

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Microorganismos Asociados a Semillas de Pino Azul (*Pinus maximartinezii*
Rzedowski) en Juchipila, Zacatecas

Por:

GEMANINA LÓPEZ PÉREZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México

Mayo de 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Microorganismos Asociados a Semillas de Pino Azul (*Pinus maximartinezii*
Rzedowski) en Juchipila, Zacatecas

Por:

GEMANINA LÓPEZ PÉREZ

TESIS

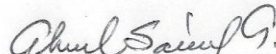
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

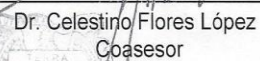
Aprobada



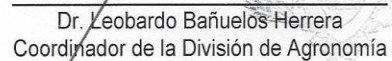
Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda
Asesor Principal



M.C. Abiel Sánchez Arizpe
Coasesor



Dr. Celestino Flores López
Coasesor



Dr. Leobardo Bañuelos Herrera
Coordinador de la División de Agronomía

Coordinación
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Mayo de 2015

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de existir y cumplir una etapa más de mi vida, por darme la fe y confianza en mí misma, por guíllarme siempre por buenos caminos, por enseñarme a creer que cualquier sueño se puede lograr no importa cuán difícil sea.

“Alma Terra Mater” Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por darme la oportunidad de formarme profesionalmente y abrirme sus puertas y formar parte de ella.

A la Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda por brindarme su valioso conocimiento y formar parte de este trabajo, por sus consejos, por escucharme cuando más lo necesite, siempre la llevare presente en mi corazón.

Al MC. Abiel Sánchez Arizpe por el apoyo incondicional y comprensión que me brindó para realizar este trabajo, por sus sabios consejos y por dedicar su valioso tiempo en la revisión de este trabajo.

Dr. Celestino Flores López por apoyarme en las correcciones de este trabajo ya que me serán ejemplo en mi vida profesional.

T.A Blanca Estela Mares Fermín, T.A Cristina Sánchez Flores Por su valiosa amistad y por toda la paciencia que me brindaron para realizar esta parte experimental del trabajo de laboratorio.

A mis ex profesores del Departamento de parasitología por brindarme sus valiosos conocimientos, por compartir experiencias consejos, y brindarme las herramientas necesarias para seguir formándome cada día y lograr formarme profesionalista.

DEDICATORIA

A mis padres:

Porfirio López Pérez

y

Elena Pérez de León

Por haberme dado la oportunidad de existir, por brindarme su infinito amor y cariño por poner su confianza en mí persona, por enseñarme ser una mujer de muchos valores y seguir luchando que nunca debo de darme por vencida ante los achaques de la vida, hoy no encuentro palabras para decirles lo mucho que los amo y quiero con todo mi corazón “los amo”.

A mis hermanos:

Rosy Pérez de León por brindarme su cariño por su apoyo incondicional por su linda sonrisa que siempre me contagiaba de la alegría te quiero no lo olvides.

Ángel Pérez De León gracias por tu apoyo moral e incondicional que me distes durante la trayecto de esta carrera te quiero y ojala pronto vuelvas con la familia.

Líliana López Pérez por brindarme tu cariño, por ser mi confidente fiel por tus sabios consejos y regaños te quiero hermana mayor.

Fredy López Pérez por ser mi gran motor a seguir y poder culminar este sueño sé que ahora podre apoyarte y juntos saldremos adelante.

Marín López Pérez por tu cariño y sonrisas compartidas te quiero mucho.

Victoria López Pérez (+) aunque ya no estas con nosotros por tu carisma y sonrisa siempre seguirás vivo en nosotros y gracias por ser un angelito mas no cabe duda que desde del cielo te sientes orgullosa de tu hermana, discúlpame y perdóname por no ser la hermana que siempre quisiste fueron muchos factores por el cual no me permitían verte.

Paulino y Jesús López Pérez por motivarme día a día los quiero.

A mis Sobrinos:

Ruth, Daniel, Viridiana y Mayra López Pérez

Por llegar en momentos difíciles de la familia luego convertirse en una gran bendición, por ser la alegría de la casa los quiero mucho.

A mis compañeros de generación CXVI:

Por haberlos conocido y compartir su amistad pasar momentos agradables en el trayecto de la carrera.

A la familia de Lucíos Juárez:

Por ser mi gran ejemplo a seguir, y por sus sabios consejos, por guiarme siempre por el camino del bien.

A la familia García Morales:

Por brindarme todo su apoyo y cariño incondicional gracias por llegar en momentos difíciles de mi vida y dejar formar parte de su familia hoy no encuentro palabras para decirles lo mucho que los quiero y que siempre serán unas personitas especiales para mí, los llevare presente en todo momento.

A mis amigos de generación CXVI:

Manuel Eduardo Chí Chuc, Víctor Pérez, Ethel Reyes, Emília Zùnun, Kennia Moreno, Jessica Hernández, por los momentos agradables que pase con ustedes porque siempre había algo bueno de que

platicar y siempre tratábamos de reír juntos y seguir adelante gracias porque siempre tomaron todo lo bueno de mí.

Amigos:

Normíta Morales, Olguíta Morales, leydí Recinos, Amanda Gómez, Keyla Pérez, Deysí Ortiz, Joss Mejía por sus palabras de aliento, porque en medio de la soledad siempre me acompañaron y también formaron parte de mi familia las quiero.

INDICE CONTENIDO

Página

AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIA	IV
INDICE CONTENIDO	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE CUADROS	X
RESUMEN	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 OBJETIVO	3
1.2 HIPÓTESIS	3
1.3 JUSTIFICACIÓN	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 El Pino Azul (<i>Pinus maximartinezii</i>)	4
2.1.1 Origen.....	4
2.2 Importancia Económica	4
2.3 Importancia Social	5
2.5 Características Morfológicas de las Semillas	6
2.6 Pruebas de Sanidad en Semillas Forestales	6
2.7 Patógenos Asociados a Semillas Forestales	7
2.8 <i>Fusarium oxysporum</i>	8
2.8.1 Características generales.....	8
2.8.2 Ubicación taxonómica.....	8
2.8.3 Biología.....	8
2.8.4 Morfología.....	9
2.8.5 Ciclo de la enfermedad.....	9
2.8.6 Características de la enfermedad.....	10
2.8.7 Síntomas de la enfermedad.....	10
2.9 <i>Phytophthora cinnamomi</i>	11
2.9.1 Ubicación taxonómica.....	11
2.9.2 Biología.....	12
2.9.3 Morfología.....	12
2.9.4 Ciclo de la enfermedad.....	13
2.9.5 Características de la enfermedad.....	13
2.9.6 Síntomas de la enfermedad.....	14
2.10 Bacterias Fitopatógenas en Especies Forestales	14
2.10.1 Clasificación taxonómica de <i>Brenneria</i> (SENASICA, 2013).	15
2.10.2 Síntomas de la enfermedad.....	15

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1 Ubicación del Experimento.....	17
3.2 Descripción del Área de Estudio.....	17
3.3 Ubicación de Colecta de Conos	18
3.3.1 Selección de árboles para la colecta conos.....	18
3.3.2 Traslado de las semillas	18
3.4 Siembra de la Semilla de Pino en Cámara Húmeda.....	18
3.5 Pruebas de Congelación en Cámara Húmeda.....	19
3.6 Preparación de Medios PDA y Agar Nutritivo	19
3.7 Vaciado de Cajas	20
3.8 Aislamiento y Purificación por Punta de Hifa.....	20
3.9 Cultivo Monospórico	21
3.10 Incremento de Cepas.....	21
3.11 Identificación a Nivel especie de los hongos en Semillas de Pino	21
3.12 Purificación de las Bacterias	22
3.13 Caracterización Bioquímicas de las Bacterias.....	23
3.13.1 Pruebas bioquímicas preliminares.....	23
3.13.1.1 Tinción de Gram.....	23
3.13.1.2 Pruebas de catalasa.....	23
3.13.1.3 Pruebas de oxidasa.....	24
3.13.1.4 Pruebas de hidróxido de potasio al 3% (KOH., RYO)	24
3.13.6 Pruebas específicas	24
3.13.6.1 Oxido fermentación (Hugg-Leiffson).....	24
3.13.2.2 Producción de indol.....	26
3.13.2.3 Medio de CVP	26
3.13.2.4 Crecimiento a 36 °C.	27
3.13.2.5 Medio de tolerancia al cloruro de sodio	27
3.13.2.6 Acido de manosa.....	28
3.13.2.7 Pectolisis de papa	28
3.13.2.8 Sensibilidad a eritromicina.....	28
3.13.2.9 Pruebas de arginina	29
3.13.2.10 Medios de Y.D.C.A.....	29
3.13.2.11 Pruebas de patogenicidad.....	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4.1 Siembra de las Semillas de Pino en Cámara Húmeda.....	32
4.2 Pruebas de Patogenicidad	33
4.3 Caracterización Bacteriana.....	35
5. CONCLUSIÓN	42
6. LITERATURA CITADA	43

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Ciclo biológico de <i>Fusarium</i> spp. Tomado de (Agrios, 2006).....	10
Figura 2 Ciclo de vida de <i>Phytophthora cinnamomi</i> (Arauz, 1998).	13
Figura 3 Ubicación y distribución de Árboles Muestreados en la Población de <i>Pinus maximartinezii</i> Rzedoswki en el sur del Estado de Zacatecas (Cruz, 2012).....	17
Figura 4 Preparación de medios de cultivo PDA y Agar Nutritivo (López, 2014). .	20
Figura 5 Presencia de conidióforos de <i>Aspergillus</i> y <i>Penicillium</i> aislados de semillas de <i>P. maximartinezii</i> (López, 2014).....	32
Figura 6 Cepa en V8 agar y presencia de Zoosporas de <i>Phytophthora cinnamomi</i> (López, 2014).	33
Figura 7 Cepa en Agar Papa Dextrosa (PDA) presencia de macroconidios y microconidios de <i>F. oxysporum</i> . (López, 2014).	33
Figura 8 Respuesta negativa a la inoculación de los diferentes microorganismos aislados de las semillas de <i>P. maximartinezii</i> (López, 2014).....	34
Figura 9 Resultado positivo de las pruebas de patogenicidad en diferentes plantas hospederas de los patógenos aislados de las semillas de <i>P. maximartinezii</i> (López, 2014).....	34
Figura 10 Resultados de la prueba tinción Gram considerado negativo (López, 2014).	36
Figura 11 Reacción positiva para catalasa y negativo para oxidasa en la cepa bacteriana de <i>P. maximartinezii</i> (López, 2014).....	36
Figura 12 Pruebas de Indol con reacción negativo. (López, 2014).	37
Figura 13 Pruebas en medio CVP sin degradación considerado negativo, pruebas a 36 °C sin presencia de crecimiento lo cual también es considera una reacción negativa.	37
Figura 14 Pruebas de Acido de manosa considerado positivo	37
Figura 15 Pruebas consideradas negativas sin actividad Pectolitica y para pruebas a sensibilidad a eritromicina no hubo ningún crecimiento bacteriano en el medio.....	38
Figura 16 Pruebas de Arginina con reacción positivo.	38
Figura 17 Microorganismos presentes en semillas de <i>Pinus maximartinezii</i>	39
Figura 18 Incidencia de patógenos en semillas de <i>Pinus maximartinezii</i> UAAAN 2015.....	41

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1 Inoculación de patógenos en diferentes plantas hospederas.....	31
Cuadro 2 Resultados de las pruebas bioquímicas de la cepa bacteriana aislada de semillas de <i>Pinus maximartinezii</i> UAAAN 2015.....	35
Cuadro 3 Incidencia de microorganismo presentes en cámara húmeda y pruebas de congelación.	40

RESUMEN

El *Pinus maximartinezii* Rzedowski es una especie de piñonero endémica de México, actualmente sus semillas son utilizadas para aspectos comerciales y como cubierta protectora del suelo, los piñones ocupan un lugar importante en la economía de la población esta especie se ha visto afectada no solo por el ser humano, sino también por agentes patógenos que provocan enfermedades pudiendo a si delimitar su explotación. Esta investigación se realizó en dos apartados una es la siembra en cámara húmeda y la otra fue a base de pruebas de congelación en el laboratorio, para observación de los microorganismos que pudieran presentarse y se procedió a su identificación. De acuerdo a los patógenos asociados a semillas fueron *Penicillium* y *Aspergillus* considerados como uno de los contaminantes más comunes e importantes en las semillas, los hongos de importancia forestal se identificaron a *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cinnamomi* y a la bacteria *Brenneria* spp., al final se logró aislar cinco microorganismos presentes en semillas y de gran importancia ya que afectan tanto a semillas como también en estado de plántulas.

Correo Electrónico; Gemanina López Pérez. Estrellita_406@live.com.

Palabras clave: Semillas, *Pinus maximartinezii*, *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium oxysporum*, *Brenneria* ssp. *Penicillium*, *Aspergillus*.

1. INTRODUCCIÓN

Las diferentes especies de pino producen una gran cantidad de semillas, la mayoría de las cuales cumplen un papel importante, como estructuras de reproducción y que no son utilizadas por el hombre, pero algunas especies producen semillas comestibles, las cuales pueden ser consumidas por animales silvestres y por el hombre (Fonseca, 2003).

El *Pinus maximartinezii* es una de las especies que produce piñas y piñones más grandes de México, sus semillas miden de 20 hasta 28 milímetros y sus piñas de dieciocho a veintidós centímetros de largo. Los piñones son semillas con alto valor nutritivo, teniendo un 48.2 % de proteínas nivel muy alto si se considera que la soya contiene un 49.8 de proteínas en condiciones similares (Fonseca, 2003).

En México, el conocimiento que se tiene de los hongos patógenos de la raíz es principalmente sobre su biología, daños que causan en plantas de importancia agronómica. El mayor número de trabajos de investigación que se han realizado es sobre los géneros *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium* y *Phymatotrichum*, debido al amplio rango de plantas hospedantes que atacan, a su distribución cosmopolita y a los elevados daños económicos que provocan en cultivos de importancia económica. Actualmente se carece de un conocimiento pleno y comprensivo del comportamiento dinámico de las enfermedades ocasionadas por estos patógenos de la raíz (Rodríguez s/n).

Los hongos y bacterias pueden llegar a causar pérdidas económicas en el hombre no solo por sus aspectos benéfico, así también por los perjuicios que causan en la selvicultura, agricultura, y también en el campo forestal con frecuencia se han reportado perdidas económicas e importantes debido a enfermedades provocadas por hongos y bacterias ya que los daños pueden reducir el crecimiento, pudrición, deformación e incluso hasta la muerte de árboles (Luko *et al.*, 1991).

Dentro de los hongos fitopatógenos el género *Fusarium* infecta tejidos vegetales y plantas, que incluye tejidos radiculares, vasculares y ornamentales y forestales, etc., de diferentes hábitat del mundo, ocasionando muchas veces pérdidas económicas importantes, ya que en el grupo de las coníferas en específico el género *Pinus* debe prestarse atención a la presencia de *Fusarium circinatum*, este hongo ocasiona la enfermedad conocida como “pitch canker” en los pinos, tiene la capacidad de infectar, durante todas las estaciones del año, estructuras vegetativas y reproductivas en diferentes estados de madurez, lo que ocasiona mortalidad de flores femeninas y piñas maduras, deterioro de semillas, y debilitamiento y muerte de plántulas y árboles jóvenes y adultos (Dwinell *et al.*, 2002 citado por González *et al.*, s/n).

Phytophthora cinnamomi es uno de los principales patógenos de coníferas y más concretamente de *Pinus* spp., afectando tanto a planta adulta como a material de vivero. Provoca amarillamiento y clorosis del follaje que se torna posteriormente bronceado y marrón rojizo, acículas y brotes más pequeños, así como, necrosis y pudrición del sistema radicular que en algunos casos pueden conllevar finalmente a la muerte de la planta (Sinclair *et al.*, 1987 citado por Mansilla & Pinto, s/n).

La presencia de bacterias es común en el ataque de semillas forestales, los géneros más comunes son, *Corynebacterium*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* ya que estas pueden causar aborto de semillas, pudriciones y decoloraciones en forma de barniz (Arguedas, 1997).

1.1 OBJETIVO

Identificar a los microorganismos importantes asociados a las semillas de *Pinus maximartinezii*.

1.2 HIPÓTESIS

Se espera encontrar en las semillas de pino azul un complejo de microorganismos.

1.3 JUSTIFICACIÓN

El *Pinus maximartinezii* es de suma importancia, ecológica y económica en nuestro país esta especie de pino se ha visto afectada por distintas plagas y enfermedades, de las cuales no se tiene conocimientos si pueden ser transmitidos por las semillas. Por lo que se pretende determinar la sanidad.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El Pino Azul (*Pinus maximartinezii*)

2.1.1 Origen

El Pinus maximartinezii Rzedowski es una especie de piñonero originaria de México, considerada en peligro de extinción debido a la alteración de sus poblaciones y de su hábitat restringida (Robledo *et al.*, 2009).

México posee la mayor riqueza de especies del género *Pinus*, esta especie se distribuye en suelos calcáreos y de buen drenaje (López & Galván, 2011).

Se conoce solo una población de *P. maximartinezii* al extremo del sureste de la Sierra de Morrones, pueblo viejo Municipio de Juchipila, Zacatecas, en México, se encuentra en altitudes que van desde 1500 a 2550 m.s.n.m (Arteaga, 1999).

El segundo sitio de *P. maximartinezii* se encuentra al sur del estado de Durango, cerca del poblado la Muralla, perteneciente a la comunidad indígena de Santa María de Ocotán y Xoconoxtle, municipio del Mezquital, a 190 km al NW. Se desarrolla entre los 1750 y 2260 m.s.n.m. sobre laderas escarpadas con pendientes de 25 a 80 % principalmente en las exposiciones al E, N, y S en una cañada remontadas por mesetas angostas, con un desnivel de casi 1000 m entre el fondo y las partes altas (de 1373 a 2355 m.s.n.m.). *P. maximartinezii* en Durango se desarrolla en una superficie de aproximadamente 110 ha (González *et al.*, 2011).

2.2 Importancia Económica

Actualmente las semillas son utilizadas para aspectos comerciales y como cubierta protectora del suelo para el control de la erosión (Arteaga, 1999).

Las semillas de *P. maximartinezii* pueden medir hasta 25 mm de largo, 12.8 mm de ancho y 10.4 mm de grueso. En la zona se cosecha la semilla para su venta tanto en el mercado local Pueblo Viejo y Juchipila, Zacatecas, como en el internacional principalmente México, Estados Unidos, y Japón. Un kilo de semilla fresca recién cosechada se vende \$260 pesos (USA \$22 dólares, a una tasa de \$12.00 pesos por dólar) en noviembre de 2005 (López & Galván, 2011).

El hábitat del pino azul se encuentra seriamente amenazado por la creciente erosión del suelo debido al pastoreo y a los incendios inducidos a las escasas actividades agrícolas, ya que los incendios limitan el crecimiento de los bosques el apacentamiento de ganado vacuno y el uso de la madera de esta especie para fines de construcción y leña contribuyen también a limitar el crecimiento del bosque bajo condiciones naturales *P. maximartinezii* (López & Galván, 2011).

2.3 Importancia Social

Han sido usada desde hace mucho tiempo para consumo humano ya que tiene un contenido de proteínas, aminoácidos y ácidos grasos, la nuez del pino azul actualmente es de valor dietético sobresaliente (López & Galván, 2011). Es una especie altamente apreciada como ornamental por su follaje suave y de color azulado y por sus ramas flexibles (González *et al.*, 2011).

En las porciones secas, los piñones ocupan un lugar importante en la economía de la población rural, ya que recolectan grandes cantidades de esa semilla, que se colocan en el mercado en forma de "nuez" para consumo directo, o bien en las industrias dulceras y de helados (Musalem *et al.*, 2008)

2.4 Taxonomía

La ubicación del pino es de la siguiente manera (Rzedowski, 1964).

Reino: *Plantae*.

División: *Coniferophyta*.

Clase: *Pinopsida*.

Orden: *Coniferales*.

Familia: *Pinaceae*

Género: *Pinus*

Especie: *maximartinezii*

2.5 Características Morfológicas de las Semillas

Las semillas del pino piñonero pueden medir de 20 a 28 mm y sus piñas de 18 a 22 cm. Los piñones son semillas con una cubierta dura, la cual debe romperse para extraer la parte comestible que puede ser de color rosa, marfil o amarillo (FIPRODEFO, 2009).

2.6 Pruebas de Sanidad en Semillas Forestales

En regiones de clima húmedo y siempre que se quiera aplicar a siembra de primavera la recolección de frutos de otoño, la extracción de la semilla se hará el secado en hornos. Son procedimientos más caros y más rápidos que los anteriores. Para evitar la muerte del embrión de la semilla hay que controlar que la temperatura no supere los 60° en ningún momento (Serrada, 2000).

La sanidad de las semillas se refiere al estado de enfermedad de una muestra de semillas y a la presencia o ausencia de organismos y plagas que causan enfermedades las pruebas de sanidad determinan el estado de una muestra, de un lote de muestras o de una accesión con respecto a enfermedades que afecten ese cultivo o especie silvestre (Kameswara *et al.*, 2007).

Pruebas en papel secante y congelamiento revela la presencia de hongos imperfectos en las semillas transportadas, para realizar esta prueba se necesitan dos semanas y las de germinación en invernadero el propósito de esta prueba es obtener la expresión de patógenos transmitidos por la semilla y verificar la viabilidad de la misma, esta prueba se realiza en tres semanas, si las plántulas presentan síntomas deberán ser sometidas a otras pruebas (Mezzalama, 2010).

2.7 Patógenos Asociados a Semillas Forestales

Los hongos son los principales agentes causantes de enfermedades forestales pudiendo atacar diferentes partes de las plantas afectando su funcionamiento en diferentes formas (Pildain & Errasti, 2011).

Phytium ssp., *Fusarium ssp.* Y *Rhizoctonia* son de amplia distribución en el suelo que causan el mal del tallo o pudrición de raíces en muchas especies forestales, desde el punto de vista fitopatológico las de mayor importancia son *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizopus* y *Mucor* ya que causan pudriciones en semillas almacenadas (Luko *et al.*, 1991).

La enfermedad *Diplodia pinea* ataca a las acículas , pero después es capaz de colonizar el sistema vascular y propagarse dentro del árbol, se muestra a través de manchas esféricas de color negro que aparecen claramente en las piñas, es un patógeno oportunista aprovecha heridas, tormenta, granizo o las sequias que provocan decoloración pardo rojiza generalizada en acículas de los pinos que exteriormente se vuelven de color pajizo con una curvatura de las acículas en forma seca de los ramillos y brotes terminales, se seca la guía terminal conocido como “ pie puntiseco” las piñas son infectadas al segundo año siendo una fuente importante para la infección (Martínez, 2014).

Pestalotia es una enfermedad poco conocida pero que también puede atacar diferentes plantas forestales, principalmente en los pinos en algunas ocasiones se puede confundir con royas, esta enfermedad afecta alas acículas

apareciendo manchas amarillas y necrosadas ya que esto afecta la capacidad fotosintética, llegando a debilitar los arboles (Martínez, 2014).

2.8 *Fusarium oxysporum*

2.8.1 Características generales

Es una de las especies más importantes del género *Fusarium* ya que ocasiona pérdidas considerables en la mayoría de las flores y hortalizas, en muchas plantas de campo como el algodón tabaco, plantaciones tales como el plátano, café, y caña de azúcar así como en algunos árboles de sombra (Agrios, 2006).

2.8.2 Ubicación taxonómica

La ubicación del hongo es de la siguiente manera (Alexopoulos & Mims, 1996):

Reino: Micetae.

División: Amastigomycota.

Subdivisión: Deuteromycotina.

Clase: Deuteromycetes.

Subclase: Hyphomycetidae.

Orden: Moniliales.

Familia: Tuberculariaceae.

Género: *Fusarium*

Especie: *oxysporum*.

2.8.3 Biología

En medios de cultivo sólido, tales como Agar Papa Dextrosa (PDA), las diferentes formas especiales de *F. oxysporum* puede tener diferentes apariencias. En general, el micelio es aéreo y blanco aparece al principio, y luego pueden cambiar a una variedad de colores que van desde el violeta hasta el

púrpura oscuro de acuerdo a la cepa (o forma especial) de *F. oxysporum*. Si sus esporodoquios son abundantes, puede parecer, crema o de color naranja (Smith *et al.*, 1988).

2.8.4 Morfología

Agrios (2006) menciona que *F. oxysporum* produce tres tipos de esporas asexuales: microconidias, macroconidias y clamidosporas. Las microconidias son de una a dos células y son las esporas que el hongo produce con más frecuencia. Las macroconidias están constituidos de tres a cinco células se adelgazan gradualmente y se encorvan hacia ambos extremos similares a los esporodoquios. Las clamidosporas, que están constituidas por una o dos células son de pared gruesa y redondas que se forman terminal o intercaladamente en el micelio más viejo o en los macroconidios.

2.8.5 Ciclo de la enfermedad

F. oxysporum es un organismo que habita en el suelo y que sobrevive entre los cultivos en los restos de plantas infectados que nacen en el suelo en forma de micelio y en cualquiera de sus formas de esporas, pero lo hace con mayor frecuencia en forma de clamidosporas sobre todo en regiones templadas frías. Se propaga a corta distancia a través del agua y el equipo agrícola contaminado y a grandes distancias principalmente en los trasplantes infectados o en el suelo que va en ellos. Es frecuente que una vez que un área haya sido infectada por *Fusarium* se mantenga a sí por tiempo indefinido (Agrios, 2006).

El micelio del hongo se propaga intercelularmente a través de la corteza de la raíz y cuando llega a los vasos xilémicos, entran en ellos a través de las punteaduras. Se mantienen entonces exclusivamente en los vasos y viaja a través de ellos en sentido ascendente, hacia el tallo de la planta. Cuando se encuentra en los vasos, dicho micelio se ramifica y produce microconidios que son desprendidos y llevados hacia la parte superior de la planta. Los micro conidios germinan en un punto ascendente, el micelio penetra la pared superior del vaso y

el hongo produce más microconidias en el siguiente vaso (Figura 1) (Agrios, 2006).

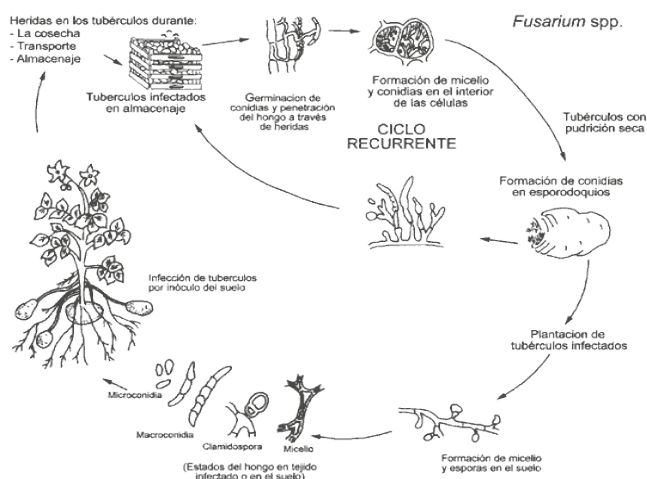


Figura 1 Ciclo biológico de *Fusarium* spp. Tomado de (Agrios, 2006).

2.8.6 Características de la enfermedad

Es un hongo que ataca principalmente a las partes subterráneas y aéreas de las plantas el micelio del hongo sobrevive saprofitamente en el suelo y penetra por las heridas de las raíces y a veces a través de los espacios intercelulares de la cofia, dentro de los tubos cribosos y traqueídas destruyendo unas veces sus paredes y obstruyendo otras estos conductos con tilos o con materia granulosa pardo rojiza del duramen, con lo cual se producen perturbaciones en la circulación de la savia y las plantitas languidecen, se marchitan y se mueren. Esta fusariosis puede tener carácter crónico o agudo, según la edad y estado de desarrollo que tengan las plantas (Martínez, 1944).

2.8.7 Síntomas de la enfermedad

Los primeros síntomas de esta enfermedad se manifiestan en un ligero aclaramiento de las nervaduras de los folíolos jóvenes más externos, después de lo cual ocurre una epinastía de las hojas senescentes ocasionada por el debilitamiento de los peciolo. Cuando las plantas son infectadas en la etapa de la

plántula se marchitan frecuentemente y mueren poco después de haber presentado síntomas. En plantas adultas pueden marchitarse y morir repentinamente en caso que la infección sea severa y favorecido por el clima antes del achaparramiento aparece un aclaramiento en las nervaduras, amarillamiento, marchitamiento en hojas y tallo, defoliación, necrosis en el margen de las hojas finalmente se muere hasta destruir el follaje y ocasionar muerte del tallo (Agrios, 2006).

2.9 *Phytophthora cinnamomi*

Es una de las especies que causan varias enfermedades en distintos tipos de plantas desde hortalizas anuales o de ornatos hasta árboles forestales, las enfermedades con mayor frecuencia es el de la hoja pequeña del pino, la pudrición de la raíz del aguacate, piña, alfalfa, tomate, zanahoria, fresa entre otras. Las pérdidas son considerables debido a las pudriciones de la raíz especialmente en árboles y arbustos (Agrios, 2006).

2.9.1 Ubicación taxonómica

Reino: Chromista.

División: Oomycota.

Subdivisión: Mastigomycotina.

Clase: Oomycetes.

Orden: Peronosporales.

Familia: Peronosporaceae.

Género: *Phytophthora*

Especie: *cinnamomi*.

Citado por (Tainter & Baker, 1996).

2.9.2 Biología

Las colonias en agar V8 es distintivo mediano, denso, lanoso, uniforme, que llena el espacio entre la tapa y la superficie de agar y forma esporangios no papilados y ovoide en el agua, pero suelen ser escaso los esporangios aparecen casi semi papilados debido a una ligero espesamiento la temperatura óptima para el crecimiento de las hifas es de entre 24 °C y 28 °C. (Robín *et al.*, 2012) Y el micelio en Agar Papa Dextrosa (PDA) a temperaturas de 20 a 22 °C es muy toruloso, con una vesícula grande y globosa, esférica y piriforme, colonias compactas con bordes no definidos (Ángel & Morales, 2007).

Esporangióforo robustos de aspecto de hifas vegetativas simple o ramificado y los esporangios se encuentran ausentes en medio sólido y presentes en extracto del suelo de manera ovaladas, oval, alargadas, no deciduos, de 23 a 63µm de largo no papilados, con clamidosporas abundantes, esféricas comúnmente terminales (Ángel & Morales, 2007).

2.9.3 Morfología

Produce clamidosporas en las raíces infectadas, las cuales pasan al suelo donde pueden sobrevivir por varios años, las clamidosporas germinan producen esporangios que liberan zoosporas y éstas alcanzan a las raíces absorbentes atraídas por los exudados radicales las zoosporas se enquistan, germinan y penetran a la raíz, colonizando el tejido vegetal y causando necrosis o pudrición de la raíz y la producción de clamidosporas y esporangios ocurre en un rango de temperatura entre 12 °C y 30 °C, siendo las temperaturas óptimas entre 21 °C y 24 °C para ambas estructuras (Medina, 2000).

2.9.4 Ciclo de la enfermedad

P. cinnamomi vive y se reproduce principalmente a nivel de superficie del suelo, sin embargo en algunas ocasiones las esporas del hongo puede ser diseminada hacia la cortezas dañada de una rama o bien hacia los frutos, él hongo inverna en los tejidos ya infectados en forma de micelio o clamidosporas Figura 2 (Agrios, 2006).

El patógeno se propaga lentamente a través del contacto de la raíz y se mueve rápidamente con el movimiento del agua (Robín *et al.*, 2012).

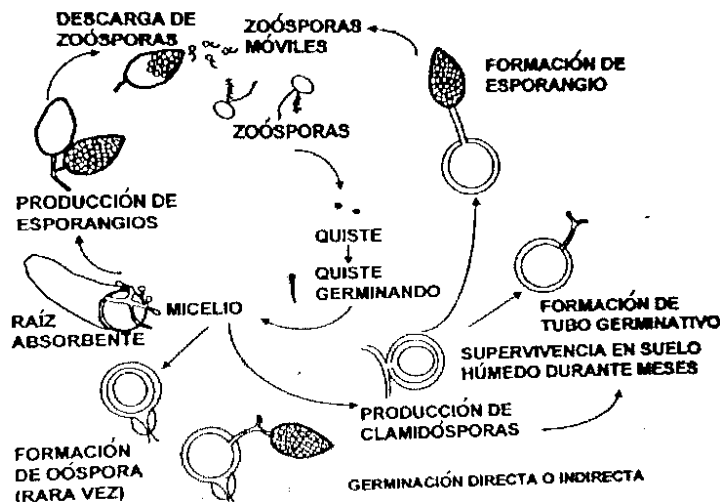


Figura 2 Ciclo de vida de *Phytophthora cinnamomi* (Arauz, 1998).

2.9.5 Características de la enfermedad

Este devastador patógeno fue aislado por primera vez a inicios del siglo 20, y se piensa que se originó en Papúa Nueva Guinea, pero actualmente tiene una distribución mundial y se considera que tiene un rango de hospedantes más de 3,000 especies de plantas. Es heterotálico con sistemas de apareamiento A1 y A2, sin embargo la recombinación sexual no juega un rol significativo en la diversidad poblacional. Con frecuencia, las poblaciones consisten de un solo

sistema de apareamiento. Este patógeno infecta raíces fibrosas y puede sobrevivir y crecer saprófitamente en el suelo. Produce clamidosporas aún en ausencia de reproducción sexual, las mismas que pueden sobrevivir por largos periodos en el suelo (Fry & Niklaus, 2010).

2.9.6 Síntomas de la enfermedad

La enfermedad provoca un decaimiento progresivo del árbol, que ofrece un aspecto general de marchitez, las hojas son más pequeñas de lo normal y de un color verde pálido y la copa del árbol se va defoliando, llegando a secarse las ramas completamente en un estado avanzado, la fructificación va decayendo, aunque a veces se puede producir una fructificación excesiva, con muchos frutos y la causa del decaimiento del árbol es la pudrición de la mayor parte de las raíces alimenticias, que presentan un aspecto ennegrecido en las raíces más viejas y gruesas presentan en su interior unas manchas de color castaño rojizo (Gallo *et al.*, 1978).

En ocasiones los árboles mueren en poco tiempo y producen frutas de tamaño pequeño, las raíces secundarias se ennegrecen volviéndose quebradizas al morir (Ángel & Morales, 2007).

2.10 Bacterias Fitopatógenas en Especies Forestales

La “corona de agallas” (*Agrobacterium tumefaciens*) es una enfermedad causante de tumores de amplia distribución mundial, capaz de afectar a más de 80 familias herbáceas y forestales es producida por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* de la familia *Rhizobiaceae*.

La bacteria se caracteriza por formar agallas o tumores, principalmente en la base de los tallos a nivel de la superficie del suelo. Inicialmente forma pequeños crecimientos esféricos con la apariencia de callos, los cuales crecen rápidamente hasta constituirse en grupos de protuberancias fácilmente

distinguibles. En árboles de dos a tres años, los tumores pueden llegar a alcanzar diámetros superiores al de su hospedero (Argedas, 2009).

El género *Brenneria* agrupa especies bacterianas que producen chancros con lesiones necróticas y exudados en plantas leñosas. En España, en los últimos años, se han identificado varias especies de *Brenneria* como responsables de chancros bacterianos (González *et al.*, 2008).

Brenneria se nombra en el año 1998 (Hauben *et al.*, 1998., citado por González *et al.*, 2008). Para agrupar a seis especies bacterianas, anteriormente incluidas en el género *Erwinia*, que afectan a varias especies leñosas produciendo generalmente chancros con exudados. En España, las bacteriosis causadas por *Brenneria* spp. Eran desconocidas, pero en la última década se han identificado como el chancro bacteriano (López *et al.*, 1994; González *et al.*, 2002 citado por González B. *et al.*; 2008).

2.10.1 Clasificación taxonómica de *Brenneria* (SENASICA, 2013).

Dominio: Bacteria

Phylum: Protobacteria

Clase: Gamma proteobacteria

Orden: Enterobacterales

Familia: *Enterobacteriaceae*

Género: *Brenneria* (*Erwinia*)

2.10.2 Síntomas de la enfermedad

Los primeros síntomas observados y los más llamativos, fueron los Chancros con exudados copiosos en el tronco y ramas, y que, dependiendo de su número y localización, pueden limitar el desarrollo del árbol pudiendo causarle la muerte. También es habitual la observación de exudados en frutos en formación,

causando su caída prematura, y con menor frecuencia en yemas, esta bacteria es una de las causas del síndrome de la seca de las quercíneas que produce decaimiento y muerte de los bosques en varias zonas de Europa y noreste de África (Soria *et al.*, 1997).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del Experimento

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en el laboratorio de Parasitología Molecular ubicado en el Departamento de Parasitología.

3.2 Descripción del Área de Estudio.

La población estudiada de *Pinus maximartinezii* Rzedowski se encuentra ubicado en el Cerro de Piñones en la Sierra de Morones, Juchipila al sur del estado de Zacatecas, propiedad privada declarado como (UMA) unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre con clave de registro VGS-CR-EX3446-ZAC, integrado por doce propietarios con una superficie de 169-84-04 hectáreas, con un rango latitudinal de 2120 a 3327 m.s.n.m una parte de las dos únicas poblaciones existentes en el mundo (Rzedowski, 1964; Gonzáles *et al.*, 2011).

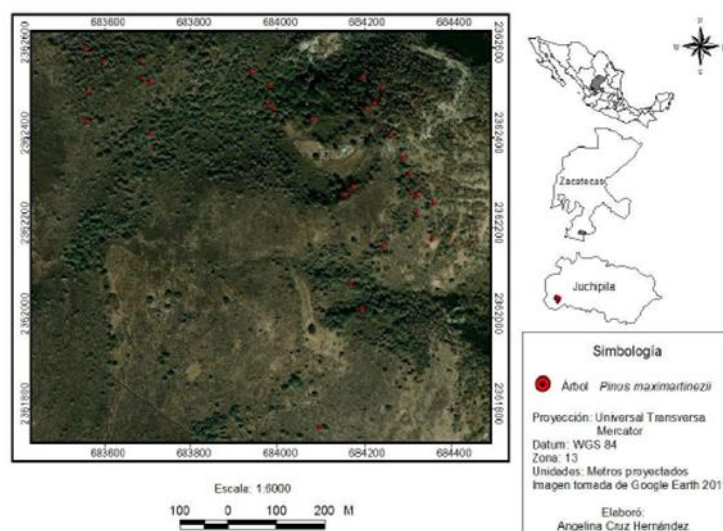


Figura 3 Ubicación y distribución de Árboles Muestreados en la Población de *Pinus maximartinezii* Rzedowski en el sur del Estado de Zacatecas (Cruz, 2012)

3.3 Ubicación de Colecta de Conos

3.3.1 Selección de árboles para la colecta conos

El material botánico se colectó el 18 y 19 del mes de noviembre del 2009. Se seleccionaron 40 árboles de manera selectiva considerando una distancia mayor o igual a 50m tomando en cuenta algunas características fenotípicas deseables como: son árboles más dominantes del área, mayor número de conos, color del cono ya que esto indica la maduración del mismo. Se colectaron de dos a cuatro conos por árbol de acuerdo a la fase de maduración.

Los conos colectados se colocaron en bolsas de papel estraza cada bolsa se identificó con un marcador de tinta permanente, se identificó con el nombre de la especie, localidad, número de árbol correspondiente. Los conos se dejaron secar de manera natural por dos meses (diciembre-enero) en el Departamento de Forestal (Cruz, 2012).

3.3.2 Traslado de las semillas

Ya que estaban empaquetados las semillas en bolsitas se trasladaron al Departamento de Parasitología del laboratorio de Biología Molecular para realizar algunas pruebas de microorganismos que pudieran estar presentes.

3.4 Siembra de la Semilla de Pino en Cámara Húmeda

De las muestras colectadas se tomaron 2 de 4 semillas con sus respectivas claves PIMAA1 y fueron llevadas a un vaso de precipitado 500 ml, se lavaron con agua corriente posteriormente se desinfectaron con cloro al 2 % por 1 minuto enseguida se enjuagaron en agua destilada estéril con un tiempo de 5 minutos

para eliminar los excesos del desinfectante luego fueron secadas en papel de estraza por 48 horas. Estas semillas fueron colocadas en cajas de plásticas transparentes de 20 cm x 15 cm, que contenían papel de estraza estéril luego se humedeció con agua estéril y llevadas a una incubadora a una temperatura de 25 y 27 °C para que se expresaran los microorganismos.

3.5 Pruebas de Congelación en Cámara Húmeda

Se lavaron de 2 a 4 semillas por cada muestra en un vaso de precipitado con cloro al 2 % por 1 minuto en seguida se sumergieron en agua destilada estéril con un tiempo de 5 minutos para eliminar los excesos del desinfectante; posteriormente se tomaron las semillas con una pinza estéril y se colocaron en cajas de Petri para después llevarlos a una estufa para realizar el proceso de secado con un tiempo de 3 horas a una temperatura de 30 °C para luego someterlos a congelación por 24 horas a una temperatura de -20 °C con la finalidad de matar el embrión y pudieran expresarse los patógenos.

Concluidas las 24 horas, se colocaron en las cajas de Petri con papel de estraza estéril con sus respectivas semillas y llevadas a incubación para observar la presencia de los patógenos en las semillas a 25 y 27 °C ya identificadas con sus claves respectivas de cada muestra a la que pertenece. Fecha y siembra y se incubaron por 8 días para observar la expresión de los microorganismos.

3.6 Preparación de Medios PDA y Agar Nutritivo

Se pesaron 9.75 gr de Agar Papa Dextrosa (PDA) y 9.5 de Agar bacteriológico para cada uno de los matraces Erlenmeyer de 250 ml. Y se aforó a 250 ml con agua destilada estéril y se llevó a una autoclave para ser esterilizado a 121 °C por 15 minutos (Figura 4).



Figura 4 Preparación de medios de cultivo PDA y Agar Nutritivo (López, 2014).

3.7 Vaciado de Cajas

Esta parte del experimento se realizó en una cámara de transferencia para evitar ciertos contaminantes, se dejó con un tiempo de 24 horas para que el medio solidificara.

3.8 Aislamiento y Purificación por Punta de Hifa

Se procedió a separar los diferentes microorganismos con una aguja de disección flameada y estéril, de las especies fúngicas y bacterianas, tomamos un aislado y pasamos a las cajas con medio de cultivo fueron llevadas a la incubadora a una temperatura de 25 y 27 °C y se observaron continuamente.

Una vez que las colonias tenían un centímetro de diámetro se procedió a su purificación por el método de punta de hifa, que consiste en obtener bajo un microscopio de disección 2 mm de una hifa la que se coloca en una caja con PDA la cual se sella y se identifica para incubarla a 25 y 27 °C.

3.9 Cultivo Monospórico

Del crecimiento micelial y esporulado se hace un raspado con una aguja estéril la cual se coloca en tubo de ensaye con agua bidestilada para separar las esporas las cuales se observaran en el microscopio de disección y tomar una sola spora y sembrarla (PDA) y se llevaron nuevamente a una incubadora a temperaturas 25 y 27 °C.

3.10 Incremento de Cepas

Una vez teniendo las cepas puras de los hongos se hicieron resiembras, utilizando Agar Papa Dextrosa (PDA) y con la ayuda de un sacabocado colocaron en cajas Petri dejando a una incubación de 25 a 27 °C.

3.11 Identificación a Nivel especie de los hongos en Semillas de Pino

Una vez obtenida las cepas puras se procedió hacer varios montajes semipermanentes de las diferentes colonias en un portaobjetos y se adiciono lactofenol azul para después observar el tipo de micelio en un microscopio compuesto siguiendo las claves diferentes para el proceso de identificación de los patógenos, se consideró las coloración de cada cepa del crecimiento micelial en los primeros 8 días ya que pueden cambiar a una variedad de colores según sea el patógeno.

Luego se procedió a observar, utilizando un estereoscopio y un microscopio. Para poder observar las características distintivas de cada género de los patógenos. Con ayuda de claves de (Barnett & Barry, 1976).

Para la identificación de la especies las preparaciones se observaron después al microscopio compuesto (Marca Olympus) en los objetivos 10x, y 40x Siguiendo las claves de (Barnett & Barry 1976). Se tomó fotografías con una cámara (Marca Sony, Formato Carl Zeiss, Modelo DSC-W630) montada en el microscopio (Marca Olympus, Modelo CKCX41SF).

3.12 Purificación de las Bacterias

La purificación de bacterias se realizó de acuerdo al manual de prácticas de bacteriología (López, 2002). Se esterilizaron materiales y medios de Agar bacteriológico KB (B de King) para aislar las bacterias de las semillas, se tomaron colonias y fueron sembradas en los medios selectivos por el método de estría simple, tomando suspensión bacteriana con un asa estéril, luego se hace un rayado sobre el medio de cultivo solido quedando en forma de estría en las cajas de Petri, se incubaron a una temperaturas de 28 °C. En un lapso de 24 a 48 horas y se observaron.

Para efectuar la separación de las colonias que se observaron en el medio de cultivo se utilizó un asa bacteriológica, con el cuidado de esterilizarlo a la flama y las colonias fueron sembradas por el método de estría múltiple en los medios específicos incubados por 24 horas.

La morfología de las colonias puede ser de diferentes tamaños desde su morfología, tamaño, color, aspectos y consistencias dependiendo de las especies a la que pertenecen ya sean Fitopatógenas.

3.13 Caracterización Bioquímicas de las Bacterias

3.13.1 Pruebas bioquímicas preliminares

3.13.1.1 Tinción de Gram

Esta prueba nos permite diferenciar las bacterias que retienen el primer color Gram-positivas de las que no lo retienen Gram-negativas y para realizar esta prueba se tomó un porta objeto limpio y estéril con un asa, tomamos un frotis y se secó al aire posteriormente se pasó a la flama ya que quedo seco adicionamos la solución de Cristal violeta y lugol los dos reactivos por 60 segundos, se decoloro con Etanol por 30 segundos hasta que ya no saliera más colorante se lavó a agua corriente y posteriormente se adiciono la solución de Safranina por 30 segundos y se lavó nuevamente con agua y se dejó secar al aire y se observó al microscopio Marca Olympus, Modelo CKCX41SF) se enfocó a 100 micras y se adicionó aceite de inmersión para observar si eran (Gram negativa o positivas) se tomó la fotografía y se documentó la imagen .

3.13.1.2 Pruebas de catalasa

Es un enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos son las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas. El principal objetivo de esta prueba es separar (positiva) de las (negativa). Para realizar esta prueba se tomó un portaobjeto donde fue añadido una gota de agua oxigenada y con un asa bacteriológica desinfectada, se tomó una asada de la bacteria y se dispersó con el agua oxigenada para detectar la presencia de burbujas (Fernández *et al.*, 2010).

3.13.1.3 Pruebas de oxidasa

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas, la reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromático que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrogeno según la especie bacteriana. Para realizar esta parte del experimento se tomaron disco de papel filtro se esterilizaron en un autoclave a 121 °C por 15 minutos ya que estaban estéril en un portaobjeto colocaron los discos y con un asa desinfectado y estéril de platino tomamos una asada de la bacteria y aplicamos sobre los filtros, luego añadimos una gota del reactivo oxidasa se tomó un tiempo de 10 segundos para observar las diferentes reacciones que pudieran manifestarse se tomó la fotografía y se documentó la imagen (Fernández *et al.*, 2010).

3.13.1.4 Pruebas de hidróxido de potasio al 3% (KOH., RYO)

Tomamos una portaobjeto limpio y estéril del cultivo bacteriano puro se tomó una asada, se mesclo el cultivo con el hidróxido de potasio al 3 % durante 5 segundos y se levantó lentamente el asa al mismo tiempo se observó si formaba un hilo en este caso la reacción fue positiva por el cual la bacteria pertenece al grupo de las Gram negativas (Rodríguez, 2006).

3.13.6 Pruebas específicas

3.13.6.1 Oxido fermentación (Hugg-Leiffson)

Mediante esta prueba se va a determinar si la utilización de los hidratos de carbono por parte de un microorganismo se realiza por vía oxidativa (proceso aeróbico, presencia de oxígeno) o por vía fermentativa (proceso anaeróbico, ausencia de oxígeno). Y para realizar esta parte de las pruebas se pesaron 0.5 gr

de peptona, 1.25 gr Ncl, 0.075g K₂HPO₄, 0.75 gr de Agar y se vaciaron en un matraz de Erlenmeyer 500 ml, se aforó con una probeta de 1000 ml a 250 ml de agua se agitó, se agregaron 0.0003 gr de azul de bromitímol y se llevó a esterilizar en un autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Se esperó a que quedara a temperatura ambiente para agregar los 5 gr de Glucosa esto se realizó en la cámara de transferencia utilizando un filtro de millipore de 1.5 se esperaron 24 horas, con una pipeta tomamos 10ml de medio ya preparado, se pasaron a los 5 tubos de ensaye, para realizar la inoculación bacteriana tomamos con un asa una asada de la cepa pura e inoculamos por picaduras a cada uno de los cuatro tubos de ensaye, dos de ellos le agregamos 5ml de aceite mineral y se dejó un testigo para observar los diferentes cambios que se pudieran presentar (Schaad, 2005).

Mediante esta prueba se detecta la liberación de indol en un cultivo bacteriano, dicha liberación se debe a la degradación del aminoácido triptófano mediante el enzima triptofanasa. Para realizar esta prueba se pesaron de 10 gr de bacto de triptona y 2.5 cloruro de sodio (NaCl) y se disolvieron en un matraz de Erlenmeyer de 500 ml en 250 ml de agua destilada y luego se distribuyeron en 6 tubos de ensaye 10 ml del medio y se llevó a esterilizar en un autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Se preparó un reactivo llamado KOVAC utilizando las siguientes soluciones Para-dimetil-aminobenzaldehído y le agregamos 2.5 gr y 37.5 gr de Alcohol amílico o Isoamílico, 7.5 Ácido clorhídrico concentrado, luego disolvimos el Para-dimetil-amino benzaldehído y se agregó lentamente el Ácido clorhídrico concentrado en el Alcohol amílico o Isoamílico mezclamos bien ya que estuvieran disueltos en el matraz Erlenmeyer de 250 ml y se agregó 150 ml de agua estéril tapamos y agitamos posteriormente se envolvió en un papel aluminio, para ser almacenado por 24 horas en un refrigerador antes de usarse, ya que estuvieran los tubos con el medio estéril se procedió a la inoculación con una asa de platina tomamos una asada e inoculamos a los tubos del medio y se llevó a incubar a 37 °C por 40 a 48 horas, después añadimos 0.3 ml del reactivo KOVAC y agitamos suavemente para observar la aparición de un anillo rojo en la superficie del medio llamada capa alcohólica.

3.13.2.2 Producción de indol

Mediante esta prueba se detecta la liberación de indol en un cultivo bacteriano, dicha liberación se debe a la degradación del aminoácido triptófano mediante el enzima triptofanasa. Para realizar esta prueba se pesaron de 10 gr de bacto de triptona y 2.5 cloruro de sodio (NaCl) y se disolvieron en un matraz de Erlenmeyer de 500 ml en 250 ml de agua destilada y luego se distribuyeron en 6 tubos de ensaye 10 ml del medio y se llevó a esterilizar en un autoclave a 121 °C por 15 minutos. Se preparó un reactivo llamado KOVAC utilizando las siguientes soluciones Para-dimetil-aminobenzaldehído y le agregamos 2.5 gr y 37.5 gr de Alcohol amílico o Isoamílico, 7.5 Ácido clorhídrico concentrado, luego disolvimos el Para- dimetil-amino benzaldehído y se agregó lentamente el Ácido clorhídrico concentrado en el Alcohol amílico o Isoamílico mezclamos bien ya que estuvieran disueltos en el matraz Erlenmeyer de 250 ml y se agregó 150 ml de agua estéril tapamos y agitamos posteriormente se envolvió en un papel aluminio, para ser almacenado por 24 horas en un refrigerador antes de usarse, ya que estuvieran los tubos con el medio estéril se procedió a la inoculación con una asa de platina tomamos una asada e inoculamos a los tubos del medio y se llevó a incubar a 37 °C por 40 a 48 horas, después añadimos 0.3 ml del reactivo KOVAC y agitamos suavemente para observar la aparición de un anillo rojo en la superficie del medio capa alcohólica (Schaad *et al.*, 2005).

3.13.2.3 Medio de CVP

Se precalentó un vaso de licuadora se adiciono 500 ml de agua destilada caliente y agregamos los siguientes reactivos, 0.5ml de cristal violeta y 2.25 ml de hidróxido de sodio (NaOH 1N*) y de solución acuosa de (CaCl₂O) al 1% y se utilizó 1gr de agar y de Nitrato de sodio (NaNO₃) 0.5 gr. La solución (NaOH 1N*) se preparó mezclando 8 gr en 250 ml de agua destilada y se procedió calentar el agua a punto de ebullición y se licuaron todos los ingredientes a una velocidad alta por 15 segundos y luego se disminuyó la velocidad para luego agregar 9 gr de Polipectato de sodio luego aumentamos la velocidad por 15 segundos y se

transfirió a un matraz de Erlenmeyer de 50 ml, se tapó con papel aluminio y se pasó a esterilizar en una autoclave 121 °C por 15 minutos dejamos a que quedara una temperatura ambiente y vaciamos bajo una cámara de transferencia utilizando mecheros de alcohol encendido, vaciamos el medio en cajas de Petri y esperamos 24 horas a que se pusiera consistente luego realizamos la siembra se tomó una asa de platina y de la cepa bacteriana pura se tomó una asada y sembramos en forma de estrías y por puntos y se selló con plástico kontak y fueron llevados a la incubadora a 27 °C por 24 y 48 horas para observar el proceso de degradación (Schaad *et al.*, 2005).

3.13.2.4 Crecimiento a 36 °C.

En una caja con medio de Agar nutritivo, con el asa de platina de nuestra cepa pura tomamos una asada y sembramos en forma de estrías y llevamos a una incubadora a 36 °C por 48 horas y observar la presencia del crecimiento bacteriano (Schaad *et al.*, 2005).

3.13.2.5 Medio de tolerancia al cloruro de sodio

En una balanza analítica se pesaron las siguientes porciones de reactivos 0.5 gr NaCl Cloruro de sodio, 0.8 gr de caldo nutritivo y 0.1 gr Glucosa tomamos un matraz Erlenmeyer de 250 ml vaciamos todos los reactivos ya pesados, con una probeta de 500 ml adicionamos 100 ml de agua destilada y agitamos hasta quedar sin grumos y con una pipeta de 10 ml tomamos 10 ml del medio para para 5 tubos de ensaye posteriormente fueron llevados a un autoclave 121 °C por 15 minutos después se esperaron 24 horas para poder realizar la inoculación, se tomó un asa de platino esterilizamos y tomamos una asada para los cuatro tubos de ensaye con medio e inoculamos bajo una cámara de transferencia y se llevaron a una incubadora por 48 horas (Schaad *et al.*, 2005).

3.13.2.6 Acido de manosa

Se pesaron los siguientes reactivos en una balanza analítica 1 gr de Peptona, 0.00003 gr de Azul de bromitimidol y 1 gr de Disacárido, la peptona y el indicador se disolvieron en 95 ml de agua destilada en un matraz de Erlenmeyer de 250 ml ajustamos el PH a 7.0 y se llevó a esterilizar en un autoclave 121 °C por 15 minutos luego disolvimos el disacárido en los 5ml de agua estéril (manosa, lactosa o maltosa) adicionamos los 5 ml al medio por filtro de millipore previamente esterilizado y se distribuyeron en 10 tubos de ensaye, tomamos un asa de platina y de la cepa bacteriana pura tomamos una asada para diez de los cuatro tubos y se llevaron a incubar por 48 horas para ver el crecimiento bacteriano o cambios de coloración (Schaad *et al.*, 2005).

3.13.2.7 Pectolisis de papa

Para esta prueba se esterilizaron cajas de vidrio con su respectivo cortes de papel de estraza en una autoclave a 121 °C por 15 minutos, después tomamos una papa sana lavamos con agua y jabón, se pasó a un vaso de precipitado con cloro al 2 % por 3 minutos y se lavó con agua estéril y se realizaron cortes en rodajas en la cámara de transferencia en el corte se le hizo una pequeña herida en forma de zeta y para poder inocular tomamos de nuestra cepa bacteriana pura, una asada y se inocularon por vía herida se pasaron a las cajas estéril y se llevaron a una incubadora a 27 °C para observar la presencia de la bacteria o degradación en papa (Rodríguez, 2006).

3.13.2.8 Sensibilidad a eritromicina

Se realizó la preparación de medio, donde se pesó 9.7 gr de Agar nutritivo utilizando 250 ml de agua destilada se vació en un matraz de Erlenmeyer de 500 ml, se llevó a esterilizar en una autoclave a 121 °C por 15 minutos, y se vaciaron a 3 cajas de Petri con la finalidad de tener un testigo, y se procedió la aplicación de 2 capsulas de eritromicina se esperó hasta que ya estuviera bien diluido sin

grumos para vaciar a las cajas de Petri, posteriormente se esperaron 24 horas hasta quedar consistente, de nuestra cepa bacteriana pura con un asa de platina tomamos una asada y sembramos en las cajas con eritromicina y sin eritromicina, se llevaron a una incubadora a una temperatura de 27 °C por 24 horas para observar la inhibición del crecimiento (Rodríguez, 2006).

3.13.2.9 Pruebas de arginina

Preparación del medio se pesaron los siguientes reactivos en una balanza analítica 0.1 gr de peptona, 0.5 de cloruro de sodio, 0.003 de Fosfato de potasio, 0.3 de Agar, 0.00003 gr de rojo de fenol y 1 gr de Hidrocloruro de arginina tomamos un matraz de Erlenmeyer de 500 ml se vaciaron los reactivos ya que estaban en el matraz, con una probeta de 500 ml tomamos 250 de agua destilada y aforamos a 100 ml de agua en el matraz y se disolvieron los reactivos ya que estaban disueltos tomamos una pipeta de 10 ml se tomaron 10 ml del medio y se pasaron a los 10 tubos de ensaye se llevaron esterilizar en un autoclave a 121 °C por 15 minutos, pasada las 24 horas se realizó la siembra por picaduras. Y a partir del cultivo bacteriano se inocularon 4 de los tubos con medio de cultivo tomando una asa de platina previamente flameada no inoculado con la bacteria, adicionamos un 1 ml de aceite mineral estéril a cada uno de los 4 tubos dejando un testigo sin inocular, fueron llevados a una incubadora a 28 °C durante 72 horas (Rodríguez, 2006).

3.13.2.10 Medios de Y.D.C.A

Se procedió a pesar los reactivos en una balanza analítica, se pesaron 7.75 gr de Agar Nutritivo, 4 de gr de levadura, 1.25 gr de CaCo₃, 1.25 gr de peptona de carne, 0.75 gr de Extracto de carne, 2.5 gr de Dextrosa y 3.75 gr de Agar bacteriológico ya pesado fueron llevados a un matraz Erlenmeyer de 500 ml y se disolvieron los reactivos en 250 ml de agua destilada después fueron llevados al autoclave a 121 °C por 15 minutos, se esperó a que quedara a temperatura

ambiente de modo que pudiera tomarse con las manos y se vaciaron en cajas de Petri, dejamos por 24 horas para poder realizar la prueba, con asa de platina flameada y estéril, tomamos una asada de la bacteria y sembramos en forma de estrías, sellamos con plástico kontak y fueron llevadas a la incubadora por 48 horas (Schaad *et al.*, 2005).

3.13.2.11 Pruebas de patogenicidad

El patógeno debe aislarse, desarrollarse en medios de cultivos nutritivos puros y se deben caracterizar como saprofitos no obligados) o bien debe de permitirse desarrollarse sobre una planta hospedante o susceptible y registrar su presencia y los efectos que puedan presentarse, el patógeno debe de ser inoculado en plantas sanas de la misma variedad o especie en que haya aparecido la enfermedad y debe aparecer la misma enfermedad en las plantas inoculadas a esto se le denomina como postulados de Koch (Agrios, 2006).

Para corroborar la patogenicidad de los microorganismos aislados de las semillas de *P. maximartinezii* se inocularon los patógenos en diferentes plantas hospederas como se observa en el (cuadro 1). De acuerdo a los postulados de Koch.

Para realizar esta prueba se esterilizó sustrato en una autoclave a una temperatura de 121 °C por 15 minutos y posteriormente se realizó la preparación de sustrato en vasos de unicel y se procedió a sembrar diferentes especies de semillas hasta esperar a que germinaran ya obtenidas las plántulas se prepararon las soluciones de la cepa bacteriana de igual manera para la cepa del hongos se tomaron 50 ml de agua estéril y vaciamos a la caja de Petri en el medio bacteriano se raspo lenta mente hasta obtener la soluciones concentradas de la bacteria y luego se volvió a tomar otros 50 ml de agua estéril y vació nuevamente a la caja de Petri de la cepa fúngica se raspo todo el crecimiento micelial hasta obtener las soluciones , y de las dos soluciones, se compararon por el método de colimetría con la escala de Mac Farland quedando la solución bacteriana a una escala de 1×10^{-6} y la solución del patógeno 1×10^{-3} de estas soluciones

concentradas con una jeringa de 5 ml se tomaron 3 ml de las soluciones y a 4 de las plantas diferentes fueron inoculadas tres una con diferentes microorganismos que son *F. oxysporium*, *P. cinnamomi* y *Brenneria* ya inoculadas se llevaron a una cámara donde pudieran tener horas luz y horas oscuras y se mantenían regadas continuamente hasta observar que respondieran las plantas a los patógenos.

Cuadro 1 Inoculación de patógenos en diferentes plantas hospederas

Patógeno	Hospederos	Concentración
<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Phytophthora cinnamomi</i>	Pino azul Piñón. (<i>P. maximartinezii</i>) Pino piñonero (<i>P. cembroides</i>) Tomate <i>Solanum Licopresici</i> Chile (<i>Capsicum annum</i>) Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) Melón (<i>Cucumis melo L.</i>)	1×10^{-3} (3ml x Planta)
<i>Brenneria</i> spp.	Pino azul Piñón. (<i>P. maximartinezii</i>) Pino piñonero (<i>P. cembroides</i>) Tomate (<i>Solanum Licopresici</i>) Chile (<i>Capsicum annum</i>) Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) Melón (<i>Cucumis melo L.</i>)	1×10^{-6} (3 ml x Planta)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Siembra de las Semillas de Pino en Cámara Húmeda

Se identificó morfológicamente los hongos *Aspergillus* y *Penicillium* los cuales se encontraba presentes en la mayoría de las semillas (Figura 5), se procedió a su identificación a nivel género de acuerdo a las claves (Barnett & Hunter, 2003).

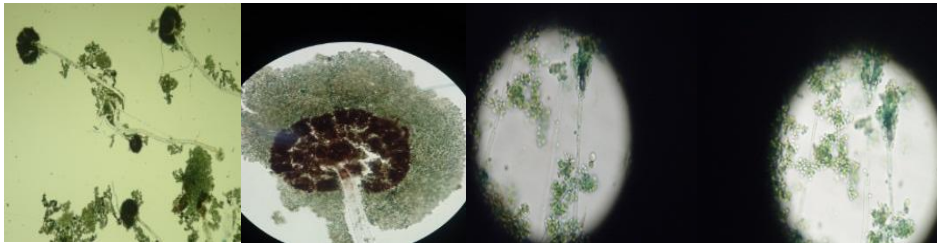


Figura 5 Presencia de conidióforos de *Aspergillus* y *Penicillium* aislados de semillas de *P. maximartinezii* (López, 2014).

De acuerdo con la literatura reportada, estos hongos son los contaminantes más comunes e importantes de las semillas almacenadas ya que la humedad favorece su crecimiento debido a que pueden presentarse en todas partes y crecen en condiciones más secas de las que pueden soportar otros hongos de campo (Bolívar, 2007).

A demás se identificaron los siguientes hongos patógenos, (Figura 6), *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium oxysporum* (figura 7), fueron aislados de las semillas de *P. maximartinezii* los que tienen una amplia distribución que ocasionan amarillamiento, marchitez y muerte de los árboles (Abad, 2002).

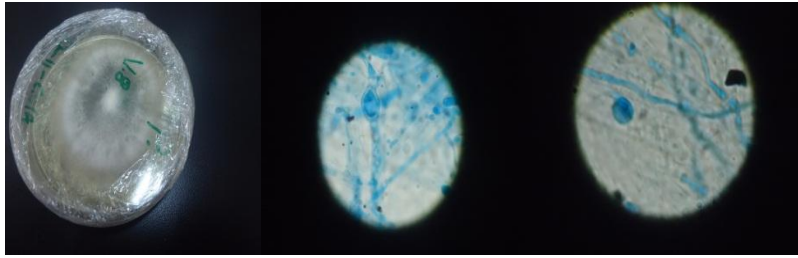


Figura 6 Cepa en V8 agar y presencia de Zoosporas de *Phytophthora cinnamomi* (López, 2014).

Estos hongos son reportados como agentes causantes de enfermedades forestales pudiendo atacar diferentes partes de las plantas afectando su funcionamiento en varias formas. *F. oxysporum*, *Phytophthora cinnamomi* causan defoliación provocan una disminución en la tasa fotosintética; los causantes de canchales debilitan el tronco o reducen el transporte desde y hacia las raíces; los pudridores de raíces pueden incrementar el riesgo de caída por viento y reducen la absorción de agua y minerales (Pildain & Errasti, 2011).

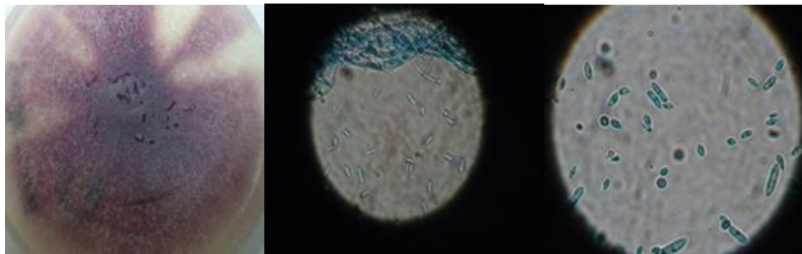


Figura 7 Cepa en Agar Papa Dextrosa (PDA) presencia de macroconidios y microconidios de *F. oxysporum*. (López, 2014).

4.2 Pruebas de Patogenicidad

De los microorganismos inoculados en diferentes plantas, la respuesta que se tuvo fueron en distintos tiempos en el caso de *P. maximartinezii* los síntomas se presentaron a los 10 días y en *P. cembroides* a los 6 días en este último con mayor severidad presentándose los siguientes síntomas necrosis, estrangulamiento de las acículas; clorosis y amarillamiento de las hojas, a medida

que transcurrió el tiempo, para el caso de la inoculación de la bacteria, se presentaron los mismos síntomas, solo que con un exudado presente en las acículas que se pudo observar a simple vista y en las otras plantas no se presentaron ningún tipo de síntomas como se puede observar en la (Figura 8 , 9). Por lo que es una respuesta negativa.



Figura 8 Respuesta negativa a la inoculación de los diferentes microorganismos aislados de las semillas de *P. maximartinezii* (López, 2014).

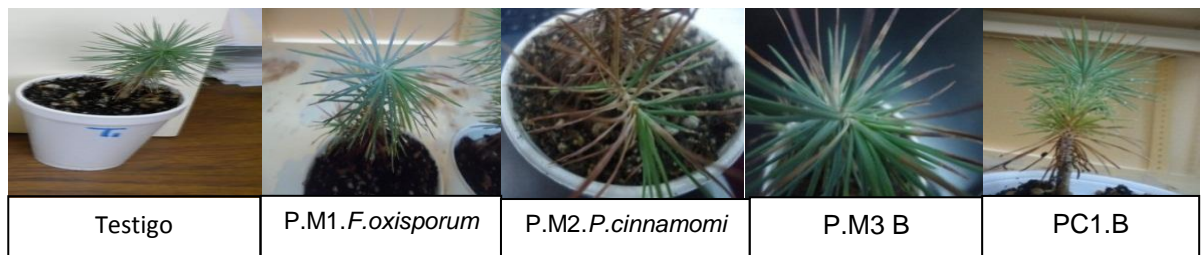


Figura 9 Resultado positivo de las pruebas de patogenicidad en diferentes plantas hospederas de los patógenos aislados de las semillas de *P. maximartinezii* (López, 2014).

En las plantas de *Pinus maximartinezii* inoculadas con *Fusarium oxisporum*, *Phytophthora cinnamomi* y *Brenneria* los síntomas se presentaron a los diez días y en *Pinus cembroides* la aparición de síntomas fue a los 6 días, en las plantas inoculadas con los mismos patógenos con mayor severidad, lo cual explica que *Pinus maximartinezii* ya está adaptado a estos tipos de microorganismos y para el caso de los dos testigos *Pinus maximartinezii* y *Pinus cembroides* no presentó ninguna sintomatología, que pudiera asociarse con las condiciones climáticas y/o nutricionales de las plantas.

4.3 Caracterización Bacteriana

Se identificó la cepa bacteriana de acuerdo al manual de (Schaad *et al.*, 2005). en las semillas colectadas en Juchipila, Zacatecas. Se determinó de acuerdo a la respuesta en las diferentes pruebas que se trataba del género *Brenneria* spp. (Cuadro 2).

Cuadro 2 Resultados de las pruebas bioquímicas de la cepa bacteriana aislada de semillas de *Pinus maximartinezii* UAAAN 2015.

Pruebas preliminares	Literatura.	Cepa
Tinción de Gram	(-)	(-)
Oxidasa	(-)	(-)
Catalasa	(+)	(+)
KOH o (Ryo)	(+)	(+)
Oxido fermentación (Hug O/F)	(+)(-)	(+)(-)
Arginina	(+)	(+)
Sensibilidad a Eritromicina	(-)	(-)
Producción de Indol	(-)	(-)
Acido de Manosa	(+)	(+)
Actividad pectolítica	(-)	(-)
Medio de CVP	(-)	(-)
Tolerancia al cloruro de sodio	(+)	(+)
Pruebas a 36 °C	(-)	(-)

Se observa la reacción de la prueba tinción de Gram donde las paredes de las bacterias se tiñen de un pigmento rojo lo cual se considera como negativo (Figura 10).

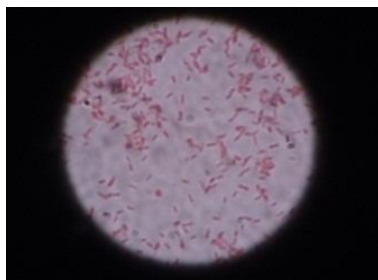


Figura 10 Resultados de la prueba tinción Gram considerado negativo (López, 2014).

De acuerdo a las prueba de catalasa realizada se puede observar que la reacción que presento fue positiva lo cual indica que son bacterias que tienen la capacidad de sintetizar o hidrolizar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que es liberado en forma de burbujas. En las pruebas de oxidasa se puede apreciar la reacción que se va presentando, esto debe un sistema citocromático que activa la oxidación lo cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose en forma de agua (Figura11). (Fernández *et al.*, 2010).

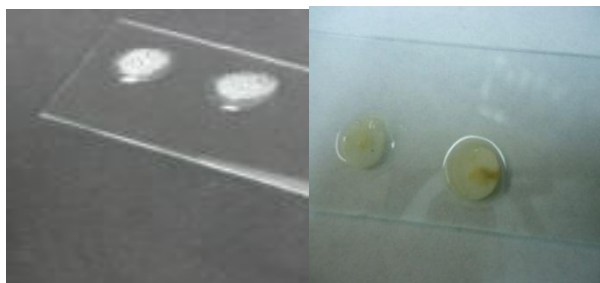


Figura 11 Reacción positiva para catalasa y negativo para oxidasa en la cepa bacteriana de *P. maximartinezii* (López, 2014).

a) Se puede apreciar que la reacción de la prueba Indol es negativo no hubo presencia de un anillo rojo (Figura. 12). En la parte superficial.



Figura 12 Pruebas de Indol con reacción negativo. (López, 2014).

b) En la prueba en medios de CVP no hay proceso de degradación de pectatos de la bacteria lo que significa que no tienen la capacidad de degradar las paredes las plantas. Y para la prueba a 36 °C sin respuesta con una reacción negativa (Figura 13). Esta prueba es para para bacterias que pueden desarrollarse a temperaturas muy altas (López, 2014).



Figura 13 Pruebas en medio CVP sin degradación considerado negativo, pruebas a 36 °C sin presencia de crecimiento lo cual también es considera una reacción negativa.

c) En el aprovechamiento de la manosa fue positivo ya que formo un ácido, que cambio de color en el medio (Figura 14).



Figura 14 Pruebas de Acido de manosa considerado positivo

d) Se puede observar con una reacción negativa ya que no hubo actividad pectolítica lo que significa que algunas bacterias tiene la capacidad de degradar tales como *Pectobacterium* y para pruebas a sensibilidad a eritromicina no hubo crecimiento (Figura 15), lo cual indica que el producto inhibió el crecimiento de la Bacteria en el medio.



Figura 15 Pruebas consideradas negativas sin actividad Pectolítica y para pruebas a sensibilidad a eritromicina no hubo ningún crecimiento bacteriano en el medio.

e) Para las pruebas de Arginina como se puede observar en el testigo y con las inoculadas presentaron una coloración diferente (Figura 16) a esta reacción se consideró como positivo.

De acuerdo a los resultados de estas pruebas se determinó que se trataba del género *Brenneria* ssp.

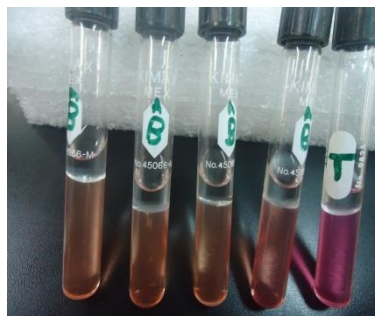


Figura 16 Pruebas de Arginina con reacción positivo.

Penicillium y *Aspergillus* se pueden presentar debido a los excesos de humedad ya que los conos que se colectaron, en diferentes edades algunos se colectaron en su maduración exacta y otros se colectaron a mitad de tiempo, a la hora de la colecta no hubo ningún proceso de desinfección por lo cual los

patógenos podrían favorecerse para reproducirse de manera más rápida, en caso de la bacteria *Brenneria* spp. Ha sido reportada en robles, lo cual podría considerarse como un hospedero en Juchipila, Zacatecas, ya que *Pinus maximartinezii* se encuentra asociados con árboles diferentes lo cual favorece la presencia de los microorganismos (cuadro 3).

De acuerdo con los resultados se encontraron cuatro géneros de hongos presentes en semillas de *Pinus maximartinezii*: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Phytophthora cinnamomi* y *Fusarium oxisporum* (Figura 17) en la mayoría de las semillas de la especie de coníferas latifoliadas son propensas al ataque de estos patógenos aunque algunas veces su patogenicidad ha sido muy debatida debido a que se pueden desarrollar sobre la superficie de la semillas y otros pueden causar infecciones internas, en su mayoría a veces pueden ser considerados saprofitos, pero también pueden ser estudiados como causantes de pérdidas antes o después de su cosecha, ya que su influencia puede presentarse de manera variable de manera que vaya incrementando su desarrollo, la viabilidad de las semillas llegan a decrecer y a si delimitar su porcentaje de germinación (Guerra *et al.*, 2004).

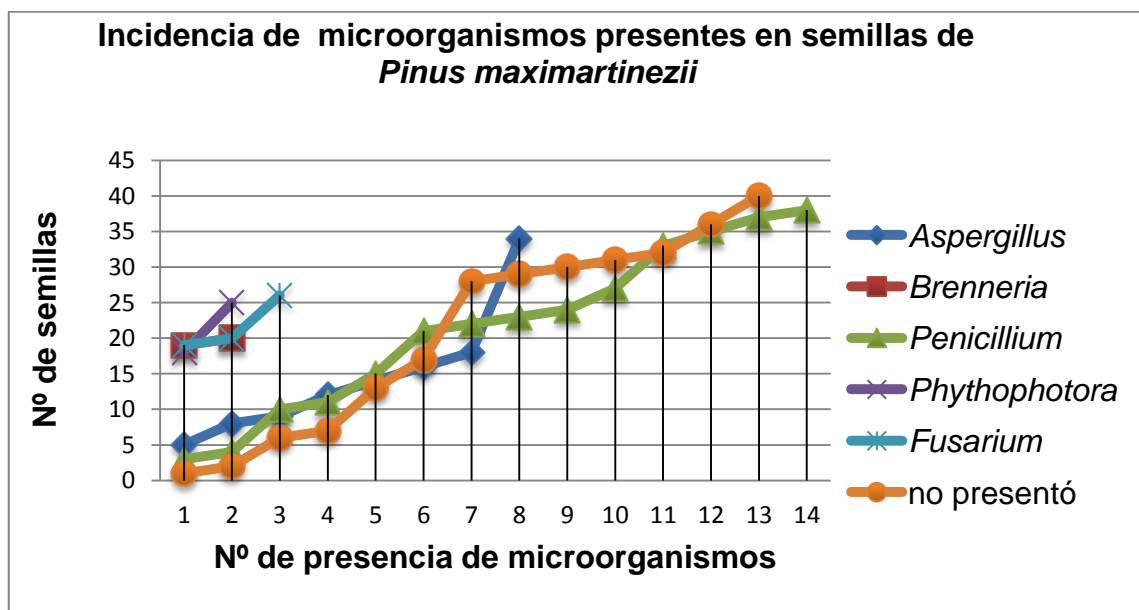


Figura 17 Microorganismos presentes en semillas de *Pinus maximartinezii*

Cuadro 3 Incidencia de microorganismo presentes en cámara húmeda y pruebas de congelación.

Claves de las Semillas	Patógenos
PIMA A 1CV.	X
PIMA A 2 CV.	X
PIMA A 3 CV.	<i>Penicillum</i>
PIMA A 4CV	<i>Penicillum</i>
PIMA A 5 CV.	<i>Aspergillus</i>
PIMA A 6 CV.	X
PIMA A 7 CV	X
PIMA A 8 CV	<i>Aspergillus</i>
PIMA A 9 CV.	<i>Aspergillus</i>
PIMA A10 CV	<i>Penicillum</i>
PIMA A 11 CV	<i>Penicillum</i>
PIMA A12CV	<i>Aspergillus</i>
PIMAA 13 CV	X
PIMA A 14 CV	<i>Aspergillus</i>
PIMA A15 CV	<i>Penicillum</i>
PIMA A 16 CV	<i>Aspergillus</i>
PIMA A 17CV	X
PIMA A 18CV	<i>Aspergillus, Phytophthora</i>
PIMA A 19CV	<i>Fusarium, Brenneria</i>
PIMA A 20 CV	<i>Fusarium, Brenneria</i>
PIMA A 21CV	<i>Penicillum</i>
PIMA A 22CV	<i>Penicillum</i>
PIMA A 23CV	<i>Penicillum</i>
PIMA A 24CV	<i>Penicillum</i>
PIMA A 25CV	<i>Phytophthora</i>
PIMA A 26CV	<i>Fusarium</i>
PIMA A 27CV	<i>Penicillum</i>
PIMA A 28CV	X
PIMA A 29CV	X
PIMA A 30CV	X
PIMA A 31CV	X
PIMA A 32CV	X
PIMA A 33CV	<i>Penicillum</i>
PIMA A 34CV	<i>Aspergillus</i>
PIMA A 35CV	<i>Penicillum</i>
PIMA A 36CV	X
PIMA A 37CV	<i>Penicillum</i>
PIMA A 38CV	<i>Penicillum</i>
PIMA A 39CV	<i>Penicillum</i>
PIMA A 40CV	X

De acuerdo a los resultados de la gráfica, los patógenos con mayor incidencia en las semillas *Pinus maximartinezii* fueron las del género *Aspergillus*, con un 20 % y 35 % para *Penicillium* (Figura 18). Considerados como saprofitos del suelo, pero también puede considerarse como patógenos importantes de las semillas almacenadas ya que se ve favorecido por exceso de humedad (Bolívar, 2007) de los patógenos importantes en semillas forestales específicas en las del género *Pinus* la incidencia que se presentaron en las semillas fue de un 20 % para *Phytophthora cinnamomi* y un 5 % para *Fusarium oxysporum* y una especie de bacteria que fue identificada como *Brenneria* spp. Esta bacteria se encontró en un 5 % de las semillas y el 30 % de las semillas se encontraron sanas sin ninguna presencia de microorganismos.

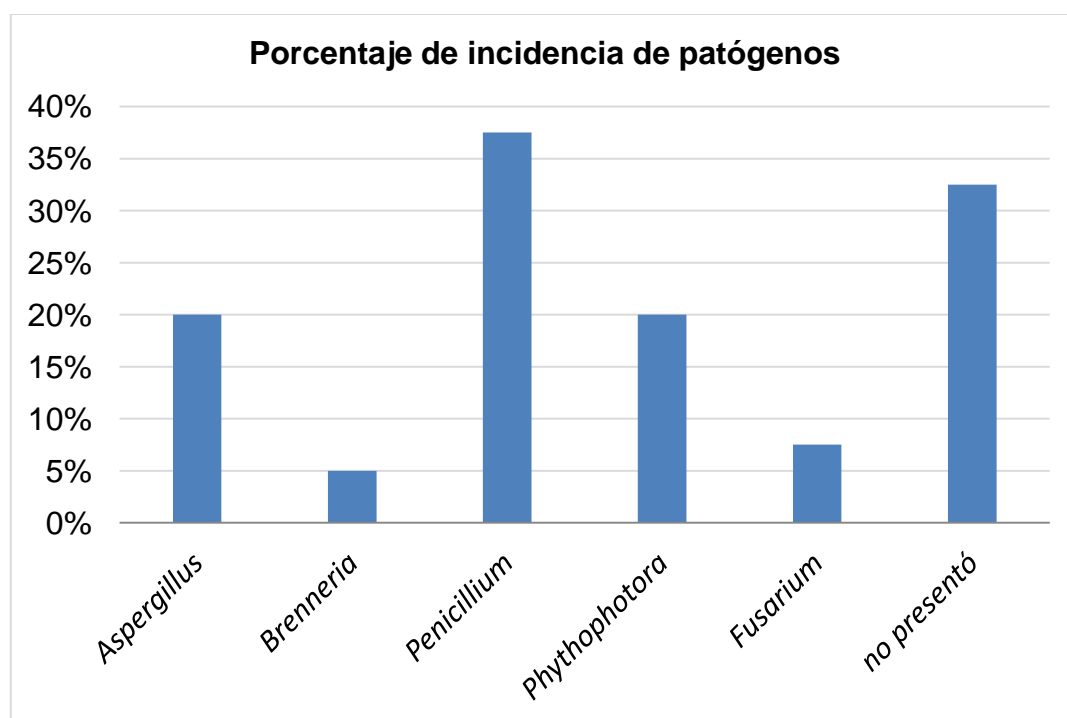


Figura 18 Incidencia de patógenos en semillas de *Pinus maximartinezii* UAAAN 2015.

5. CONCLUSIÓN

- 1.-Se aislaron cinco microorganismos en semillas de *Pinus maximartinezii*.
- 2.-Los hongos *Asperigullus* y *Penicillum* son importantes en semillas almacenadas
- 3.-Se identificaron tres patógenos de importancia forestal, *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium oxysporum*, *Brenneria* spp. De las semillas provenientes de Juchipila Zacatecas.
- 4.-Estos patógenos son encontrados por vez primera en la semillas del *Pinus maximartinezii*.

6. LITERATURA CITADA

- Abad Gloria .2002. Plant Pathogen Identification Laboratory. Depto. of Plant Pathology. Primer Taller Internacional sobre "Identificación de Hongos y Stramenopilas Transmitidos por semillas, Texcoco, México.26p.
- Agrios, G. N. 2006. Fitopatología. Ed Noriega. México. 838p.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., y Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology. 4th Ed. John Wiley and Sons, New York. 869p.
- Ángel Palomares José Luciano & Ercelia Morales .2007. Hongos Fitopatógenos de Importancia Agrícola 1ra Ed .Michoacán, México. 265p.
- Arauz Cavallini Luis Felipe .1998. Fitopatología un enfoque Agroecológico. Ed. San José .Costa Rica .117p.
- Argedas, M. 2009. Plagas y enfermedades forestales. La corona de agallas (*Agrobacterium tumefaciens*).Revista Forestal (Costa Rica) 26 (2) p.
- Arguedas Marcela .1997. Plagas de semillas forestales en América central y el Caribe Ed. Orlando Arboleda. Costa Rica. 113p.
- Arteaga Martínez Baldemar .1999. Producción de semilla de *Pinus maximartinezii* Rzedowski. Segundo Simposio sobre avances en la producción Semillas forestales en América Latina. CAITE, Costa Rica.53p.
- Barnett H.L. and Hunter B.B .2003. Illustrated genera of imperfect Fungi Ed. Burgess Publishing Company. Third Edition .United states of America.241p.
- Bolívar Blancas Mario. 2007. Manejo de granos en almacenamiento, causas de deterioro y prevención .Latinoamericana vol.15.Cusco Perú 10p.
- Cruz Hernández Angelina .2012. Producción de Semillas de *Pinus maximartinezii* Rzedowski en Juchipila, Zacatecas. Tesis del Departamento de Forestal Uaaan.18-19p.

- Fernández Olmos Ana, García de la Fuente Celia, Saés Nieto Juan Antonio, Valdezate Ramos Sylvia .2010. Metodos de Identificación bacteriana en el laboratorio de Microbiología. Seimc, México. 52p.
- FIPRODEFO (Fideicomiso para la Administración del Programa de Desarrollo Forestal) .2009. Experiencias y manual para la producción de árboles de navidad en el estado de Jalisco.
- Fonseca Juárez Rosa María .2003. De piñas y piñones Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal.65p
- Fry William E. & Nicklaus .J Grunewald .2010. Introducción a Oomycetes la Universidad de Cornell.
- Gallo Llobet Luisa, Miralles Ciscar Felipe, Álvarez de la peña Francisco Javier .1978. La podredumbre de las raíces del Aguacate. Ministerio de Agricultura, Madrid.p16.
- Gonzáles Biosca Elena, Pérez Laorga Arias Eduardo, Águila Clarés Begoña, Catala Senet José Francisco, Delgado Santander Ricardo, Gonzáles Abolafo, López Gonzáles María Milagros .2008. Distribución de *Brenneria* spp. En la comunidad Valenciana y especies forestales a las que afecta. Sociedad Española de Ciencias Forestales. Valencia, España.6p.
- González B. Pintos C.; Mansilla, J. P.; Agúin, O. & Pérez R. s/n. Presencia de especies de fusarium sobre semillas de *Pinus* spp. En Galicia. Estación Fitopatológica do Areeiro.vol.2.6p.
- González Elizondo Martha, González Elizondo M. Socorro, Ruacho González Lisbeth y Molina Olvera Moisés .20011. *Pinus maximartinezii* Rzed. (*Pinaceae*), primer registro para Durango, segunda localidad para la Especie. Acta Botánica nùm.96 Instituto de Ecología, A.C. Pátzcuaro, México.16 p.

- Guerra, Celia; Cruz, Haylett, Vila, Iviaine, Duarte Ángela, López, María O .2004. Principales hongos que afectan a *Pinus tropicalis* Morelet en Cuba Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal.Vol.8 La Habana, Cuba.16p.
- H.L. Barnett and Hunter Barry .1972. Illustrated género of imperfect Fungi Third edition Division of plant sciences West Virginia University Morgantown.p241.
- Hauben L, Moore ER, Vauterin L, M Steenackers, Mergaert J, L Verdonck, Columpios J .1988. Posición filogenética de Fitopatógenos dentro de las enterobacterias. Revista mexicana de Fitopatología 21 (3): 384-97.
- Kameswara Rao N, Jean Hanson, M. Ehsan Dulloo, Kakoli Ghosh, David Nowell & Michael Larinde .2007. Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8. Bioersity International, Roma, Italia.146p.
- López F.M.C .2002. Manual de prácticas de Bacteriología. Universidad Autónoma de Chapingo.59p.
- López Mata Lauro Galván & Escobedo Iris Grisel. 2011. Extracción de semillas de *Pinus maximartinezii* y sus consecuencias poblacionales CONABIO Biodeversistas, 98:1-7.
- López, M.M.; Martí, R.; Morente, C.; Orellana, N.; Ninot, T. & Aleta, N.; .1994. Bacterias fitopatógenas identificadas en nogal en España. 2: 307-314.
- Luko Hilje Q., Carlos Araya F., Félix Scorza R., Manuel Víquez .1991. Plagas y Enfermedades forestales en América. CATIE. Turrialba Costa, Rica p98.
- Mancilla Vázquez J. Pedro & Pintos Varela s/n. Aislamiento de *Phytophthora cinnamomi* Rands en viveros Forestales de *Pinus Radiata*. EXCMA.
- Martínez Benito José .1944. Un "Fusarium " patógeno, nuevo para la Micoflora Española. Laboratorio de Hongos y Patología vegetal del Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias. Madrid.13p.
- Martínez Sergio .2014. Hongos fitopatògenos en Bonsay.

- Medina Pachano Crístomo A .2000. Pudrición Radicular o Muerte Descendente (*Phytophthora cinnamomi* Rands) en plantaciones de aguacate vol.4. .SEDAF. Santo Domingo Republica Dominicana.4p.
- Mezzalama, M .2010. Sanidad de Semillas Reglas y normas para el desplazamiento seguro de germoplasma. 2da. Ed. CIMMYT México. 26p.
- Musalem, M. A., Lomas-Barrié, C. T. & Mendoza, M .2008. *Pinus maximartinezii*. 12 p.
- Pildain María Belén & Errasti Andrés .2011.Hongos patógenos de Pinos en la Patagonia y su asociación con plagas entomológicas.14p.
- Robin, C., Smith, I Smith, I., & Hansen, EM .2012. *Phytophthora cinnamomi*.
- Robledo Paz, Alejandrina, Villalobos Arámbula Víctor Manuel & cruz Varela .2009. Inducción Eficiente de Brotes Adventicios en Cotiledones de *Pinus maximartinezii* Rzedowski.16p
- Rodríguez Guzmán Ma. Del Pilar s/c. Biodiversidad de los Hongos Fitopatógenos del Suelo de México. Instituto de Fitosanidad Colegio de Postgraduados. Montecillos Chapingo, Edo. De México,
- Rodríguez Mejía Ma. De Lourdes. 2006. Manual para la Identificación de Bacterias. 3ra Ed. Costa Rica.146p.
- Rzedowski, J .1964. Una especie nueva de Pino piñonero del Estado de Zacatecas, México. Ciencia. 23(1) 17-20.
- SENASICA .2013. Cancro profundo del Nogal (*Brenneria Rubrifaciens*).Direccion general de Sanidad Vegetal. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2da. Ed México, D.F. 2p.
- Serrada R .2000. Apuntes de Repoblaciones Forestales. FUCOVASA, Madrid.77p.
- Shaad N.W. Jones, J.B.J, and w.Chun. 2005. Laboratory Guide for identification of plant Pathogenic Bacteria Third edited. p373.

Smith, IM, J. Dunez, Phillips DH, Lelliott RA, SA, & Archer, eds. 1988. Europea Manual de Enfermedades de las Plantas. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 583p.

Soria, M. M. López & M. J. López López .1997. Presencia, Sintomatología y Daños de *Erwinia quercina* en España y su posible relación con la “seca de la Encina” .10p.

Tainter, F.H., and F.A. Baker .1996. Principales of forest pathlogy. John wiley and.