visión. Todo esto se realiza cerca de un mechero de alcohol u gas para evitar contaminaciones.

Los géneros encontrados fueron *Alternaria*, *Rosellinea* y *Aspergillus*.

La identificación de los microorganismos presentes, se llevó a cabo con auxilio de las claves de Barnett y Hunter (1972), Agrios (1988) y Romero (1993).



Figura 5. Aislamiento e identificación de hongos, UAAAN 2019.

3.3.3 Pruebas de patogenicidad

3.3.3.1 Inoculación de Hongos en *Juniperus monosperma*

Los hongos aislados de *Juniperus monosperma* se inocularon en tejidos sanos de esta misma especie para corroborar la patogenicidad de cada microorganismo y se realizó de la siguiente manera:

Como unidades experimentales se utilizaron charolas de plásticos con papel filtro húmedo y tallos de *Juniperus monosperma*. Posteriormente se procedió a preparar la suspensión de esporas de cada muestra (*Alternaria*, *Rosellinea* y *Aspergillus*). Se raspó el crecimiento micelial de la cepa fúngica y se mezcló en frascos atomizadores con 50 ml de agua destilada estéril, ajustando a una concentración de 1×10^6 , las soluciones se compararon por el método de colimetría con la escala de Mac Farland. Por último, se atomizaron las plantas con las soluciones de los patógenos, excepto una que se utilizó como testigo, este se atomizó con agua destilada estéril.

Los tallos de *Juniperus monosperma* inoculados se mantuvieron en una cámara donde pudieran tener horas luz y horas obscuras en el laboratorio de Parasitología, regándolos diariamente. Se compararon las características morfológicas del hongo inoculado, los síntomas que presentaron las plantas evaluando en tejido daño (clorosis, necrosis y pudrición).



Figura 6: Prueba de patogenicidad fúngica, UAAAN 2019.

3.3.4 Etapa de laboratorio para Bacterias fitopatógenas

3.3.4.1 Aislamiento de bacterias.

Después del periodo de incubación, se observó el crecimiento bacteriano obtenido en cada uno de los medios generales y se inició la fase de aislamiento de los crecimientos bacterianos a cajas con medio KB y fueron llevadas a la incubadora a una temperatura de 27° C.

3.3.4.2 Resiembra en medios de cultivo.

Posteriormente se resembró por la técnica de estría cruzada las colonias bacterianas fitopatógenas, la resiembra por estría cruzada se repitió hasta obtener cultivos bacterianos puros, lo que permitió determinar las características de cada especie bacteriana para su identificación.

3.3.4.3 Pruebas bioquímicas generales.

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación. Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varían entre unos segundos hasta unas pocas horas. Otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48h; a este grupo pertenecen la mayoría de las pruebas que detectan componentes metabólicos o aquellas que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras cultivo en medios de identificación que contienen el sustrato a metabolizar (Fernández *et al.*, 2010).

3.3.4.4 Tinción de Gram

Una de las etapas fundamentales para las tinciones simples o compuestas es el frotis, que consiste en extender un cultivo bacteriano sobre un portaobjetos para visualizar estructuras específicas de las bacterias. La tinción de Gram es una tinción compuesta que utiliza 4 reactivos distintos: el cristal violeta cuya función es proporcionar color a las células, el Lugol que forma el complejo cristal violeta-yodo, el alcohol-acetona que es un agente decolorante y la safranina que es un reactivo de contra tinción (Rojas Triviño, 2011). Además, la tinción Gram proporciona colores dependiendo del tipo de pared celular que tenga la bacteria (Arauz Cavallini, 1998). Las

bacterias de tipo Gram positivas reservan el color azul o violeta debido a que su pared celular consta de una gruesa pared celular compuesta en su gran mayoría por peptidoglicano (Salton & Kim, 1996), mientras que las Gram negativas adquieren tonalidades rojas o rosadas debido a que su pared celular posee solo una capa (Ellner, 2000).

Para esta prueba se utilizó un porta objeto limpio y se colocó una gota de agua estéril, luego con un aza estéril se colocó una muestra de la cepa bacteriana y se fijó con calor.

Una vez seco adicionamos la solución de Cristal violeta por 60 segundos, se decantó el colorante y se lavó a agua corriente, agregamos Lugol por 60 segundos, decantamos y lavamos.

Se decoloró con Etanol por 30 segundos, adicionamos Safranina 60 segundos, se lavó nuevamente y se dejó secar al aire, Se adicionó aceite de inmersión, con ayuda del microscopio se observó a 4x, 10x, 40x, 100x.

3.3.4.5 Pruebas de catalasa.

La prueba de la catalasa tiene como principio detectar la presencia de la enzima catalasa. Además, en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que poseen citocromos está presente la catalasa, mientras que los anaerobios obligados carecen de catalasa. En algunas bacterias, la catalasa se sintetiza en respuesta a O₂, H₂O₂ o alguna otra sustancia formada cuando el H₂O₂ está presente, confiriéndole el término de enzima inducible. La catalasa se encarga de descomponer el peróxido de hidrógeno u oxidar sustratos secundarios (MacFaddin, 2003).

Se Colocó una gota de agua oxigenada sobre un portaobjetos, con ayuda de un asa bacteriológica se tomó una pequeña porción de la cepa y se mezcló con el agua oxigenada para detectar la formación de burbujas.

3.3.4.6 Pruebas de la oxidasa.

La prueba de la oxidasa permite identificar a los microorganismos que carecen de la enzima citocromo oxidasa o a los que son anaerobios obligados. El sistema citocromo puede encontrarse en microorganismos aerobios o microaerófilos y anaerobios facultativos. Como un control

positivo se puede tomar *Pseudomonas aeruginosa* y como control negativo a *Escherichia coli* (Koneman, *et al.*, 2008).

Se cortaron trozos de papel filtro y se procedió a esterilizarlos en una autoclave a 121° C por 15 minutos, una vez estéril el papel se colocó sobre un portaobjetos.

Con un asa bacteriológico estéril se tomó una porción de la cepa y se colocó sobre el papel, luego añadimos una gota del reactivo de oxidasa, se dejó reposar la muestra por 10 segundos, se observaron las diferentes reacciones y por último se tomaron los datos correspondientes.

3.3.4.7 Prueba de hidróxido de potasio al 3% (KOH).

Otra forma de evaluar la reacción Gram puede ser mediante la adición de KOH al 3% a una solución que esté concentrada de bacterias, debido a que este reactivo libera ácido desoxirribonucleico al destruir las paredes celulares (Meurant, 1987); de manera que, si la solución se torna viscosa, indicando que las bacterias presentes en la solución son Gram negativas. En su gran mayoría las bacterias gramnegativas son especies fitopatógenas (Arauz Cavallini, 1998).

Colocamos sobre una laminilla una gota de KOH al 3 %, después con el asa estéril se tomó muestra de la colonia bacteriana, se mezcla con la gota de KOH durante 5 segundos y se levantó lentamente el asa.

Interpretación: Si al separar el asa de la mezcla se forma una hebra o hilo, la prueba es positiva e indica que se trata de bacterias Gram negativas. Si al separar el asa no se forma hebra, la prueba es negativa, e indica que las bacterias son Gram positivas.

3.3.4.8 Prueba del O/F (Oxidación - Fermentación) de Hugh-Leifson.

Esta prueba indica el tipo de metabolismo energético: respiratorio (O) o fermentador (F). Se suele utilizar glucosa como sustrato. Se detecta la acumulación de ácidos con un indicador ácido-base (azul de bromotimol). La bacteria se inocula con el hilo recto (por picadura) y se incuba en condiciones de aerobiosis (sin parafina) y de anaerobiosis (con parafina, tubo cerrado), simultáneamente.

Se pesaron 0.5 gr. de peptona, 0.075 gr de K₂HPO₄, 1.25 gr. De NaCl, 0.75 de Agar, se vaciaron en un matraz de Erlenmeyer de 500 ml, con una probeta de 1000 ml se aforo a 250 de agua y se

agitó. Finalmente se agregó 0.0003 gr. De bromitimo1, posteriormente se llevó a esterilizar a un autoclave a 121° C por 15 minutos. Una vez que se quedó a temperatura ambiente se agregó de Glucosa y se dejó por 24 hrs.

Tomando 10 ml del medio de cultivo ya preparado se vaciaron a los tubos de ensaye con ayuda de una pipeta, tomamos una porción de la muestra pura con un asa estéril e inoculamos por picaduras cada tubo, a dos de ellos le agregamos 5ml de aceite mineral dejando un tubo como testigo para comparar y observar los posibles cambios.

Para detectar la producción de indol se utiliza el medio Caldo triptófano y la lectura de la prueba se realiza con el reactivo de Kovacs (alcohol isoamilo, *p*-dimetilaminobenzaldehído y ácido clorhídrico concentrado) con el que el indol producido reacciona generando una coloración rosa intensa.

3.3.4.9 Producción de Inodol

En esta prueba se pesaron 10 gr de bacto de triptona y 2.5 de cloruro de sodio (NaCl) y se mezclaron en un matraz Erlenmeyer de 500 ml con 250 ml de agua destilada agitándolo muy bien y se vaciaron en 6 tubos de ensaye, se esterilizo en un autoclave por 15 minutos.

Para el reactivo Kovac se disolvió el para-dimetil-amino-benzaldehído en 2.5 gr de alcohol butílico o amílico, añadimos 7.5 gr de ácido clorhídrico en un matraz con 150 ml de agua mezclándolo muy bien, se conservó en refrigeración en el mismo matraz colocándole un tapón de aluminio por 24 hrs.

Una vez que estuvieran los tubos con el medio estéril se hizo la inoculación con ayuda de un asa y se inoculo a 37° C por 48 hrs. Tras la incubación se agregó 0.3 del reactivo KOVAC agitándolo cuidadosamente para ver la aparición de la coloración del anillo rosa.

3.3.4.10 Medio CVP

En el vaso de la licuadora se agregó 500 ml de agua destilada caliente junto con los siguientes reactivos, 2.25 gr de hidróxido de sodio (NaOH) y de solución acuosa al 1 %, 0.5 ml de cristal violeta, 1 gr de agar 0.5 gr de nitrato de sodio.

Se licuó por 15 segundos, vaciamos en un matraz de 500 ml, tapamos con papel aluminio, esterilizamos por 15 minutos, dejamos que se enfriara a temperatura ambiente, una vez frío el medio vaciamos en cajas de Petri.

Transcurridas 24 horas con un asa estéril tomamos parte de la muestra bacteriana pura y sembramos en forma de estrías y por puntos, sellamos las cajas para que no se contaminaran con cinta kontak, por último, se incubaron por 48 horas a una temperatura de 28° C y se tomaron los datos correspondientes.

3.3.4.11 Crecimiento 36 °C

En una caja con medio de Agar nutritivo se inoculo el crecimiento bacteriano puro de prueba, se incuba a 37 °C durante 48 horas y se observó el crecimiento de la bacteria.

3.3.4.12 Tolerancia al cloruro de sodio

En un matraz Erlenmeyer de 500 ml vaciamos 0.8 de caldo nutritivo, 0.5 de NaCl, 0.1 gr de Glucosa y le agregamos 100 ml de agua destilada agitando cuidadosamente hasta disolverse por completo, con una pipeta tomamos 10 ml de la solución ya preparada y vaciamos en 5 tubos de ensaye y se esterilizaron por 15 minutos a 121° C.

24 horas después se realizó la inoculación, con un asa estéril se toma una asada de la muestra y se inocula en una cámara de transferencia y se incubo por 48 hrs.

3.3.4.13 Pectolisis de la papa

Cortamos papel estraza en forma de círculo del tamaño de las cajas de vidrio, las colocamos dentro y se esterilizaron en autoclave por 15 minutos a 121 ° C.

Lavamos una papa sana con agua y jabón, posteriormente la sumergimos en cloro al 2 % por 3 minutos y enjuagamos con agua estéril.

Cortamos la papa en rodajas, las colocamos dentro de las cajas y en el corte se hizo una pequeña herida para inocular una porción de la muestra bacteriana pura, se llevó a la incubadora a 28° para observar la presencia de la bacteria.

3.3.4.14 Prueba de la Arginina

Se pesaron los siguientes reactivos:

0.5 de cloruro de sodio, 0.1 gr de peptona, 0.0003 de Fosfato de Potasio, 0.3 de Agar, 0.00003 de rojo de fenol, 1 gr de Hidrocloruro de arginina y se vaciaron en un matraz en 100 ml de agua destilada agitando suavemente hasta mezclarse bien, con ayuda de una pipeta se tomaron 10 ml de medio y se fue llenando los diez tubos de ensaye llevándolos a esterilizar por 15 minutos en el autoclave a una temperatura de 120° C.

Transcurrido 24 hrs. se realiza la siembra por picadura inoculando los 4 tubos con el medio bacteriano agregando 1 ml de aceite mineral estéril a cada tubo dejando un tubo como testigo sin inocular, se incuba junto a un tubo testigo estéril durante 24 h (en ocasiones 2-7 días).

3.3.4.15 Medios de Y.D.C.A

En la balanza analítica se pesaron los siguientes reactivos:

4 gr de Extracto de levadura, 2.5 de Dextrosa, 7.5 gr de Agar, 1.25 gr de Carbonato de calcio, 1.25 gr de Peptona, 3.75 de Agar bacteriológico, se vaciaron en un matraz Erlenmeyer de 500 ml con 250 ml de agua destilada y se esterilizaron en el autoclave por 15 minutos a 121° C. El medio esterilizado se dejó enfriar hasta que pudiera manipularse y se vaciaron en cajas Petri. Pasadas las 24 hrs. Se realizó la siembra, con un asa estéril se tomó una asada de la bacteria y sembramos en forma de estrías, sellamos las cajas con cinta Contac y se incubaron por 48 hrs

3.3.4.16 Pruebas de patogenicidad en Bacterias.

Después de llevar a cabo las pruebas bioquímicas generales, se realizaron pruebas de patogenicidad y los resultados obtenidos fueron analizados para determinar si existía o no presencia de bacterias fitopatógenas y los posibles géneros presentes.

Este tipo de pruebas se realizaron para determinar en un tiempo breve la patogenicidad de cada aislamiento bacteriano, lo que nos permitió, en algunos casos, conocer la especie de bacteria involucrada, mediante la prueba de pudrición de papa y pudrición de zanahoria.

La prueba consistió en utilizar cultivos bacterianos puros de 24 horas de crecimiento con los que se hicieron suspensiones bacterianas tomando como referencia el estándar N° 1 de la escala propuesta por Mc Farland (1.2×10^6 UFC/ml). Las plantas fueron infiltradas con 3 ml de la suspensión en la nervadura central de la lámina foliar de la hoja, con ayuda de una jeringa esterilizada, la planta inoculada fue la maravilla (*Mirabilis jalapa L.*). Las plantas inoculadas se mantuvieron a temperatura ambiente.

Durante los días transcurridos después de la inoculación se observó si existía alguna reacción de hipersensibilidad expresada en forma de necrosis o marchitamiento, en tal caso la bacteria

3.3.4 Identificación Molecular

Para corroborar la identificación a nivel especie se mandaron a secuenciar 4 muestras fungicas, las cuales fueron secuenciadas en el laboratorio de IPICYT en San Luis Potosí, con el método de didesoxinucleótidos marcados en el análisis molecular corroboró la identificación según secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Las muestras fueron secuenciadas con el método de didesoxinucleótidos marcados en el secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Las secuencias fueron leídas con el programa Blastn(Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos GenBanck (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=ProTeins>).

Las especies encontradas fueron *Aspergillus niger* y *Alternaria sp.*

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La identificación de muestras se hizo con tejidos vegetales y con la ayuda del Ing. Braham del Dpto. de forestal de la UAAAN.



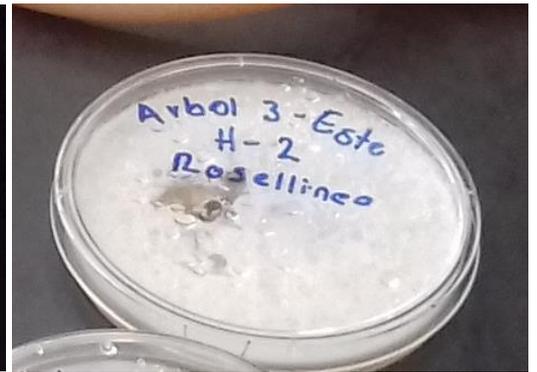
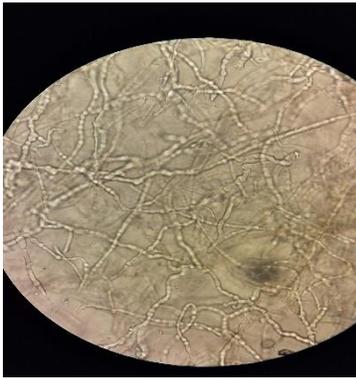
Figura 7. Árbol y semilla de *J. monosperma*, procedente del Municipio de Artiaga, Coahuila.

4.1 Aislamiento e identificación microorganismos:

De acuerdo a la identificación fúngica se detectaron 3 colonias de diferentes colores, en las colonias amarillas se observaron características de *Aspergillus* y *Rosellinea* (figura A y figura B), por último, en la colonia blanca se encontró características de *Alternaria* (figuras C).



B



C

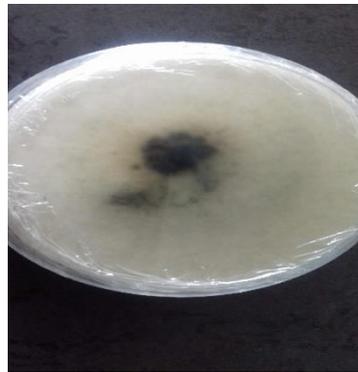
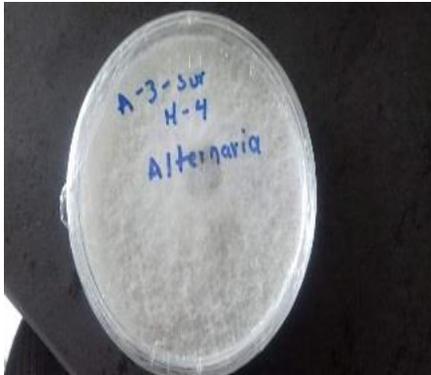


Figura 8: Hongos aislados en el departamento de parasitología.

A) *Aspergillus*, B) *Rosellinea*, C) *Alternaria*

4.2 Incidencia de los patógenos sobre *Juniperus monosperma*

Durante el estudio de investigación, se identificaron 3 géneros de hongos asociados a *Juniperus monosperma* que son *Aspergillus*, *Alternaria* y *Rosellinea*.

En el cuadro 1, se observan los comportamientos que presentaron los patógenos, “*Alternaria*” se comportó de manera más constante en comparación a la muerte en *Juniperus monosperma*, se observa que en el cuadrante 3 se manifestó mayor daño en cuanto a incidencia y severidad por los patógenos *Alternaria* y *Aspergillus* mientras que el cuadrante 7 hubo menor daño encontrando nuevamente *Alternaria*. En el cuadrante 4 se identificó daños por los géneros *Alternaria* y *Rosellinea*.

Cuadro 1. Géneros fitopatógenos encontrados en las muestras de *Juniperus monosperma*.

Incidencia				Severidad				Géneros fitopatógenos encontrados
No. de árbol	Orientación	Altura de c/árbol(m).	Presencia de síntomas	Escala de daño (%) por ramas en cada orientación.				
				Norte	Sur	Este	Oeste	
1	SE	1.80	5%	10%	0%	25%	100%	<i>Aspergillus</i> <i>Alternaria</i>
2	SE	2.10	1%	15%	20%	10%	20%	<i>Alternaria</i>
3	SE	1.40	35%	100%	100%	10%	5%	<i>Alternaria</i> <i>Aspergillus</i>
4	SE	1.80	20%	0%	1%	5%	40%	<i>Rosellinea</i> <i>Alternaria</i>
5	SE	2	15%	5%	10%	20%	50%	<i>Alternaria</i>
6	N	5	30%	30%	5%	1%	1%	<i>Alternaria</i>
7	N	2	5%	5%	20%	5%	10%	<i>Alternaria</i>
8	N	6	10%	10%	15%	5%	20%	<i>Alternaria</i>
9	N	5	10%	5%	50%	5%	5%	<i>Alternaria</i>
10	O	8	15%	0%	10%	100%	5%	<i>Alternaria</i>

4.3 Incidencia de Patógenos asociados a *Juniperus monosperma*.

Considerando los resultados del cuadro 1, en la figura 9 se observa la escala de incidencia presente en cada árbol, los árboles con mayor incidencia fueron el 3 con un 35% y el 6 con un 30 % de área foliar dañada. Mientras que el árbol 1 y el árbol 2 solo presentaron 1% y 5% de síntomas.

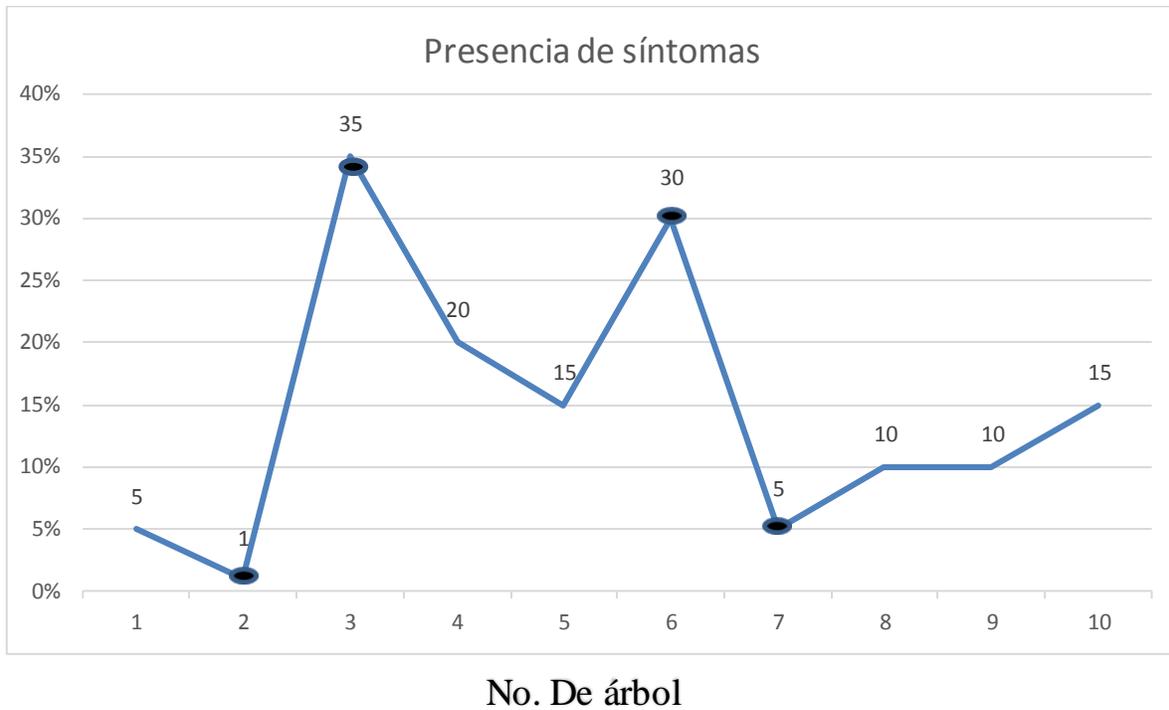


Figura 9. Incidencia de patógenos en *Juniperus monosperma*, UAAAN 2019.

4.3 Porcentaje de Severidad de Patógenos asociados a *Juniperus monosperma*.

De acuerdo a los resultados reflejados en la gráfica los resultados de severidad van de 10% a 100%, el hongo con mayor severidad en *Juniperus monosperma* fue los géneros *Alternaria* con un 100 %, el patógeno que menos se presentó fue *Rosellinea* con un 10 % y 20 % para *Aspergillus* (Figura 10).

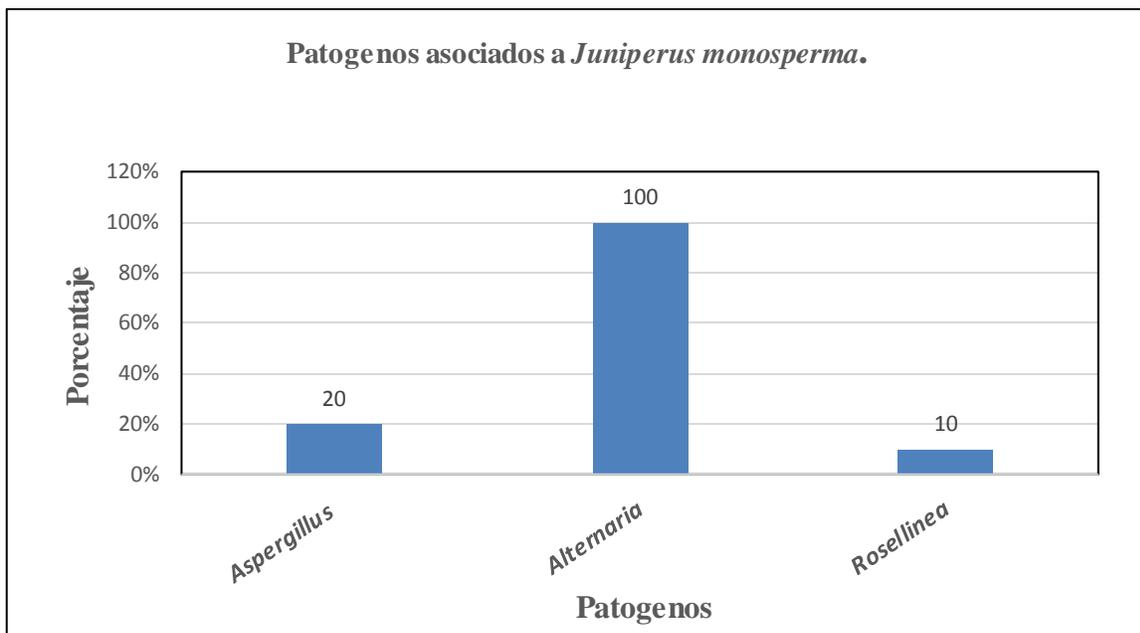


Figura 10. Severidad de patógenos en *Juniperus monosperma*, UAAAN 2019.

4.4 Pruebas Bioquímicas de confirmación.

De las muestras colectadas de *Juniperus monosperma* se aisló un crecimiento bacteriano, obteniendo un total de 2 cepas puras fitopatógenas, con las cuales se realizaron pruebas bioquímicas específicas, también llamadas pruebas de confirmación (Cuadro 2), con el objetivo de lograr mediante sus propiedades fisiológicas y bioquímicas la identificación precisa de la especie a la cual pertenecían (Schaad, *et al.*, 2001).

Cuadro 2: Resultados de las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de las cepas bacteriana aislada de *Juniperus monosperma*, UAAAN 2019.

Pruebas bioquímicas	Reacción
Gram	Positivo
Catalasa	Positivo
Oxidasa	Negativo
Reconfirmación de Gram con KOH al 3%	Negativo
Crecimiento a 36°	Negativo
Arginina	Positivo
Medio de CVP	Negativo
Tolerancia al cloruro de sodio	Negativo
Producción de inodol	Negativo
Pectolisis de la papa	Negativo
Crecimiento en O-F (Hugh-Leifson)	Negativo

De acuerdo a los resultados de la tinción gram se puede observar que el resultado fue positivo ya que las paredes de la bacteria se tiñen de color azul o morado, (Ellner, 2000).

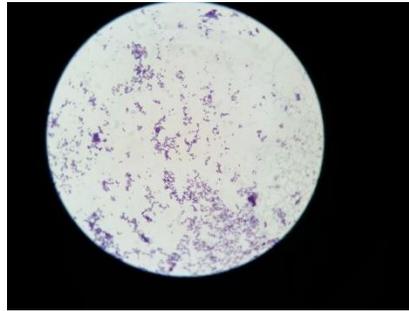


Figura 11: Bacilos Gram- positivos.

En la figura 11 se observa que en la prueba de catalasa el resultado fue positivo esto se debe que la bacteria tiene la capacidad del peróxido de hidrogeno en el agua y oxigeno que es liberada en forma de burbujas, en cuanto a la prueba de oxidasa el resultado fue negativo ya que hubo carencia de color en el disco.

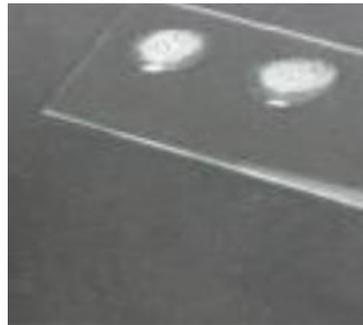


Figura 12: Reacción negativa para la prueba de oxidasa y positiva para catalasa, UAAAN 2019.

4.5 Pruebas de patogenicidad

En la planta de la maravilla (*Mirabilis jalapa L.*), se inoculo con 3 ml de la suspensión de la cepa bacteriana en la nervadura central de la lámina foliar de la hoja, la respuesta fue negativa ya que no presentó ninguna sintomatología. De acuerdo a las pruebas realizadas y los datos reflejados del cuadro 2, se determinó que no existen daños por bacterias en *Juniperus monosperma*, se consideró no fitopatógena.

Con respecto a la inoculación fúngica en *Juniperus monosperma* los resultados con las diferentes cepas todos los hongos evaluados presentaron daños en los tejidos, esto debido a que ese tejido era el hospedante ideal para las cepas utilizadas. (Figura 12).

Al inocular los tres patógenos se observó amarillamiento y muerte en el tejido, entre los aislamientos que causaron más daños en los tallos está el género *Roselinea*, mientras que el género que menos incidencia tuvo fue *Aspergillus* y *Alternaria*.

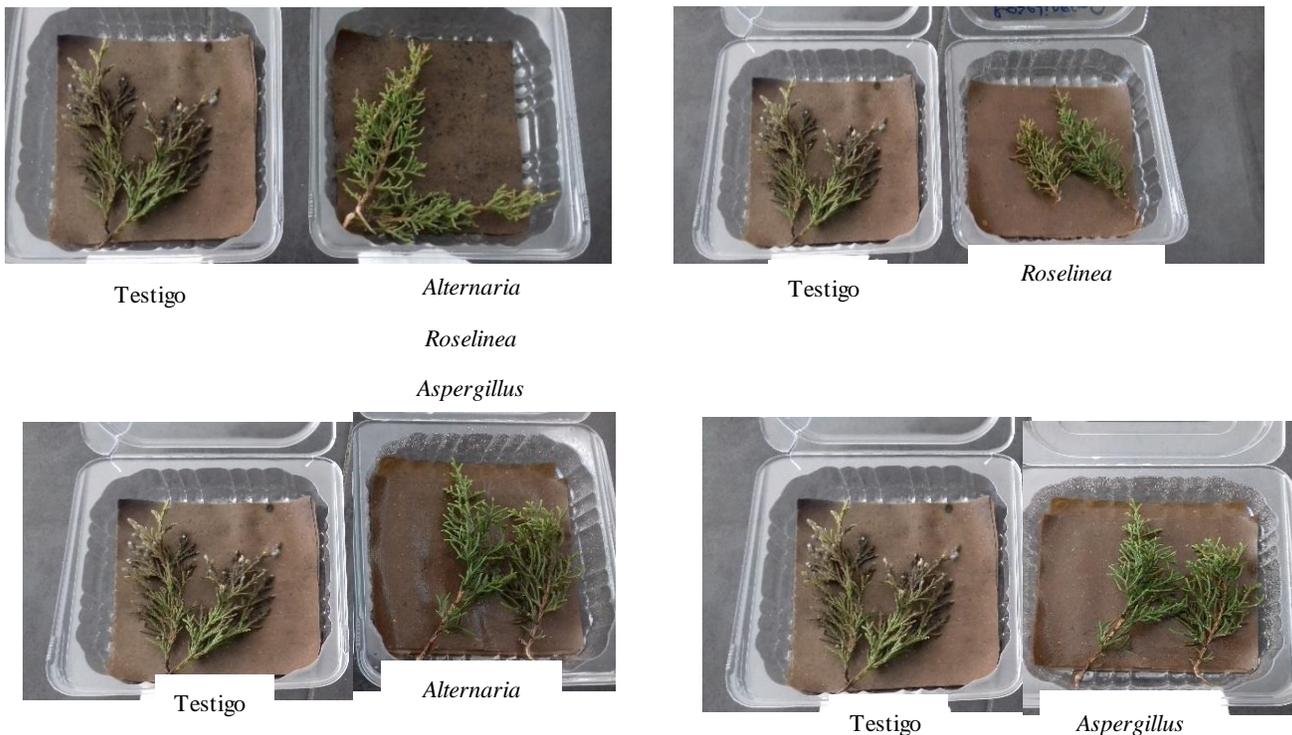


Figura 13: Resultado positivo de las pruebas de patogenicidad en *Juniperus monosperma*, UAAAN 2019.

5. CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que:

Se encontraron 4 especies de hongos asociados a *Juniperus monosperma* que son *Aspergillus niger*, *Alternaria sp* y *Rosellinea sp*.

De acuerdo a la hipótesis los hongos *Lirula macrospora* y *Sphaeropsis sp*. no estuvieron presentes en *Juniperus*.

Según los datos tomados en campo, *Alternaria sp*. fue el hongo que se comportó con mayor incidencia y severidad sobre *Juniperus monosperma* siendo el más perjudicial.

Con base a los resultados obtenidos en el laboratorio se obtuvieron 8 cepas puras de *Alternaria sp*. Presentando también mayor incidencia.

6. LITERATURA CITADA

- Agrios 1987. Fitopatología. 2da edición. Editores Noruega. México, D.F. Págs.: 537-560.
- Agrios G. N. 1998. Fitopatología. 2da. Edición. Uteha. México, D. F. p. 570REEIMPRESIÓN.
- Agrios G.N., 2005. Plant Pathology. Academic Press, New York, USA.
- Alexopoulos, C.J., And Mims, W.C. 1979. Introductory Mycology. 3ed ed. Wiley, New York. P 1- 614.
- Aránzazu, HF. 1996. Comportamiento de la llaga estrellada *Rosellinia* pepo Pat. sobre raíces de cacao (en línea). Fitopatología Colombiana 20(1):7-10. Consultado 28 jul 2013. Disponible en <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=C O1999 002871>.
- Arauz Cavallini, L. F. (1998). Fitopatología: Un enfoque agroecológico (Primera ed.). San José: Editorial de la Universidad de Costa Rica.
- Arriel A, NR Fonseca, LMS Guimarães, PS Hermenegildo, RG Mafía, N Borges Júnior, HP De Souza, AC Alfenas. 2014. Wilt and die-back of Eucalyptus spp. caused by *Erwinia psidii* in Brazil. Forest Pathology 44(4): 255-265. DOI: 10.1111/efp.12087.
- ANDERSON K., B.; CRELLING, J. J. 1995. Amber, resínate and fossil resins. ACS Symposium series 6171, Agosto 21-25, 1994. American Chemical Society, Washington D.C. 297 pp. Información de <http://www.fao.org/do crep/XD453E/ XD453E00.htm> (13/10/2001).
- Andersen B., Nielsen K.F., Pinto V.F., Patriarcha A., 2015. Characterization of *Alternaria strains* from Argentinean blueberry, tomato, walnut and wheat. Int. J. Food Microbiol. 196, 1-10. Aneja J.K., Agarwal A., Agniho.
- Brackett R. E. 1999. Microbiología en frutas, hortalizas y granos. Acribia. Zaragoza, España.

Cazorla, F; Duckett, S; Bergström, E; Noreen, S; Odiijk, R; Lugtenberg, B; Thomas-Oates, J; Bloemberg, G. 2006. Biocontrol of avocado *Dematophora* root rot by antagonistic *Pseudomonas fluorescens* PCL1606 correlates with the production of 2-hexyl 5-propyl resorcinol (en línea). *Plant Disease* 19(4):418–428.

Cedeño, Luis, Carrero, Chrystian, Franco, Wilfredo, Torres Lezama, Armando, *Sphaeropsis sapinea* asociado con quema del cogollo, muerte regresiva y cáncer en troncos, ramas y raíces del pino caribe en Venezuela. *Interciencia* [en línea] 2001, 26 (mayo): [Fecha de consulta: 19 de mayo de 2019] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33905606>> ISSN 0378-1844 .

Cifuentes, D. (1990). *Prácticas de patología vegetal*. Murcia: EDITUM.

Chase A.R., 2005. Advanced treatment of *Alternaria*. *Pests Dis.* 6, 38-44. PERELLA Y SISTERNA 2006.

Coutinho TA, O Preisig, J Mergaert, MC Cnockaert, KH Riedel, J Swings, MJ Wingfield. 2002. Bacterial blight and dieback of *Eucalyptus* species, hybrids, and clones in South Africa. *Plant Disease* 86(1): 20-25. DOI: 10.1094/PDIS.2002.86.1.20.

Coutinho TA, CL Brady, M Van Der Vaart, SN Venter, N Telechea, M Rolfo, C Pérez, MJ Wingfield. 2011. A new shoot and stem disease of *Eucalyptus* species caused by *Erwinia psidii*. *Australasian Plant Pathology* 40(1):55-60. DOI: 10.1007/s13313-010-0013-y.

Ellner, R. (2000). *Microbiología de la leche y de los productos lácteos*. Madrid: Díaz de Santos.

Fernández Olmos Ana, García de la fuente Celia, Saes Nieto Juan Antonio, Valdezate Ramos Silvia. 2010. *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de Microbiología*. Seimic, Mexico. 52p.

- FONSECA, ROSA MARÍA. 2006. *Juníperos*, la ginebra, el incienso, los lápices y los repelentes. *Ciencias* 81, enero-marzo, 44-47.
- FRESA, R. A. 1975. Podredumbre de las raíces de los frutales, pp. 237–342. *In: Fitopatología. Curso Moderno. Tomo II. Micosis.* SARASOLA, A. A.; ROCCA DE SARASOLA, A. M. (eds.). Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina.
- GARCÍA, C. J.; GEORGE, A.; ARGYLE, T.; HOOPEN, M.; KRAUSS, U. 2005. ¿Existe la tolerancia genética del cacao (*Theobroma cacao*) a *Rosellinia bunodes* y *Rosellinia pepo*? *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* 75: 21–31.
- GARCIA, MENODOZA. A; ORDOÑEZ, M. de J.; DIAZ; BRIONES SALAS, M. 2004. Biodiversidad de Oaxaca. Universidad Autónoma de México, Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza, Oaxaca, World Wildlife Fund. 605 pp.
- Gibson S., I. A. y R. Quinard S. 1985. Notas sobre enfermedades forestales y su manejo. INIFAP. México. 196 p.
- Godoy A.; Yáñez, J. M.G.; Gastelum, L. R. y Sánchez, P. J. 1991. Control, químico de la mancha bacteriana *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) bajo condiciones de invernadero. XVIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Puebla de los Ángeles. Pág. 37.
- GÓMEZ DE AIZPÚRUA, C. 1995. Fauna lepidopterológica de los principales árboles del género *Juniperus*, representados por las especies *communis* L., *sp. nana* (WILLD.), *oxycedrus* L., *thurifera* L., y *sabina* L., de la familia *Cupresaceae* Bol. Sanidad Vegetal. *Plagas*, 21: 527-538 pp.
- Gómez-Nava, M. S. 1970. Microorganismos asociados con “Damping-off” en plántulas de *Dioscorea compositae* Hemsl. INIF. México. Boletín técnico # 36. Pp.6-7

- Guillen R., A. 1975. Coníferas ornamentales Floraprint, España, 143 p.
- Hansen, E. y K. Lewis. 1997. "Compendium of conifer diseases". Ed. APS. 92 pp.
- INIFAP. 2006. Los Muérdagos (*Loranthaceae*) en Michoacán. Libro Técnico Núm. 2. División Forestal. Uruapan Michoacán.
- INSHT, 2012. Instituto de seguridad e higiene en el trabajo, fichas de agentes biológicos, *Aspergillus*, p. 1.
- Johnson, K. A. 2002. *Juniperus monosperma*. In: Fire Effects Information System, [Online]. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fire Sciences Laboratory (Producer). Available: <http://www.fs.fed.us/database/feis/> [2004, April 9].
- Junqueira NTV. 2000. Doenças e Pragas. In Manica I eds. Fruticultura Tropical 6 Goiaba. Porto Alegre, Brasil. Cinco Continentes. p. 225-270.
- Kakalíková L., Janura E., Šrobárová A., 2009. First report of *Alternaria* bunch rot of grapevines in Slovakia. Australas. Plant Dis. Notes 4, 68-69.
- KHAN, A. H. 1959. Biology and pathogenicity of *Rosellinia necatrix* (Hart.) Berl. Biología Lahore 5: 199-245.
- Koneman, E., et al. (2008). Koneman diagnóstico microbiológico (Sexta ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Kurzawińska H., Mazur S., Nadziakiewicz M., Nawrocki J., 2015. Redroot pigweed as a host for *Alternaria alternata* – the causal agent of *Alternaria* leaf blight.

- Larrañaga P., Díaz-Dellavalle P., Cabrera A., Alem D., Leoni C., Luis A., Souza A., GiovanniDe-Simone S., Dalla-Rizza M., 2012. Activity of naturally derived antimicrobial peptides against filamentous fungi relevant for agriculture. *Sustain. Agr. Res.* 1(2), 211-221.
- López F. 1996. Los caminos de la fitobacteriología. Universidad autónoma de Chapingo. Texcoco, México. Pp. 216.
- MacFaddin. (2003). Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica (Tercera ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Mallén, R. C. 2005. Hacia un moderno manejo forestal. *Teorema Ambiental*. Año 11, abril-mayo, Número 51: 28-38.
- Martínez, M. 1963. Las Pináceas mexicanas. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 400 p.
- Martínez, J. 2012. *Hongo Rosellinia*.
- MENDOZA, Z. C. 2002. Fungicidas en ornamentales, pp. 119-147. *In: Manejo Fitosanitario de Ornamentales*. BAUTISTA, M. N.; ALVARADO, J.; CHAVARÍN, J. C.; SÁNCHEZ, H. (eds.). Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. México.
- Meurant, G. (1987). *Methods in Microbiology*. Orlando: Academic Press.
- Mittal, R. K.; R. L. Anderson; S. B. Mathur: *Microorganisms Associated with Tree Seeds, World Checklist 1990*, Patawawa National Forestry Institute, 1990.
- Morales G., J. L. 1991. Enfermedades en el pino durante la etapa de vivero, en el Campo Experimental Forestal Barranca de Cupatitzio, Michoacán. *Rev. Ciencia Forestal en México*. 16 (70): 69-85.

Nadziakiewicz, Małgorzata & Kurzawińska, Halina & Mazur, Stanisław & Tekielska, Dorota. (2018). *Alternaria alternata* - The main causal agent of disease symptoms in juniper, rose, yew and highbush blueberry in nurseries in southern Poland. *Folia Horticulturae*. 30. 10.2478/fhort-2018-0002.

Oku, H. 1994. *Plant Pathogenesis y Disease control*. Lewis publishers. 193 p.

Pegg K., Duff J., Manners A., 2014. *Alternaria* diseases in production nurseries. Nursery Production Plant Health & Biosecurity Project, Australia, 6 pp.

Perello A.E., Sisterna M.N., 2006. Leaf blight of wheat caused by *Alternaria triticina* in Argentina. *Plant Pathol.* 55, 303.

PÉREZ-JIMÉNEZ, R. M. 2006. A review of the biology and pathogenicity of *Rosellinia necatrix*—cause of white root rot disease of fruit trees and other plants. *Journal of Phytopathology* 154: 257–266.

Reséndiz Martínez, Guzmán Díaz., Muñoz Viveros., Nieto de Pascual Pola, C., & Olvera coronel, L. (2018). Enfermedades foliares del arbolado en el Parque Cultural y Recreativo Tezozómoc, Azcapotzalco, D.F. *Revista Mexicana De Ciencias Forestales*, 6(30), 106-123. <https://doi.org/https://doi.org/10.29298/rmcf.v6i30.211>

Rodríguez A., R.; Huerta C, J. 1995. Usos industriales de la madera de Juníperos. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 4 (1): 27-30 pp.

ROMERO-COVA, S. 1993. *Hongos Fitopatógenos*. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 347 p.

RUANO-ROSA, D.; SCHENA, L.; IPPOLITO, A.; LÓPEZ-HERRERA, C. J. 2007. Comparison of conventional and molecular methods for the detection of *Rosellinia necatrix* in avocado orchards in southern Spain. *Plant Pathology* 56: 251–256.

- Schaad N.W., J. B. Jones and W. Chun. 2001. Laboratory guide for identification. Plant Pathogenic bacteria. 3o edition, pp.373. The American Phytopathological Society Minnesota.
- Score A. J. y Palfreyman J.W. (1994). Biological control of the dry rot fungus *Serpula lacrymans* by *Trichoderma* spp.: The effects of complex and synthetic media on interaction and hyphal extension rates. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 33, 115–128.
- SEMARNAT. 2002. Estudio de tendencias y perspectivas del sector forestal en América Latina al año 2020. Informe Nacional. México. FAO-SEMARNAT.
- Sergio *et al.* 1994. FLORA DEL BAJÍO Y DE REGIONES ADYACENTES.
- Simmons, E.G. 2007. *Alternaria: an identification manual*. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands. 775 pp.
- SIMONS, S. A. 1997. Root and tuber crops, pp. 109–149. *In: Soilborne Diseases of Tropical Crops*. HILLOCKS, R. J.; WALLER, J. M. (eds.). Cab International. New York, USA.
- STREETS, B. R. 1979. *The Diagnosis of plant diseases. A field and laboratory manual emphasizing the most practical methods for rapid identification*. University of Arizona Press. Tucson Arizona. USA. 245 p.
- TAMAYO, M. P. J. 2007. Enfermedades del aguacate. *Revista Politécnica* 4: 51–70.
- Tirmenstein, D. 1999. *Juniperus deppeana*. *In: Fire Effects Information System*, [Online]. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fire Sciences Laboratory (Producer). Available: <http://www.fs.fed.us/database/feis/> [2004, April 10].

- Truman R. 1974. Die-back of *Eucalyptus citriodora* caused by *Xanthomonas eucalypti* sp. Nov. *Phytopathology* 64:143-144.
- Wijnand J. y J. Wingfield. 1991. "Biology and Control of *Sphaeropsis sapinea*. on *Pinus* Species in South Africa". *Plant Disease*: 761-766.
- Windham A.S., 2008. Identification and management of plant diseases in landscapes. Extension Soil Plant and Pest Center, Nashville, USA.
- Xenopoulos, S & Tsopelas, Panagiotis. (2009). *Sphaeropsis* canker, a new disease of cypress in Greece. *Forest Pathology*. 30. 121 - 126. 10.1046/j.143.
- Zavaleta, Y., 2008. Identificación, incidencia y severidad de muérdago en el Cañon de los Lirios de la Sierra de Arteaga, Coahuila. Tesis de Licenciatura. UAAAN. Saltillo, Coahuila.

APÉNDICE

Resultados de secuenciación e Identificación Molecular.

Las regiones amplificadas con los oligonucleótidos ITS1-ITS2 cuyo porcentaje de homología fue 95% según alineamientos en la base de datos del NCBI-BLAST y la caracterización morfológica previa, permitieron identificar a *Alternaria sp.*

GGAACATATGAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTC
ACCCTTGTCTTTTGC GTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTCGCCACC ACTAGGACA
AACATAAACCTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACA ACT
TTCAACAACGGATCTCTTGGTTC TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
AAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC
GCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCT
TTGCTTGGTGTGGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAA
TTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGC ACTCTCTATCAGC
AAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGG
GATACCCGCTGAACTTAAGCATATCACAAAACCGGAAAAAAAAATCGGTACGCAG
ATATCGAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCCTGCTGAATTATTCACCCT
TGTCTTTTGC GTACTTCTGGTTGCCCTGGTGGGTTCGCCACC ACTAGGACAAACA
TAAACGTTTTGTAATTGCGATCAGCGTCAGTAACAAAGTAATAATTACTTTCAA
CAACGGATCTCTGGGTTC TGGCATCGATGAAGAAAGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAAATTGCAGAATCAGTGAATCATAGCATCTGTGAACGCACATGGCGCACG
TTTGGTATTCCAAAGGGCATGC GTTTCGAGCGTCA TTCTTACCCTCCAGCTTTA
GCTTGGTGATTAGGGCGTTC TTGTTCTTCTGCATTTGCTGGAAACTCGACCATGAG
TATTTGGCAGCGGCTACAGACTTTCTGTATGCGAGCAAAC TTGCCAGTTGTCATTT
CACGAGTCTAGCAGCGTTAAGCTTTTGTCACTGTTGACTCGGATCAGGTAGTTACC
GCTAACTTAGCATAGTTTACC GGAGAGAAAAA.

Con un 93% según alineamientos en la base de datos del NCBI- BLAST la especie que se encontró fue *Aspergillus niger*.

TCGATCCGCGGAGGAGGTTTTGGGCGAGCCTCCCATCCGTGTCTATTGTACTG
TTGCTTCGGCGGGCCCGCATCTTGTTCAGCAGGTGGGAAAGGCCACTGCTCGAGAT
CCGAGCCCGTGGGAGACCTGAATTTCAACACTGTCTGACAGGATAGAGGGAGAGT
TAATTGAATGACATCCCGTAATTGTTTCAACAATGGATCTCTTGATTCGGGTGTCC
ACGAGAAAAGCAGGGAAATGAAAGAGCTATTGAA AATTGGATAATTCACTGAAT
TCTGCAATTCTTTTAGTTATTTGTTTCGCTGCTACTTCATCGATGCCGGAACCAAGA
GATCCATTGTTGAAATTTTTAACTGATTGCGTTCGTCAACTCATACTGCTCGCTTT
CAGAAAGTGTTCGTGTTGGGGTCTCCGGCGGGCACGGGACCGGGGGGCAGAGGC
GCCCCCGGCGGCCGACAAGCGGCGGGCCCGCCGAAGCAACAGGGTACAATAG
ACACGGATGGGAGGTTGGGCCCAAAGGACCCGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCA
GGTTCAACTACAAGAATCATTACCGAGTGCGGGTCTTTGGGCCCAACCTCCCATC
CGTGTCTATTGTACCCTGTTGCTTCCGCCGGCCCGCCGCTTGTCGGCCGCCGGGGG
GGCCCCTCTGCCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAACCCACAAAAAATTGTTTG
AAAGCGGGA ACTGAAGTTGATGAATGCAATCCGTAAACTTTTACATGGGATCTT
TTGGTTCCGGCATCCATAAAAAACCCGGGAAATGCGATAACTAGGGGAAATTGC
GAAATTCAGGGATCACAGACTCTTTTAAACCAATTGCTCCCCCTGGTATTCCGGGG
GGCATCCTGTCCAAGCTATATTTCTCCCCACACCGCTCTGTGTGTGTTGTGTCGCT
CCCCCTCTCTCGGCGGGAGGAGAGCGCGATAAGAACACCCCCCCCACCCACCACC
CCCCCGATAGGAGTCGTTGTAGCTCTCATCGTAGTAGAGGCCGGCACGCAGCGAC
CAACCACCTACTTACTCGTCTGCTGCTTCCTC.

Con un 95% según alineamientos en la base de datos del NCBI- BLAST la especie que se encontró fue *Alternaria sp.*

GGCCCCCTCCGTCTGCGCTGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACT
AGGACAAACATAAACCTTTTGTAAATTGC AATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAAT
TACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC
ACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCC
TCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTCTTGTC TCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTA
AAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCAC AAGTCGCACTCTCT
ATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCA
GGTAGGGATACCCGCTGA ACTTAAGCATATCAATAAGCGGAAGAAAATCGGTAC
ACAGTATGAGCGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATCA
CCCTTGACTTTTGCCTACTTCTGGTTTCCCTGGTGGGTTCCCCCACCCTAGGAAA
ACATAAACCTTTTGGGATTGCGATCAGCGTCGTAACAAAGTAATAATTACA AACTTT
CAACTACGGACTCTGGGTTCTGGCATCGATAAAAAGCAGCGAAATGCGATAAAG
TAGTGGGAATTGCGGAATTCGGTGAATCCCCCATCTGTGAACGCACATTGCCGCC
CTTTGGTATTTCCAAAGGCAGGC GTTTCAGGCCCATTTGTACCCCCCAGCCTTTG
CTGGGAGTTAGGCGGC TTGTCCCTGC TTTTGCTTGGAACCCCCCTTGACATAATT
TGCACCCGGCTACAGATTTTCTTAGCCAGCCAACCTCCCAGTTTTCTTTCCAACAG
GTCTAGCGCCCTTAACCCTTTTTTTCAGTATGAC ACTGATCAGGTAGGGATACCCC
CCTAACTATAAAGCCTTCGCTAGGCGCGGAGGAAAAAAA.