

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE AGRONOMIA



**PATÓGENOS INVOLUCRADOS EN LA MUERTE DE PINO *Pinus halepensis*
MILL EN LA ZONA DE REFORESTACION DE ZAPALINAMÉ.**

REALIZADA POR:

LILIA CRUZ CHAVEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Buenvista Saltillo, Coahuila, México Mayo de 2002

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE AGRONOMIA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

**Patógenos Involucrados en la muerte de Pino *Pinus halepensis* Mill en la
zona de Reforestación de Zapalinamé.**

POR:

LILIA CRUZ CHAVEZ

TESIS

**QUE SOMETE A CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE INGENIERO
AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

MC: Ma. ELIZABETH GALINDO CEPEDA

MC: FAUSTINO LARA V.

M.C. ABIEL SÁNCHEZ ARIZPE

M.C. JORGE DAVID FLORES F.

M.C: REYNALDO ALONSO V.

Coordinador de la División de Agronomía.

Buenavista Saltillo, Coahuila Mayo de 2002

TESIS DEDICADA A:

EFRÉN CRUZ CHAVEZ

DEDICATORIAS:

A MIS PADRES:

Venancio cruz Santiago y Ursula Chávez Salazar .

Gracias por su apoyo, su amor, su comprensión, sus consejos y la confianza que siempre han depositado en mi y gracia por estar conmigo siempre. Tengan presente siempre que los quiero hoy y siempre.

A MIS HERMANOS:

Gabino, Efrén, Virginia, Beatriz, Rigoberto.

No tengo palabras para agradecerle todo lo que me han dado y no me que da mas que agradecerles todo el apoyo moral y económico. Gracias por el amor que me han brindado he podido realizar todas mis metas ya que sin ustedes no lo hubiera logrado y recuerden siempre que los quiero mucho y siempre estaré con ustedes en las buenas y en las malas. Los quiero mucho.

A MIS SOBRINOS Y CUÑADA:

Vladimir , Pavel y Guadalupe.

Ustedes son el complemento de la familia y han sido la alegría de la casa, los quiero mucho.

A MI TÍO JOSÉ:

Gracias por sus consejos y por estar conmigo en las buenas y en las malas.

A MI PADRINO LEOBARDO:

Es un ángel que dios me puso en el camino, muchas gracias por la amistad incondicional que siempre me da mostrado, por apoyarme económicamente y por estar cuando más lo necesito.

A MIS PADRINOS:

Elvira Pérez y Guillermo Álvarez

Por la amistad y apoyo incondicional en todo momento.

A ESMERALDA:

Amiga gracias por tu amistad y por estar conmigo siempre cuando te necesito, por tu apoyo incondicional y espero que siempre se mantenga nuestra amistad.

A MIS AMIGOS:

Teodora, , Filomeno, Lilia Pérez, Anacleto, Andrés, Roberto Carlos, Héctor, cristina Sánchez, Silvia Ovalle, M.C. Elizabeth Galindo, gracias a todos ustedes por su amistad y apoyo que me han dado.

AGRADECIMIENTOS:

A DIOS:

Por permitirme llegar hasta este momento y por estar conmigo en todo momento.

A MI "ALMA TERRA MATER"

Por haberme permitido adquirir los conocimientos y por todas las facilidades que nos proporciona.

A LA M.C. ELIZABETH GALINDO CEPEDA:

Por su gran amistad, consejos, apoyo y por su gran disposición y paciencia en la realización de este trabajo. Maestra no tengo palabras para agradecerle todo el apoyo que me brindado siempre en todo momento.

AL M.C. FAUSTINO LARA VICTORIANO:

Gracias por sus sugerencias, el apoyo, por el interés y paciencia que demostró durante la realización de este trabajo.

AL M.C. ABIEL SÁNCHEZ ARIZPE:

Por sus sugerencias y apoyo durante la realización de este trabajo.

AL M.C: JORGE DAVID FLORES FLORES:

Gracias por sus sugerencias y apoyo durante la realización del trabajo.

A LA T. L. Q CRISTINA SÁNCHEZ y SILVIA OVALLE:

Gracias por la amistad, la alegría y el apoyo incondicional que me proporcionaron durante mi estancia en el laboratorio. Espero que nunca cambien y siempre las recordare con mucho cariño.

A LA GENERACIÓN 92 DE PARASITOLOGIA.

Gracias por compartir los momentos mas felices y por la amistad que me brindaron y quiero que sepan que siempre los recordare.

A TODOS LOS MAESTROS DE LA ESPECILIDAD Y A LOS QUE TUVE DURANTE MI CARRERA :

Mil gracias por transmitirme sus conocimientos.

RESUMEN.

El objetivo de este trabajo fue identificar los patógenos involucrados en la marchitez de los pinos *Pinus halepensis* en la zona de reforestación de Zapalinamé para la realización de la cual se siguió la siguiente metodología que consistió en los siguientes pasos: muestreo del área experimental , aislamiento del patógeno, purificación de cepas de hongos y bacterias, inoculación de cepas, Reaislamiento de cepas y la identificación de los patógenos.

Los resultados del estudio revelan la existencia de los siguientes patógenos en las raíces , agujas y ramas: en raíces; *Dematophora sp*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Verticillium sp*, *Monilia sp* y *Agrobacterium tumefaciens.*; en agujas y ramas: *Pestalotia sp*, *Aposphaeria sp*, *Alternaria solani* y *Fusarium subglutinans*.

INDICE DE CUADROS

Cuadro No.1. Características comparativas obtenidas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y según Shaad; 1990-----	31
--	----

INDICE DE FIGURAS

Fig.1-a. Planta completamente sana-----	34
1-b. Haces vasculares completamente sano-----	34
Fig. 2-a. Árbol con agujas cafés intercaladas con agujas verdes intercaladas en la parte basal y apical de la planta-----	35
2-b. Tallo con corteza desprendible-----	35
2-c. Haces vasculares dañados con un avance de 13cm-----	35
2-d. Presencia de resina y corchos en la zona de inoculación-----	35
2-e. Presencia de micelio blanco en la raíz-----	35
Fig.3: Cepa del hongo <i>Dematophora necatrix</i> -----	36
Fig.4-a; Presencia de resina y coloración rojiza en el cambium-----	37
4-b. Presencia de micelio blanco-----	37
4-c. Presencia de micelio en la raíz-----	37

Fig.5. Cepa del hongo <i>Fusarium oxysporum</i> -----	38
Fig.6-a. Agujas amarillentas en la parte apical y necrosis en la parte apical del árbol-----	39
6-b. Presencia de micelio blanco en el cuello del tallo y daño en los haces vasculares-----	39
6-c. Presencia de micelio blanco en la raíz-----	39
Fig.7.Cepa del hongo <i>Fusarium solani</i> -----	40
Fig.8-a. Amarillamiento en las agujas apicales, agujas muertas, ramas laterales muertas contrapuestas con las agujas verdes-----	42
8-b. Muerte apical de agujas por estrangulamiento en la base del tallo--	42
8-c. Presencia de resina, cambium necrótico y corteza desprendible----	42
8-d. Presencia de micelio blanco, oxidación del cambium y oxidación de haces vasculares-----	42
8-e. formación de corchos en los haces leñosos necrosis de los mismos-----	42
Fig. 9.Cepa del hongo <i>Verticillium sp</i> -----	42

Fig.10- a. Amarillamiento total de la planta-----	43
10-b; presencia de micelio en la zona de Inoculación-----	43
Fig. 11. Cepa del hongo <i>Monilia sp</i> -----	44
Fig.12. planta completamente sana-----	44
12-a. Corteza desprendible-----	45
12-b. Presencia de resina y cáncer en la zona de inoculación-----	45
Fig.13. Cepa del hongo <i>Pestalotia sp</i> -----	46
Fig.14-a. Muerte de agujas en la parte apical, central y muerte de ramas en la unión con el tallo-----	48
14-b. Presencia de micelio blanco, resina, y necrosis del cambium-----	48
Fig.15; Cepa del hongo <i>Aposphaeria sp</i> -----	48
Fig.16-a. Plantas completamente muertas-----	49
16-b. Presencia de micelio blanco y resina en la zona de inoculación---	49
16-c. Haces vasculares completamente dañados-----	49
Fig.17. Cepa del hongo <i>Alternaria sp</i> -----	50

Fig.18-a. Muerte de las agujas y ramas en la parte apical del tallo y del árbol--	51
18-b. Presencia de micelio blanco y necrosis en haces vasculares-----	51
18-c. Presencia de micelio, resina, oxidación raíces-----	51
18-d. Presencia de micelio blanco en las y cáncer en la zona de inoculación-----	51
18-e. Muerte de haces vasculares.-----	51
Fig. 19.Cepa del hongo <i>Fusarium subglutinans</i> -----	52

INDICE DE CONTENIDO

INDICE DE CUADROS

INDICE DE FIGURA

RESUMEN

I.- INTRODUCCIÓN-----	1
II.- OBJETIVOS-----	3
III.- HIPÓTESIS-----	3
VI.-REVISION DE LITERATURA-----	5
Origen del <i>Pinus halepensis</i> Mill-----	5
Ubicación taxonómica.-----	5
Descripción botánica.-----	5
Patógenos que atacan a pinos <i>Pinus halepensis</i> Mill-----	5
4.1.- <i>Armillaria mellea</i> -----	6
4.2.- <i>Fomes annosus</i> -----	8
4.3.- <i>Cronartium flaccidum</i> -----	10
4.4.- <i>Crumenulopsis sororia</i> -----	11
4.5.- <i>Diplodia pinea</i> -----	12
4.6.- <i>Lophodermium pinastri</i> -----	15
4.7.- <i>Lophodermium seditiosum</i> -----	17
4.8.- <i>Micosphaerella pini</i> -----	18
4.9.- <i>Lecanosticta acicola</i> -----	20
4.10.- <i>Fusarium subglutinans</i> -----	21

V.- MATERIALES Y METODOS	24
Descripción Del Área	24
Localización	24
Clima	25
Suelo	25
Vegetación	25
Muestreo	26
Método de aislamiento	26
Toma de muestras	26
Aislamiento del hongo	27
Desinfección y secado del material	27
Siembra del material vegetal	28
Aislamiento de cepas	28
Aislamiento de bacterias	29
Siembra de bacterias	29
Purificación de bacterias	30
Identificación de bacterias	30
Patogenicidad en Pinos	32
Evaluación de patogenicidad	33

VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
Reaislamiento	34
<i>Dematophora necatrix</i>	35
<i>Fusarium oxysporum</i>	37
<i>Fusarium solani</i>	39
<i>Verticillium spp</i>	40
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	44
<i>Pestalotia sp</i>	46
<i>Aposphaeria sp</i>	47
<i>Alternaria sp</i>	49
<i>Fusarium subglutinans</i>	50
VII.- CONCLUSION	53
VIII.- LITERATURA CITADA	54

I.-INTRODUCCIÓN

Los bosques son de mucha importancia ya que son los pulmones de la humanidad, en ellos se desarrolla una gran variedad de flora y fauna, además de ser la fuente en donde se recargan los mantos acuíferos. Es fundamental la conservación de los bosques porque de ellos obtenemos muchos beneficios como el oxígeno, la madera, protección de recursos naturales así como el equilibrio ecológico.

En nuestro país los bosques están constituidos por una gran variedad de especies de pinos, adaptados a los diferentes tipos de clima, suelo y alturas sobre el nivel del mar ocupando más de 70% de superficie del territorio nacional.

El uso irracional de los recursos naturales es un problema común en la actualidad y por ello grandes áreas que eran bosques se han perdido y esto ha traído como consecuencia un gran deterioro ecológico, erosión de terrenos, modificación de climas, decremento de mantos freáticos así como un decremento de precipitación pluvial. Este ejemplo claramente lo podemos apreciar en la Sierra de Zapalinamé en donde se llevo acabo el trabajo.

La reforestación es una tarea fundamental para disminuir todos los agraviantes antes mencionados y es quizá la mejor arma para enfrentar el problema. La presencia de las enfermedades en las especies forestales, se debe muchas veces a que son plantadas fuera de su rango ecológico esto con el fin de extender las áreas boscosas; pero en algunos casos las especies utilizadas no logran adaptarse a la región, teniendo como consecuencia que los árboles no crezcan bien y estén sujetos al ataque de las enfermedades. Por todo lo anterior, es muy importante estudiar los factores negativos que están influyendo en el desarrollo de las especies forestales principalmente los de origen biótico.

En 1997 cuando recién llegué a la universidad en los primeros meses conocí la zona de reforestación llamada Zapalinamé, por referencias de catedráticos de la universidad me enteré de que se había perdido la vegetación nativa y la Universidad estaba implementando un plan de reforestación con especies de plantas exóticas. Por algún factor desconocido las plantas están siendo debilitadas y se están perdiéndose los árboles plantados algunos años atrás, el transcurso de mi estancia en la universidad estuve visitando la zona de reforestación lo cual me permitió darme cuenta que los árboles morían con gran rapidez sin importar tamaño o edad aparentemente, especialmente el *Pinus halepensis* comúnmente llamado pino alepo.

Mi interés de conocer que está pasando con los árboles y especialmente lo relacionado con el aspecto fitopatológico hizo que nos planteáramos el siguiente objetivo:

II.- OBJETIVOS

1.- Identificar los agentes involucrados en la marchitez de pino *Pinus halepensis* en la zona de reforestación de Zapalinamé.

III.- HIPOTESIS

El hongo *Fusarium oxysporum* es el principal agente involucrado en la muerte de pino *Pinus halepensis*.

IV.- REVISIÓN DE LITERATURA

Origen: El pino alepo *Pinus halepensis* es originario Siria.

Ubicación taxonómica: Según Sarget, 1965 y Rzedowski, 1979.

Reino-----Plantae
División-----Embryophyta
Orden-----Coníferas
Familia-----Pinacea
Genero-----***Pinus***
Especie-----***halepensis*** Mill.

Descripción botánica: Árbol perenne de la familia de las pináceas que alcanza de 20-22 m de altura, de copa clara y con poco follaje, con el tronco a veces tortuoso y la corteza gris-plateada.

Tallos.- de corteza blanquecina plateada en la juventud, pero de tonos más oscuros y enrojecidos cuando llega a la madurez. Corteza que también se va agrietando con el paso de los años.

Hojas.- Acículas u hojas en forma de aguja, con un milímetro de grosor, fasciculadas en grupos de 2, finas de menos de 1 mm de grosor, de 6-10 cm de longitud, de color verde claro.

Flores .- Florece de marzo a mayo madurando la piña a finales del segundo verano. Esta es alargada y tiene una longitud de entre 6 y 12 cm, presentándose recurvada en un pedúnculo de uno o dos centímetros. La semilla es un piñón gris oscuro provisto de un ala tres veces mas larga que el. La piña puede permanecer cerrada unos cuantos años hasta que por el calor generado en un incendio se abre para así resembrar la zona quemada.

Frutos .-Piñas cónicas, pedunculadas y curvadas, de 6-12 cm de longitud, con escamas aplastadas y ombligo poco saliente. Son de color marrón brillante y persisten varios años sobre el árbol.

http://www.seremirm.minagri.gob.cl/forestacion/Pinus_halepensis/Principal.htm

Patógenos que atacan al pino alepo *Pinus halepensis* Mill.

Patógenos de la raíz: *Armillaria mellea*, *Fomes annosus*, de las agujas: *Diplodia pinea*, *Lophodermium pinastri*, *Lophodermium seditiosum*, *Micosphaerella pini*, *Scirrhia acicola*, de la corteza: *Crumenulopsis sororia* ,

Fusarium subglutinans, *Cronartium flaccidum* (French,1988; Sinclair et al, 1987; Smith y colaboradores, 1992; Terry 1979; Torres,1993).

4.1. *Armillaria mellea* (Vahl) Quel.

Etiología:

Sinónimo; *Armillariella mellea*. Hongo Basidiomiceto de la familia, Agaricaceae que causa pudrición de la raíz y base del tallo (Torres,1993; Agrios,1996).

Hongos con cuerpos fructíferos en forma de seta comestible de color miel, tienen la parte superior cubierta de escamas de color pardo oscuro y aparecen generalmente en otoño formando masas que surgen en la base de los troncos de los árboles enfermos. Se propagan rápidamente mediante unos cordones miceliares oscuros llamados rizomorfos, formados por hifas diferenciadas que son de dos clases: subcorticales y subterráneas (Torres , 1993).

Forma un basidiocarpo suave y carnoso de color amarillento, que generalmente crece en racimos alrededor de los troncos de los árboles. El píleo de los basidiocarpos al principio tienen forma de cúpula pero después se deprime por el centro y el margen se vuelve hacia arriba, dejando a las laminillas completamente expuestas. En los estípetes jóvenes es muy notoria la presencia

de un anillo membranoso blanco (Romero,1988). Crece en medios de cultivo: malta agar 2% o Papa Dextrosa Agar(PDA) (Crop Protection,2000).

Sintomatología:

Presenta una masa laminar de micelio blanco que se observa al descortezar la zona de cuello de la raíz de los árboles, que viene acompañado de los rizomorfos subcorticales (Torres , 1993).

Reduce el crecimiento de las plantas ya sea en forma repentino o gradual. Presenta follaje reducido, amarillento y caída prematura de las agujas. La muerte de ramas en la parte superior de la corona que toma rápidamente un color castaño y después la muerte total de la planta durante el verano. Hay un crecimiento reducido que se observa en forma más apreciable después de que alrededor del sistema central de la raíz muere. La madera primero se ve levemente empapada de agua, ligeramente gris, con el tiempo esto se convierte en amarillo ligero casi blanco, suave, esponjoso, frecuentemente fibroso y marcado por líneas negras sobre la superficie (Sinclair *et al*, 1987).

Epidemiología:

Se desarrollan en todos los países del mundo. Son hongos parásitos facultativos de los más peligrosos, mata rápidamente a las plantas afectadas tanto a jóvenes así como a los adultos . Viven en tocones o en raíces de los

árboles. La infección normalmente se produce en los puntos de contacto de sus raíces con otras raíces enfermas o mediante rizomorfos, sin necesidad de que las plantas presenten heridas (Torres , 1993). Crece en todo tipo de suelos, aunque crece mejor en suelos alcalinos (Llacer y Colaboradores , 1996) y pH neutros (Crop Protection, 2000).

4.2. *Fomes annosus* (Fr) Karst anámorfo: *Trametes radiciperda* (Fr.) Karst.

Sinónimo; ***Heterobasidium annosum***, esta extendido en Europa, Asia, África, Oceanía. En España produce sus mayores daños en los pinares (Crop Protection 2000).

Etiología:

Basidiomiceto de la familia Poliporaceae que causa la enfermedad podredumbre del abeto Rojo. Los cuerpos fructíferos se forman generalmente debajo de la superficie del suelo, son leñosos de tamaño muy variado, su parte superior es de color pardo y el himenoforo de color blanco o amarillento (Torres, 1993).

Sintomatología:

Presenta flujos resinosos que se presentan en la parte baja de los troncos enfermos y caída general de las acículas cuando son golpeados los árboles (Torres, 1993). Hay presencia de árboles muertos o declinados solos o en grupos y árboles tumbados con pudriciones en las raíces. En árboles jóvenes el follaje se torna de un color gris y se caen rápidamente sin ningún síntoma con anterioridad, la caída de las agujas indica la muerte de la corteza y del cambium del cuello de las raíces. Los árboles quizás se tardan en caerse de un año a más antes de su muerte (Sinclair *et al*, 1987).

Epidemiología:

Este hongo vive como saprofito en el suelo, ataca cuando encuentra árboles debilitados debido a que están en condiciones desfavorables de suelo o clima. Sus daños son menores en las masas naturales que en las artificiales al igual que en árboles adultos que en jóvenes. Destruye los tejidos de la raíz, del cuello de la raíz y del tronco y produce una pudrición blanca de la madera. Cuando el árbol muere *Fomes annosus* sigue viviendo en forma saprofita, alimentándose de la lignina de la madera. Se propaga al ponerse en contacto las raíces externas con las sanas (Torres, 1993), requiere una temperatura entre 20° y 30°C, óptimo de 27°C, pH ácido entre 4.5 –5.5 (Llacer *et al*, 1996).

4.3. *Cronartium flaccidum* (Alb y Schw).

Sinónimos ; *Peridermium pini* (Will), *Coleosporium senecionis* (Fr). Esta distribuido por Europa, Siberia, China, India y Japón (Sinclair,1987).

Etiología:

Basidiomiceto de la familia Cronarciaceae que provoca la roya vesicular de la corteza de pinos. Presenta picnidios redondos o irregulares de 2-3mm de color pardo-amarillo. Peridermios salientes, redondeados u oblongos de 3-8mm de color amarillo anaranjado que se abren lateralmente o por la parte superior, dejando las ecidiosporas (cuerpo fructífero en forma de taza y provista de una externa). Los peridermios vacíos son de color blanco. Las uredosoros y teleutosoros se forman en el envés de las hojas de las plantas que presentan la forma de pequeñas pústulas de color anaranjada. La diseminación o propagación es por medio de ecidiosporas, cuyo micelio penetra en la parte viva del árbol, donde inverna y produce los picnidios y peridermios (Torres, 1993).

Sintomatología:

El micelio destruye el liber y cambium de las partes atacadas y se originan deformaciones y chancros acompañados de resinosis. Formación de anillos anuales excéntricos debido a la muerte parcial del cambium. Desecación de

sitios en donde se encuentra el hongo y las acículas presentan ligeros necrosis y por lo tanto se forman pequeñas manchas (Torres,1993).

Epidemiología:

El patógeno requiere una temperatura de 18-22°C y una humedad relativa entre 60 y 80% (Smith *et al*, 1992).

4.4. *Crumenulopsis sororia* (P. Karsten) Groves.

Sinónimo; *Crumenula sororia*. Se encuentra en Finlandia, Francia, Reino Unido, Holanda y en URSS(Smith *et al*, 1992).

Etiología:

Presenta apotecios negros con un himenio gris de 1-1.5mm de diámetro. Ascosporas incoloras con ascas septadas con 0-5 septos, que normalmente miden de 17-23X 5-6um (Smith *et al*, 1992), picnidios negros subgloboides de 0.5mm de diámetro con conidias multicelulares que miden de 30-50X3.5-5.5µ esporulan en Agosto y Septiembre; la formación de chancros probablemente empieza en otoño, principalmente en los nudos siendo su desarrollo más rápido en la primavera siguiente(Smith *et al*,1992).

Sintomatología:

En la corteza presenta pequeñas gotas de resina, presenta chancros en los entrenudos, cuando los chancros están bien desarrollados la muerte de las células cambiables lleva a un aplastamiento de la rama. La enfermedad se desarrolla con rapidez si hay heridas, en árboles con mal crecimiento debido a deficiencia de nutrientes, con mal drenaje, con profundidad y estructuras de suelos inadecuados (Smith *et al*, 1992).

4.5. *Diplodia pinea* (Desm) Kickx anámorfo: *Sphaeropsis ellisii* Sacc.

Sinónimo: ***Botriodiplodia pinea* (Desm) Petr.** Esta ampliamente distribuida en África, América del Sur, Australia, Nueva Zelanda y Europa.

Etiología:

Deuteromyceto de la familia Sphaeropsidaceae, forma picnidios pequeños de color negro más o menos esféricos, en su interior se van formando las conidias de forma elíptica con extremos redondos. Al principio son de tipo *Sphaeropsis*

hialinos y desprovistos del tabique , pero al madurar van adquiriendo gradualmente el color pardo y el tabique transversal característico del tipo *Diplodia*. Pueden penetrar por medio heridas de podas, picaduras de cercópodos y áfido, lesiones por heladas , granizo, viento o a través de las aberturas naturales como son los estomas o lenticelas de las hojas (Torres, 1993).

Sintomatología:

Decoloración parda-rojiza del follaje de los pinos y defoliación inmediata, brotes periféricos, curvados, secos y quebradizos de las ramillas mas externas de la copa. Lesiones en forma de acanaladura, depresiones, estrangulamientos, acompañadas de resinosis que aparecen en troncos y ramas (Torres, 1993). Marchitez y muerte de ramas inferiores causada ambas por cáncer y después la destrucción y herida acumulativa de yemas y vástagos. La destrucción anual de muchas yemas y vástagos causa gradualmente la caída de la agujas. Lesiones de los tejidos presentan resina y una coloración parda rojiza oscura y estos frecuentemente exudan la resina. Cuando la enfermedad es muy severa los racimos de yemas se marchitan y las ramas están deformadas. Las lesiones aumentan rápidamente e infectan las yemas y retoños y estos suspenden antes su crecimiento o durante la elongación de las agujas (Sinclair *et al*, 1987). La madera presenta una decoloración negra y después la muerte de los árboles (Scharpf, 1993).

Durante la primavera recién emergida el follaje ocurre el bronceado de inmediato en la base de las agujas y hacia las puntas hasta que estas se mueren completamente. Usualmente las agujas infectadas están debilitadas y se tornan o se ponen amarillas antes de morir. La infección se propaga sobre los vástagos de las agujas y ocurre totalmente en el follaje del año y sobre la infección de las heridas es usualmente muerte y próxima muerte regresiva en las ramas (Terry, 1978). Bajo condiciones favorables, las ramas grandes pueden ser estranguladas a un determinado nivel por la fusión de varios canceres y después, se observa un desprendimiento de la cubierta cortical, que deja expuestos parcialmente cuerpos fructíferos del hongo (Romero,1988).

Epidemiología:

Es un hongo que vive en forma saprofita sobre los restos leñosos pero puede adquirir virulencia una vez introducida dentro del tejido y llegar a producir daños severos bajo el efecto de ciertos factores tales como podas, plagas de insectos, sequías, suelo poco profundos, pobres y pedregosos y la utilización de repoblaciones artificiales de especies alejadas de sus áreas naturales de distribución. El patógeno necesita temperaturas de 12-36°C, el óptimo es de 28°C (Sinclair *et al*, 1987).

4.6. *Lophodermium pinastri* (Fr) Chev.

Sinónimo: ***Leptostroma pinastri* Des**, se encuentra reportado en Carolina del Sur ,en el Oeste de Washington y Oregon (French,1988).

Etiología:

Causa la caída de las agujas de los pinos enfermedad llamada tizón de las agujas de los pinos. El hongo infecta las agujas de los pinos durante el verano y caen en invierno en la siguiente primavera se desarrollan manchas pardas, con márgenes amarillas y estas infecciones vuelven nuevamente a finales de Abril, Mayo y hasta Junio. La infección es menor cuando ataca partes de la planta que cuando ataca en su totalidad, que es lo más frecuente(French, 1988).

Las fructificaciones del hongo pueden formarse cuando las hojas aun están en el árbol, o hasta que caen al suelo, aunque la maduración normalmente ocurre en este ultimo (Romero, 1988).

Durante el próximo verano se forma la histerotecia y como por Agosto hasta Octubre estos ascocarpos absorben humedad, se maduran y se liberan las ascosporas las cuales son diseminados por el viento (French,1988).

Hongo de color gris oscuro ligero en las agujas, con obscurecimiento definido en el margen de la pared con o sin ostiolas, es un parásito obligado (Vázquez,1992).

Presenta apotecios, cubierto por un estroma negro grueso, se abre al madurar y presenta ascosporas alargadas (Alexopoulos *et al*, 1996).

Sintomatología:

En otoño, hojas infectadas de un color verde opaco a rojo púrpura y en la primavera siguiente se forman manchas necróticas, las hojas mueren y finalmente se caen (Romero, 1988). En las agujas hay líneas estromáticas negras (Smith *et al*,1992).

Epidemiología:

En condiciones de estrés hay una caída prematura de agujas (Smith *et al*,1992). Forman pequeñas manchas con halos amarillos alrededor de ellas, esto ocurre en las agujas del año anterior, es mas severo en la parte baja del árbol aunque quizás es infectado uniformemente, este patógeno es favorecido por inviernos benignos y veranos húmedos(Terry, 1978).

4.7. *Lophodermium seditiosum* Minter, Stanley & Millar.

Este patógeno se encuentra en Polonia, Holanda, Escandinavia, Reino Unido, Yugoslavia, Europa del Norte y Central y América del Norte (Hansen & Lewis ,1997).

Etiología:

Produce cuerpos fructíferos negros elípticos, es decir, apotecio o histerotecia. Apotecio de 0.5-1.8mm de largo, produce picnidios (Smith *et al*,1992). Presenta un ascomata conspicuo, brillante, negro, ovoide o elipsoide levantado sobre la superficie de las agujas. Las ascosporas son largas y filiformes con una cubierta gelatinosa (Hansen & Lewis ,1997).

Sintomatología:

Causa empardecimiento y caída de agujas de las plántulas, transplante y árboles jóvenes en plantación. Defoliación prematura de agujas verdes en árboles maduros. En árboles jóvenes se presenta empardecimiento ocasional de las agujas , en las ramas y hasta en el árbol totalmente, en árboles viejos a veces solo empardecen las agujas de un lado de la rama. En las células epidérmicas se presentan manchas amarillas diminutas que después se empardecen, en árboles de un año las agujas presentan manchas castaño con

bordes amarillos y muerte de las puntas de las agujas , a lo largo los vástagos muestran como si las agujas estuvieran tiradas. La planta presenta una reducción en la capacidad fotosintética (Smith *et al*,1992).

Epidemiología:

El hongo requiere una temperatura de 20°C y una humedad relativa de 100% (Smith *et al*,1992).

4.8. *Micosphaerella pini* anámorfo: *Scirrhia pini*

Sinónimo: *Dothistroma pini*, *Septoria pini*, se encuentra distribuido en Canadá, Inglaterra, África y sur de América (Crop Protection,2000).

Etiología:

Presenta picnidios oscuros, separados, globosos, ostiolados, conidias hialinos, alargados o filiformes multiseptados (Romero,1988).

Sintomatología:

Manchas amarillas aparentemente nunca al final de la estación del crecimiento. Estas manchas que son en forma circular u oblonga torna de un color gris a pardo rojizo , la decoloración de las agujas en circulo resulta superior al final de la banda y la decoloración del tejido torna a gris (French,1988).

Presenta manchas necróticas más o menos circulares bien delimitadas, rara vez difusas y con numerosos puntos negros que son los picnidios, se presenta una defoliación y debilitamiento de las plantas (Romero,1988).

Los primeros síntomas son manchas amarillas en el sitio de la infección , estas se tornan a pardo rojizo y son alargados, producen bandas rojas características cerca de las agujas. La parte distal de las agujas aunque no la base infectada pueden quedar restos de color verde durante algún tiempo. Frecuentemente casi o todo el follaje de los árboles se infecta, los que son severamente infectados exhiben una apariencia de cola de león y solamente con muy pocas agujas se quedan al final en las ramas (Scharpf,1993). En especies muy susceptibles hay caída prematura de las agujas (Smith *et al*,1992).

Epidemiología:

El hongo requiere una temperatura de 5-25°C (Sinclair et al, 1987).

4.9. *Lecanosticta acicola*, anámorfo: *Septoria acicola*,

Sinónimo: ***Micosphaerella dearnessii*, *Scirrhia acicola***, se encuentra en Europa y Norte de Siberia (Hansen & Lewis ,1997).

Etiología:

Presenta un estroma conidial, la conidia forma un acérvulo en un estroma negro, son cilíndricos, curvados de color verde olivo o castaño y tienen de 1-4 septos. Las células son hialinas, oblongas y bicelulares (Hansen & Lewis ,1997). Son maduradas cuando hay lluvia, rocío y neblina y son dispersadas por el viento (French, 1988).

Sintomatología:

Los síntomas se presentan como manchas frecuentemente aumentadas cerca de las bandas de las agujas y causa la muerte de la parte superior de las bandas. En el sur aparecen los síntomas en cualquier tiempo del año pero mas común en Mayo a Octubre. Los síntomas son retrasados hasta Junio a Julio en el Llano Central y hasta Agosto en la Región de Great Lakes. Las lesiones son de dos tipos, cada uno mide cerca de 3mm de ancho. El mas común es el que inicialmente es un amarillamiento falso convirtiéndose en castaño ligero con bordes oscuros. Las lesiones de este tipo sobre las agujas de los pinos de hojas largas eventualmente aparecen levantados porque los tejidos infectados en

medio de las lesiones disminuyen la muerte de las agujas. El segundo tipo de síntomas consiste en manchas castañas sobre bandas ámbar-amarillentas. El tejido amarillo está cubierto con resina. Las agujas enfermas frecuentemente tienen tipos de muertes; la zona central con manchas severas en tejidos verdes y bases verdes. Agujas con muchas lesiones moteadas y las que se mueren gradualmente se caen, tornan de un color rojizo pardo y lentamente adquieren un color parduzco o matiz (Sinclair *et al*,1987).

Epidemiología:

El hongo requiere una temperatura óptima de 30°C (Hansen & Lewis ,1997).

4.10. *Fusarium oxysporum* var. *subglutinans*, teléomorfo: *Gibberella fujikurui* var. *subglutinans*.

Sinónimos : *Fusarium subglutinans*, *Fusarium subglutinans* f. sp. *Pini*

Etiología:

Produce macroconidias en un esporodoquio anaranjado pálido, son largos, usualmente delgados , casi rectos, usualmente de 3 a 5 septos y con pared delgado, están producidas por monofiálides sobre cadenas de conodioforos en

un esporodoquio raramente por monofiálides formadas directamente sobre las hifas. Microconidias usualmente ovals, elípticas o alantoides de 0 a 1 septo (Burguess *et al*,1988).

Sintomatología:

El primer síntoma es la filtración de resina en las lesiones de los vástagos, el desarrollo de pequeñas ramas y canceres sobre ramas grandes y troncos de plantas perennes. El cáncer en plantas perennes es eventualmente rodeado por partes afectada de los restos de la cara de la corteza. Usualmente forman exudados de resina en la lesión y puede correr debajo de la de la corteza o gotear en el follaje . Las agujas rodeadas de vástagos y ramas tornan de un color amarillo a gris. El síntoma más común quizás sea la muerte por heridas del limbo, canceres del tronco (Sinclair *et al*, 1987).

Los primeros síntomas están asociados con canceres sobre los árboles. El síntoma clásico es el exudado resinoso de cáncer sobre los troncos terminales, ramas grandes y raíces expuestas. El cáncer se presenta frecuentemente en la corteza retenida y la madera de abajo.

Otros síntomas es la muerte descentente en la corona superior resultante de la formación de canceres en las ramas. Como en las ramas con heridas son rodeados por el hongo, las agujas tornan de un color amarillo a rojizo castaño. La muerte por las heridas severas quizás permanecen en la corona por años y

sirve de indicador de las enfermedades. Presenta infecciones de estructuras vegetativas y reproductivas, es decir, causa la muerte de flores hembras, de conos maduros, deterioro de semillas y reducción de crecimiento de las plantas (Hansen & Lewis ,1997).

Epidemiología:

Temperatura optima de 24°C (Sinclair et al,1987).

V.-MATERIALES Y METODOS

El siguiente trabajo se llevó a cabo en la zona de Reforestación Zapalinamé ubicado en la carretera Saltillo-Zacatecas , en el laboratorio de Fitopatología y en el Invernadero del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" en el periodo Mayo-Diciembre de 2001.

5.1. Descripción del área de estudio

5.1.1. Localización:

El área de reforestación compuesta de Pino alepo (*Pinus halepensis*) y otros, está situada entre los límites de la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro". Las coordenadas en que se encuentra localizada dicha área son 100° 59' 57" y 101° 02' 00" de longitud Oeste; 25° 20' 00" y 25° 23' 42" latitud Norte, la altitud que presenta va desde los 1620 hasta 1985 msnm, comprendiendo una superficie aproximadamente de 2000has.

Clima:

El área presenta un clima semiárido con una precipitación total anual media de 289.5mm, en donde la temporada lluviosa se presenta de Junio a Octubre, siendo el mes de Julio el más lluvioso y Marzo el mes más seco, con temperaturas que van de 19.8°C como media anual y registrándose mínimas de -15°C y máximas de 38°C, además presenta heladas que va de los meses de Octubre-Noviembre siendo menos severas que las que se presentan en Enero-Marzo hasta Abril. La evaporación total anual en promedio es de 3000mm a 750mm (Mendoza, 1983)

Suelo:

El área de reforestación presenta suelos que corresponden a las formaciones cuaternarias con asientos basálticos presentando un subsuelo que se caracteriza por la presencia de estratos continuos de caliza. Textura que va de franco a franco arcilloso. El pH va de 7.5-8.5 con un espesor de 30cm a 2m (De Luna, 1989).

Vegetación:

La zona de reforestación de Zapalinamé se encuentra compuesta de en su mayoría por la especie de pino alepo (*Pinus halepensis*) aproximadamente en un 80% de la superficie total, el 15% por pino piñonero (*Pinus cembroides*) y el

resto de la vegetación corresponde a *Cupressus arizonica* , lila, trueno, fresno, gobernadora, mezquites, biznagas.

5.2. Muestreo

El área de reforestación de Zapalinamé esta dividido en tres estratos, para la realización de este trabajo se dividió cada estrato en 3 sitios de acuerdo a las edades de los árboles que va de 10-20 años, 20-30 años y 30-40 años, dichos sitios se seleccionaron al azar y se midió un área de 100m², con la finalidad de facilitar el área de muestreo.

5.3. Aislamiento de patógenos:

Antes de empezar utilizar la cámara de flujo laminar es necesario prenderla 15 minutos antes, luego desinfectarla con alcohol y limpiarla, esto con la finalidad de evitar la contaminación de la siembra con organismo presentes en el ambiente y en cuando a la asepsia que debe realizar la persona que va a sembrar el tejido vegetal es la siguiente: se debe de desinfectar las manos con alcohol, no hablar durante la actividad o utilizar cubrebocas y finalmente en cada utilización de los materiales requeridos es necesario desinfectarlos con alcohol y flamearlos en el mechero.

5.3.1.Toma de muestras:

Para determinar la presencia de patógenos en las muestras de material vegetal traídas del área de muestreo, se procedió a tomar muestras de raíz, ramas, corteza, tallos y agujas que presentaban síntomas de amarillamiento necrosis y muerte de estas, todo esto se realizo con la ayuda de palas, picos, motosierras, machetes. Las muestras tomadas se introdujeron en bolsas de papel destreza y se identifico con el numero de sitio y estrato correspondiente.

5.3.2. Aislamiento de hongos:

5.3.2.1.Desinfección y secado del material vegetal:

El tejido vegetal tomado de la parte que presentaban síntomas en los pinos en cada uno de los sitios se trajeron al laboratorio, para desinfectar el material vegetal se realizaron cortes de tejido de aproximadamente 1cm y se dejo en un matraz con hipoclorito de sodio al 3% por espacio de 3 minutos y posteriormente se dejo en agua destilada estéril por espacio de dos minutos (repetir dos veces este paso) esto con la finalidad de quitar el exceso de cloro. Por ultimo se colocaron los trozos de tejido desinfectado en papel estéril destreza en la cámara de flujo laminar para su secado .

5.3.2.2. Siembra del material vegetal:

El material vegetal de las muestras ya desinfectadas se sembraron en medios de cultivo Papa Dextrosa Agar acidificado (PDA), Agar Nutritivo (AN) y Jugo de V8 (V8) con la ayuda de unas pinzas se toma cada uno de los trozos de tejido y se colocan dentro de la caja petri con medio de cultivo, se puede colocar de uno hasta ocho trocitos de tejido en cada caja y de esta manera se sembraron toda el material vegetal traído de cada sitio y finalmente se etiquetaron y se sellaron las cajas con Kleen Pack , se colocaron en incubadora a una temperatura de 24°C por siete días para posteriormente realizar el aislamiento de las cepas.

5.3.2.3. Aislamiento de cepas:

De cada cepa diferente en color y forma se tomo un explante con el sacabocados para aislarlo de los demás hongos y así obtener las diferentes cepas que posteriormente se van a purificar.

5.3.2.4. Purificación:

De las cepas aisladas se procedió a realizar la purificación de los hongos. Los hongos que presentaron cuerpos fructíferos se purifico por cultivos monóspóricos y los hongos que solo presentaron crecimiento micelial se realizo

por punta de hifa. La cantidad de cepas purificadas fueron 100 las cuales se utilizaron en la inoculación.

5.3.3.1 Aislamiento de bacterias:

Del material vegetal traída del muestreo se tomo de manera directa y principalmente de la corteza del tejido se realizo cortes de aproximadamente de 1cm, de las cuales fueron colocados en un matraz con agua estéril durante 2 minutos, posteriormente se cambia el tejido en un tubo de ensaye y se deja reposar durante quince minutos, después se procede a realizar las diluciones pero para ello es necesario sacar el tejido de la solución ya que esto se tomo como solución madre.

5.3.3.2. Siembra de bacterias:

Para este caso se utilizo la siembra por dilución de 10^{-1} hasta 10^{-6} , primeramente se requirió preparar tubos de ensaye con nueve mililitros de agua destilada estéril , después de la solución madre se toma un mililitro y se coloca se toma 1ml de la solución madre con la ayuda de pipetas para realizar la primera dilución 10^{-1} y así sucesivamente hasta llegar a la ultima dilución 10^{-6} posteriormente se coloca 0.1ml en cada caja petri con medio de cultivo KB y se distribuyó dentro dicha caja con la ayuda de el triangulo bacteriológica previamente desinfectada con alcohol y flameada. Finalmente se etiquetaron,

se sellaron las cajas con Kleen Pack y se colocaron en incubadora a una temperatura de 24°C durante ocho días.

5.3.3. 3. Purificación de bacterias:

La purificación de las cepas se realizó de la siguiente manera: primeramente se observa en el microscopio las colonias bacterianas que crecieron en las en el medio de cultivo, para seleccionar las colonias se debe observar su tamaño que debe ser pequeño y de aspecto mucoso, y de estas bacterias que presentaron dichas características con la ayuda de una asa bacteriológica se toma una porción de la colonia bacteriana la cual mediante una estría seriada se transfiere al medio de cultivo KB para su purificación posteriormente se sello, se etiquetó y finalmente se colocó en la incubadora a una temperatura de 24°C. Transcurrido 24 horas después de la siembra se toman las colonias aisladas y se transfiere al medio de cultivo KB y de esta manera se tiene una cepa bacteriana pura.

5.3.3.4. Identificación de Bacterias

Para el caso de bacterias fitopatógenas a las 24hrs se realiza la Tinción de Gram y se observa al microscopio, las características que deben presentar dichas bacterias son; tinción de color rojo y bacterias en forma de bacilos pequeños. Para identificar géneros y especies se realizaron las pruebas preliminares que fueron: Oxidación/fermentación, catalasa, oxidasa, las pruebas

bioquímicas como son: hidrólisis de almidón , hidrólisis de esculin y la utilización de citratos y diferenciales específicas que en este caso fue D1-M ya que con las dos primeras pruebas se sospechaba que era el genero Agrobacterium y para determinar la prueba de patogenicidad se hizo inoculación en zanahoria. De todas las 17 cepas aisladas solamente una cepa resulto bacteria fitopatógica.

Cuadro No. 1: Características obtenidas de las bacterias y características según Shaad; 1990.

Pruebas realizadas	Resultados	Resultados según Shaad
Tinción de Gram	-	-
Prueba de RYO	+	+
Reacción de catalasa	+	+
Reacción de oxidasa	+	+
Prueba de Oxidación y fermentación	+	+
	-	-
Hidrólisis de almidón	+	+
Hidrólisis de esculin	+	+
Desarrollo en D1-M	+	+
Utilización de citratos	+	+
Prueba de patogenicidad en zanahoria	+	+

Según el cuadro comparativo indica que la bacteria es de Agrobacterium tumefaciens dado que las características obtenidas coinciden con lo que cita Shaad;1990.

5.4. Patogenicidad en pinos.

Para poder determinar las pruebas de patogenicidad realizo lo siguiente manera:

Primeramente se colocaron las plantas en una cama dentro del invernadero que fue previamente lavada, luego se colocaron las plantas y se le pusieron etiqueta . El segundo paso fue realizar la herida en los tallos de los pinos con la ayuda de pinzas estériles , después se colocaron los vasos desechables, estos estaban cortados de un lado y en el centro para poder introducirlos en los tallos de los pinos y se sellaron con cinta adhesiva para evitar la perdida de humedad del material de inoculación. Para poder inocular se colocaron aproximadamente 50g de suelo estéril en los vasos de la licuadora con agua destilada estéril y el patógeno, todo esto se realizo en el laboratorio, esta metodología se realizo en las 100 cepas puras que se utilizaron para la inoculación y una cepa de bacteria, se llevo al invernadero y se vació el 50% del material en los vasos desechables previamente colocados, de cada cepa se hicieron dos repeticiones , posteriormente se procedió a tapar los vasos con sus respectivas tapaderas y finalmente se sellaron con Plastilina para evitar la dispersión y contaminación de los patógenos en el invernadero (Colquhoun & Harry, 2000).

En cuanto al riego esto se realiza diariamente o cada tercer día según las necesidades de las plantas.

5.5. Evaluación de patogenicidad.

Transcurrido un periodo de 35 días de haber realizado la inoculación se procedió al la evaluación de los síntomas de cada una de las cepas tomando en cuenta la presencia de resina, canceres, micelio en el punto de entrada, presencia de micelio en las raíces, amarillamiento de la planta para que con ello poder determinar si es o no un fitopatógeno a pinos alepo (*Pinus halepensis*). Después de la evaluación se procedió a reaislar los hongos fitopatogenos para comprobar si realmente son los responsables en los síntomas que presenta los pinos en la zona de reforestación de Zapalinamé.

5.5. Identificación de los patógenos.

La siembra de estos hongos fitopatogenos se realizo en el medio de cultivo PDA, transcurrido siete días de la siembra se procedió a realizar montajes para caracterizar cada uno de las estructuras que presento el hongo y con la ayuda de claves de Barnett & Hunter, 1998; Booth, 1977; Denniss, 1978.

VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son los siguientes: las plantas que se utilizaron como testigos no hubo ningún tipo de síntomas ni en las agujas ni a nivel vascular como se puede apreciar en las figuras 1-a y 1-b.



Fig.1-a: Planta completamente sana completamente



1-b; Haces vasculares sano.

6.1. Reaislamiento.

De las 100 cepas inoculadas , únicamente se obtuvieron 8 cepas de hongos fitopatógenas, en cuanto a la bacteria no fue necesario volver a reaislarlo dado que no mostró ningún tipo de síntomas ni en la raíz, agujas y ni a nivel de haces vasculares.

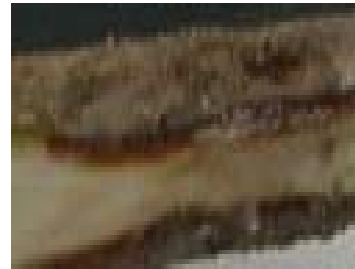
6.2.1. *Dematophora necatrix*: teléomorfo; *Rosellinia necatrix*.

Síntomas:

En los árboles se observaron agujas de color café intercaladas con verdes en la parte apical y basal (Fig.1-a) , presentando tallo con corteza desprendible (Fig.1-b), haces vasculares dañados con un avance de 13cm y la zona de inoculación que fue a nivel del cuello de la raíz se observó un color rojizo(Fig. 1-c), con presencia de cáncer y de corchos (Fig.1-d) y en las raíces hubo presencia de micelio de color hialino (Fig.1-e).



Fig. 2-a; árbol con agujas café intercaladas con agujas verdes intercaladas en la parte basal y apical de la planta



2-b; Tallo con corteza desprendible.



2-c; Haces vasculares dañados con un avance de 13cm.



2-d; Presencia de resina y corchos en la zona de inoculación.



2-e; presencia de micelio blanco
en la raíz.

La cepa de este hongo presento un crecimiento micelio esponjoso de color blanco a los tres días (Fig.2) posteriormente cambia a un color negro. Las características de este hongo es que produce un micelio de obscuro con hinchamiento que se encuentran a nivel del septo , no hay formación de conidias solamente hay rizomorfos y el hinchamiento característico de las hifas esto coincide con lo que reporta; Gilman, 1963, Romero,1988. Este hongo es reportado que causa la pudrición de raíz en varias especies (Smith *et al*,1992).

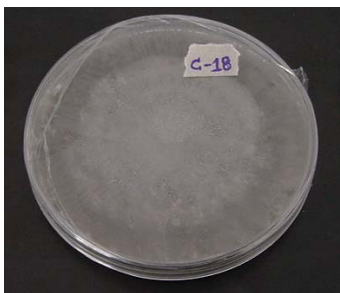


Fig.3: Cepa del hongo *Dematophora necatrix*.

Produce tres tipos de esporas: ascosporas, conidia en coremios en estado de *Dematophora* y clamidosporas en medio de cultivo pero no se puede ver esto en campo (Smith *et al*,1992).

Diámetro: ascas de 365-380 X 8.5-9.0micras, ascosporas de 43-47 X 7.0 micras, conidióforos de 3.0 micras (Landaluce, 1971).

6.2.2. *Fusarium oxysporum*.

Las plantas mostraron resinosidad así como una coloración rojiza en el cambium(Fig. 3-a), en la zona de inoculación esta planta presento micelio blanco (Fig. 3-b) y finalmente en las raíces se aprecia la presencia de micelio blanco(Fig.3-c).



Fig.4-a; Presencia de resina y coloración rojiza en el cambium.



4-b; Presencia de micelio blanco.



4-c; Presencia de micelio en la raíz.

Este hongo presenta un micelio de color variable que va de un color rosa a violeta o morado oscuro con un pobre desarrollo aéreo en el medio de cultivo a los tres días, cambiando a rojizo a los siete días en el medio de cultivo (Fig.4-a). Microconidias ovales o elipsoides, mono o bicelulares se forma en fiálides cortas no ramificadas, nunca en cadenas, agrupadas en falsas cabezuelas o capítulos. Presento macroconidias de 3-5 septos, ligeramente curvados con una célula, basal pedicelada formadas en fiálides y finalmente en un esporodocio. Esto coincide con lo que dijo (Smith y Colb, 1992; Barnett & Hunter, 1998).

Diámetro de las conidias: 34-45 micras de largo X 4.2 micras de ancho (Landaluce, 1971).



Fig.5: Cepa del hongo *Fusarium oxysporum*

6.2.3. *Fusarium solani*:

Síntomas:

Las plantas presentaron de color amarillamiento en la parte apical y una necrosis en la parte apical del árbol(Fig.5-a), en la zona de inoculación de las plantas es decir, a nivel de cuello del tallo se muestra un micelio blanco y daño en los haces vasculares una coloración rojiza y oxidación en el cambium (Fig.5-b) y micelio de color blanco en las raíces(5-c).



Fig. 6-a; Agujas amarillentas en la parte apical y necrosis en la parte apical del árbol.



6-b; Presencia de micelio blanco en el cuello del tallo y daño en los **haces vasculares**.



6-c; Presencia de micelio blanco en la raíz.

Este hongo presentó un crecimiento micelial abundante de color violeta usualmente esparcida en el medio de cultivo(Fig.6), produjo una gran cantidad

de micro y macroconidia en un esporodoquio hialino a si como clamidiospora, todas estas características fueron observadas en las cepas aisladas, presenta conidióforos alargados, microconidias formadas en falsas cabezuelas sobre monofiálides muy largos, tienen de 1-2 células, son ovaes elipsoides o reniformes, macroconidias gruesos, de 3-4 septos, no puntiagudos; estas características coinciden con lo que reporta Romero, 1988; Burgess et al,1988.

Pared gruesa formada por monofiálides sobre los conidióforos ramificados en un abundante esporodoquio de color crema, anchura máxima de 4.5-5.5 micras, masa de esporas. Clamidiosporas presentes después de dos semanas según Romero, 1988; Burgess et al,1988.



Fig.7; Cepa del hongo *Fusarium solani*

6.2.4. *Verticillium sp*:

Síntomas:

La planta presento amarillamiento en las agujas apicales, base y puntas café y muerte de las mismas, ramas laterales completamente muertas contrapuestos con las ramas verde(Fig.7-a). También hubo muerte de agujas

en la parte apical por estrangulamiento y enrollamientos muerte de las agujas que se encuentran en la base del tallo(Fig.7-b). En la zona de inoculación la planta muestra presencia de resina, en el cambium se observa una zona necrótica y la corteza es fácilmente desprendible(Fig.7-c), presencia de micelio blanco y oxidación en el cambium, oxidación en los haces vasculares de 15cm(Fig.7-d), se observo la formación de corchos en los haces leñosos que estaba completamente necrótico (Fig.7-e).



Fig.8 -a; Amarillamiento en las agujas apicales, agujas muertas, ramas laterales muertas contrapuestas con las agujas verdes



8-b; Muerte apical de agujas por estrangulamiento en la base del tallo.



8-c; Presencia de resina, cambium necrótico y corteza desprendible.



8-d; Presencia de micelio blanco, oxidación del cambium y oxidación de haces vasculares.



8-e; formación de corchos en los haces leñosos necrosis de los mismos.

Presento poco crecimiento de micelio al medio de cultivo de color blanco a los 3 días y a los 7 días cambio a un color blanco- amarillento con poco micelio aéreo(Fig.8), presentando conidióforos delgados, hialinos, conidias ovaladas producidas en una cabezuela y dispuestas en forma verticilada(5-f) (Smith y Colaboradores,1992).



Fig. 9; Cepa del hongo *Verticillium sp*

Es uno de los patógenos involucrados en la marchitez y presenta conodioforos delgados, ramificados , conidias ovals o elipsoidales, hialinos, unicelulares producidos apicalmente, solitarias o en pequeñas cabezuelas (Romero,1988). La disposición de las conidias sobre el conidióforo es en forma verticilada estas

características se observaron en el montaje que se realizo para identificar este patógeno. Forma microesclerocios hialinos, pardos oscuros o negros (Barnett & Hunter 1996; Smith y Colaboradores ,1992).

6.2.5. *Monilia sp*:

Síntomas:

Las plantas presentaron amarillamiento de las agujas distribuido en su totalidad (9-a) y hubo presencia de micelio blanco en la zona de inoculación(9-b)



Fig.10 -a; Amarillamiento total de la planta



10-b; presencia de micelio en la zona de Inoculación.

Este hongo presento un crecimiento de micelio de color blanco que al madurar se pone negro en el medio de cultivo como se puede apreciar en la Fig.10.

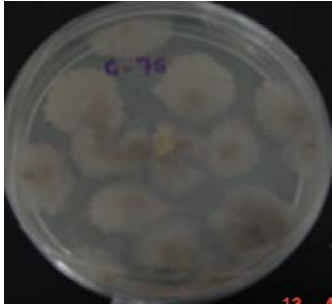


Fig. 11; Cepa del hongo *Monilia* sp.

Presenta conidióforos cortos con conidias ovales, unicelulares en cadenas hialinas, apotecios pedicelados, suaves, carnosos, en forma de copa o disco; ascas cilíndricas, hialinas con pedicelo corto; ascosporas ovales o elípticas con los extremos redondos. Esto coincide con lo que cita Barnett & Hunter, 1996)

Diámetro: macroconidias de 10-28 micras X 7-11 micras y microconidias de 2.1 a 4 micras (Walker, 1973).

6.2.6. *Agrobacterium tumefaciens*:

Síntomas:

Las plantas que fueron inoculadas con esta bacteria se encontraron completamente sanas sin ningún tipo de síntomas como se puede ver en la Fig. 11). Esta bacteria esta reportan como habitante normal de suelos forestales y que requiere de daño físico la planta para poder penetrar en ella. Aunque en este estudio las plantas si tenían heridas la bacteria no manifestó

síntomas dado que tal vez no encontró las condiciones para su desarrollo y tal vez requería de mayor tiempo.



Fig.12; planta completamente sana.

Según Smith,1992 los síntomas característicos de *Agrobacterium* son que al principio se manifiesta en forma de pequeños hinchazones o crecimiento excesivo de que se inicia a partir de células transformadas en cualquier parte de la planta pero especialmente cerca de la superficie de tallo(cuello) estos son tejidos endurecidos de color parda oscura.

Formación de agallas en raíces y tallos, especialmente en el cuello de la raíz,. En plantas jóvenes con grandes y numerosas agallas tienden a estar impedidas y predispuestas al daño por sequía y el invierno (Sinclair,1987).

No se presento ninguna de las características antes mencionadas por los anteriores autores en la evaluación.

Patógenos aislados en agujas y ramas (corteza):

6.2.7. *Pestalotia* sp

Síntomas:

Los síntomas que se observaron en las plantas inoculadas con este hongo fueron corteza fácilmente desprendible(Fig.12-a) y en la zona de inoculación hubo presencia de resina y cáncer(Fig.12-b).



Fig.13-a; Corteza desprendible



Fig.13-b; presencia de resina y cáncer en la zona de inoculación

Este hongo presenta un crecimiento micelial de color café amarillento, a los tres días hubo poco crecimiento aéreo en el medio de cultivo y a los siete días hubo formación de picnidios(Fig.13), al realizar un corte de este picnidio observaron conidias de color negro con apéndices.

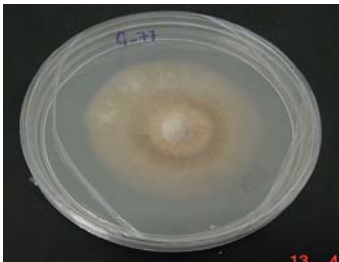


Fig.13; Ceba del hongo *Pestalotia* sp.

Presento conidias oscuras multicelulares con células terminales puntiagudas las cuales tienen dos o más apéndices apicales e hialinos, se presentan en conidióforos simples y cortos agrupados en un acérvulo (Romero, 1988; Barnett & Hunter, 1998; Smith y Colb, 1992, Sinclair et al,1987).

Presenta mancha amarilla y parda que va progresando como manchas cerca de la base de las agujas. Hay una marchitez en las heridas, esto ocurre cuando las lesiones son suculentas (Sinclair et al, 1987); estos síntomas coinciden con los obtenidos en la evaluación de las plantas utilizadas en pruebas de patogenicidad.

6.2. 8. *Aposphaeria* sp:

Síntomas:

Las plantas mostraron muerte de agujas en la parte apical del árbol y muerte de ramas en la unión con el tallo y en la parte central de la planta(Fig.-14-a) y zona de inoculación hubo presencia de micelio blanco, necrosis ,resina, haces vasculares necróticos y cambium necróticos (Fig.14-b).



Fig.14-a ; Muerte de agujas en la parte Apical, central y muerte de ramas en la Unión con el tallo.



14-b; presencia de micelio blanco, resina, y necrosis del cambium.

Crecimiento de micelio abundante de color blanco a los tres días y que cambia a grisáceo a los siete días(Fig.15).

Son hongos reportados como saprofitos sobre madera, presenta un picnidio obscuro con un corto cuello ostiolar, conodióforo corto, conidia elongada de una sola célula. Estas características coinciden con lo que cita Barnett & Hunter, 1998.

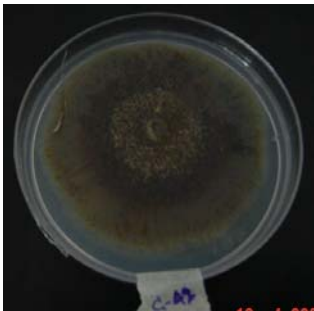


Fig.15; Cepa del hongo *Aposphaeria sp.*

6.2.8. *Alternaria* sp.

Síntomas:

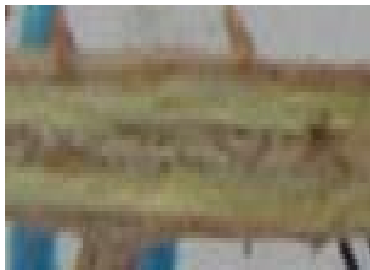
Las plantas estaban completamente muertas(Fig.16-a), en la zona de inoculación se observaron presencia de micelio blanco y resina(Fig.16-b), haces vasculares completamente necróticos(Fig.16-c).



Fig.16-a; Plantas completamente muertas



16-b; presencia de micelio blanco y resina en la zona de inoculación.



16-c; Haces vasculares completamente dañados.

Es uno de los organismos reportados como saprofitos más sin embargo algunas especies causan tizones en tejidos vegetales , el hongo presenta conidias moriformes con septos longitudinales y transversales que se forman en conidióforos simples cortos y oscuros con micelio septado , abundante(Fig.17)

y se presenta un rápido crecimiento en medio de cultivo, todas estas características coinciden con lo que menciona Walker 1973; Landaluce *et al* 1971.

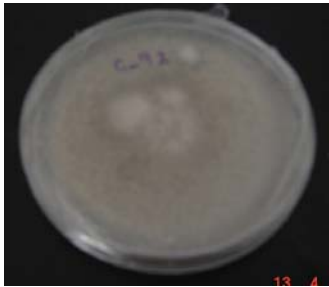


Fig.17; Cepa del hongo *Alternaria sp.*

6.2.9. *Fusarium subglutinans*.

Síntomas:

Las plantas presentaron agujas y ramas muertas en la base, centro, en la parte apical del tallo y en la parte apical del árbol (Fig.18-a), con presencia de micelio blanco y necrosis en haces vasculares (Fig.18-b). También hubo en la zona de inoculación presencia de resina, oxidación, de micelio y cáncer, (Fig.18-c), presencia de micelio blanco en las raíces (Fig. 18-d) y muerte de haces vasculares (Fig.18-e).



Fig.18-a; muerte de las agujas y ramas en la parte apical del tallo y del árbol.



18-b; Presencia de micelio blanco y necrosis en haces vasculares.



18-c; presencia de micelio, resina, oxidación cáncer en la zona de inoculación.



18-d; Presencia de micelio blanco en las y raíces.



18-e; Muerte de haces vasculares.

Este hongo ocasiona pequeños canceres en ramas y ramillas con exudados gomosos, presenta un micelio de color naranja claro a los tres días y crecimiento micelial aéreo poco desarrollado(Fig.19).



Fig. 19.Cepa del hongo *Fusarium subglutinans*

Produce macro y microconidias después de los 10 días , se produce en un esporodocio que mide de 1-2mm de ancho (French,1998). Conidias que presentan de 1-4 células, son curvadas(10-g) y elongadas con puntos finales (Sinclair et al,1987).

CONCLUSION:

Los patógenos involucrados en la muerte de pinos alepo *Pinus halepensis* son: en raíces; *Dematophora sp*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Verticillium sp*, *Monilia sp*; en agujas y ramas: *Pestalotia sp*, *Aposphaeria sp*, *Alternaria solani* y *Fusarium subglutinans*, todos estos patógenos asociados a las condiciones desfavorables de clima y estrés en que se encuentran los pinos en la zona de reforestación de Zapalinamé.

LITERATURA CITADA

Alexopoulos, J.C. Mins, Blackwell M, C. W. 1996. Introductory Micology. Ed;4^a Edit; John Wiley & Sons. New York. 632p

Agrios N. G.1996. Fitopatología. Ed; 2^a . Edit; Uteha Noriega, México D. F. 838p

Barnet H. L. Hunter B, B.1987. Illustrated Genera Imperfet Fungi. Ed;4^a. Edit ;Macmillan Publishing Company . New York. 192p.

Booth C. 1977. Fusarium, laboratory guide to the identification of de major species. Common Wealth Mycological Institute Ferry lane, Kew. Surrey .

Burguess L, w. Liddell C.M. Summerell B, A.1988. Laboratory Manual for *Fusarium* Research. Ed;2^a . Edit ; The University of Sydney.156p

Colquhoun I.J. Hardy G. St J. 2000. Managing the Risks of Phytophthora Root and Collar Rot During Bauxite Mining in the *Eucalyptus marginata* (Jarrah) Forest of Western Australia. Plant Disease. Vol. 84.No.2. Edit; The American Phytopathological Society.

De Luna R, M. 1989. Influencia de Edades de la Reforestación de Zapalinamé sobre Infiltración y Producción de Sedimentos. T. L. UAAAN.; 45p.

Dennis R.W.G. 1977. British Ascomycetes. Edit; J. Cramer. 583P.

French D, W. 1988. Forest and Shade Tree Pathology. Edit; University of Minnesota Department of Plant Pathology. St. Paul, U.S.A.271p.

Gilman, C. J. 1963. Manual de Hongos del Suelo. Ed.1ª. Edit; Continental México, D. F.

Hansen E, M. Lewis K, J. 1997. Compendium of Conifer Diseases. Edit ; The American Phytopathological Society. 127p

INTERNET:

http://www.seremirm.minagri.gob.cl/forestacion/Pinus_halepensis/Principal.htm

Landaluce U. P; Rodríguez S. J. Santaolalla A. G.1971. Patología Vegetal Agrícola. Ed; 2ª. Edit; mundi-prensa, Madrid. 755p.

Oviedo R, J. L.1980. Inventario de las Alternativas de Transformación de Especies Forestales de la Sierra de Zapalinamé. T. L. UAAAN. Pág. 75.

Romero C, S. 1988. Hongos Fitopatogenos. Ed; 1ª . UACH, México. Edit; Trillas. 347p.

Sinclair W, A. Lyon H, H. Johnson W, T. 1987. Disease of Tree and Shrubs. Ed;1^a . Edit; Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Ithaca and London.574p.

Smith I, M. Dueñez D,H. Phillips R.A. Lelliott S, A. Archer.1992. Manual de Enfermedades de las Plantas. Edit; Mundi- Prensa. 671p

Scharpf R,F. 1993. Disease of Pacific Coast Conifers. Ed;2^a. Edit; Forest Service U.S. Department of Agriculture. Berkeley, California.199p

Shaad N.W.1990. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacterial. Ed; 2^a. APS Press. 611p

Terry A,T.1978. Disease of Shade Trees. Ed;1^a . Edit; Academic Press, Inc. New York San Francisco London. 260p.

Torres J. J. 1993. Patología Forestal. Ed;2^a Edit; Mundi-Prensa. 270p.

Vázquez S, J. A.1992. Determinación del Agente Causal del Amarillamiento y Caída de Agujas en Pinos (*Pinus sp*) en Arteaga Coahuila, T. L. UAAAN.

Walker J. C.1973. Patología Vegetal. Edi; 2^a Edit; ediciones omega Barcelona . 818p.