

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



Fusarium verticillioides asociado al cancro resinoso de *Pinus greggii* en los Lirios, Arteaga, Coahuila.

Tesis

Que presenta ANA KAREN GUADALUPE DE LEÓN TORRES como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASTOLOGÍA AGRICOLA


M.C. Abiel Sánchez Arizpe
Director (UAAAN)


Dr. Raúl Rodríguez Guerra
Director externo

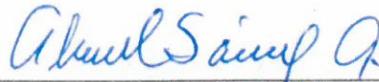
Saltillo, Coahuila

Diciembre 2020

Fusarium verticillioides asociado al cancro resinoso de *Pinus greggii* en los Lirios, Arteaga, Coahuila.

Tesis

Elaborada por ANA KAREN GUADALUPE DE LEÓN TORRES como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



M. C. Abel Sánchez Arizpe
Asesor Principal



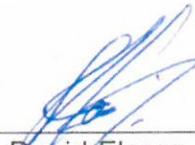
Dr. Raúl Rodríguez Guerra
Asesor



Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda
Asesor



Dr. Eladio Cornejo Oviedo.
Asesor



M.C. Jorge David Flores Flores.
Asesor



Dr. Marcelino Cabera de la Fuente
Subdirector de Postgrado
UAAAN

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



Fusarium verticillioides asociado al cancro resinoso de *Pinus greggii* Engelm en los Lirios, Arteaga, Coahuila.

Tesis

Que presenta ANA KAREN GUADALUPE DE LEÓN TORRES
como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASTOLOGÍA AGÍCOLA

Saltillo, Coahuila

Diciembre 2020

Agradecimientos

A mi Alma Mater y al departamento de Parasitología por ser siempre una puerta abierta a grandes oportunidades.

A la sociedad de Plantadores Forestales Comerciales de Durango S.P.R. de R.L. por facilitar material para la realización de esta investigación.

Al comité de Asesoría: Dr. Raúl Rodríguez, M. C Jorge David Flores, Dra. Ma Elizabeth Galindo, Dr. Eladio Cornejo, por su disponibilidad y consejos.

Al M.C Abiel Sánchez Arizpe por su puntual asesoría y acompañamiento en este trabajo de investigación.

Dedicatoria

Con todo mi agradecimiento: Josefina Torres, Juan Manuel de León

Otilia de León.

A la fuente más pura de inspiración: Santiago y Pablo.

Por ser un gran apoyo siempre gracias: Elizabeth, Reina, Ulises, Yoseni.

INDICE GENERAL

Agradecimientos	ii
Dedicatoria.....	iii
RESÚMEN.....	vii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS.....	3
HIPÓTESIS.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Importancia de los ecosistemas forestales	4
Pinus greggii.....	6
Descripción de <i>Pinus greggii</i>	7
<i>Fusarium spp.</i> como agente causal de enfermedades forestales.....	8
Pudrición de raíz por <i>Fusarium oxysporum</i>	9
Sintomatología.....	9
Biología y Ecología.....	10
<i>Fusarium oxysporum</i> Alexopoulos y Mims, (1979)	11
Clasificación taxonómica de <i>Fusarium verticillioides</i> . Alexopoulos y Mims (1979)	12
Cancro resinoso (<i>Fusarium circinatum</i>)	13
Clasificación taxonómica	15
(Nirenberg y O'Donnell 1998, Britz <i>et al.</i> , 2005)	15
Morfología.....	16
Epidemiología	17
Sintomatología.....	17
Marchitamiento de acículas y desecación de las guías	17
Formación de chancros y exudados de resina	18
Piñas, semillas y raíz.....	18

Vías de dispersión	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Área de estudio	20
Estimación de la incidencia y severidad.	20
Aislamiento y purificación del patógeno.....	21
Identificación morfológica y molecular del patógeno	22
Inoculación en árboles de <i>P. greggii</i>	23
Inoculación en microplacas	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
Aislamiento del hongo	26
Incidencia y severidad	28
Prueba de patogenicidad in vivo.....	29
Prueba de patogenicidad <i>in vitro</i>	30
CONCLUSIÓN	31
REFERENCIAS	32

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 Escala utilizada para la evaluación de la severidad de la enfermedad de cancro resinoso en <i>P. greggii</i> Engelm la plantación CAESA, En Los Lirios, Arteaga, Coah.	20
Ilustración 2 Características micro y macroscópicas de <i>F. verticillioides</i> aislado de <i>Pinus greggii</i>	27
Ilustración 3 Desarrollo de la Severidad de <i>F. verticillioides</i> durante las cuatro fechas de evaluación después de la inoculación.....	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Identificación molecular de <i>F. verticillioides</i> , aislado de <i>Pinus greggii</i> Engelm	27
Tabla 2 Incidencia y severidad evaluados en las nueve secciones de <i>P. greggii</i> Engelm en la plantación forestal CAESA, Los Lirios Arteaga, Coahuila.	28
Tabla 3 Germinación de conidios de <i>F. verticillioides</i> y Nivel de absorbancia en tres extractos de <i>Pinus greggii</i> Engelm.....	30

RESÚMEN

Los objetivos de esta investigación fueron evaluar la incidencia y severidad del cancro resinoso en la plantación forestal de *Pinus greggii* Engelman del Campo Agrícola Experimental Sierra de Arteaga (CAESA) en la región de los Lirios Arteaga, Coahuila y determinar la asociación de *Fusarium verticillioides* a esta enfermedad. Se aisló, purificó e identificó mediante criterios morfológicos a la especie asociada a cancro resinoso a partir de acículas, raíces, corteza, resina y brotes de 5 árboles por sección. Se evaluó el porcentaje de árboles dañados (incidencia) y la proporción del área foliar afectada (severidad) por la enfermedad. Se realizaron pruebas de patogenicidad *in vivo* e *in vitro* que permitieron la asociación de *Fusarium verticillioides* al cancro resinoso presente en la zona de estudio.

Palabras clave: Enfermedades forestales; cancos; postulados de Koch; incidencia; severidad.

INTRODUCCIÓN

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), 2011, reconoce a los bosques como un pilar para la conservación de la vida por ser necesarios para garantizar la preservación de la seguridad alimentaria. Actualmente la superficie forestal se encuentra amenazada por problemas como la deforestación, los cambios de uso de suelo, asentamientos humanos, catástrofes naturales, plagas, enfermedades etc. representando un riesgo para el desarrollo del ecosistema, sin embargo se le ha dado poca importancia a estos problemas (Durán, 2014).

El establecimiento de plantaciones forestales presenta dificultades desde los viveros donde la mayoría de las pérdidas en producción se relacionan con la presencia de damping off, comúnmente asociado a *Pythium spp.*, *Phytophthora spp.*, *Rhizoctonia spp.*, *Botrytis spp.* y *Fusarium spp.* (Benítez *et al.*, 2004 y Ezziyyani *et al.*, 2004). En los viveros mexicanos *Fusarium spp.* representa pérdidas hasta de un 40%(Cibrián *et al.*, 2001).

Aunque las especies de *Fusarium* son ampliamente distribuidas y económicamente importantes para plantas cultivadas (Leslie y Summerell 2006), de ellas, *F. circinatum* es considerada como un potencial riesgo para *Pinus spp* (Wingfield*etal.*,2008a) afectando hasta 60 especies(Bezos *et al.*,2017), de las cuales Hodge y Dvorak, 2000; Gordon *et al.*, 2001 indican que *Pinus radiata* es la especie más susceptible, sin embargo, estudios más recientes la han reportado en otras coníferas (Martínez-Álvarez *et al.*, 2014).

El aumento en la dispersión de la enfermedad puede relacionarse con la movilización de material vegetal, la presencia abundante del inóculo en el aire además puede ser incrementada por insectos vectores principalmente de las familias Scolitydae, Anobiidae y Cercopidae (Gordon *et al.*, 2001), por otro lado, el cambio climático favorece a una mayor adaptación del patógeno, basados en el hecho de que la frecuencia de los fenómenos climáticos extremos, tales como la sequía, las inundaciones, las fluctuaciones de altas temperaturas y las tormentas, se incrementarán en el corto y mediano plazo (Watt *et al.*, 2011).

OBJETIVOS

General

- Identificar las especies de *Fusarium* asociadas al cancro resinoso de *Pinus greggii*, entre ellas *F. verticillioides* en la plantación forestal de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Arteaga, Coahuila.

Específicos

- Estimación de incidencia y severidad.
- Aislamiento e identificación de *Fusarium sp.*
- Pruebas de patogenicidad *in vivo* e *in vitro*.

HIPÓTESIS

Se confirmará la presencia de al menos dos especies de *Fusarium* afectando *Pinus greggii*

REVISIÓN DE LITERATURA.

Importancia de los ecosistemas forestales

La importancia de los ecosistemas forestales radica en el fundamental papel para la conservación de la vida por sus funciones ecológicas ya que disminuyen la erosión, eliminan el bióxido de carbono del aire, reducen el calentamiento del planeta, regulan el régimen de lluvias, favorecen la recarga de los mantos acuíferos y preservan la biodiversidad de la flora y la fauna, además, proveen insumos directos y materias primas industriales (FAO, 2011).

La Comisión Nacional Forestal (CONAFOR), reporta un incremento de las enfermedades forestales a partir del año 2004, situación no exclusiva de México, observándose esta condición en diversas regiones del mundo, donde factores bióticos y abióticos han disminuido en 3.1 % la superficie forestal mundial durante el periodo de 1990 a 2015, es decir, se han perdido 129 millones de hectáreas hasta quedar un total de 4,000 millones (Durán, 2014, FAO, 2016). Aunado a esto, el cambio climático incide en la sanidad forestal agravando los efectos de las plagas y enfermedades forestales ocasionando una alteración en la diversidad de especies y su comportamiento, además aumentando el estrés limitando la capacidad de defensa de los árboles, haciéndolos más susceptibles a organismos patógenos (Durán y Poloni, 2015).

En consecuencia, el impacto de plagas y enfermedades forestales además de incrementar la mortalidad de la superficie boscosa ocasionan cambios en la diversidad de los ecosistemas, pérdida en la cantidad y calidad de los productos y servicios ambientales (Whitehead, 2011), además Durán y Poloni (2015), mencionan que en un mediano plazo pueden conducir a la degradación, incendios, inundaciones y derrumbes implicando procesos de recuperación duraderos.

A nivel mundial, México forma parte de los 10 países con mayor diversidad y superficie de boscosa (SEMARNAT, 2011), se caracteriza por poseer bosques templados que se distribuyen desde la Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental y la Sierra Madre del Sur (Challenger, 1998; CONAFOR, 2012).

Por otro lado, de la superficie del Estado de Coahuila (15'067,115.00 ha) SEMARNAT-CONAFOR 2013, señalan que tan solo 4.1 % de su vegetación corresponde a bosques de coníferas y de latifoliadas, los cuales constituyen una parte muy importante en la estabilidad de los ecosistemas.

El empobrecimiento y disminución de la superficie arbolada nacional ha generado problemas ecológicos, económicos y sociales, esto a consecuencia del uso de técnicas no sustentables en el aprovechamiento de los recursos forestales, el avance de la frontera agrícola, pastoreo, contaminación atmosférica, plagas y enfermedades forestales (Jiménez y Alanís, 2011; López-Feldman, 2012).

Pinus greggii

Ramírez-Herrera *et al.*, (2005) señalaron a *Pinus greggii* como una especie endémica de México; su distribución natural en forma de manchones abarca zonas semiáridas y algunas áreas semitropicales de la Sierra Madre Oriental entre los entre los 20°13' y los 25°29' de latitud Norte. Abarcando los Estados de Coahuila y Nuevo León al norte donde se le conoce como *P. greggii* var. *greggii*, mientras que la región meridional se le nombra *P. greggii* var. *australis*. Esta región incluye los Estados de San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo, Puebla y Veracruz (López-Upton y Donahue, 1995; Prieto, 2006; Martínez y Prieto, 2011; Zagoya, 2018).

P. greggii se caracteriza por reportar en ensayos genéticos o de selección de especies altas tasas de crecimiento en altura, así como un alto potencial para adaptarse en áreas nutricionalmente pobres y bajo condiciones limitantes de humedad. En conjunto estas características permiten apoyarse del uso de esta especie en programas de reforestación para recuperar suelos, la restauración y protección de cuencas, la rehabilitación de zonas urbanas (parques, jardines, camellones, bulevares) y suburbanas, así como en áreas con baja productividad agrícola y de pastizales (González *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2008; SEMARNAT, 2010; Rodríguez *et al.*, 2013).

Ramírez-Herrera *et al.*, (2005) reconocen que el desarrollo de los ecosistemas forestales depende del crecimiento de distintas plantas herbáceas y arbustivas que se encuentran ligadas con el microambiente generado por la especie *P. greggii*.

Descripción de *Pinus greggii*

Martínez, (1948) y Eguiluz, (1978), aludieron que *P. greggii* puede llegar a de 10 a 25 m de altura y 40 cm de diámetro al alcanzar la madurez, la corteza de la parte inferior del tronco es gruesa, áspera, color café grisáceo, dividida por profundas fisuras verticales en largas placas escamosas.

Las acículas de apariencia delgada a medianamente gruesas son color verde claro brillante, miden alrededor de 7 a 15 cm de largo y 1-1.2 mm de ancho, poseen bordes aserrados con denticillos muy cortos, presenta estomas en la superficie dorsal y ventral, se disponen en grupos de tres, raramente dos y cuatro (Farjon *et al.*, 1997; Perry, 1992).

Los conos son duros, casi sésiles, oblongos cónicos, oblicuos, algo encorvados, de color ocre, lustrosos, agrupados por pares de 2 a 8, rara vez más. Miden de 6 a 12 cm de largo, pudiendo llegar hasta 15 cm; de 3 a 5 cm de ancho cuando están cerrados, la semilla es de color gris a café-negruzco, miden de 5 a 7 mm de largo, de 3.0 mm de ancho, 1.9 mm de grueso y de 12.9 mg de peso. (López, 1990; Farjon *et al.*, 1997).

***Fusarium spp.* como agente causal de enfermedades forestales.**

Se han reconocido varias especies de *Fusarium* como patógenos de coníferas, algunas de estas enfermedades generan impactos ecológicos y económicos significativos (Martín-Pinto *et al.*, 2006). Entre ellas se encuentran las responsables de damping off en viveros, clasificadas de acuerdo al momento en el que se desarrollan; las infecciones de damping off pre emergente provocan un deterioro rápido de los tejidos afectados antes de que las plántulas puedan llegar a la superficie del suelo; damping off post emergente se produce durante los primeros meses después de la aparición de la plántulas se caracteriza por el colapso de éstas a nivel del suelo y el subsiguiente derrumbe de las partes que están por encima del suelo (Cibrián *et al.*, 2001; Gordon *et al.*, 2015); por último se encuentran las infecciones latentes, tienen lugar después de la lignificación de la planta resultando en su establecimiento pobre o fracaso, por la destrucción total o parcial del sistema radical de las plántulas (Jones *et al.*, 2014). Además, se encuentran también las especies que interfieren en el crecimiento de árboles maduros como lo es la enfermedad de cancro resinoso (Cibrián *et al.*, 2001)

La capacidad de distribución propia de la mayoría de las especies del género *Fusarium* puede atribuirse a su eficiente mecanismo dispersión y adaptación para colonizar un amplio número de sustratos y nichos ecológicos creados por el hombre (Chávez, 2019).

Pudrición de raíz por *Fusarium oxysporum*

La marchitez por *Fusarium oxysporum* afecta a muchos cultivos agrícolas y representa el problema fitopatológico más importante de las plantas que crecen en sustratos artificiales, además puede ser transmitido por semilla y por agua de riego (Mendoza *et al.*, 2009; Gordon *et al.*, 2015).

Dampingoff es una de las enfermedades más comunes en plántulas de coníferas, se estima que puede ocasionar la muerte de hasta un 60 % o más de toda la producción (García *et al.*, 2007).

Aunque esta enfermedad puede ocurrir antes o poco después de la emergencia de la plántulas, una plántula infectada puede sobrevivir durante varios meses y desarrollar o no síntomas (Gordon *et al.*, 2015).

Sintomatología

La podredumbre de hipocótilo afecta a plantas de mayor edad y la mayor parte de los daños son en viveros con manejo de plántulas de raíz expuesta o desnuda en la primera etapa de crecimiento (Dumroese y James, 2005), se caracteriza por la aparición de una lesión en el tallo debajo de los cotiledones que puede extenderse hasta la línea del suelo o por debajo de ella (Brownell y Schneider, 1983), retraso en el crecimiento, amarillamiento y necrosis de las acículas y marchitez.

La sintomatología de pudrición del sistema radical inicia con una lesión sobre este, provocando la muerte y rápida descomposición de las plántulas (Dumroese y James, 2005), mientras que el follaje puede observarse con acículas dispersas, cloróticas o retorcidas, seguidas por muerte descendente, también se observa achaparramiento.

El sistema radical enfermo muestra carencia de desarrollo de raíces finas y extensiva pudrición cortical, por lo que la epidermis puede retirarse en tiras con facilidad. Uno de los principales signos de esta enfermedad, es la producción de

estructuras de fructificación (esporodoquios) sobre el tallo de las plántulas, donde masas de esporas amarillo-anaranjadas son exudadas (James, 1985) éstas esporas típicamente son multicelulares, tienen forma de hoz, y pueden ser usadas para identificar al hongo. El hongo puede invadir una planta ya sea con el tubo germinativo o el micelio penetrando las raíces de las plantas.

Biología y Ecología

F. oxysporum Schlechtendal puede sobrevivir como micelio o como cualquiera de sus tres tipos de espora en forma de organismo saprófito en el suelo, sobre tejidos de plantas o sobre materia orgánica muerta, el desarrollo óptimo se presenta a 20 °C aunque el rango varía de 12 a 28°C, acompañada de alta humedad relativa y días cortos de baja intensidad lumínica (Agrios, 2005).

***Fusarium oxysporum* Alexopoulos y Mims, (1979)**

Reino... Mycetae

División... Amastigomycota

Subdivisión... Deuteromicotina

Clase... Deuteromycetes

Subclase... Hypohmycetidae

Orden... Moniliares

Familia... Tuberculariaceae

Género... *Fusarium*

Especie... *oxysporum*

Características macroscópicas: Teixeira, (2017) describen que en un principio la colonia es lisa y algodonosa, tornándose de blanco a salmón, purpura en el centro al pasar el tiempo, puede presentar esporodoquios de una coloración crema anaranjado.

Características microscópicas: las microconidias nacen de monofiálides laterales, cortas y anchas, afiladas hacia la punta, solitarias o ramificadas. Pueden formar masas pero no cadenas, su forma es ovoide o arriñonada, con un tamaño de 5-12 x 2,3-3,5 μm , ocasionalmente con uno o dos septos.

Las macroconidias tienen de uno a cinco septos. Su tamaño es de 23-54 x 3-4,5 μm . Su célula apical es afilada y la célula basal con forma de pie pero pueden tener ambos extremos afilados.

Clamidosporas: abundantes, pueden observarse aisladas, en parejas, intercalares o terminales (Leslie y Summerell, 2006).

Clasificación taxonómica de *Fusarium verticillioides*. Alexopoulos y Mims (1979)

Reino... Mycetae

División... Amastigomycota

Subdivisión... Deuteromicotina

Clase... Deuteromycetes

Orden... Moniliares

Familia... Tuberculariaceae

Género... *Fusarium*

Especie... *verticillioides*

Características macroscópicas: micelio aéreo abundante algodonoso, color blanco durazno o rosa salmón, se tiñe de azulado o púrpura en pocos días, el color del reverso varía de crema a lila, vino tinto o púrpura.

Microconidias: ovoides o en forma de maza con base truncada, sus dimensiones son 7-10 x 2,5-3,2 μm con uno o dos septos. En algunos medios forma cadenas. Los conidióforos nacen lateralmente de la hifa y son escasamente ramificados. Las células conidiógenas son monofiálicas, delgadas y largas.

Macroconidias no se forman en todas las cepas. Cuando existen son ligeramente fusiformes, casi rectas, con superficies dorsal y ventral casi paralelas. La célula basal con forma de pie y la célula apical a menudo son curvadas y afiladas. Pueden tener entre tres y siete septos y su tamaño es de 31-58 x 2,7-3-6 μm .

No forma clamidosporas. Puede presentar esclerocios azul oscuro, los esporodoquios se forma raramente.

Cancro resinoso (*Fusarium circinatum*)

La enfermedad de cancro resinoso fue detectada por primera vez en el sureste de Estados Unidos sobre *Pinus virginiana Mill* (Hepting y Roth, 1946), hoy en día se sabe que abarca desde Florida hasta el Norte de Virginia y hacia el este de Texas (Dwinell *et al.*, 1985; Ridley y Dick 2000). Sin embargo, se cree que esta enfermedad pudo originarse en México debido a que las poblaciones de *F. circinatum* presentes en varias regiones del país poseen mayor diversidad genética en comparación con otras poblaciones (Viljoen *et al.*, 1997; Guerra-Santos 1998; Wikler y Gordon, 2000).

Luego de su aparición, el primer reporte de expansión del patógeno fue detectado en Haití afectando a *Pinus occidentalis* (Hepting y Roth, 1953). Pero, no fue hasta 1986 cuando su diseminación se aceleró ganando importancia en las plantaciones nativas de pino a nivel mundial con mayor énfasis en *Pinus radiata* (Gordon *et al.*, 1996).

En el año 1987 se registraron por primera vez infecciones en Asia, específicamente Japón (Kobayashi y Muramoto, 1989) sobre *Pinus luchuensis* en la zona central de México afectando a *Pinus radiata* (Guerra-Santos, 1998). Donde se ha reportado en 19 especies de pino (Hodge y Dvorak, 2007).

En el año 1990 *Fusarium circinatum* fue confirmado como el agente causal de la pudrición radicular en esquejes de *Pinus patula*, en Sudáfrica (Viljoen *et al.*, 1994), 15 años más tarde inició su expansión a plantaciones y viveros forestales de *P. patula* Schltl y Cham. El reporte más reciente de la aparición de esta enfermedad en Sudáfrica fue en el año 2007 en la región de la Península del Cabo (Coutinho *et al.*, 2007). Wingfield *et al.*, 2008 consideran que, en Sudáfrica, probablemente la diseminación del cancro resinoso del pino de vivero hacia plantaciones fue lenta por la intervención de diversos factores como el clima, bajo nivel de inóculo inicial, ausencia de vectores y la falta de asociación entre la biota nativa y los ejemplares en las plantaciones.

Durante el año 2002 fue detectada en Chile en viveros de *P. radiata* y en algunos árboles de de mayor edad que fueron establecidos sobre suelo ya infectado (Wingfield *et al.*, 2002), además hay registros en Europa, provocando en el norte de España pérdidas en viveros de *P. radiata* y *P. pinaster*, (Pérez-Sierra *et al.*, 2007) y en Italia *P. halepensis* y *P. pinea* (Carlucci *et al.*, 2007), como consecuencia de la distribución de las especies susceptibles y las condiciones climáticas presentes en esta región, *F. circinatum* es catalogado como especie de importancia cuarentenaria (EFSA, 2010).

Recientemente *Fusarium circinatum* ha sido identificado en Uruguay (Alonso y Bettucci, 2009), Colombia (Steenkamp *et al.*, 2012) y Brasil (Pfenning *et al.*, 2014).

La propagación de *F. circinatum* es de gran preocupación para muchos países puesto que no solamente amenaza a plantaciones forestales establecidas por el hombre, sino también a las nativas (Dick 1998).

Es importante mencionar que la expansión de esta enfermedad se encuentra ligada a diversos factores entre ellos el cambio climático y el rango alto de adaptabilidad del patógeno a los cambios ambientales y la globalización (Watt *et al.*, 2011).

Clasificación taxonómica
(Nirenberg y O'Donnell 1998, Britz *et al.*, 2005)

Reino... Fungi

Sub-reino...Dikarya

Filo...Ascomycota

Sub-filo...Pezizomycotina

Clase...Sordarioomycetes

Sub-clase...Hypocreomycetidae

Orden...Hypocerales

Familia...Nectriaceae

Género...*Fusarium*

Fusarium circinatum se ubica dentro de la sección Liseola, donde se clasifican especies que producen falsas cadenas o cabezas las cuales son una agrupación de células sin cohesión morfológica y además no producen clamidosporas (Hepting y Roth 1946). En 1978, a partir de la recolección de aislados de cancro resinoso del pino, en los que se destaca la presencia de microconidios con falsas cabezas y la ausencia de clamidosporas, se asignó la especie como *Fusarium moniliforme* variedad *subglutinans* (Dwinel *et al.*, 1985).

En 1983, fue elevado a nivel de especie denominándose *Fusarium subglutinans* (Nelson *et al.*, 1983) y en 1992 por efecto de pruebas moleculares de ADN mitocondrial se clasificó como *F. subglutinans* f. sp. *pini* (Correll *et al.*, 1992). Nirenberg y O'Donnell, no fue hasta en el año 1998, Nirenberg y O'Donnell lo describieron con el nombre de *F. circinatum*, perteneciente al complejo *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw., dentro de la sección Liseola, confirmado por estudios morfológicos (Britz *et al.*, 2005) y análisis filogenéticos (Schweigkofler *et al.*, 2004).

Morfología

Peritecio: ovoide a subpiriforme, mide alrededor de 325 μm de largo por 230 μm de ancho, punteado alrededor del ápice pero liso en el resto. Las ascas son cilíndricas, de 85-100 x 7,5-8,5 μm (Leslie y Summerell 2006).

Las ascosporas, son de elipsoidales a fusiformes, lisas, hialinas y separadas con un septo medio en un principio. Posteriormente se pueden desarrollar varios septos más. Miden (9,4-)11,1-12,6-14(16,6) x (4,5-)4,7-5,1-5,5(-6) μm (Nirenberg y O'Donnell 1998, Leslie y Summerell 2006)

Los macroconidios son relativamente finos y muestran tres o cuatro septos. La célula apical es curvada, mientras que la basal está poco desarrollada. Sus medidas son: (32-)33,7-38,2-42,7(-48) x (3,2-)3,4-3,6-3,7(-3,8) μm (Nirenberg y O'Donnell 1998).

Microconidios: son ovoides u ovalados sin septos de entre 7- 12 μm de largo y 2.5-3.9 μm de ancho. Se presentan en micelio aéreo de forma aislada o agregados en falsas cabezas. Las células conidiógenas son mono o polifálides, pudiendo presentarse en gran cantidad (Nirenberg y O'Donnell 1998).

Clamidosporas: No se encuentran en esta especie, aunque en algunas cepas se producen hifas que pueden parecerse superficialmente a clamidosporas o pseudoclamidosporas(Herrera y Ulloa 1990).

Fusarium circinatum es un patógeno de comportamiento necrotrófico, se caracteriza por la producción de enzimas degradantes de células y micotoxinas como la poligalacturonasa responsable de la degradación de la pared celular y la posterior penetración del huésped (Leslie y Summerell 2006)

Epidemiología

Wingfield *et al.* (2008), mencionan que la temperatura óptima para la germinación de esporas es de 20 a 25° C, así como altos niveles de humedad.

Sintomatología

Es posible que la enfermedad de cancro resinoso presente en cualquier etapa fenológica y sobre diferentes órganos como brotes, tallos, ramas, acículas, conos, semillas y raíces (Dwinell *et al.* 2001; Wingfield *et al.*, 2008). La intensidad de expresión de los síntomas dependerá del hospedero, órgano afectado, las condiciones ambientales y las prácticas forestales llevadas a cabo (Dwinell *et al.* 1985; Gordon *et al.* 2001).

Marchitamiento de acículas y desecación de las guías

Uno de los síntomas característicos de esta enfermedad es la coloración de las acículas, las cuales se tornan desde amarillas a rojas para después caerse (Hepting y Roth 1946).

El cancro resinoso del pino origina la muerte de la guía principal del árbol y de ramas secundarias afectadas por una lesión que puede estrangular la rama a la altura del punto de infección. Aunque el patógeno se desarrolla tanto hacia la parte distal como hacia la parte basal de la planta desde el punto de infección, en algunos casos el crecimiento no se extiende hacia abajo y no ocasiona daños visibles en el resto del árbol (Dwinell *et al.*, 1985)

Los brotes desarrollados por encima del punto de infección se vuelven marrones para después marchitarse y morir con rapidez, también se puede observar la muerte de la punta (Correll *et al.*, 1991).

Formación de chancros y exudados de resina

Se caracteriza por provocar canchros sobre áreas donde el tejido de la planta ha sido dañado por el hongo. Los canchros localizados en la parte inferior del tronco pueden ocasionar la muerte del árbol completo por estrangulamiento (Correll *et al.*, 1992).

Piñas, semillas y raíz.

En los viveros la aparición de la enfermedad está asociada especialmente a semillas infectadas (Soria, 2010), ocasionando damping off, además, puede sobrevivir en el suelo y que es capaz de infectar a las plantas actuando como un patógeno de raíz (Dwinell *et al.*, 1985) Así como posee la capacidad de infectar no solo la superficie externa de las escamas de los conos sino también logra penetrar en su interior causando la muerte de estróbilos femeninos y piñas maduras (Dwinell, 2001).

El daño tardío causa pudrición, malformación en la plántula, acículas rojizas y raíces caféas (Peterson, 2008; Solano y Brenes, 2012). En plantas en vivero (mayores de seis meses) el patógeno se puede asociar a pudrición de raíces (Gordon *et al.*, 2001), en estado avanzado de la enfermedad pueden presentarse esporodoquios en el tallo de las plantas (Wingfield *et al.*, 2008).

Vías de dispersión

Fusarium circinatum forma esporodoquios en los tejidos infectados y esporula durante todo el año. Los conidios son fácilmente dispersados por el viento durante tiempo húmedo acompañado de fuertes vientos y las salpicaduras de agua. (Blakeslee y Rockwood 1978, Correll *et al.*, 1991). Logrando generar nuevas infecciones en ramas y brotes dañados (Blakeslee *et al.*, 1978; Gordon 2006)

Owen y Adams (1999), observaron una distribución lenta y gradual del hongo a partir de áreas infectadas inicialmente. Pero la localización de la enfermedad en

zonas muy lejanas y aisladas de los centros importantes de infección parece indicar el transporte de forma asistida por medios humanos como el acarreamiento de madera para leña, corteza de pino para jardinería, árboles de navidad, material de acampada etc. Además el suelo puede ser un agente de dispersión de la enfermedad porque puede adherirse al calzado, a maquinaria, a vehículos y a la superficie de contenedores de planta mal limpiados (Gadgil *et al.*, 2003). Las semillas pueden ser otro mecanismo de dispersión del hongo. Storer *et al.*(1998) realizaron una serie de ensayos en los que consiguieron aislar *Fusarium circinatum* de la superficie de semillas extraídas de piñas aparentemente sanas de *Pinus radiata*. En el caso de piñas enfermas extrajeron semillas de las que aislaron el hongo, tanto de la superficie como del interior. También aislaron el hongo de plántulas germinadas a partir de semillas extraídas de piñas aparentemente sanas. Cuando la recolección de semilla se hace de árboles en apariencia sanos pero en áreas afectadas por la enfermedad, el hongo puede permanecer latente y no manifestarse hasta que las plántulas nacen en el vivero (Iturrutxa *et al.*, 2011).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El estudio fue realizado en la plantación forestal del Campo Agrícola Experimental Sierra de Arteaga (C.A.E.S.A) de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Los Lirios, Arteaga, Coah. ubicada en las coordenadas geográficas 25° 24' 11.2" N y 100° 36' 25.46" W, a una latitud de 2269 msnm

Estimación de la incidencia y severidad.

Árboles de *P. greggii* fueron seccionados al azar para su evaluación en nueve secciones correspondientes a dos calles compuestas de hasta 72 árboles cada una.

Se evaluó la incidencia como el total de árboles enfermos por sección y la severidad como la proporción de daño de la enfermedad por cada árbol (pudrición, %) mediante una escala (Figura 1).

1 Sano	2 Leve	3 Moderado	4 Alto
			
Presencia de follaje saludable en todas las ramas. Sin daños en la corteza.	Perdida del follaje menor a 50%, acículas levemente cloróticas.	Pérdida de follaje entre 55% a 75%, clorosis, tonalidades rojizas, abundante secreción de resina y lesiones en la corteza.	Follaje nulo y presencia de cancos.

Ilustración 1 Escala utilizada para la evaluación de la severidad de la enfermedad de cancro resinoso en *P. greggii* Engelm la plantación CAESA, En Los Lirios, Arteaga, Coah.

Los datos obtenidos de la incidencia y severidad de la plantación se transformaron por raíz cuadrada del arcoseno, se procesaron con el Statistical Analysis System (SAS) versión 9.1 (SAS, 2002).

Aislamiento y purificación del patógeno

Se seleccionaron árboles consíntomas de la enfermedad como: exudado de resina, presencia de canchros, coloración rojiza en las acículas y defoliación descendente y se tomaron muestras de resina, raíces, acículas, ramas, corteza, canchros y piñas (estróbilos femeninos). Se hicieron cortes de ± 1 cm y se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 1% por 3 min, posteriormente, se lavaron en agua destilada estéril por 1 min (dos veces) siguiendo la metodología de Robles *et al.* (2016).

Se colocaron de 5 a 8 cortes de manera equidistante en placas con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) y se mantuvieron a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 120 h. La purificación del patógeno se realizó mediante cultivos monoconidiales en medio de cultivo Spezieller Nährstoff-farmer (SNA) y Agar Clavel (AC) y se mantuvieron a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 120 h.

Identificación morfológica y molecular del patógeno

La identificación morfológica se basó en características microscópicas de 100 conidios (forma, color, largo y ancho) usando el software Dinocapture 2.0 (DinoCapture, 2020), y macroscópicas de la colonia (textura y color), utilizando el manual de laboratorio de *Fusarium* de Leslie y Summerell (2006) y la clave interactiva para *Fusarium* de Seifert (1996). La identificación molecular se realizó a partir de cepas axénicas, se realizó en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, usando los cebadores ITS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G3') e ITS4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC3'), para la extracción de ADN se hizo mediante el método Dellaporta (Dellaporta *et al.*, 1983), la visualización del ADN obtenido se realizó por electroforesis en un gel de agarosa al 2% (p/v), además, el ADN se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 y el termociclador Veriti para PCR de punto final. Las muestras se secuenciaron con el método de didesoxinucleótidos marcados en el secuenciador del Analizador Genético 3130, y la secuencia obtenida se alineó y comparó con las disponibles en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

Inoculación en árboles de *P. greggii*

La inoculación se llevó a cabo en 15 plántulas de *P.greggii* de 2 años de edad, con una altura promedio de 86.5 cm y un diámetro de 3 cm, La suspensión de esporas 10^8 esporas mL^{-1} de *F. verticillioides* se inyectó al tallo principal de las plantas y a dos ramas superiores laterales distales del brote más reciente, además, un control (plántulas inoculados solo con agua destilada estéril). Las evaluaciones del porcentaje de daño se realizaron cada 15 días durante tres meses y se registró la severidad durante los 45, 60, 75 y 90 días después de la inoculación (DDI).

Los datos obtenidos de la inoculación fueron en porcentaje y se transformaron a la raíz cuadrada del arcoseno, posteriormente, se hizo un análisis de varianza considerando un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 2 x 4. El factor A estuvo representado por dos niveles, plántulas inoculadas y plántulas no inoculadas, en tanto que el factor B lo conformaron cuatro niveles que correspondieron a las fechas de evaluación (45, 60, 75 y 90 días). El diseño comprendió tres repeticiones con cinco plántulas por repetición y nivel del Factor A. El modelo estadístico empleado fue el siguiente Steel y Torrie (1986):

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} : Es la ijk -ésima observación en el i -ésimo nivel del factor A con el j -ésimo nivel del factor B

" μ " = Es la media general

" α_i " : Es el efecto producido por el nivel i -ésimo del factor A.

" β_j " : Es el efecto producido por el nivel j -ésimo del factor B.

" $\alpha\beta$ " ij : Es el efecto de la interacción del nivel i -ésimo del factor A con el nivel j -ésimo del factor B.

" ϵ_{ijk} " : Error experimental

Inoculación en microplacas

Para la evaluación *in vitro* se empleó la metodología propuesta por Wilson *et al.* (1997). Se colocó material vegetal de *P.greggii* (acículas, ramas y brote) por separado en bolsas de plástico de polietileno y se mantuvieron a -20°C por 24 h. Posteriormente, se descongelaron y el líquido resultante se colocó en vasos de precipitados de 250 mL y se preparó una solución una suspensión de esporas 1×10^4 esporas mL⁻¹ de *F. verticillioides* en caldo estéril de extracto de malta.

La inoculación se llevó a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos en las cuales se colocaron 50 µL del extracto de la planta y 50 µL de la suspensión de esporas, se emplearon tres tratamientos con 8 repeticiones y un control, distribuidos de la siguiente manera: una columna de suspensión de esporas, una columna en blanco, 1 columna son extracto de acículas, 1 columna con extracto de brote y 1 columna con extracto de corteza. Las placas se mantuvieron a 25 °C por 12 h. Se observó y cuantificó el porcentaje de esporas germinadas en el microscopio de luz invertida y se evaluó el nivel de absorbancia en el lector de microplacas BIO-RAD modelo 550.

Los resultados de la inoculación de microplacas se procesaron en un análisis completamente al azar, con comparación de medias de Tukey ($p=0.5$), utilizando el programa estadístico SAS versión 9.1 (SAS, 2002) El modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

$$i = 1, \dots, t;$$

t = número de tratamientos

$$j = 1, \dots, n;$$

n = número de repeticiones por tratamiento

Dónde:

τ_i = es el efecto del i-ésimo tratamiento

ε_{ij} = error experimental

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento del hongo

Las cepas presentaron microconidios ovoides hialinos con dimensiones de 7 a 10 x 2.5 a 3.5 μm , de largo y ancho, respectivamente, además, formando cadenas, conidióforos escasamente ramificados nacidos lateralmente de la hifa. La presencia de macroconidios fusiformes, con célula basal en forma de pie, la célula apical afilada y curva, con tres a seis septos, con medias de largo de 29.34-60.89 μm y ancho de 2.7 a 3.6 μm . Las cepas axénicas presentaron inicialmente crecimiento micelial algodonoso color blanco que con el paso de los días se tornó color rojo-violáceo, todas estas características determinantes para *F. verticillioides* (Figura 3), similares a lo reportado por Nelson *et al.* (1983); Leslie y Summerell (2006), Fuentes *et al.* (2012) y Maciel *et al.* (2017). La secuencia obtenida comparada en el BLAST dio como resultado a *F. verticillioides* (Cuadro 1). La alta capacidad adaptativa de *Fusarium spp.* favorece el desarrollo de infecciones en plantas cultivadas desde etapas prematuras hasta el estado avanzado de la fenología de la planta (Martin-Pinto *et al.*, 2007; Chenget *al.*, 2019; Ezrari *et al.*, 2020). Al hablar de coníferas como *P. pinaster*, *P. radiata*, *P. patula*, *P. sylvestris* Pérez *et al.* (2006) reportan a *F. circinatum* como uno de los principales agentes responsables de pérdidas económicas y alto impacto ecológico en plantaciones forestales al causar la enfermedad de cáncer resinoso, también se asocia a este patógeno a enfermedades de vivero como lo indican Mitchell *et al.* (2011) y Hernández *et al.* (2018).

Otra de las especies cosmopolita del género *Fusarium* que reporta considerables pérdidas es *F. verticillioides* que al producir enfermedades vasculares en conjunto con otros patógenos desencadena la muerte en viveros, cultivos y árboles, (Abad *et al.*, 2012; Liewet *al.*, 2016)

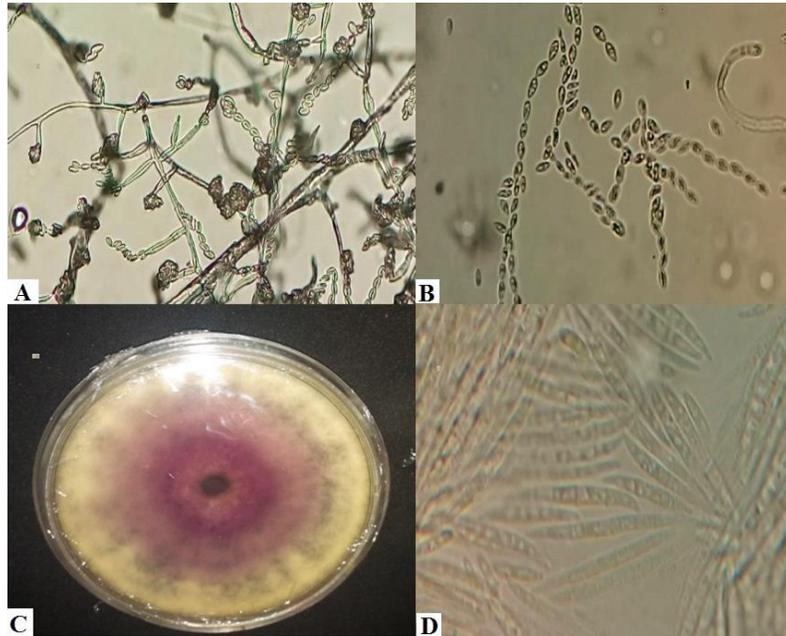


Ilustración 2 Características micro y macroscópicas de *F. verticillioides* aislado de *Pinus greggii*

A) Microconidios, B) Microconidios en cadena y D) Macroconidios

Tabla 1 Identificación molecular de *F. verticillioides*, aislado de *Pinus greggii* Engelm

Patógeno	Puntaje Máximo	Puntaje Total	% de identidad	Adhesión
<i>F. verticillioides</i>	931	1180	100	MK790051.1

Incidencia y severidad

En los arboles de *P. greggii* de la plantación forestal en estudio la incidencia fue del 66.66 al 100%. En general el impacto de los síntomas de cáncer resinoso fue de 32.27%. Durante el recorrido se encontró que la sección 2 con 65 árboles presentó la mayor severidad con 36.56% y la sección 8 presentó 25.62%. (Cuadro 2)

Tabla 2 Incidencia y severidad evaluados en las nueve secciones de *P. greggii* Engelm en la plantación forestal CAESA, Los Lirios Arteaga, Coahuila.

Sección	No. A.	Incidencia (%)	DS	Severidad (%)	DS
1	71	81.69	15.832	31.69	15.95
2	65	93.75	13.488	36.56	13.59
3	65	90.62	12.185	31.64	12.28
4	67	93.44	9.738	34.29	6.83
5	71	87.3	9.678	36.43	9.75
6	71	76.81	18.925	26.79	19.26
7	70	84.61	17.418	31.74	17.55
8	66	66.66	19.567	25.62	20.32
9	74	88.88	17.754	35.55	18.63

No. A.= Número de árboles, SD = Desviación estándar

Prueba de patogenicidad in vivo

La aparición de los primeros síntomas se registró entre 15 y 30 DDI con acículas cloróticas y secreción de resina, posteriormente pasados 45 DDI comenzaron a tornarse rojizas. La muerte de brotes y ramas se caracterizó por ocurrir de forma descendente, iniciando con clorosis, posteriormente coloración rojiza y secreción de resina observándose marchitez al llegar a los 90 DDIAI comienzo de la infección se registró 3% de severidad, finalizando en los 90 DD hasta con 35% de daño de la plántula.

Durante el período de evaluación el follaje del testigo presentó únicamente clorosis y escasa secreción de resina.

El análisis estadístico encontró diferencias altamente significativas en el desarrollo del patógeno entre los ejemplares inoculados y su testigo, por su parte tanto el desarrollo de la enfermedad y la interacción entre las fechas de evaluación presentaron diferencias significativas.

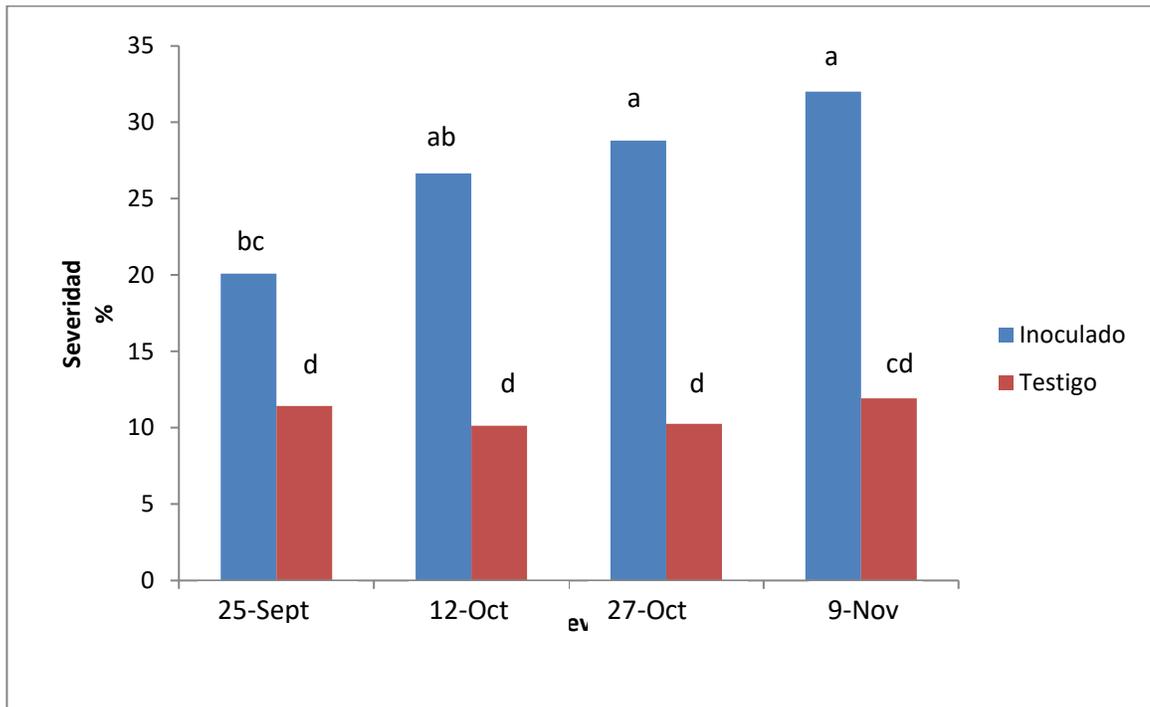


Ilustración 3 Desarrollo de la Severidad de *F. verticillioides* durante las cuatro fechas de evaluación después de la inoculación

Prueba de patogenicidad *in vitro*

El análisis estadístico de la evaluación de germinación conidios encontró diferencias significativas entre los cuatro tratamientos evaluados tanto en la germinación de conidios y en los niveles de absorbancia, habiendo una media de 41.250 en el extracto de acículas, mientras que la media del extracto de corteza fue de 26.434, los niveles de absorbancia tuvieron un comportamiento similar a la germinación de conidios, con una media de 0.2236 en extracto de acículas y 0.1263 en corteza.

Tabla 3 Germinación de conidios de *F. verticillioides* y Nivel de absorbancia en tres extractos de *Pinus greggii* Engelm

Tratamiento	Germinación de esporas (Medias)	Desviación estándar	Nivel de absorbancia (Medias)	Desviación estándar
Testigo	23.684	3.66	0.00	0.00
Acículas	41.250	3.06	0.22	0.02
Brote	28.723	2.42	0.16	0.01
Corteza	26.434	4.40	0.13	0.01

El éxito de las plantaciones forestales depende de la supervivencia y calidad de las plántulas utilizadas, la presencia de *Fusarium spp.* Link, limita su establecimiento al haber diversas especies asociadas a la pudrición de semillas e infecciones latentes en coníferas (Maciel *et al.*, 2017), entre ellas se ha reportado a *F. sambucinum*, *F. circinatum*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides*, *F. solani* y *F. subglutinans* sobre *P. elliotii*, *P. radiata*, *P. pinaster*, *P. patula*, *P. taeda*, *P. elliotii* y *P. greggii* respectivamente. *F. verticillioides* ha sido reconocido como patógeno de viveros (Ocamb *et al.*, 2002; González *et al.*, 2008; Abadd, 2012), además se asocia con la rizosfera del suelo (Ocamb y Juzwik, 1995), al ser ampliamente adaptable a diferentes condiciones ambientales *Fusarium spp.*, se encuentra mundialmente distribuido sin limitarse únicamente a viveros (Maciel *et al.*, 2013). Por lo que es de vital importancia realizar investigaciones profundas en el comportamiento del patógeno en plantaciones forestales.

CONCLUSIÓN

Los síntomas reproducidos después de la inoculación; coloración rojiza de las acículas y secreción de resina en los árboles de *Pinus greggii* permiten asociar a *Fusarium verticillioides* a la enfermedad de cancro resinoso de pino en la plantación forestal en el CAESA, Arteaga, Coah.

REFERENCIAS

Abad-Campos, P., Marco, A. G., Piazza, S., León, M., & García-Jiménez, J. (2012). Detección de *Phytophthora spp.* y patógenos fúngicos en viveros forestales de la comunidad de Valencia. Actas de la II reunión sobre sanidad forestal, 99, 99

Agrios, G.N. 2005 Plant Pathology. 5th edition. Elsevier Academic Press, California.

Alexopoulos, C. J., C.W. Mims. 1979. Introductory Micology. 2th Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA

Alonso, R., & Bettucci, L. (2009). First report of the pitch canker fungus *Fusarium circinatum* affecting Pinus taeda seedlings in Uruguay. *Australasian Plant Disease Notes*, 4(1), 91-92.

Blakeslee, G. M., & Rockwood, D. L. (1978). Pitch canker resistance in slash pine. *Res Rep Fla Univ Sch For Resour Conserv.*

Benítez, T., Rincón, A.M.; Limón, M.C., Codón, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Intl. Microbiol.* 7(4), 249-260 pp.

Bezós, D., Lomba, J. M., Alvarez, P. M., Fernandez, M., & Diez, J. J. (2012). Effects of pruning in Monterey pine plantations affected by *Fusarium circinatum*. *Forest Systems*, 21(3), 481-488.

Bezós, D., Martínez-Alvarez, P., Fernández, M., & Diez, J. J. (2017). Epidemiology and management of pine pitch canker disease in Europe—A review. *Balt. For*, 23, 279-293.

Brownell, K. H., & Schneider, R. W. (1983). *Fusarium* hypocotyl rot of sugar pine in California forest nurseries. *Plant disease*, 67(1), 105-107.

Carlucci A, Colatruglio L, Frisullo S (2007) First report of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus halepensis* and *P. pinea* in Apulia (Southern Italy). *Plant Disease* 91, 1683.

Cibrián, T. D. (2001). Manual para la identificación de plagas y enfermedades forestales en el estado de Jalisco. *FIPRODEFO. Publicación especial*.

Comisión Nacional Forestal. (2012). Inventario Nacional Forestal y de Suelos, informe del 2004-2009 (1a. ed). Zapopan, Jalisco, México: Conafor.

Correll JC, Gordon TR, McCain AH, Fox JW, Koehler CS, Wood DL, Schultz ME. 1991. Pitch canker disease in California: pathogenicity, distribution and canker development on Monterey pines (*Pinus radiata*). *Plant Disease* 75: 676-682.

Correll JC, Gordon TR, McCain AH. 1992. Genetic diversity in California and Florida populations of the pitch canker fungus *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*. *Phytopathology* 82: 415-420

Coutinho TA, Steenkamp ET, Mongwaketsi K, Wilmot M, Wingfield MJ (2007) First outbreak of pitch canker in a South African pine plantation. *Australasian Plant Pathology* 36, 256--261. doi: 10.1071/AP07017

Chavez Chirinos, G. (2019). Etiología y control de la marchitez en pino (*Pinus tecunumanii*), mediante el uso de hongos benéficos del género *Trichoderma* spp. a nivel de vivero La Convención–Cusco.

Challenger, A. 1998. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México; pasado, presente y futuro. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad

Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA minipreparation: version II. *Plant molecular biology reporter*, 1(4), 19-21.

Dick M.A., (1998). Pinepitchcanker—the threat to New Zealand. *New Zealand Forestry* 42, 30.

Dick MA, Dobbie K (2002). Species of *Fusarium* on *Pinus radiata* in New Zealand. *New Zealand Plant Prot.* 55:58-62.

Dumroese, R.K., James, R.L., 2005. Root diseases in bare root and container nurseries of the Pacific Northwest: epidemiology, management, and effects on outplanting performance. *New For.* 30, 185e202.

Durán, E., y Poloni, A. (2014). Escarabajos descortezadores: diversidad y saneamiento en bosques de Oaxaca. *Biodiversitas*, 7, 12-citation_lastpage.

Durán y Poloni, op.cit. ix CONAFOR (2015) “Criterios para la ejecución de proyectos de saneamiento forestal”. Lineamientos del Programa de Sanidad. Anexo 1. México: CONAFOR

Dwinell, LD., Barrows-Broadus, J., Kuhlman, EG., (1985) Pitch canker: a disease complex of southern pines. *Plant Disease* 69, 270--276. doi: 10.1094/PD-69-270

EFSA, 2010. Risk assessment of *Gibberella circinata* for the EU territory and identification and evaluation of risk management options. *EFSA Journal* 8(6), 1620.

Eguiluz, P. T. 1978. Ensayo de integración de los conocimientos sobre el género *Pinus* en México. Tesis Profesional. Escuela Nacional de Agricultura. Chapingo. México, D. F. 623 p.

Ezziyyani, M., S.C. Pérez, M.E. Requena, L. Rubio y M.E. Candela 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología* 26: 69-78.

Ezrari, S., Lahlali, R., Radouane, N., Tahiri, A., Asfers, A., Boughalleb-M'Hamdi, N., ... & Lazraq, A. (2020). Characterization of *Fusarium* species causing dry root rot disease of citrus trees in Morocco. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 1-17.

Farjon, A., De la Rosa P. J. A. y Styles B. T. 1997. Guía de campo de los pinos de México y América Central. The Royal Botanic Gardens, Kew-Instituto Forestal de Oxford, Universidad de Oxford. 151p.

Fuentes, Y. M. O., Chávez, E. C., Morales, G. G., Flores, J. L., Ortiz, J. C. D., Camacho, S. H., ... & Portugal, V. O. (2012). Identificación de especies de *Fusarium* en semilla de ajo en Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Micología*, 36, 27-31.

Gadgil P, Dick M, Simpson J, Bejakovich D, Ross M, Bain J, Wylie R, Horgan G (2003) Management plan for response to an incursion of pine pitch canker for Australia and for New Zealand. Unpublished report, Forest Research, Rotorua

García, D. S. E., (2007). Damping-off y pudrición de raíz por *Fusarium*/dampingoff and root rot by *Fusarium*. *Fusarium oxysporum* Schltdl. (Moniliales, Moniliaceae) 502-505.

González-Elizondo, M., M. S. González-Elizondo, R. Álvarez-Zagoya, I. L. López-Enríquez. 2008. Libro: Árboles y arbustos de los parques y jardines del norte-centro de México. Guía de identificación. ISBN: 978-970-36-0437-1. Instituto Politécnico Nacional. Dir. de Publicaciones. Abril 2008. D.F., México. 168 p.

González, B., Pintos, C., Mansilla, J., Aguín, O., & Pérez, R. (2008). Presencia de especies de *Fusarium* sobre semillas de *Pinus* spp. en Galicia. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales*, 26, 149-154.

Gordon, T.R., Storer, A.J., Okamoto, D. (1996). Population structure of the pitch canker pathogen, *Fusarium subglutinans* sp. *pini*, in California. *Mycological Research* 100, 850--854.

Gordon, T. R., Storer, A. J., & Wood, D. L. (2001). The pitch canker epidemic in California. *Plant disease*, 85(11), 1128-1139.

Gordon, T. R., Swett, C. L., & Wingfield, M. J. (2015). Management of *Fusarium* diseases affecting conifers. *Crop Protection*, 73, 28-39.

Granados, S. D., López R., G. F. y Hernández G., M. A. (2007). Ecología y silvicultura en bosques templados. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 13 (1):67-83.

Guerra-Santos, J.J., (1999). Pitch canker on Monterey pine in Mexico. In 'Current and potential impacts of pitch canker in radiata pine. Proceedings of the IMPACT Monterey workshop, California, USA, 30 November to 3 December 1998'. *Forestry and Forest Products* No. 112. (Eds ME Devey, AC Matheson, TR Gordon) pp. 58--61. (CSIRO: Canberra)

Hepting, G.H., Roth, E.R. (1946). Pitch canker, a new disease of some southern pines. *Journal of Forestry* 44, 724—744.

Hepting, G.H., Roth, E.R. (1953), Host relations and spread of the pine pitch canker disease. *Phytopathology* 43, 475.

Herrera, T. Ulloa. M.(1990): El reino de los hongos. *Micología básica y aplicada*.

Hodge, G.R., Dvorak, W.S., (2000). Differential responses of Central American and Mexican pine species and *Pinus radiata* to infection by the pitch canker fungus. *New Forests* 19, 241--258. doi: 10.1023/A:1006613021996

Hodge, G. R., & Dvorak, W. S. (2007). Variation in pitch canker resistance among provenances of *Pinus patula* and *Pinus tecunumanii* from Mexico and Central America. *New Forests*, 33(2), 193-206.

Iturrutxa, E., Ganley, R. J., Wright, J., Heppe, E., Steenkamp, E. T., Gordon, T. R., & Wingfield, M. J. (2011). A genetically homogenous population of *Fusarium circinatum* causes pitch canker of *Pinus radiata* in the Basque Country, Spain. *Fungal Biology*, 115(3), 288-295.

James, R. L. (1985). Pathogenic *Fusarium* on spruce seed from the Towner Nursery, North Dakota.

Jiménez, J. y Alanís, E. (2011). Análisis de la frecuencia de los incendios forestales en la Sierra Madre Oriental y Occidental del norte de México y sur de Estados Unidos de América. *Ciencia UANL*, 14 (3), 255-263.

Jones, N.B., Ford, C.M., Light, M.E., Nadel, R.L., Greyling, I., Fourie, G., Wingfield, M.J., Morris, A.R., 2014. Effect on nursery and field performance of

Pinus patulaseedlings after inoculation with *Fusarium circinatum*. South. For. 76, 125-136.

Kobayashi, T., Muramoto, M. (1989). Pitch canker of *Pinus luchuensis*, a new disease of Japanese forests. Forest Pests 40, 169--173.

Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *Fusarium* laboratory workshops--A recent history. *Mycotoxin Research*, 22(2), 73.

Liew, E. C. Y., Laurence, M. H., Pearce, C. A., Shivas, R. G., Johnson, G. I., Tan, Y. P., ... & Summerell, B. A. (2016). Review of *Fusarium* species isolated in association with mango malformation in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 45(6), 547-559

López-Feldman, A. (2012). Deforestation in México: A preliminary analysis. University Library of Munich, Germany.

López U. J. 1990. Selección Familiar por tolerancia a sequías en *Pinus greggii* Engelm., Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. Montecillo, México. 97 p.

López-Upton, J., & Donahue, J. K. (1995). Seed Production of *Pinus greggii* Engelm. *natural stands in Mexico. Tree Planter's Notes*, 46(3), 86-92.

Maciel, C. G., Walker, C., Santos, R. F. D., Muniz, M. F. B., & Brum, D. L. (2017). *Fusarium oxysporum* and *F. verticillioides* associated with damping-off in *Pinus* spp. *Revista Ciência Agronômica*, 48(1), 134-141

Martínez, M. 1948. Los pinos mexicanos. Segunda edición. Ediciones Botas. México. 361 p.

Martínez-Álvarez, P., Pando, V., & Díez, J. J. (2014). Alternative species to replace Monterey pine plantations affected by pitch canker caused by *Fusarium circinatum* in northern Spain. *Plant pathology*, 63(5), 1086-1094.

Martínez-Salvador, M. y J. A. Prieto-Ruíz. 2011. Determinación de áreas potenciales para el establecimiento de plantaciones forestales comerciales en la Región Norte de México. INIFAP, Centro de Investigación Regional Norte Centro, Campo Experimental Valle del Guadiana. 1ª Ed. Folleto Técnico No.47. Durango, México. 27 p

Martín-Pinto P, Pajares JA, Díez JJ (2006b). In vitro effects of four ectomycorrhizal fungi, *Boletus edulis*, *Rhizopogon roseolus*, *Laccaria laccata* and *Lactarius deliciosus* on *Fusarium* damping off in *Pinus nigra* seedlings. *New Forests* 32:323-334.

Martín-Pinto, P., Pajares, J., & Díez, J. (2008). Pathogenicity of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium oxysporum* on *Pinus nigra* seedlings in northwest Spain. *Forest Pathology*, 38(2), 78-82.

Martín-Rodríguez, N., Sánchez-Zabala, J., Salcedo, I., Majada, J., González-Murua, C., & Duñabeitia, M. K. (2015). New insights into radiata pine seedling root infection by *Fusarium circinatum*. *Plant Pathology*, 64(6), 1336-1348.

Mendoza, A. R., & Sikora, R. A. (2009). Biological control of *Radopholus similis* in banana by combined application of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* strain 162, the egg pathogen *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and the antagonistic bacteria *Bacillus firmus*. *Biocontrol*, 54(2), 263-272.

Morante C., J., J. Alba L., y L del C. Mendizábal H. 2005. Estudio de conos, semillas y plántulas de *Pinus greggii* Engelm. de una población del estado de Veracruz, México. *Foresta Veracruzana*, 7(2): 23-31.

Nelson, P. E., Toussoun, T. A., & Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium species: an illustrated manual for identification*.

Nirenberg, H. I., & O'Donnell, K. (1998). New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90(3), 434-458.

Ocamb, C. M., Juzwik, J., & Martin, F. B. (2002). *Fusarium* spp. and *Pinus strobus* seedlings: root disease pathogens and taxa associated with seed. *New forests*, 24(1), 67-79.

Ocamb, C. M., & Juzwik, J. (1995). *Fusarium* species associated with rhizosphere soil and diseased roots of eastern white pine seedlings and associated nursery soil. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 17(4), 325-330.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2005). *Evaluación de los Recursos Forestales Mundiales 2005*. Roma, Italia: FAO.

Pérez-Sierra A, Landeras E, León M, Berbegal M, Garcia-Jiménez J, Armengol J (2007) Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. in northern Spain. *Mycological Research* 111, 832--839. doi: 10.1016/j.mycres.2007.05.009

Perry J. P. 1992. *The Pines of México and Central América*. Timber Press. Portland, Oregon. USA. 231 p.

Peterson, M. 2008. *Fusarium* species. A British Columbia perspective in forest seedling production. *In*: Dumroese, R. K., Riley, L. E. (technical coordinators). National Proceedings: Forest and Conservation Nursery Associations 2007. Fort Collins (CO): USDA Forest Service, Rocky Mountain Research Station. Proceedings RMRS-P-57: 109-125

Pfenning LH, Costa SDS, Melo MPD, Costa H, Ventura JA, Auer CG, Santos ÁFD (2014) First report and characterization of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker in Brazil. *Trop Plant Pathol* 39(3):210–216

Pinto, P. M., Alonso, J. A. P., Fernández, V. P., & Casero, J. J. D. (2006). Fungi isolated from diseased nursery seedlings in Spain. *New Forests*, 31(1), 41-56.

Prieto R., J.A., E. Merlín B. y M.A. Perales de la C. 2006. Establecimiento de plantaciones para el cultivo de árboles de navidad en clima semiárido. Desplegable Técnica No. 7. Campo Experimental Valle del Guadiana. INIFAP. Durango, Dgo., México. 6 p

Ramírez-Herrera, C., Vargas-Hernández, J. J., y López-Upton, J. 2005. Distribución y conservación de las poblaciones naturales de *Pinus greggii*. *Acta Botánica Mexicana*, (72), 1-16.

Robles Yerena, L., Leyva Mir, S. G., Cruz Gómez, A., Camacho Tapia, M., Nieto Ángel, D., & Tovar Pedraza, J. M. (2016). *Fusarium oxysporum* Schltdl. y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. causantes de la marchitez de plántulas de *Pinus* spp. en vivero. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 7(36), 25-36.

Rodriguez L., R., S. Valencia M., J. Meza R., M. A. Capo A., y A. Reynoso P. 2008. Crecimiento y características de la copa de procedencias de *Pinus greggii* Engelm. Galeana, Nuevo León. *Revista Fitotecnia Mexicana* 31: 19-26.

Rodríguez-Laguna, R., R. Razo-Zárate, S. Valencia-Manzo, J. Meza-Rangel. 2013. Características dasométricas de *Pinus greggii* Engelm. de nueve procedencias en Galeana, Nuevo León. Rev. Mex. de Ciencias Forestales 4

Seifert, K. (1996). *Fuskey: Fusarium interactive key* (No. 632.4/S459). Agriculture and Agri-Food Canada.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2011). Anuario estadístico de la producción forestal 2009. Recuperado de <http://www.semarnat.gob.mx/temas/gestionambiental/forestalsuelos/Anuarios/Vista> 14-09-19

Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales – Comisión Nacional Forestal (Semarnat-Conafor). 2013. Inventario Estatal Forestal y de Suelos. Coahuila 2013. Semarnat. México, D.F., México. 137 p.

Soria Pérez, S. (2010). Determinación de la presencia de *Fusarium circinatum* en plántulas de *Pinus taeda* en vivero y desarrollo de estrategias para su biocontrol.

Solano, B. M., y C. D. Brenes. 2012. Evaluación de métodos de curación de sustratos para la prevención del mal de talluelo. Rev. For. Mesoam. Kurú 9: 63-65

Steenkamp, E. T., Rodas, C. A., Kvas, M., & Wingfield, M. J. (2012). *Fusarium circinatum* and pitch canker of *Pinus* in Colombia. *Australasian Plant Pathology*, 41(5), 483-491.

Storer, A. J., T. R. Gordon, and L. Clark. 1998. Association of the pitch canker fungus, *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*, with Monterey pine seeds and seedlings in California. Plant Pathol. 47: 649-656.

Teixeira, L., Coelho, L., & Tebaldi, N. D. (2017). Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates and resistance of passion fruit genotypes to fusariosis. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 39(3).

Viljoen, A., Marasas, W. F. O., Wingfield, M. J., & Viljoen, C. D. (1997). Characterization of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pinica* causing root disease of *Pinus patula* seedlings in South Africa. *Mycological Research*, 101(4), 437-445.

Viljoen A, Wingfield MJ, Marasas, W.F.O. (1994). First report of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* on seedlings in South Africa. *Plant Disease* 78, 309--312.

Watt, M. S. S. M. S., Ganley, R. J. R. J. J., Kriticos, D. J. J. D. J., & Manning, L. K. L. K. K. (2011). *Dothistroma* needle blight and pitch canker: the current and future potential distribution of two important diseases of *Pinus* species. *Canadian Journal of Forest Research/Revue Canadienne De Recherche Forestiere*, 41(2), 412–424. <https://doi.org/10.1139/X10204>

Wikler, K., & Gordon, T. R. (2000). An initial assessment of genetic relationships among populations of *Fusarium circinatum* in different parts of the world. *Canadian Journal of Botany*, 78(6), 709-717.

Wingfield, M. J., Hammerbacher, A., Ganley, R. J., Steenkamp, E. T., Gordon, T. R., Wingfield, B. D., & Coutinho, T. A. (2008). Pitch canker caused by *Fusarium circinatum* growing threat to pine plantations and forests worldwide. *Australasian Plant Pathology*, 37(4), 319-334.

Wingfield, M. J., Jacobs, A., Coutinho, T. A., Ahumada, R., & Wingfield, B. D. (2002). First report of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, on pines in Chile. *Plant pathology*, 51(3), 397-397.

Whitehead, D. (2011). Modelling the impacts of pests on forest productivity: a pathway through complexities and conundrums. *Tree Physiology*, 31(7), 683-685.

Zagoya, R. Á., Ramírez, M. C., & Muñoz, L. R. (2018). Insectos en plantaciones de *Pinus greggii*, en Durango, México. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*, 9(21), 1205-1215.