

**CARACTERIZACION Y PATOGENICIDAD DE HONGOS ASOCIADOS AL
BARRENADOR AMBROSIAL (*Euplatypus segnis*) Y METABOLITOS
SECUNDARIOS EN MADERA DAÑADA DE NOGAL PECANERO (*Carya
illinoensis*).**

RAMON ALVIDREZ VILLARREAL

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA



**Universidad Autónoma Agraria
"Antonio Narro"**

**Buenvista, Saltillo, Coahuila.
Enero de 2012**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”
SUBDIRECCION DE POSTGRADO**

**CARACTERIZACION Y PATOGENICIDAD DE HONGOS ASOCIADOS AL
BARRENADOR AMBROSIAL (*Euplatypus segnis*) Y METABOLITOS
SECUNDARIOS EN MADERA DAÑADA DE NOGAL PECANERO (*Carya illinoensis*).**

POR

RAMON ALVIDREZ VILLARREAL

TESIS

**ELABORADA BAJO LA SUPERVISION DEL COMITÉ PARTICULAR DE ASESORIA
Y APROBADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE:**

DOCTOR EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

COMITÉ PARTICULAR:

Asesor principal _____
Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo

Asesor _____
Dr. Oswaldo García Martínez

Asesor _____
Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal

Asesor _____
Dr. Raúl Rodríguez Herrera

Asesor _____
Dr. Cristóbal Noe Aguilar González

Dr. Fernando Ruíz Zárate
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México; Enero de 2012

DEDICATORIA

A mi esposa Janet.

A mis hijos; Janet Getzeman, Ramón Ignacio y Diego Eduardo.

A mis padres; José Ignacio (+) y Alicia (+).

**A mis hermanos Manuel Ignacio, José Guadalupe, Martha, Álvaro Martín, Noé,
Antonio y María Alicia.**

AGRADECIMIENTOS

A nuestra Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria por brindarme el tiempo y el apoyo suficiente para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al pueblo de México.

A mi Alma Terra Mater por brindarme los elementos fundamentales para mi formación profesional.

Al Departamento de Investigación en Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila. por brindarme instalaciones y equipo para la investigación.

A los integrantes de mi Comité de Asesoría, Dr. Daniel, Dr. Oswaldo, Dra. Rosalinda, Dr. Raúl y Dr. Cristóbal.

A todos los maestros del Departamento de Parasitología Agrícola.

A las laboratoristas Ma. Cristina y Blanca.

A mis grandes amigos: Francisco y Faustino.

A todas las personas que de alguna u otra manera colaboraron en la realización de este trabajo.

COMPENDIO

**CARACTERIZACION Y PATOGENICIDAD DE HONGOS ASOCIADOS AL
BARRENADOR AMBROSIAL (*Euplatypus segnis*) Y METABOLITOS
SECUNDARIOS EN MADERA DAÑADA DE NOGAL PECANERO (*Carya
illinoensis*).**

Por

Ramón Alvidrez Villarreal

DOCTORADO

PARASITOLOGIA AGRICOLA

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, ENERO DE 2012

Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo –asesor-

Palabras claves: Patogenicidad, nogal pecanero, barrenador ambrosial y *Euplatypus segnis*, caracterizacion, identificacion, metabolitos secundarios y *Carya illinoensis*.

Euplatypus segnis, es un insecto considerado como plaga de importancia económica en el nogal pecanero, ya que en los Municipios de Parras, Torreón y General Cepeda ubicados en el Estado de Coahuila, México, se han reportado pérdidas de más de 773.82 ton anuales de nuez pecanera y 20% de la superficie establecida de nogal ha sido atacada por el insecto causándoles la muerte. *E. segnis* es un insecto ambrosial que establece simbiosis con hongos cuyo papel es importante como fuente de alimento y necesarios para culminar el ciclo de vida. El insecto a su vez colabora con la invasión de los hongos, causando finalmente la muerte del árbol. Adicionalmente, el insecto contribuye en la dispersión de los hongos en las plantaciones de nogal pecanero. Los hongos asociados al insecto y madera dañada de nogal pecanero identificados y caracterizados morfológicamente fueron *Helmintosporium sp*, *Aspergillus sp* y *Penicillium sp*, *Phoma*, *Ascochyta sp.*, *Phaeocylomices sp*, *Umbeliopsis sp*, *Torula sp*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* *Alternaria alternata*, *Lasiodyplodia (Botryodiplodia) theobromae*. En las pruebas de patogenicidad aplicadas a 28 árboles sanos de nogal pecanero del cultivar Westerns de tres años de edad, inoculados con una suspensión de 10^9 conidias/ml de los hongos asociados, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata* y *Lasiodyplodia (Botryodiplodia) theobromae* causaron muerte regresiva a los 84 días después de inoculados, y fueron caracterizados molecularmente a nivel de especie. Así mismo se ha observado que algunos árboles logran sobrevivir con y sin tratamiento químico, por ello el presente estudio también determino algunos de los cambios bioquímicos (contenido de nitrógeno, proteína cruda, terpenos, taninos condensados e hidrolizables, celulosa, lignina y sílice) que ocurren en los árboles del cultivar Western colonizado por este complejo. Se analizaron tres árboles sanos y tres dañados de tres huertas muestreadas en tres Municipios del estado

de Coahuila. Las variables de respuestas se analizaron bajo un diseño anidado, se realizó la prueba de comparación de medias utilizando la prueba de Tukey ($P < 0.05$). Los resultados indicaron que el contenido de: terpenos, taninos hidrolizables, celulosa lignina y sílice aumentaron significativamente en los arboles dañados en comparación de los sanos, esto permite inferir que estos componentes aumentan como una respuesta química de defensa del nogal pacanero a la invasión del insecto y a la acción enzimática de los hongos fitopatógenos asociados.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION AND PATHOGENICITY OF ASSOCIATED FUNGI AMBROSIA BORER (*Euplatypus segnis*) (CHAPUIS) AND SECONDARY METABOLITES DAMAGED PECAN (*Carya illinoensis*) WOOD

By

Ramón Alvidrez Villarreal

DOCTOR'S DEGREE SCIENCES

AGRICULTURAL PARASITOLOGY

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, JANUARY 2012

Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo –Advisor-

**Key Words: Pathogenicity, Pecan nut, and *Euplatypus segnis*, borer insect,
Characterization, identification, secondary metabolites, *Carya illinoensis***

Euplatypus segnis is an pest insect of economic importance in the Pecan nut, in Parras, General Cepeda and Torreón located in the State of Coahuila, Mexico, have been reported losses of more than 773.82 tons per year of nut Pecan and 20% of the set of walnut has been attacked by the insect causing death. *E. segnis* is an insect ambrosial

establishing symbiosis with fungi that are important as a source of food and necessary to complete the life cycle. The insect in turn works with the invasion of fungi, eventually causing tree death. Additionally, the insect contributes to the spread of fungi in Pecan nut plantations. The fungi associated with insect damaged wood walnut Pecan were identified and characterized morphologically *Helminthosporium sp.*, *Aspergillus sp.* and *Penicillium sp.*, *Phoma sp.*, *Ascochyta sp.*, *Phaeocylomices sp.*, *Umbeliopsis sp.*, *Torula sp.*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Lasiodyplodia (Botryodiplodia) theobromae*. In the pathogenicity tests applied to 28 healthy trees of walnut cultivar Pecan Westerns three years of age, inoculated with a suspension of 10⁹ conidia / ml of fungi associated, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata* and *Lasiodyplodia (Botryodiplodia) theobromae* dieback caused at 84 days after inoculation, and were characterized molecularly to the species level. It also has been observed that some trees can survive with or without chemical treatment. So The aim of present study also was to determine the biochemical changes (contained of nitrogen, crude protein, terpen, condensed and hydrolyzable tannins, cellulose, lignin and silicium) in tissue of pecan trees cv. Western colonized by Ambrosia Borer (*Euplatypus segnis* Chapuis) and associated fungi complex. Three damaged trees and three healthy trees were sampled in three different plantations in each one of three Coahuila State localities. The responses variables were analyzed under a nested design, Tukey s test ($p < 0.05$) was used to compare mean treatment differences. Data indicated that content of: terpenes, hydrolyzables tannins, cellulose, lignin and silicium increased significantly in the damaged trees in comparison to healthy trees. This results allowed inferring that these components increased as a chemical defense answer to insect invasion and to the enzymatic action of the associated phyto-pathogenic fungi

INDICE DE CONTENIDOS

PAGINA	No.
INDICE DE CONTENIDO	ix
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	2
JUSTIFICACION	4
Objetivos	6
REVISION DE LITERATURA	7
Clasificación taxonómica del insecto	7
Características morfológicas de la familia Curculionidae	7
Identificación de hongos fitopatógenos utilizando caracterización morfológica	11
Identificación de hongos fitopatógenos utilizando marcadores moleculares	12
Diagnóstico de hongos fitopatógenos utilizando marcadores moleculares	12
Género <i>Alternaria</i>	13
Caracterización Morfológica del Género <i>Alternaria</i>	15
<i>Alternaria alternata</i> (fr.) Keissler.	16
Genero <i>Fusarium</i>	16

Caracterización Morfológica del Genero <i>Fusarium</i>	17
<i>Fusarium solani</i> . (Mart.) Sacc.	18
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht.	19
Genero <i>Lasiodiplodia</i> (<i>Botriodiplodia</i>)	19
Caracterización Morfológica de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> Pat.	20
Barrenadores ambrosiales	20
Hábito de alimentación de los barrenadores	21
Hongos ambrosiales.	22
Mutualismo entre insectos y hongos.	23
Mecanismos de transmisión de hongos por barrenadores.	24
Los hongos como alimento de los barrenadores.	26
Los barrenadores y la especificidad del hospedero.	28
El mutualismo y su relación con el clima.	29
Metabolismo secundario de plantas.	30
Defensa metabólica inducida por el ataque de los patógenos	31
Interacción planta-patógeno	32
Nutrición de los fitopatógenos	33
Especificidad de las interacciones planta-patógeno	33
Defensa de las plantas	35
Activación de la defensa	36
Mecanismos de reconocimiento	37
Mecanismos de defensa	38

Reacción hipersensible	39
Producción de fitoalexinas	40
Formación de barreras estructurales	41
ARTICULO 1	43
Secondary Metabolite Changes in Pecan (<i>Carya illinoensis</i>) Tissue Damaged by <i>Euplatypus segnis</i> Chapuis and Associated Fungi	
ARTICULO II	77
Isolation and Pathogenicity of Fungi Associated to Ambrosia Borer (<i>Euplatypus Segnis</i>) Found Injuring Pecan (<i>Carya illinoensis</i>) Wood	
CONCLUSIONES GENERALES	98
LITERATURA CITADA	100

INTRODUCCION

El nogal pecanero, *Carya illinoensis* Koch es originario del norte de México y Sudeste de los Estados Unidos de Norte América, donde se encuentra distribuido en los estados de Texas, Oklahoma, Nuevo México, Alabama, Mississippi, Illinois. Este país ocupa el primer lugar, ya que produce 316,806.92 toneladas de nuez anualmente que representan el 78.6 por ciento de la cosecha mundial. México se sitúa en el segundo lugar con una producción de 79,002.8 toneladas que equivale al 19.6 por ciento de la producción mundial; Australia e Israel aportan el 1.8 restante. (Shafer, 1999).

En México los principales estados productores de nuez son: Chihuahua 40,590.21 ha, Coahuila 11,668.00 ha, Nuevo León 4,278.00 ha, Durango 3,192.39 ha y Sonora 2,338.00 ha, que ocupan el 97.56% de la superficie plantada. En menor importancia están, Hidalgo 679.40 ha, Oaxaca 225.00 ha, Aguascalientes 194.00 ha, Querétaro 147.00 ha, San Luis Potosí 109.00 ha, Tamaulipas 79.00 ha, Guanajuato 60.00 ha, Jalisco 24.00 ha, Zacatecas 34.00 ha, que en conjunto suman una superficie nacional plantada de 63,617.60 hectáreas, (SIACON, 2004)

La región Sur de Coahuila que comprende entre otros, a los Municipios de Parras, Torreón y General Cepeda, donde se llevará a cabo el estudio, se encuentran establecidas 11,668 ha con un rendimiento promedio de 1,658 Ton/ha, produciendo un total de 19,345.54 Toneladas anuales, con una densidad de 525,060 árboles, de los cuales el 20 % están atacados por *E. segnis*. Esta plaga afecta al nogal ocasionando una

pérdida aproximada de 773.82 ton por pérdidas, que equivale al 4 por ciento de la producción total (CESAVECO, 2002).

En el área, el manejo de este cultivo se requiere invertir , 3,000, 000 de pesos por ciclo, aproximadamente equivalentes a un millón de jornales para actividades de desmonte, trazo, plantación, injertos, poda, labores culturales, apaleo, recolección, envasado, venta, transporte, etc. (Zamudio, 1981), (ASERCA, 2004)

El nogal pecanero es atacado por el barrenador ambrosial *Euplatypus segnis* quien está relacionado con la introducción y diseminación de hongos específicos que causan un daño adicional al árbol produciendo lesiones y cánceres de diferentes magnitudes que llegan a causar la muerte de nogales jóvenes y adultos.

En 1996 se inició una campaña contra el barrenador donde se involucraron diversos organismos: Gobierno del Estado, Departamentos de Fomento Agropecuario de las Presidencias Municipales, Asociaciones de Productores, Instituto de Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias; organizados en el Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Coahuila. (CESAVECO, 2001). En los últimos ciclos agrícolas se han venido utilizando métodos de control aislados, que van desde el químico (Malation 500), Mezcla Vélez que al parecer contienen fungicidas insecticidas y atrayentes de insectos, control cultural colocando trampas pegajosas, incineración de árboles dañados, y en menor escala el control biológico (aplicación del hongo entomopatógeno, *Beauveria bassiana*), sin resultados satisfactorios. En pocos años *Euplatypus segnis* se ha convertido en plaga clave de los nogales de la región.

El cultivo del nogal enfrenta este grave problemas fitosanitario, y esto se puede observar al hacer recorridos por el área al encontrar árboles con sintomatología de enfermos, asociados con un barrenador el cual se encontró produciendo aserrín suelto

finamente molido en la base de los tallos, o aserrín en forma de pequeños cigarros en la corteza. En los orificios de entrada también se detecta la presencia de excreciones líquidas color cristalino, rojiza que posteriormente se tornan a café obscura el cual presentan un olor penetrante. Al despegar la corteza se observan orificios de 2 mm de diámetro y mancha necróticas, con la forma punta de diamante teniendo como punto de partida el orificio de entrada de los insectos; las mancha necróticas varían en color que van desde el café claro al café rojizo.

En árboles colonizados por el barrenador, se observan síntomas como pérdida de turgencia, amarillamiento, caída de hojas, muerte parcial de ramas y muerte total del árbol. Estos síntomas se observan principalmente en la parte apical del árbol donde también se detecta una fuerte actividad del insecto.

Los productores de estas zonas mencionan que cuando inicia la expresión de estos síntomas, la muerte del árbol ocurre en lapsos de tiempo relativamente cortos (tres meses a un año). Todas estas situaciones contribuyen al descenso de la producción de nuez en la región. Este barrenador pertenece a un grupo coleópteros que normalmente se encuentran relacionados con la diseminación de hongos específicos que causan daños internos al árbol, adicional al físico, como son las perforaciones. Hasta ahora no existe ningún estudio sobre su relación con cambios bioquímicos, lesiones o cánceres de diferentes tamaños que se observan en los árboles colonizados y con los hongos que se han observado o consignado en la literatura.

ANTECEDENTES

En un estudio realizado por Cuellar (1986) en huertas nogaleras de Santa María de Río San Luis Potosí, determino que el 41.45 por ciento de los árboles estaban sanos 34.42 plagados y 24.12 por ciento muertos, porque siempre ha estado presente *Euplatypus segnis*, y que las razones de que sus poblaciones hayan explotado deben ser de orden ecológico principalmente.

Jiménez (1991) fue el primero en realizar un estudio de la magnitud del problema sobre *Euplatypus segnis* en el estado de Coahuila determinando que esta presente en nogal pecanero dañando en su mayoría a árboles criollos, incluyendo al conocido como Fructuoso, en los Municipios de General Cepeda, Parras y Torreón. Este autor concluye también que este insecto estaba presente en zonas aledaña a Saltillo, como El Álamo y la Aurora pero no en Los González, Arteaga y Ramos Arizpe.

Alvídrez (2000) reporta a los hongos asociados al tejido vegetal del nogal pecanero son: *Fusarium solani*, *Fusarium lateritium*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium nivale*, *Phoma* sp., *Gonatobotrys* sp., *Colletotrichum* sp., *Alternaria alternata*, *Cephalosporium* sp., y *Stemphylium* sp.

Los hongos asociados al cuerpo de *Euplatypus segnis* (Chapuis) son: *Fusarium solani*, *Fusarium lateritium*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium nivale*, *Phoma* sp., *Gonatobotrys* sp., *Colletotrichum* sp., *Alternaria alternata*, *Cephalosporium* sp. y *Stemphylium* sp.

La presencia de numerosos hongos en la enfermedad progresiva del tronco y ramas del nogal pecanero (*Carya illinoensis* Koch.) en las regiones productoras de Coahuila y Chihuahua, dificulta el manejo de esta y se acentúa más cuando se encuentran interactuando entre ellas.

JUSTIFICACIÓN

En árboles colonizados por el barrenador, se observan síntomas como pérdida de turgencia, amarillamiento, caída de hojas, muerte parcial de ramas y muerte total del árbol. Estos síntomas se observan principalmente en la parte apical del árbol donde también se detecta una fuerte actividad del insecto.

Los productores de estas zonas mencionan que cuando inicia la expresión de estos síntomas, la muerte del árbol ocurre en lapsos de tiempo relativamente cortos (tres meses a un año). Todas estas situaciones contribuyen al descenso de la producción de nuez en la región. Este barrenador pertenece a un grupo de coleópteros que normalmente se encuentran relacionados con la diseminación de hongos específicos que causan daños internos al árbol, adicional al físico, como son las perforaciones.

En pocos años *Euplatypus segnis* se ha convertido en plaga clave de los nogales de la región, y esto se puede observar al hacer recorridos por el área al encontrar árboles con sintomatología de enfermos, asociados con un barrenador el cual se encontró produciendo aserrín suelto finamente molido en la base de los tallos, o aserrín en forma de pequeños cigarros en la corteza. En los orificios de entrada también se detecta la presencia de excreciones líquidas color cristalino, rojiza que posteriormente se tornan a café oscuro el cual presentan un olor penetrante. Al despegar la corteza se

observan orificios de 2 mm de diámetro y mancha necróticas, con la forma punta de diamante teniendo como punto de partida el orificio de entrada de los insectos; las manchas necróticas en el xilema varían en color que van desde el café claro al café rojizo, probablemente producidos por metabolitos secundarios, como una respuesta defensiva inducible ante la invasión de tejidos vegetales por un microorganismo foráneo. Esta “respuesta hipersensible” o apoptosis (muerte celular programada) de las células vegetales ocurre en aproximadamente 24 horas después que la planta percibe un patógeno potencial. El objetivo de esta apoptosis en la zona en la que se ha detectado la penetración de un microorganismo patogénico es el de aislar al invasor.

En un equivalente biológico a una estrategia de “tierra quemada”, el fenómeno que consiste en retirar los nutrientes al atacante, aislar el área por medio del refuerzo mecánico de las paredes celulares de células circundantes y secretar fitoalexinas en la zona aislada. (. Vivanco, *et al.* 2005)

Kuroda y Yamada (1996) han reportado que el marchitamiento de los árboles de roble contiene un xilema de color oscuro que casi cubre las secciones de cruce de los troncos más bajos donde las galerías de los escarabajos son encontradas, y la savia ascendente es completamente detenida en esas áreas.

El área descolorida es llamada lesión del corazón de madera o lesión de madera y es disfuncional. Esto sugiere la posibilidad para resolver el mecanismo del marchitamiento del factor causal para la formación de la lesión de madera.

Hasta ahora no existe ningún estudio sobre su relación con los cambios bioquímicos que sufre el árbol, lesiones o cánceres de diferentes tamaños que se observan en los árboles colonizados y con los hongos que se han observado o consignado en la literatura.

Objetivos

- Aislar y caracterizar los hongos fitopatógenos asociados con *Euplatypus segnis* y tejido vegetal dañado del nogal pecanero a través de técnicas morfológicas y moleculares.
- Determinar la patogenicidad de los hongos asociados con *Euplatypus segnis* que dañan al nogal pecanero (Incidencia, severidad y progresión de la enfermedad).
- Identificar los metabolitos secundarios derivados de la acción de los hongos.

REVISION DE LITERATURA

Clasificación taxonómica del insecto (Borror, *et al.*, 1992; Wood, 1992)

Reino..... Animal

Phylum..... Arthropoda

Subphylum..... Atelocerata

Clase..... Hexapoda

Subclase..... Pterygota

División..... Endopterygota

Orden..... Coleoptera

Suborden..... Polyphaga

Superfamilia..... Curculionoidea

Familia..... Curculionidae

Subfamilia..... Platypodinae

Tribu..... Platypodini

Género..... *Euplatypus*

Especie..... *segnís* (Chapuis)

Características morfológicas de la familia Curculionidae

El segmento tarsal 1 es tan largo como los segmentos 2 al 5 combinados; el cuerpo es alargado y de lados paralelos, la cabeza es visible dorsalmente y tan ancha o

ligeramente más ancha que el pronotum; el color es café - rojizo, y miden de 2-9 mm de longitud.

El insecto *Euplatypus segnis* (Chapuis) (Coleoptera: Platypodidae), también conocido como barrenador del tronco y ramas, ataca a árboles de nogal pecanero, *Carya illinoensis* K; aguacatero, *Persea americana* Mill; manzano, *Malus* spp; quince, *Cydonia oblonga* Mill; duraznero *Prunus persica* L; granado, *Punica granatum* L; chabacano, *Prunus armeniaca* L; álamo *Populus* spp; mora, *Morus micophylla* Buck; y fresno, *Fraxinus uhdei* (Wenzig.), debilitados por sequia, daño mecánico, incendios y heladas intensas (Samaniego, 2008). El barrenador se encuentra en México en los estados de Coahuila, Durango, Chihuahua, San Luis Potosí y Jalisco (Equihua y Atkinson, 1987; García, 1999; Galván, 2000). *E. segnis* es una especie monogina por su tipo de comportamiento reproductivo (Kirkendall 1983), polífaga por su grado de especificidad con respecto al hospedero, y xilomicetófago por su hábito de alimentación, consumiendo los conidios de los diferentes hongos, que siembran y cultivan (Wood, 1982). Ulloa, (1991) menciona que los barrenadores tienen el hábito de alimentarse de los hongos introducidos por ellos, en el sistema de galerías construidas en la madera. Estos hongos parecen ser no específicos relativamente y necesitan básicamente madera húmeda para su desarrollo. Las especies que cultivan hongos en las galerías se llaman escarabajos o barrenadores de la ambrosia y ellos son dominantes en las áreas tropicales (Flechtmann, 1995). La mayoría de las construcciones de los sistemas de túneles de los barrenadores de ambrosia (galerías) son en tejidos finos de hospederos vigorosos, debilitados recientemente muertos, aunque unas ciertas especies se especializan por colonizar la médula, semillas grandes, frutas, y los peciolo de la hoja (Harrington 2005, Wood 1982). El término ambrosia se refiere a los hongos cultivados por los

escarabajos en las paredes de la galería, sobre los cuales se alimentan como fuente exclusiva de alimento. Los escarabajos son obligatoriamente dependientes de los hongos, de los cuales adquieren las vitaminas, los aminoácidos, y los esteroides esenciales (Beaver 1989, Kok et al. 1970). Los hongos constituyen la principal fuente de alimentos para larvas y adultos y son esenciales para culminar su ciclo de vida (Morales 2000). En algunas tribus, solamente las hembras realizan tareas de cultivo en el huerto, mientras que los machos son de poco vuelo breve duración (Norris 1979). Después de copular, las hembras se dispersan al nuevo sustrato del hospedero, llevando los hongos en los bolsillos especializados llamados micangia. Una vez dentro, las hembras fundadoras "plantan" los hongos en las paredes de los túneles excavados, ponen los huevos, atienden el cultivo y a la crías (Norris 1979). De una manera no entendida, pueden controlar el crecimiento de la cosecha fungina, así como, el grado de composición múltiple de la especie (Beaver 1989, French y Roeper 1972, Kingsolver y Norris 1977, Roeper et al. 1980). Si la hembra muere, el cultivo es rápidamente contaminado por otro tipo hongos y bacterias, que da lugar en última instancia a la muerte de la cría (Borden 1988, Norris 1979). Los cultivos de hongos ambrosiales de los barrenadores, no son monocultivos puros como cree, pero se componen de una mezcla de micelio de hongos, levaduras, y bacterias (Batra 1966, Haanstadt y Norris 1985). Norris (1965) llamo a estas mezclas complejos multiespecie. Sin embargo, trabajos más recientes han revelado que un hongo primario domina siempre en los cultivos del insecto (Baker 1963, Batra 1966, Gebhardt *et al.* 2004, Kinuura 1995). Además, los escarabajos llevan solamente el hongo primario en las micangias (aunque los hongos secundarios a veces también se aíslan de micangia), las hembras tienden a favorecer el cultivo del hongo primario, que le da una gran ventaja alimenticia (Francke-Grosman 1967, Gebhardt *et al.* 2004,

Morelet 1998, Norris 1979). Algunos hongos auxiliares también apoyan el desarrollo del escarabajo, pero la supervivencia apoyada solamente en hongos auxiliares se reduce grandemente (Norris 1979). Estas observaciones implican el hongo primario como la cosecha primaria, mientras que los hongos, levaduras y las bacterias secundarias pueden ser "malas hierbas" o pueden desempeñar papeles auxiliares adicionales en los cultivos. La transmisión del cultivar fungoso entre las generaciones de los escarabajos granjeros es transmitida verticalmente por el padre a las generaciones descendientes (Fernandez-Marin *et al.* 2004, Francke-Grosmann 1967, Haanstad y Norris 1985). Las hembras reproductivas adquieren inoculo de sus cultivos originales, lo llevan con ellos en bolsas especializadas durante vuelos de dispersión y utilizan este inoculo como semilla para sus nuevos cultivos. Los barrenadores ambrosiales solamente se asocian a una especie particular de cultivar primario dentro de una región geográfica específica (Gebhardt *et al.* 2004, Batra 1967). Sin embargo, aunque la mayoría de los escarabajos se asocian a una especie específica de hongo primario en su área geográfica. Especies de escarabajos de ambrosia relacionadas distantemente se asocian a veces al mismo cultivar fungoso, implicando el intercambio, directo o indirecto. El intercambio del cultivar entre y dentro de la especie de escarabajos puede ocurrir cuando diversas hembras colonizan el mismo árbol y las asociaciones de hongos contaminan galerías adyacentes. (Gebhardt *et al.* 2004). Los hongos primarios son principalmente asexuales (Jones y Blackwell 1998, Rollins *et al.* 2001), ejemplos de ellos son; *Xyleborus ferrugineus* con el hongo *Botryodiplodia theobromae* en aguacate (*Persea americana* Mill) (Rondón y Guevara, 1984); *Xyleborus ferrugineus* con los hongos *Fusarium solani*, *Cephalosporium sp.* y *Graphium sp.* (Kok y Norris, 1972); *Ips typographus* y el hongo *Ophiostoma polonicum* en *Picea abies* (Brignolas, 1995); *Hypotenemus hampei* con el hongo *Fusarium solani*

en árboles del género *Coffea* (Morales et al., 2000); *Platypus quercivorus* y el hongo *Raffaelea quercivorus* en *Quercus crispula* y *Q. serrata* (Kuroda, 2001); *Hypothenemus hampei* con *Penicillium brocae* en *Coffea arabica* (Peterson et al. 2003); *Platypus mutatus* con un hongo simbiótico desconocido, en plantaciones comerciales de álamo (Alfaro, 2003). *Euplatypus segnis* con los hongos *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Alternaria alternata* y *Botryodiplodia sp* en *Carya illinoensis* (Alvidrez, 2007), mientras que los hongos auxiliares menos específicos, son a menudo sexuales (Francke-Grosmann 1967).

Identificación de hongos fitopatógenos utilizando caracterización morfológica

La caracterización morfológica de los deuteromicetos se basa principalmente en la estructura, composición y ultraestructura de las células conidiales, conidióforos, acérvulos, picnidios, esporodoquios, sinnemas y clamidosporas (Barnett y Hunter, 1998).

La clave de clasificación generada tomando en cuenta criterios morfológicos es artificial, por lo que el arreglo de los géneros no necesariamente implica relaciones filogenéticas entre ellos (Hanlin, 1990).

La identificación de organismos fitopatógenos por medio de métodos tradicionales, incluye el aislamiento del patógeno y la caracterización de estos a través de pruebas de patogenicidad y características morfológicas que son laboriosas, con un alto consumo de tiempo y propensas a errores si no se tiene la debida experiencia y cuidado (Alves et al., 2002).

Identificación de hongos fitopatógenos utilizando marcadores moleculares

La identificación adecuada de organismos patógenos de las plantas cultivadas es importante en la implementación de estrategias para el manejo y control de enfermedades (Weiland y Sundsbak, 2000). Particularmente se requiere la caracterización fenotípica y genética de los patógenos de plantas persistentes en un área determinada.

La aplicación de marcadores moleculares, permite clarificar las relaciones genéticas de los grupos de hongos fitopatógenos (O'Neill *et al.*, 1997), principalmente cuando los criterios morfológicos de clasificación son variables. El uso de marcadores moleculares permite la identificación de organismos fitopatógenos de forma viable y con mayor certeza por estar basado en la composición del ADN.

La amplificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos tiene una alta sensibilidad para discriminar entre diferentes aislados, por ejemplo, se pueden discriminar con precisión diferentes aislados de *Fusarium oxysporum*. La utilización de marcadores moleculares permite además procesar un gran número de muestras en un corto periodo de tiempo (Alves *et al.*, 2002).

Diagnóstico de hongos fitopatógenos utilizando marcadores moleculares

Los análisis moleculares se utilizan en la identificación de hongos, especialmente para géneros dentro de los cuales las especies tienen características morfológicas

coincidentes entre ellas (Martin *et al.*, 2000). La detección o diagnóstico molecular podría ser más útil a partir de tejido vegetal y/o muestras de suelo directamente, sin embargo, se necesitan de mayores avances, principalmente en el desarrollo de técnicas más confiables y con mayor disponibilidad para la extracción de ADN y/o ARN de tejido vegetal o suelo, para la aplicación práctica de estas tecnologías en laboratorios de diagnóstico (Martin *et al.*, 2000).

Género *Alternaria*

El género *Alternaria* fue establecido en el año 1817 por Nees von Esenbeck con el nombre de *Alternaria tenuis*. El nombre *Alternaria* viene del latín “*alternare*” y se refiere a la disposición que guardan los conidios (Ulloa y Herrera, 1994). El género *Alternaria* spp. es un hongo deuteromyceto que pertenece a la clase Hyphomycetes en el orden Moniliales de la familia Dematiaceae (Barnett y Hunter, 1998). Esta familia se distingue por agrupar los hongos que producen los conidios pigmentados. Los conidióforos de *Alternaria* se caracterizan por poseer uno o más septos transversales con apariencia geniculada (Ellis, 1971). Los conidios son de color marrón pálido a marrón oscuro, ovalados u obclavados, con o sin cuello, poseen un annulus y son multicelulares con septos transversales, longitudinales y algunas veces oblicuos (Simmons, 1992; Ellis, 1971). Estos pueden estar solitarios o formando cadenas de manera acropetal donde el conidio más joven se encuentra en el ápice de la cadena. Needgaard (1945), citado por Rotem (1994), separó las especies de *Alternaria* dentro de tres grupos en base al número de esporas en la cadena. Los grupos son **Longicatenatae**, caracterizado por cadenas largas de aproximadamente 10 conidios sin cuello, por ejemplo *A. alternata*,

Brevicatenatae con cadenas cortas de 3-5 conidios con cuellos cortos, por ejemplo *A. tenuissima* y **Noncatenatae**, con conidios solitarios con cuellos largos, por ejemplo *A. helianthi* (Rotem, 1994).

Alternaria es un organismo cosmopolita el cual se encuentra en una variedad de habitats en el mundo. Muchas de las especies son saprofíticas, las cuales se pueden encontrar en materia orgánica en descomposición y en el suelo. Algunas especies son patógenas de cereales, plantas ornamentales, vegetales, hortalizas y frutales. Sin embargo, hay otras especies que afectan los productos postcosecha y las semillas como por ejemplo *A. radicina* Meier, Dres. & Eddy el cual causa la pudredumbre negra de la zanahoria en almacenaje (Pryor y Gilbertson, 2001). *Alternaria yaliinficiens* Rodney, *A. alternata* (Fr.) Keissler y *A. gaisen* Nagano provocan grandes daños en el cultivar de pera ‘Ya Li Pear’ en condiciones de almacenaje (Rodney, 2004). Las enfermedades causadas por diferentes especies de *Alternaria* se caracterizan por producir manchas foliares y pudriciones en raíces o frutos. Las manchas foliares son generalmente de color marrón oscuro a negro y usualmente forman anillos concéntricos (Agrios, 1997). En algunas especies su teleomorfo corresponde a un loculoascomiceto del género *Lewia* Barr & E. Simmons y otras al género *Pleospora* Rabenh. ex Ces y De Not.

Su clasificación basada en las características de los conidios es complicada, ya que este hongo es mayormente confundido con otros hongos, entre los cuales se encuentran: *Stemphylium*, *Nimbya*, *Urocladium* y *Embellisia* (Rotem, 1994). Simmons (1995), diferenció el género *Alternaria* de *Stemphylium* y *Urocladium* por la apariencia del ápice del conidióforo y el terminal basal del conidio inmaduro, respectivamente.

Las especies de *Alternaria* poseen dos rasgos importantes, la producción de melanina especialmente en los conidios y la producción de toxinas específicas del hospedero en caso de las especies fitopatógenicas (Thomma, 2003). Se han reportado alrededor de siete especies de *Alternaria* que producen toxinas específicas para el hospedero (HST) (Simmons, 1999). Se han documentado aproximadamente 12 toxinas específicas al hospedero producidas por especies patógenicas de *Alternaria* (Thomma, 2003; Walton, 1996). Las toxinas son AA1 (*Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici*), ACT (*A. alternata* f.sp. *citri tangerine*), AF (*A. alternata* f.sp. *fragariae*), AK (*A. alternata* f.sp. *kikuchiana*), ACTG (*A. alternata* f.sp. *citri tangerine*), ACR (*A. alternata* f.sp. *citri jambhiri*), AM (*A. alternata* f.sp. *mali*), Maculosina (*A. alternata*), AS (*A. alternata*, girasol), Destruixina (*A. brassicae*), AT (*A. alternata*, tabaco), ATC (*A. tenuissima*, frijol) y AB (*A. brassicicola*) (Thomma, 2003).

Caracterización Morfológica del Género *Alternaria*

Al caracterizar morfológicamente las especies de *Alternaria* hay que considerar varios criterios como lo son la producción de toxinas, planta huésped, catenulación, septos y esporulación, entre otras (Andersen *et al.*, 2001; Ellis, 1971; Simmons, 1995 y 1999; Simmons y Roberts, 1993). Estos criterios están influenciados por factores externos incluyendo la humedad, luz, temperatura y la nutrición. La esporulación de *Alternaria* ocurre en dos fases y ésta depende principalmente de la temperatura y la luz.

Los rayos ultravioleta (UV) median la formación del conidióforo y la oscuridad la producción de conidios (Rotem, 1994). No obstante, la producción de los conidios puede ser inhibida por los rayos ultravioletas. Simmons, (1999) caracterizó

taxonómicamente diferentes especies de *Alternaria* utilizando como criterio la producción de toxinas específicas en cultivos anéxicos.

Estas toxinas son esenciales para la patogénesis. Simmons utilizó medios especiales tales como agar de papa y zanahoria, agar de grama en descomposición y agar de jugo de vegetales (V8) para observar la esporulación y la forma de los conidios de las diferentes especies de *Alternaria*.

***Alternaria alternata* (fr.) Keissler.**

En medio de cultivo forma colonias afelpadas o pulverulentas de color verde oscuro a oliváceo, su crecimiento es algodonoso y el micelio se interna en el medio de cultivo. Hifas septadas y pigmentadas, el conidio elipsoidal grande es una dictiospora septada en forma transversal y longitudinal (moriforme) formando cadenas.

Genero *Fusarium*

Las especies de *Fusarium* están ampliamente distribuidas en los suelos y sustratos orgánicos, por ejemplo, han sido aislados desde el permafrost en el ártico hasta de las arenas del Sahara (Booth, 1971). Abunda en suelos cultivados de zonas templadas y tropicales y es el hongo más frecuentemente aislado por los fitopatólogos (Booth, 1971).

Fusarium es ampliamente reconocido por sus macroconidias fusiformes distintivas, sin embargo, a pesar de esta característica primaria hay muchas dificultades

para delimitar el género utilizando la morfología para alcanzar conceptos filogenéticos consistentes (Summerell et al. 2001).

Caracterización Morfológica del Género *Fusarium*

La forma y tamaño de las esporas es la característica principal para el reconocimiento de los fusarios. Las esporas están dispersas en el micelio aéreo o en esporodoquios o masas limosas (pionotos). Los macroconidios son curvados, pluriseptados, con una célula apical más o menos puntiaguda y en muchas especies con una célula basal en forma de pie. Los microconidios son comúnmente unicelulares, elipsoidales, fusiformes, claviformes, piriformes o subglobosos, similares en ancho a los macroconidios, con una base redondeada o truncada, por lo general formando cabezuelas mucosas, pero en algunas especies en cadenas basípetas. No siempre son producidos ambos tipos de esporas. Los conidióforos del micelio aéreo en algunos casos sólo constan de una célula conidiógena, en otros están ramificados, a veces en verticilos. Las monofiálides producen conidios desde una sola abertura y en las polifiálides surgen las esporas desde más de una abertura en la misma célula (Booth 1971).

La presencia de una célula basal con forma de pie en los macroconidios se considera característica de *Fusarium* pero varios géneros de *Coelomycetes* también la tienen. A su vez unas pocas especies de *Fusarium* presentan conidios pluriseptados sin esa célula basal y se las llama mesoconidios (Seifert 2001). Algunas especies presentan clamidosporas terminales, laterales o intercalares, a veces formando cadenas. Las células conidiales ocasionalmente se transforman en clamidosporas. Algunas especies forman esclerocios irregulares, de color beige, ocre, pardo o gris oscuro.

Las colonias de los distintos *Fusarium* que crecen moderada a profusamente, tienen diversos colores (blanco, rosado pálido, rojo, anaranjado, púrpura, celeste, verde aceituna o pardo), especialmente en el el reverso de la colonia, excepto pardo oscuro o negro. El micelio es ralo o denso, ya sea algodonoso, como un fieltro o con una zona central de funículos, pero en algunos casos es limoso. Hay *Fusarium* con pionotos de color anaranjado. Los pigmentos que difunden en el agar suelen variar de color o tono con el pH. Algunas especies presentan zonas concéntricas de distinta morfología macroscópica debido a la secuencia luz - oscuridad (Seifert 2001).

Los teleomorfos producen peritecios y pertenecen a los géneros *Cosmospora*, *Gibberella*, *Nectria* (*Albonectria*, *Haematonectria*), *Monographella* y *Plectosporium* (Samuels et al. 2001). La mayoría de las especies son heterotálicas. Ocasionalmente se suele observar a *N. haematococca* Berk. & Br. (*F. solani*) en los cultivos corrientes y con frecuencia los peritecios de la homotálica *G. zae* (Schw.) Petch (*F. graminearum*) al prolongar la incubación (Booth 1971).

***Fusarium solani*. (Mart.) Sacc.**

Presencia de microconidios unicelulares y algunas veces se presentan bicelulares la dimensiones de estas son 8.50 - 12.15 μ y 2.43-3 μ las características de los macroconidios son: la célula apical del macroconidio termina en forma reducida y redondeada y la célula de la parte basal en forma de pie. La ramificación de las fiálides son lateral y largas de dimensiones de tamaño fueron de 46.17 - 60.75 de largo X 2.43 - 3 μ de grueso. Las fialides se adelgazan en la parte terminal donde hay la producción de conidios. La presencia de clamidosporas en la parte terminal intercalares y en cadena

es muy evidente cuando el cultivo tiene más de siete días de edad, el tamaño de estas son 8.5- 12.15 X 8.5-9.2 μ .

Fusarium oxysporum Schlecht.

El color de la cepa varia de color rosado a color púrpura intenso. Los microconidios son abundantes en las diferentes etapas de crecimiento, la forma de estos es oval a elipsoidal, unicelulares con dimensiones de 4.86-9.72 X 2.43-2.91 μ . Los macroconidios son escasos; las dimensiones son de 27.73 - 31.59 x 2.43-2.91 μ de forma muy similar a los macroconidios de *Fusarium solani*. Las fiálides de esta especie son cortas 4.86 - 12.15 μ con un estrangulamiento en la parte apical en comparación con *Fusarium solani*. La presencia de clamidosporas en la parte terminal, intercalar, o en parejas de dos y en cadenas en el micelio.

Genero *Lasiodiplodia* (*Botriodiplodia*)

L. theobromae es un parásito facultativo que generalmente infecta a sus plantas huéspedes penetrando a través de heridas y de tejidos en descomposición. El hongo es de aparición frecuente en las regiones tropicales y subtropicales así como en diferentes áreas ecológicas, en donde ha sido identificado como la causa de enfermedades en aproximadamente 280 especies de plantas vasculares, entre las cuales destacan aguacate, manzano, mango, vid, pino, rosal, caucho, algodón, cacao, café, caña de azúcar, cacahuate, tabaco, etc. (Riva, *et al.*, 1997).

Milholland (1970) que mencionó que este tipo de hongos crecen y avanzan lentamente en el tejido vivo del hospedante debido a su carácter saprofítico. Umezurike (1969) menciona que *Botryodiplodia theobromae* tiene actividad celulolítica en la madera de árboles de *Bombax buonopozense*. El hongo ataca la celulosa de una manera similar a los hongos de pudrición blanda, utiliza el almidón y otros sacáridos presentes en la madera como sustratos iniciales antes de la degradación de la celulosa y la hemicelulosa, sin embargo no degrada la lignina.

Caracterización Morfológica de *Lasiodiplodia theobromae* Pat.

En PDA el hongo forma micelio aéreo abundante, algodonoso de color gris oscuro, en CMA el micelio fue rastrero, ralo, de color oscuro, pudiendo diferenciarse fácilmente los picnidios formados. Las hifas del patógeno son septadas, oscuras y miden de 1,5-2,8 μm de diámetro. Sobre éstas, se forman estructuras de fructificación asexuales llamados picnidios, de color oscuro, con medidas promedio de 493,04 x 622,82 μm , con ostiolos en la parte apical por donde son expulsadas las conidias. La formación de los picnidios también se observa sobre muestras vegetales infectadas por el patógeno y expuestas a la luz solar. Dentro de los picnidios se formaron conidias hialinas y aseptadas cuando están inmaduras y oscuras y septadas con estrías longitudinales cuando están maduras, de 26,54 x 11,35 μm . (Sutton, 1980).

Barrenadores ambrosiales

Los barrenadores ambrosiales (Pinhole borers) dañan árboles y a la madera y comúnmente están asociados a hongos que juegan un papel importante, a veces esencial en su vida; dada la interacción evolutiva insecto - hongo, que le da ventajas mutualistas, mismas que han influenciado su morfología, biología, ecología y distribución geográfica (Beaver, 1990).

Estos insectos se ubican en las familias Scolytidae y Platypodidae dentro de los picudos (gorgojos) *Curculionoidea*, o como subfamilias de *Curculionidae* que tienen alguna relación con el tipo de perforación producida (Wood, 1982).

Estos establecen sus poblaciones en plantas maderables, donde hacen sistemas de galería en la madera. La gran mayoría de las especies atacan solo árboles muertos o a punto de morir, o bien en partes sombreadas de las ramas. Pocas especies pueden atacar y matar árboles sanos; *Euplatypus segnis* está en este grupo.

Cada generación de barrenadores adultos después de cumplir su ciclo, tienen que dispersarse para colonizar nuevos árboles antes que el hospedero se agote como fuente de alimento, o este tan dañado que ya no sea útil para el desarrollo de los insectos lo cual tiene implicaciones obvias en cualquier asociación fija entre insectos y hongos (Beaver, 1990).

Hábito de alimentación de los barrenadores

La xilomicetofagia es el principal hábito de alimentación de los barrenadores ambrosíales, que consiste en alimentarse de hongos introducidos por ellos en el sistema de galerías construidos en la madera (Ulloa, 1991). El término se utiliza para aquellas especies en las que los hongos constituyen la principal fuente de alimento, tanto de larvas como de adultos, y que es esencial para la culminación del ciclo de vida de los barrenadores (Morales et al, 2000). La gran mayoría de los barrenadores ambrosiales se crían dentro de las galerías hechas en troncos y ramas de los árboles y de las cuales emergen después de haber completado el ciclo de vida (Nord, 1972). La mayoría de la madera excavada por los barrenadores no se ingiere, y se elimina de la galería; al parecer los fragmentos de madera ingerida no son bien digeridos. La mayoría de *Scolytidae tropical* y de casi todas las especies de *Platypodidae* es xilomicetófaga. La ambrosía ocurre por lo menos, 10 tribus de *Scolytidae*, indicando la evolución paralela del hábito un cierto número de veces, a menudo en un solo género dentro de una tribu. Atkinson y Equihua-Martinez, (1986) determinaron que el 60 por ciento de las familias *Scolytidae* y *Platypodidae* de las regiones tropicales del sudeste de México son xilomicetófaga, el 26 por ciento fleofaga, el 49.4 por ciento monofaga y 34.9 por ciento polifaga.

Hongos ambrosiales.

Norris, *et al.* (1969) ha registrado hongos asociados a barrenadores ambrosíales, la mayoría de estos solo se conocen en estado imperfecto (Deuteromicetos). En la mayoría de los casos conocidos en estado perfecto, pertenecen a Ascomicetos. Algunas

especies de *Ceratocystis* (enfermedad del olmo holandés) se sabe que funcionan como hongos de ambrosía (Agrios, 1988). Otros géneros importantes de hongos ambrosiales incluyen a *Fusarium*, *Cephalosporium*, *Ambrosiella*, *Graphium* y *Verticicladiella* (= *Leptographium*) (Barras y Perry 1971, French y Roeper 1972 y Kok y Norris 1972).

Mutualismo entre insectos y hongos.

El mutualismo implica ventajas para ambas partes en una asociación. La ventaja para los hongos es probablemente la dispersión de las esporas, y su inoculación en nuevos hábitats, convenientes para su crecimiento. El trabajo que hace el barrenador al hacer túneles ayuda a la rápida penetración del micelio, y establecimiento del hongo con lo cual se beneficia (Ulloa, 1991). El barrenador ayuda a mantener la dominancia de los hongos de ambrosía en las galerías y a obstaculizar o prevenir el crecimiento de otros hongos, como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma* (French y Roeper, 1972).

Las ventajas directas para los barrenadores son más variadas. Los hongos son la única fuente de alimento para los adultos y larvas. El rango de árboles hospederos y de condiciones climáticas para la sobrevivencia del barrenador es amplia, Atkinson y Equihua (1986). La inoculación de hongos patógenos por el barrenador en un árbol hospedero vivo, puede proporcionar ventajas directas a el, ya que el hongo ayuda a reducir los mecanismos de defensa del hospedero, creando condiciones para una colonización exitosa. Así mismo, la alimentación de varias especies con hongos y sus derivados (aminoácidos esenciales, ergosterol, esterol) ayudan a la madurez de los adultos que aun no son reproductivamente maduros (gonadas) (Kok y Norris, 1972). En especies de barrenadores que requieren colonizar hospederos muertos, como es el caso

de *Scolytus multistriatus*, al moverse a otro hospedero dispersa patógenos que lo ayudan a debilitarlo, como es el caso de *Ceratocystis ulmi* que es introducido en las ramas de olmos vivos; El hongo se dispersa sistemáticamente por el árbol, matándolo gradualmente y los barrenadores pueden entonces, criarse en las ramas muertas (Agrios, 1988).

Mecanismos de transmisión de hongos por barrenadores.

Beaver (1990) considera que la transmisión de los hongos de ambrosía ocurre en el proctodeo del barrenador de ambrosía. Sin embargo, Furniss *et al* (1987) sugiere el transporte de esporas del árbol hospedero viejo al nuevo es en estructuras del exoesqueleto del barrenador, específicamente cabeza, torax, elitros, patas etc. Las esporas de algunos hongos como *Ceratocystis*, están adaptadas para ser transportadas por artrópodos. Los hongos producen un mucílago pegajoso que mantiene a masas de esporas unidas que se adhieren al exoesqueleto del barrenador (Agrios, 1988). Una capa externa de esporas y mucílago secos, protege la masa interna de espora contra la desecación e irradiación (Dowding, 1969). El mucílago también protege a esporas contra la digestión del insecto. Sin embargo, los conidios de algunos hongos de ambrosía no pueden sobrevivir a períodos cortos de desecación, por lo que no podrían sobrevivir a la dispersión en el exterior del insecto. Los barrenadores de ambrosía han desarrollado o poseen estructuras para la transmisión de los hongos que protegen las esporas contra la desecación.

Nunberg (1951) y Nakashima (1972) sugieren que las glándulas tubulares que se encuentran en el hoyo o poro pronatal medio y en la pro y meso coxa de *Platypus*

severini *P. calamus* y *Diapus* de la familia Platypodidae, podrían desempeñar un papel importante en la transmisión de hongo. Barras y Perry (1971) mencionan el término "micangios" para tales órganos que algunos de ellos están provistos, con setas aplanadas y manojos de pelos que a menudo ayudan a retener el contenido del micangio. Si estas glándulas están ausentes, la estructura se llama pseudomicangio, y probablemente no está implicada en el transporte de los hongos.

Sin embargo, los micangios no son siempre esenciales para la transmisión adecuada de los hongos de ambrosía, existiendo otros métodos menos especializados de transporte de hongos. French (1972) encontró que el hongo principal de *Xileborus dispar*, es *Ambrosiella hartigii* Batra, y este es transmitido en forma de micromicelio en el proctodeo. Los micangios de los élitros, solamente de vez en cuando contienen *Ambrosiella*, pero regularmente contenían hongos de ambrosía auxiliares (incluyendo levaduras, *Ceratocystis* y *Penicillium*). Baker (1963) encontró que las levaduras (*Candida* spp.) y las clamidosporas del hongo principal de la ambrosía (*Raffaelea ambrosiae* (= *Sporothrix* sp.) fueron transportados dentro del tracto digestivo de *Platypus cylindrus*.

No se han encontrado micangios en un cierto número de Platypodidae. La transmisión de los hongos ocurre probablemente por la adherencia de fragmentos y esporas miceliales al exoesqueleto del insecto. Los frentes del insecto a veces muestran surcos profundos, y a menudo tienen cepillos de pelos largos; estas estructuras pueden portar esporas de hongos de ambrosía, aun cuando no parece ser su principal función (Castello *et al.*, 1976).

La entrada de las esporas en los micangios parece ser pasiva, en las paredes cuando el adulto se mueve dentro del sistema de galerías. Batra (1967) sugiere que los movimientos oscilantes de los adultos en el sistema de galerías favorece la entrada de las esporas a los micangios. La adquisición de hongos no es específica, pero solamente ciertas especies crecerán dentro de los micangios. Las glándulas micangiales pueden secretar productos químicos que inhiben el crecimiento de hongos contaminantes y/o favorecen el crecimiento de los hongos simbióticos (Schneider, 1969). Los antibióticos producidos por los hongos podrían ser también responsables de ello.

El método para liberar hongos de los micangios en el sistema de la galería, depende probablemente, en parte, del tipo de posición de los micangios y de la presión en la fina pared micangial durante la excavación del túnel.

Los hongos como alimento de los barrenadores.

La madera no es una buena fuente de alimento comparada con otros substratos orgánicos. Sin embargo la que ha sido parcialmente descompuesta por hongos proporcionándole un recurso de alta calidad alimenticia, y para los mismos hongos, un mejor estrato. Para los barrenadores ambrosiales xilomicetofagos, este alimento es rico en nitrógeno y puede ser obtenido con un mínimo de esfuerzo (Abrahamson y Norris, 1970).

En la madera y galerías del insecto, el crecimiento de los hongos es micelial y no en forma de levadura. Las hifas penetran y forman una capa ambrosial en el xilema y floema, y pueden extenderse ampliamente a través de los tejidos de la planta hospedera.

La ambrosía consiste en una capa de hifas fungosas formada en empalizada, que es repasada por los barrenadores y sus larvas; esta acción puede promover una esporulación adicional de hongo (Batra, 1966).

Los hongos de ambrosía no son específicas de los barrenadores y el desarrollo como ambrosía parece depender, en parte, del contacto físico entre el insecto y el hongo. El alimento natural de los insectos, y sus larvas, es probablemente el conjunto microbiano mutualístico del complejo (Haanstad y Norris, 1985), aunque las proporciones de hongos y bacterias pueden variar en la dieta con la etapa de desarrollo de los insectos, y de la edad del sistema de galería (Batra, 1966).

Los adultos de los barrenadores de ambrosía se dispersan normalmente con el aparato digestivo vacío y no se alimentan durante el inicio de la construcción de la galería (Baker, 1963). La mayor parte de la madera que es excavada, se expulsa directamente por la entrada de la galería. La alimentación comienza solamente después de que los hongos de la ambrosía se han establecido y es esencial para que maduren las gonadas. Si el hongo no llega a establecerse, no hay descendencia y los insectos progenitores mueren.

Usando *Xyleborus ferrugineus*, Norris (1979) encontró que el número de descendientes depende una especie del hongo que utiliza como alimento. La producción de larvas fue máxima cuando se proporciono el hongo primario de la ambrosía, *Fusarium solani*, pero se redujo en 50 por ciento cuando las hembras se alimentaron del hongo secundario de la ambrosía, *Cephalosporium* spp. y fue de 70 por ciento cuando fue alimentada con *Graphium* spp.

Kok y Norris (1972) estudio la composición de los hongos ambrosiales *F. solani*, *Cephalosporium sp* y *Graphium sp* encontrando aminoácidos esenciales como alanina, ácido glutámico, taurina, arginina y ácido aspártico, necesarios para la nutrición correcta del insecto.

La presencia de los hongos en el sistema de galería determina el índice de crecimiento de las larvas en los barrenadores de ambrosía y el desarrollo del hongo dependen, sobre todo, de la condición, del contenido de agua y temperatura de la madera. La presencia de una hembra progenitora activa es esencial para el desarrollo de las larvas; si la hembra muere, la cría muere también, debido a que es incapaz de controlar el crecimiento del hongo dentro de las galerías (Beaver, 1972). Los hongos también producen esteroides como el ergosterol, esenciales para la incubación, desarrollo larval, pupación y maduración gonadal en varias especies. Sin embargo, Barras (1970), demostró que el hongo *Ceratocystis minor* es antagónico a *Dendroctonus frontalis* ya que al colonizar y manchar el floema hace desfavorable la alimentación; ocasionando el detrimento del desarrollo del barrenador, formando larvas anormales y al cabo de tres semanas se reduce la progenie drásticamente.

Los barrenadores y la especificidad del hospedero.

Los barrenadores ambrosiales son, atraídos por árboles estresados o enfermos, muchos de los cuales tienen infecciones fungosas o bacterianas. El alcohol etílico es un subproducto bien conocido del metabolismo de varias levaduras y de hongos, lo cual es atractivo para muchos barrenadores (Elliott *et al.*, 1983).

La mayoría de los barrenadores ambrosíales son polífagos, y se crían en una amplia gama de árboles hospederos (Atkinson, 1988). Hasta donde se sabe, el insecto se alimenta del mismo hongo cualquiera que sea el hospedero.

En México, Atkinson (1988) encontró que la mayoría de los barrenadores de ambrosía con un hospedero específico se encontraban en ambientes con pocas especies de árboles, y atacaban a los árboles más abundantes. Así, la abundancia de un solo grupo determinado de hospederos permite la especificidad del insecto. Habitualmente pocos barrenadores de ambrosía que atacan a árboles vivos, ya que estos se crían con éxito sin necesidad de matar a sus hospederos, también tienden a mostrar una alta especificidad por un hospedero determinado.

La alta especificidad del insecto sobre el hospedero se debe a la necesidad de vivir en árboles vivos, para que se lleve a cabo la asociación hongo - insecto y así superar las defensas activas del hospedero. Los principales hongos asociados de ambrosía fueron señalados por Nord (1972), como *Ambrosiella xylebori* y *Pichia* sp. junto con *Fusarium* spp. Es importante mencionar que *F. solani* es el hongo de ambrosía primario de los barrenadores *Xylosandrus compactus*, *X. germanus* y *Xyleborus ferrugineus*, que algunas veces, atacan árboles vivos (Weber y McPherson, 1984).

El mutualismo y su relación con el clima.

La floefagia es el hábito de alimentación primitiva en *Scolytidae* y *Platypodidae* (Wood, 1982). Una vez que estos insectos comenzaron a depender de hongos para

alimentarse, fueron capaces de colonizar al xilema menos nutritivo, y definido, que los hongos habían penetrado y debilitado (Atkinson, 1988). Eventualmente las ventajas de comer sólo hongos en vez de madera, condujo a la xilomicetofagia y al desarrollo de una unión mutualista (Batra, 1966). Viviendo en túneles estrechos dentro de la madera, donde los insectos y sus descendientes están mejor protegidos de depredadores y parásitos. La mortalidad de las larvas del barrenador ambrosíal parece ser, menor que la de otras especies de barrenadores no ambrosiales (Beaver, 1972).

Se considera que el proceso evolutivo tuvo lugar en las selvas tropicales, donde las altas temperaturas y humedad son especialmente favorables para el crecimiento de los hongos, y donde, con frecuencia se dan asociaciones entre barrenadores y hongos. Atkinson y Equihua-Martinez, (1986) sugieren que la utilización de hongos como fuente primaria de alimento pudo ser consecuencia de la frecuente competencia entre los barrenadores y los hongos por el mismo sustrato. Que condujo a la evolución múltiple del hábito de ambrosía.

Las áreas tropicales tienen un porcentaje más alto de especies xilomicetófagas que las templadas. Los estudios de Atkinson (1988) de ocho áreas en México han demostrado una correlación alta con el clima. El porcentaje de especies xilomicetófagas varía a partir de cero en malezas superficiales, y del 13 al 16 por ciento en el bosque tropical caducifolio donde se encuentra a una altitud más alta, clima relativamente fresco y seco, y hasta el 60.2 por ciento en la selva tropical, que es caliente y húmeda.

Metabolismo secundario de plantas.

El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples, o para degradar las complejas y obtener las simples. Las plantas, organismos autótrofos, además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa en concentraciones variables, en los tejidos vegetales adultos. Estos compuestos derivados del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios, cuya función primordial parece ser la protección frente al ataque de herbívoros y defensa contra infecciones microbianas o virales, debido a que sirven de barrera inicial a la propagación de bacterias u hongos dentro de los tejidos de la planta, e inhiben la germinación de esporas. También funcionan como atrayentes de insectos polinizadores y agentes de competición planta-planta, se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas, muchos desempeñan funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de insectos. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales.

Algunas de estas sustancias son: aldehidos, alcoholes, alicina, alcanfor, borneol, cineol, capsaicina, colina, cumarina, ésteres, fenoles, jasmolina, piretrinas, taninos, terpenoides, rotenoides, saponina, entre otras muchas.

Defensa metabólica inducida por el ataque de los patógenos

Algunos fenoles relacionados con la resistencia a las enfermedades se encuentran en las plantas ya sean sanas o enfermas, pero su síntesis o acumulación al parecer aumenta después de haberse producido la infección. A estos compuestos se les denomina compuestos fenólicos “comunes”. Sin embargo, otros fenoles no los producen las plantas sanas, excepto cuando son estimuladas por algún patógeno. A estos se les conoce como fitoalexinas.

Las fitoalexinas se definieron originalmente como metabolitos secundarios de bajo peso molecular, con propiedades antimicrobianas y que se producen y acumulan en plantas expuestas a microorganismos (Paxton 1981).

La diferencia entre una planta resistente o no, recae en la velocidad de las fitoalexinas. Si la planta es resistente, se produce una cantidad suficiente para matar al patógeno, si es sensible se produce en cantidad menor y no consigue acabar con él.

Interacción planta-patógeno

Las plantas se encuentran en continuo contacto con otros organismos. Bajo condiciones naturales, ellas interactúan además con un gran número de microorganismos potencialmente patogénicos. Sin embargo, las plantas normalmente permanecen sanas debido, en parte, a la manifestación de varios mecanismos de defensa.

De acuerdo con los axiomas de resistencia planteados por Browning (1980), la resistencia y la avirulencia son la regla mientras que la susceptibilidad y la virulencia son la excepción. El autor propone además que la resistencia y la susceptibilidad son los extremos de un continuo y que la inmunidad es absoluta. Los genes que determinan la

resistencia oligogénica y la susceptibilidad en la planta, son complementarios a los genes que determinan la virulencia y la avirulencia en el patógeno (Browning 1980).

Otros autores como Keen (1992) señalan que para las plantas que se desarrollan bajo condiciones naturales, la enfermedad es la excepción y no la regla lo cual no siempre es cierto bajo las condiciones que prevalecen en la agricultura moderna

Las interacciones entre una planta y un microorganismo pueden mostrar varios tipos que van desde las relaciones altamente perjudiciales para el hospedante, hasta aquellas que benefician tanto al hospedante como al microorganismo. Como consecuencia de una estrecha coevolución, muchos microorganismos se desarrollan de una forma patogénica solo en un ámbito limitado de hospedantes, frecuentemente a nivel de género, especie y subespecies. De forma similar, las especies y cultivares de plantas, por lo general son susceptibles solamente a pocas especies, aislamientos o razas de patógenos (Heath 2000a).

Nutrición de los fitopatógenos

Como parásitos, los fitopatógenos están obligados a obtener los nutrientes de fuentes existentes y para ello necesitan invadir y adaptarse al tejido del hospedante para eventualmente reproducirse. Además, necesitan evadir o contrarrestar los mecanismos de defensa de la planta. Aquellos patógenos capaces de desarrollarse y reproducirse solo en tejidos de hospedantes vivos son llamados *biotrofos*. Estos patógenos, también conocidos como parásitos obligados, necesitan mantener la célula hospedante viva y emplean para ello mecanismos de invasión sumamente sutiles.

Los apresorios son estructuras de penetración usadas por algunos hongos para evitar el daño excesivo del tejido durante las fases iniciales de la patogénesis. Entre los patógenos biotrofos se encuentran los virus, los nematodos y algunos hongos especializados, tales como las royas.

Otro tipo de patógenos, denominados *necrotróficos*, producen la muerte de las células hospedantes obteniendo de esta forma los nutrientes a partir del tejido muerto. En este grupo se incluyen la mayoría de los hongos y las bacterias fitopatógenos. Estos

muchas veces utilizan diferentes toxinas capaces de degradar el tejido de la planta y facilitar la invasión (Collinge *et al.* 2001).

Especificidad de las interacciones planta-patógeno

La especificidad en las interacciones planta-patógeno depende tanto del genotipo de la planta como del patógeno. Esta especificidad es más fácil de estudiar a nivel de cultivar, es decir, especies cultivadas que han sido sometidas a un proceso de mejoramiento genético para producir poblaciones de plantas altamente homogéneas en su contenido genético. Como resultado de este proceso, nuevas razas de patógenos, específicas para cada cultivar, aparecen debido a la presión de selección. Una interacción biotrófica se caracteriza por tener un alto grado de especificidad ya que el patógeno necesita mantener las células hospedantes vivas, evitando la inducción de defensa, para poder sobrevivir.

Se cree que esta especificidad es el resultado de una evolución entre ambos organismos. En general, estas relaciones están determinadas a nivel de razas del patógeno y cultivares del hospedante. La especificidad observada sirve para seleccionar la interacción que proporcione una ventaja para una de las partes (patogénesis o resistencia), o para ambos organismos (simbiosis) (De Wit 1997).

Un patógeno puede ser muy patogénico o poco patogénico para un hospedante dado. El grado de patogenicidad se define frecuentemente como *virulencia* (Collinge *et al.* 2001). De esta forma, y dependiendo de su habilidad de causar enfermedad, un patógeno puede ser altamente virulento para un hospedante y levemente virulento para otro. Estos conceptos han sido discutidos por Van der Plank (1968) quien propuso que el nivel de virulencia se determina con respecto a la resistencia del hospedante. En otras palabras, la virulencia es un concepto estrechamente ligado a la habilidad del patógeno de superar la resistencia de la planta. Por otro lado, la resistencia vertical (monogénica u oligogénica) y la resistencia horizontal (poligénica) son los extremos de todo un espectro de niveles de resistencia. Sin embargo, en términos genéticos, virulencia se utiliza para definir si una variante o raza de un patógeno puede o no causar enfermedad en una

variedad o cultivar del hospedante. En otras palabras, una raza de un patógeno es virulenta si produce enfermedad y avirulenta si no produce enfermedad a un cultivar determinado del hospedante. En las interacciones planta-patógeno a nivel de especie, la resistencia del hospedante se conoce como resistencia no-hospedante, mientras que a nivel de raza-cultivar se denomina resistencia determinada por la raza. En este último caso, una especie de hospedante puede presentar cultivares que muestran *resistencia* y otros que muestran *susceptibilidad* a un patógeno dado, el cual a su vez puede presentar razas tanto virulentas como avirulentas para un cultivar determinado (Collinge *et al.* 1994).

Por lo tanto, para estudiar y comprender cualquier interacción planta-patógeno es necesario tomar en cuenta los dos componentes de sistema. En otras palabras, se debe estudiar la virulencia o avirulencia de un patógeno siempre en relación con la resistencia o susceptibilidad del hospedante. Para dar la importancia adecuada a la interrelación entre los dos organismos es conveniente utilizar los términos *interacción compatible* e *interacción incompatible*.

Una relación compatible se refiere a una interacción entre una raza virulenta y un cultivar susceptible, mientras que una relación incompatible se establece cuando el hospedante es resistente y el patógeno es avirulento. Las interacciones incompatibles (hospedante resistente, patógeno avirulento) se caracterizan por estar mediadas por sistemas de reconocimiento que activan la expresión de mecanismos de defensa que frecuentemente están asociados a la manifestación de la reacción hipersensible (Heath 2000b). Por el contrario, en las interacciones compatibles (hospedante susceptible, patógeno virulento), el reconocimiento no se lleva a cabo, la respuesta de defensa no es activada y la enfermedad se establece (De Wit 1997).

Defensa de las plantas

El ataque de patógenos es una condición desfavorable que generalmente activa una serie de mecanismos de defensa cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar la infección. Las plantas poseen *mecanismos constitutivos* de defensa que proveen de forma pasiva resistencia contra patógenos. Los mecanismos de resistencia constitutiva o

"preformada" se pueden dividir en mecanismos de defensa *estructurales constitutivos*, como por ejemplo la presencia de capas gruesas de cutícula, presencia de tricomas, deposición de ceras, entre otros; y mecanismos de defensa *químicos constitutivos*, tales como la acumulación de compuestos tóxicos en las células vegetales.

De esta forma, los mecanismos constitutivos de resistencia en las plantas se basan en los rasgos distintivos de una especie o cultivar particular y generalmente no involucra una respuesta activa del hospedante ante la presencia del patógeno.

A diferencia de la defensa constitutiva, los mecanismos inducidos de defensa, también llamados como *resistencia inducida*, se activan solamente como una respuesta al ataque de un patógeno (Collinge *et al.*1994). La resistencia inducida es un mecanismo activo de defensa que involucra cambios claros en el metabolismo provocados por la expresión diferencial de genes. Por lo tanto, para que ocurra la inducción de la defensa, es necesaria la mediación de sistemas de reconocimiento específico, mediante los cuales la planta reconoce la presencia del patógeno (Hutcheson 1998).

Activación de la defensa

La activación de la defensa en plantas supone la existencia de mecanismos de reconocimiento mediante los cuales la planta determina la presencia del patógeno.

Ciertas sustancias como carbohidratos, proteínas y pequeñas moléculas son capaces de actuar como *inductores* de defensa. Los inductores no-específicos son cualquier sustancia que induce la activación de defensa de forma no específica. Por ejemplo, los polímeros de azúcar que conforman la pared celular tanto de hongos como de las células vegetales, son reconocidos desde hace varios años como agentes capaces de inducir la expresión de genes de defensa en plantas (Darvill y Albersheim 1984). Esto es congruente con el hecho de que la muerte del tejido hospedante, causada por el ataque del patógeno o por una reacción de hipersensibilidad, libera componentes de la pared celular vegetal que inducen la activación de defensa en tejidos adyacentes. De manera similar, la actividad de algunas enzimas hidrolíticas, producidas por la célula vegetal como reacción de defensa, liberan componentes de la pared celular de ciertos hongos que tienen un efecto inductor de defensa en los tejidos vegetales. La reacción de defensa

también se puede activar de forma no específica por factores abióticos como el choque térmico, la sequía, diversas sustancias químicas y la luz ultravioleta. En general, este tipo de inductores abióticos activan respuestas de defensa ya que provocan heridas y daño físico en los tejidos (Collinge *et al.* 2001).

La inducción de la reacción de defensa de una manera específica ha sido observada en las interacciones del tipo raza-cultivar, donde el proceso de reconocimiento del patógeno por parte de la planta parece estar determinado por genes correspondientes y presentes tanto en el patógeno como en la planta. La investigación exhaustiva iniciada en los años 40 en el cultivo del lino y la roya de ese cultivo causada por *Melampsora lini*, generaron la hipótesis de gen por gen (Flor 1971) en la cual se evidencia la existencia de genes en la planta que confieren resistencia a una raza particular de un patógeno. Por otro lado, la presencia o ausencia de genes de avirulencia en el patógeno le confieren la habilidad de causar o no la enfermedad en un cultivar determinado (De Wit 1997).

La hipótesis de gen por gen tuvo mayor fundamento genético hasta después de varios años. Posteriormente, la base molecular de la hipótesis gen por gen también fue descubierta. Se ha propuesto que los inductores específicos son proteínas codificadas por los genes *Avr* de avirulencia presentes en el patógeno y que son capaces de inducir las repuestas de defensa en cultivares que posean los correspondientes genes **R** de resistencia (Parker y Coleman 1997). De esta forma, el reconocimiento tiene lugar cuando ocurre una interacción entre las proteínas codificadas por los genes **R** y los correspondientes productos de los genes *Avr* del patógeno. Esta interacción da origen a una cascada de señales y otras vías de transducción que finalmente llevan a la expresión de genes asociados a la defensa (Hammond-Kosack y Jones 1996).

Mecanismos de reconocimiento

Se han propuesto varios modelos para explicar los mecanismos moleculares de reconocimiento basados en los sistemas gen por gen. Los primeros modelos consideraron la interacción entre los productos R-Avr mediante un receptor

transmembranario (codificado por el gen R de la planta) y un "ligando" (codificado por el gen *Avr* del patógeno) (Gabriel y Rolfe 1990).

Recientemente, se reafirmaron los modelos basados en la generación de una cascada de reacciones de defensa, las cuales son activadas por la interacción "ligando"-receptor (Lamb 1996). Con el aislamiento, clonaje y caracterización molecular de varios genes *R* y genes *Avr* de diferentes especies de plantas y patógenos (Takken y Joosten 2000), ha sido posible predecir la estructura, localización y posibles mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo la interacción entre las proteínas R y Avr (De Wit 1997).

A la fecha se han caracterizado varios genes *R* y *Avr* de diferentes especies. La información obtenida es cada vez más consistente e indica que la activación de la defensa contra patógenos en plantas, al menos en los sistemas raza-cultivar, esta mediada por la interacción de proteínas Avr y R siguiendo la hipótesis gen por gen (Flor 1971). Esta es la base del reconocimiento y tiene como consecuencia la activación de una cascada de señales que, en última instancia, induce la defensa (Martin 1999). En otras palabras, los genes *R* no son responsables directos de la resistencia, pero si tienen una función determinante de la especificidad del reconocimiento, actuando como iniciadores de la defensa (De Wit 1997).

Mecanismos de defensa

Una vez que el patógeno ha sido reconocido se activan una serie de mecanismos de defensa mediante cascadas de señales. Los mecanismos de defensa, que son inducidos como consecuencia del reconocimiento, son los responsables de la resistencia, actuando muchas veces en conjunto para detener el avance del patógeno. Estos mecanismos incluyen principalmente la muerte celular por reacción hipersensible, la acumulación de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, la acumulación de enzimas hidrolíticas y la deposición de sustancias de refuerzo que evitan el avance del patógeno, entre otros (Collinge *et al.* 1994).

(García-Ponce y Rocha-Sosa, 2000). Realizaron estudios de la regulación de la síntesis de dos tipos de metabolitos secundarios en la respuesta de defensa de las plantas: los

flavonoides y las betalaínas. En el primer caso, la enzima acetil-CoA carboxilasa multifuncional (ACCasa) de frijol, *Phaseolus vulgaris* L. Esta enzima sintetiza a partir de acetil-CoA y CO₂, malonil-CoA, compuesto que es utilizado por la enzima chalcona sintasa para la síntesis del primer compuesto flavonoide, la tetrahidroxichalcona, el cual es utilizado como precursor para la síntesis del resto de los flavonoides. La ACCasa y su mensajero se acumulan en respuesta a distintas situaciones de estrés y a la aplicación de fitorreguladores JA y etileno.

Con el fin de determinar más claramente el papel de los reguladores decrecimiento como mediadores en la respuesta a herida y ataque por patógenos, se generaron plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* llevando fusiones del promotor de la ACCasa multifuncional de frijol con el gene de la β-glucuronidasa (GUS). El uso de este sistema nos permite la utilización de mutantes de *A. thaliana* afectadas en la síntesis o la percepción de fitohormonas. En estas plantas transgénicas hemos analizado la expresión órgano específica y la inducción por herida y patógenos, así como la inducción por oxilipinas y etileno.

El análisis se ha llevado a cabo tanto en plantas silvestres como en mutantes en la percepción o la síntesis de los fitorreguladores.

Las betalaínas son MS sintetizados por un pequeño grupo de plantas pertenecientes a la familia de las Caryophyllales. En nuestro laboratorio tenemos datos que sugieren que estos compuestos participan en la defensa de las plantas (Sepúlveda-Jiménez, et al. 2004). Plantas de betabel (*Beta vulgaris*) cuando son heridas o infectadas con bacterias, acumulan betalaínas en el sitio de herida o alrededor de la zona de la infección. Actualmente tenemos evidencia de que estos compuestos funcionan como “cosechadores” de EORs, por una parte, la producción de H₂O₂ precede a la síntesis de betalainas en respuesta a la infección bacteriana, además, encontramos que un sistema generador de H₂O₂, induce la síntesis de betalaínas. Un inhibidor de la NADPH oxidasa provoca una disminución significativa en los niveles de estos metabolitos como consecuencia de la infección bacteriana. Por otra parte hemos encontrado que la acumulación del mensajero de una UDP-glucosil transferasa, muy probablemente involucrada en la síntesis de las betalaínas, responde a los mismos estímulos que inducen la producción de betalaínas (Sepúlveda-Jiménez, et al. 2004).

Reacción hipersensible

En las interacciones raza-cultivar del tipo incompatible, muchas veces ocurre una alteración en el metabolismo de la planta que se manifiesta con la aparición de lesiones locales necróticas en el sitio mismo de infección. Estas lesiones son el resultado de una muerte celular programada o reacción hipersensible (**RH**). La reacción hipersensible además está asociada a la expresión simultánea o paralela de otros mecanismos de defensa, incluyendo la acumulación de fitoalexinas, deposición de lignina, suberina y proteínas ricas en hidroxiprolina y con la producción y acumulación de altas cantidades de proteínas relacionadas con la patogénesis o proteínas PR, que se asocian con el fenómeno de resistencia sistémica adquirida o RSA (Ryals *et al.* 1996). A pesar de que RH es un mecanismo sumamente efectivo que produce una reacción de resistencia casi absoluta, aún no existe consenso que defina si la RH es directamente responsable de la resistencia, al privar de tejido vivo y nutrientes al patógeno, o si más bien su acción está basada en la acumulación de compuestos dañinos que simultáneamente matan al patógeno y a las células hospedantes (Heath 2000b). Sin embargo, cada vez existe más evidencia de que el proceso de RH ocurre como resultado de una necrosis controlada de forma similar a la apoptosis o muerte celular programada conocida en los tejidos animales (Raff 1998).

El fenómeno de *muerte celular programada* o PCD está mediado por una explosión oxidativa que libera agentes altamente oxidantes llamados AOS "active oxygen species", tales como el superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Levine *et al.* 1994)

La reacción hipersensible parece ocurrir como un programa suicida activo y organizado, y no como consecuencia de un colapso celular pasivo producido por el ataque del patógeno o por toxinas derivadas de este (Gilchrist 1998). La generación de la PCD está relacionada mediante señales con la activación y coordinación de los otros mecanismos de defensa. Se ha demostrado que el H_2O_2 tiene además una función como señal difundible implicada en la inducción de otros mecanismos de defensa (Orozco-Cárdenas *et al.* 2001).

Producción de fitoalexinas

Estos compuestos normalmente se encuentran en niveles basales muy bajos en las plantas sanas pero su acumulación se incrementa dramáticamente después del ataque de un patógeno. Las fitoalexinas se acumulan en grandes cantidades tanto en el sitio de penetración como en las células y tejidos adyacentes a las células que reaccionan con la RH (Hammerschmidt 1999a). Entre las fitoalexinas más estudiadas se encuentran aquellas derivadas del metabolismo de los fenil propanoides que tienen como base el aminoácido fenilalanina.

La producción de fitoalexinas se ha correlacionado con la resistencia a patógenos y se asocia con la inducción de una serie de genes que codifican para enzimas específicas responsables de su síntesis.

Entre ellas la fenilalanina amonio liasa (PAL), la chalcona sintasa (CHS) y la chalcona isomerasa (CHI). La síntesis de estas enzimas, como respuesta a la infección se ha demostrado (Cuypers *et al.* 1988). Sin embargo, una evidencia del papel de las fitoalexinas en mecanismos de defensa se obtuvo cuando se demostró la capacidad de ciertos fitopatógenos, como el hongo *Nectria haematococca* (*Fusarium solani*) de detoxificar las fitoalexinas (Van Etten *et al.* 1995).

Formación de barreras estructurales

Uno de los mecanismos de defensa más evidentes es la producción y deposición de sustancias que actúan como barreras físicas evitando el avance de patógenos. La lignificación puede ser una característica constitutiva en algunas especies pero también

puede ocurrir como un proceso de refuerzo de los tejidos cuando están sujetos a daño físico. La lignificación también se manifiesta durante la defensa a patógenos. La acumulación de lignina en grandes cantidades puede ocurrir de forma localizada en los tejidos atacados por patógenos. La lignina se produce por la unión enzimática de unidades de fenilpropanoides formando largos polímeros que confieren impermeabilidad y resistencia mecánica; además, la lignina es resistente a la degradación producida por muchos patógenos (Nicholson y Hammerschmidt 1992).

La síntesis de lignina, al igual que la síntesis de ciertas fitoalexinas, se deriva del metabolismo de los fenilpropanoides en donde la enzima PAL juega un importante papel regulador. Sin embargo, la síntesis de otras enzimas, como la cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) y algunas peroxidasas, también ocurre durante la activación de la defensa contra los patógenos. Ciertas peroxidasas son encargadas de la polimerización de las unidades de fenilpropanoides que da lugar a la lignina (Barber *et al.* 1997).

Aparte del proceso de lignificación, las plantas producen y depositan otras sustancias que previenen el avance de ciertos patógenos. Entre ellas se puede mencionar las proteínas ricas en hidroxiprolina las cuales se acumulan alrededor de los sitios de ataque del patógeno evitando su penetración (Benhamou *et al.* 1990). Otro mecanismo estructural de defensa es la formación de papilas. La papila es una estructura de resistencia que se produce por modificaciones de las células de la epidermis. Las papilas están compuestas principalmente de calosa (b-1,3-glucano) y se asocian a la resistencia porque evitan la penetración de los hongos (Skalamera *et al.* 1997).

Materiales y métodos, resultados y discusión se indican en cada uno de los artículos incluidos, acorde al reglamento interno del Postgrado en Parasitología Agrícola.

The Journal of Agricultural Science

**Isolation and Pathogenicity of Fungi Associated to Ambrosia Borer (*Euplatypus
Segnis*) Found Injuring Pecan (*Carya illinoensis*) Wood**

Ramón Alvidrez-Villarreal¹, Francisco Daniel Hernández-Castillo¹, Oswaldo Garcia-Martínez¹, Rosalinda Mendoza-Villarreal², Raúl Rodríguez-Herrera³ and Cristóbal N. Aguilar³

¹ *Department of Agricultural Parasitology, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, 25315 Saltillo, Coahuila, México.*

² *Department of Basic Sciences. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, 25315 Saltillo, Coahuila. México.*

³ *Department of Food Research, School of Chemistry, Universidad Autónoma de Coahuila, 25000 Saltillo, Coahuila, México.*

*- Corresponding author:

Tel: +52 844 411 0326. Fax: +52 844 411 0226.

E-mail address: fdanielhc@hotmail.com (D. Hernández)

Abstract

Euplatypus segnis is an insect pest of economic importance in pecan (*Carya illinoensis*) trees grown at Parras, General Cepeda and Torreón Coahuila, Mexico. In orchards from these counties, annually are reported losses for more than 770 tons of Pecan nut and more than 20% of the pecan trees in these counties have been attacked by this insect causing death of branches and trees. *E. segnis* is an ambrosial insect which is establishing symbiosis with fungi. These fungal species are important as a source of insect food and they are necessary to complete the insect life cycle. The insect in combination with the fungal invasion eventually cause the death of trees. Additionally, the insect contributes to the spread of fungi in pecan nut orchards. The associated fungi to *Euplatypus segnis* and damaging the pecan wood were identified as: *Helminthosporium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Phoma sp.*, *Ascochyta sp.*, *Phaeocylomices sp.*, *Umbeliopsis sp.*, *Torula sp.*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, and *Lasiodyplodia (Botryodiplodia) theobromae*. In pathogenicity tests on 28 healthy and 3-year old pecan trees cv. western, each tree was inoculated with a suspension of 10⁹ conidia / mL of each of the associated fungi (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata* and *Lasiodyplodia (Botryodiplodia) theobromae*) dieback of tree branches was observed after 84 days of inoculation. In addition, associated fungi were identified at the species level using sequencing of rDNA 18S fungal regions.

Keywords: Pathogenicity, Pecan nut, *Euplatypus segnis*, ambrosial borer, *Carya illinoensis*

INTRODUCTION

In Mexico, *Euplatypus segnis* also known as trunk and branch borer is distributed in the states of Coahuila, Durango, San Luis Potosi, Jalisco and Chihuahua [1-3]. In the Coahuila Southwest region there are approximately 525 thousand pecan (*Carya illinoensis*) trees on production, and annually are harvested about 19,345 tons of nuts. However, in more that 20 percent of the tree plantations the presence of ambrosial borer *Euplatypus segnis* has been reported where this insect is reported causing yield losses of up to 4% (773 tons of nuts) [4]. In addition, *E. segnis* (Chapuis) (Coleoptera: Platypodinae), attacks wild trees such as: *Bursera copallifera*, *Barrera sp.*, *Delonix regia*, *Ficus sp. lyrata Ficus*, *Ficus retusa nitida*, *Ficus elastica* and *Ficus cotinifolia* [5], fruit trees such as avocado (*Persea americana* Mill), apple (*Malus spp*), quince (*Cydonia oblonga* Mill), peach (*Prunus persica* L), pomegranate (*Punica granatum* L), apricot (*Prunus armeniaca* L), and mango (*Mangifera indica*), and some forestry trees like silver poplar *Populus spp*, blackberry (*Morus micophylla* Buck) and shamel ash *Fraxinus uhdei* (Wenzig.) [6]. There are reports on symbiotic associations between ambrosial insects and fungus, this relation help both of them to survive, per example *Xyleborus ferrugineus* and *Lasiodiplodia (Botryodiplodia) theobromae* in avocado (*Persea americana* Mill) [7], *Xyleborus ferrugineus* and *Fusarium solani*, *Cephalosporium sp.* and *Graphium sp.* [8], *Ips Ophiostoma* and *Ophiostoma polonicum* on *Picea abies* [9], *Hypotenemus hampei* and *Fusarium solani* on Coffea genus trees

[10]. *Platypus quercivorus* and *Raffaelea quercivorus* on *Quercus crispula* and *Q. serrata* [11], *Hypothenemus hampei* and *Penicillium brocae* on *Coffea arabica* [12], *Platypus mutatus* associated with a symbiotic fungus in commercial plantations of poplar [13]. In this study, fungi associated to ambrosial borer isolated from diseased pecan wood were morphologically and molecularly identified and incidence of diseases induced by these fungal species was determined using pathogenicity tests.

MATERIALS AND METHODS

Study area

The sample collections of *E. segnis* specimens and pecan trees damaged tissues were obtained from Parras de la Fuente (25 ° 22'N 102 ° 11'W 1520 m), General Cepeda (25 ° 22'N 101 ° 28 'W 1470 m) and Torreon (25 ° 42 'N 103 ° 27'W 1120 m) all of these counties located in Coahuila, Mexico. Three orchards were sampled by locality and at each orchard were selected three 20- years old damaged trees cv. Western, the damaged trees were in the phase 3 (50% damaged leaf area, 25 to 50 holes entries and presence of sawdust at the stem base) [14]. Wood and insects samples were placed in plastic bags and were properly coded and carried to the entomology and phyto-pathology labs for examination.

Fungal isolates

The fungi were obtained from xylem, phloem and wood contained entry points and borer insects. The borer insects were sectioning into head, thorax and abdomen. Each section was disinfected used sodium hypochlorite (1.5%) by immersion for 3 min, after those insect sections were washed with sterile distilled water for 1 min and dried on sterile paper towels. Wood and insect sections were placed on Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA: 20 g potato, 20 g of dextrose, 18 g agar and 1000 mL distilled water) as a culture medium, placing 4 pieces per plate. The Petri dishes were incubated and a continuous black light lamp 40 W to 25±1 °C was using during the day.

The isolates were purified by monospore cultures on water-agar (AA: 18 g agar in 1000 mL distilled water), and increased on PDA. The strains were spread on liquid medium (Pontecorbo) in order to obtain spores and mycelium production for pathogenicity test, and freeze drying and preservation.

IDENTIFICATION OF PATHOGENIC FUNGI

Fungal morphological characterization. After 7-10 days, the isolated and purified fungi from wood and insects were observed under a composed microscope and identified by morphology using taxonomic keys for ascomycetes and imperfect fungi, in this case characterization was based on characteristics of isolate reproductive structures using Barnnet and Hunter [15], Hanlin [16], Boot [17], Rotem [18], Neergaard [19],

Sutton [20] keys for genus and Wei *et al.* [21] key for species. To identify *Lasiodyplodia theobromae* were used Punithalingam [22], Sutton [20] and Burgess *et al.* [23] keys.

Molecular identification of isolated fungi. To confirm the morphological identification of those fungi colonies that showed the highest pathogenicity on pecan trees under field conditions. DNA was isolated from *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata* and *Lasiodyplodia theobromae* fungi at the Molecular Biology laboratory, CIIDIR-IPN Oaxaca. The DNA was isolated using the methodology proposed by Ahrens and Seemüller [24]. Amplification of internal transcribed spaces of ribosomal genes (rRNA) was performed by PCR using the primers ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) and ITS5 (GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G) according to the methodology proposed by Ahrens and Seemüller [24] with minor modifications, PCR reaction was composed of sterile ultrapure water (13.22 µ L), 10X TBE buffer (2.5 µ L), MgCl₂ at 2.5 mM (2.08 µ L), dNTPs at 0.2 mM (2 µ L), primers ITS4 and ITS5 to 20 pmol (2 µ L of each), DNA polymerase (biogenic ®) 1U (0.2 µ L) and 80 ng of DNA sample (1 uL). The amplified product was purified with Wizard kit (Promega ®) and sequenced with the Genetic Analyzer ® Model 3100 (Applied Biosystems). The data base sequences with the highest value of similarity in were considered for comparison with the sequences obtained in this study. The ITS sequences obtained were analyzed using the software Lasergene ® 2001, V5 (DNASTAR ®, Inc.) and were aligned in the database of the National Gene Bank Center for Biotechnology Information (NCBI), by the BLAST program (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

PATHOGENICITY TESTS

Inoculum was incremented in PDA culture medium which was autoclaved three times continues with an interval of 24 hours among sterilization. Then were inoculated each of the twelve fungi isolated from pecan damaged wood and borer insect body: *Phoma*, *Fusarium oxysporum*, *Ascochyta*, *Phaeocylomices sp* *Lasiodyplodia* (*Botryodiplodia*) *theobromae*, *Alternaria alternata*, *Umbeliopsis sp*, *Torula sp*, *Fusarium solani*, *Helminthosporium sp*, *Aspergillus sp* and *Penicillium sp*. The isolates were multiplied in the culture media described above, then were kept in an incubator at 27 ° C with a photoperiod of 12:12 and a relative humidity of 50 ± 10%. Once sporulation was observed, the conidia from each isolate were harvested adding to each petri dish 50 mL of a solution of Tween 80 (0.05%) and sterile distilled water, and removing the mold with a spatula. Subsequently, the mold solution was liquefied for 60 sec and placed in a beaker of 250 mL (stock suspension). Then, were made three successive dilutions of 100 uL of the stock suspension in 900 uL of sterile distilled water and were labeled 10-1, 10-2 and 10-3. Finally, spore concentration was performed using a Neubauer's camera and microscope, the dilution samples were observed in 40 X to calculate spore concentration of the stock solution which was adjusted to a final concentration of 10⁹ conidia / mL.

Pathogenicity tests were performed *in vivo* in twenty eight three years-old healthy pecan trees cv western (height (150 cm) and stem diameter (4-5 cm)) established in a high technology greenhouse at a temperature of 24±2 °C, at the Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro located in Saltillo, Coahuila. The inoculation

technique used in this step was that proposed by Kuroda [25], briefly; trees bark at a height of 100 cm was sterilize with sodium hypochlorite (1.5%), then washed with sterile distilled water and dried on using sterile absorbent paper. To each tree, two holes were made on the stem until xylem with a sterile 3-mm drill diameter. Twenty four trees were inoculated with 1 mL of the conidial suspension at 1×10^9 conidia ml⁻¹ of each one of the twelve identified fungi and two trees were inoculated with a mixed suspension of all fungi spores and two trees with sterile distilled water (control). The inoculations were added using a manual sterile pipette, each wound was covered with parafilm to prevent rapid drying and possible contamination by other microorganisms. According to this technique was favored the low density against mass inoculations in the inoculated tree to prevent wilting and rapid reactions to characterize tissues in a cytological way in response to the inoculated fungi activities. The evaluations were done every 7 days, watching symptoms and disease progression for 84 days after inoculation. Later, from the infected tissues of inoculated stems was isolated the fungus in pure culture and compared morphologically with the fungus inoculated to confirm Koch's postulates.

RESULTS

Disease symptoms in pecan plantations under field conditions. In 20 years-older pecan trees were observed the characteristic symptoms of regressive dead and insect presence mainly in weakened and / or stressed (because age, water deficiency, injuries, fires, intense cold, snow or prolonged drought) trees. In trunk and branches were detected 2 mm-diameter entry holes and sawdust at the trees base, crystal reddish

exudates that eventually became dark brown and pungent, after, taking off the bark, necrotic spots were observed with the typical form of diamond. On the other hand one can hear a sound in trunks and branches; in addition one can see the sap out of the branches when phloem and xylem are pierced by the borer. Also the presence of adults, especially during morning and evening is detected, chlorosis is observed in the leaf area, wilting, premature abscission of stems and leaves, partial death of branches and downward total death of trees.

Morphological and molecular identification of plant pathogenic fungi associated

with plant damage. The morphological characterization based on reproductive structures of the fungal isolates was performed using the taxonomic keys proposed by Barnnet and Hunter [15], Hanlin [16], Boot [17], Rotem [18], Neergaard [19], and Sutton [20] for genus and Wei *et al.* [21] keys were used for the specie identification. *Lasiodiplodia theobromae* was identified using the Punithalingam [22], Sutton [20] and Burgess *et al.* [23] keys. In table 1 are shown the fungal species associated to regressive dead in pecan damaged wood. (Table 1)

Table 1. Genus and species identified in samples of pecan with dieback symptoms and presence of ambrosia insects.

Name	Morphology
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Hyphae septate, dark 1.5 to 2.8 microns in diameter. Dark-colored pycnidia 493.04 x 622.82 microns, with ostiole at the apex, formed both in artificial medium and in plant tissue. Hyaline septate conidia in immature, dark and septate with longitudinal striations in mature state 11.35 26.54 x microns.
<i>Fusarium oxysporum</i>	Microscopically <i>Fusarium oxysporum</i> isolates showed abundant macroconidios, hyaline, oval, elliptical and occasionally kidney-shaped, with one or two septa, which measured 4-5 x 2-4 um, formed in false heads. The thin-walled hyaline macroconidia are just curved (canoe) or

nearly straight, pointed at both ends, in the form of basal cell foot. Presented 3-5 septa and measure 20-59.5 x 2-6 microns. It has also marked by abundant spherical chlamydospores, large, hyaline, with smooth or rough walls. Can be seen individually or in pairs at intervals along the hyphae or branched short lateral sections.

Fusarium solani (Mart.) Sacc. *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Abundant microconidia hyaline, ovoid, with 0-1 septum and occasional 2. Born in monophialides long with collar, a false head, measuring 8-16 x 3-5 microns. Macroconidia slightly curved, with ventral and dorsal plane parallel in most of its length, with 5 -6 septa, 23-67 x 4-6 um in, slightly curved apical cell and basal cell pedicellate, cream-colored sporodochia at the beginning, later turning blue or blue.

Alternaria alternata (fr.) Keissler *Alternaria alternata* (fr.) Keissler presents colony dark green to olive, conidia (dictyosporae) in chains on short conidiophores and branching. The strings appear in dense cultures and isolated as bundles of 1 to 9 transverse septa and several longitudinal or oblique.

The generous and specie identification by sequencing of the regions ITS1 and ITS2 of ribosomal genes (rRNA) was performed only to confirm identity of those fungal generous more common as pathogens. *L. theobromae* genome sequence was compared with the genetic sequences of *L. theobromae* deposited in the gene bank (NCBI) with accession numbers EF622073 (542 bp) and EU564805 (540 bp) in 98% and AY662402.1 in 99%; the *Fusarium solani* sequences was lineated with *Fusarium solani* sequences deposited in gene bank (NCBI) with accession numbers AF440567.1 (480 bp) in 94%, and AY310442.1 (554 bp) in 100%.

The *Fusarium oxysporum* was aligned with *F. oxysporum* accession number EF495235.1 with a similarity index of 99%, *Alternaria alternata* gene sequence was compared and showed to be homologous to *A. alternata* with access numbers

AF397236.1 with a similarity index of 100%, all these fungal species were confirmed as causal agents of dieback in pecan grown in Coahuila Southeast Region.

Fungi associated to insects and damaged pecan trees in the Coahuila Southwest Region. There were isolated 459 fungal strains from insects and diseased pecan wood on artificial culture medium (PDA), distributed as follows: In Parras county were isolated 165 strains, in General Cepeda county 161 strains, and in Torreón county 131 strains. The genera isolated were described according to their morphological structures based on microscopic observations and literature guides.

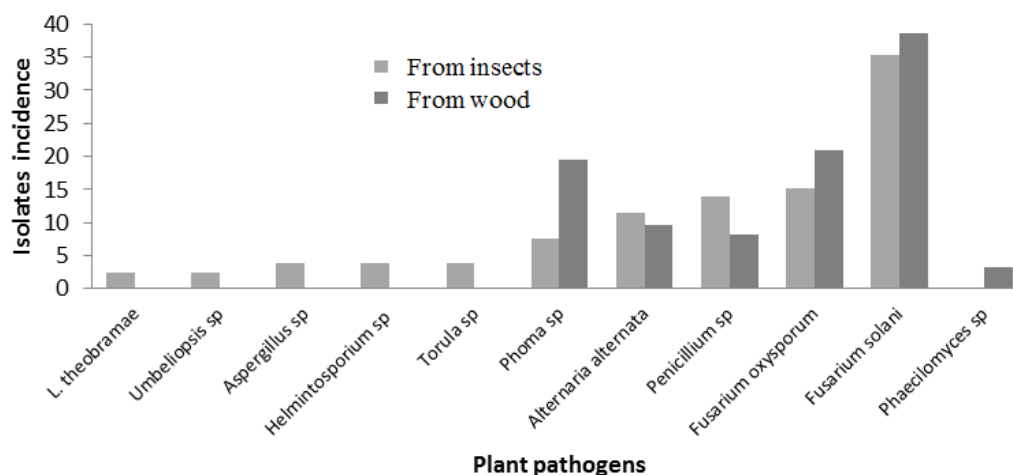


Figure 1. Fungal species found associated with *Euplatypus segnis* and diseased pecan (*Carya illinoensis*) wood collected at Parras Coahuila, Mexico.

Eighty nine fungal strains were isolated from borers insect body (*Euplatypus segnis*) collected in pecan branches and trunks at Parras county, 35% of the isolates belongs to *Fusarium solani*, 15.2% to *Fusarium oxysporum*, 13.9% to *Penicillium*, 11.4% to *Alternaria alternata*, 7.6% to *Phoma sp.*, 3.8% to *Helminthosporium sp.*, *Torula sp.*, *Aspergillus sp.*, and 2.5% to *Lasiodiplodia theobromae* and *Umbeliopsis sp.*, (Figure 1), also 76 fungal strains were isolated from diseased pecan wood, 38.7%

belongs to *Fusarium solani*, 21% to *Fusarium oxysporum*, 19.4% to *Phoma sp.*, 9.7% to *Alternaria alternata*, 8.1% to *Penicillium sp.*, and 3.2% to *Phaeocylomices sp.* (Figure 1).

Eighty five fungal strains were isolated from borer insect (*E. segnis*) body collected in pecan branches and trunks at General Cepeda county, these strains were distributed as follow: 45.9% belonging to *Fusarium oxysporum*, 21.2% to *Penicillium*, 11.4% to *Alternaria alternata*, 10.6% to *Phoma sp.*, 7.1% to *Fusarium solani* and 3.5% to *Aspergillus sp.* (Figure 2). On the other hand 76 fungal strains were isolated from pecan (*C. illinoensis*) diseased wood, distributed as follow 38.7 % belongs to *Fusarium oxysporum*, 21.2% to *Penicillium sp.*, 16.3% to *Fusarium solani*, 11.8% to *Alternaria alternata*, 7% to *Phoma sp.*, 2.3% to *Ascochyta sp.* and 1.2% to *Aspergillus sp.* (Figure 2).

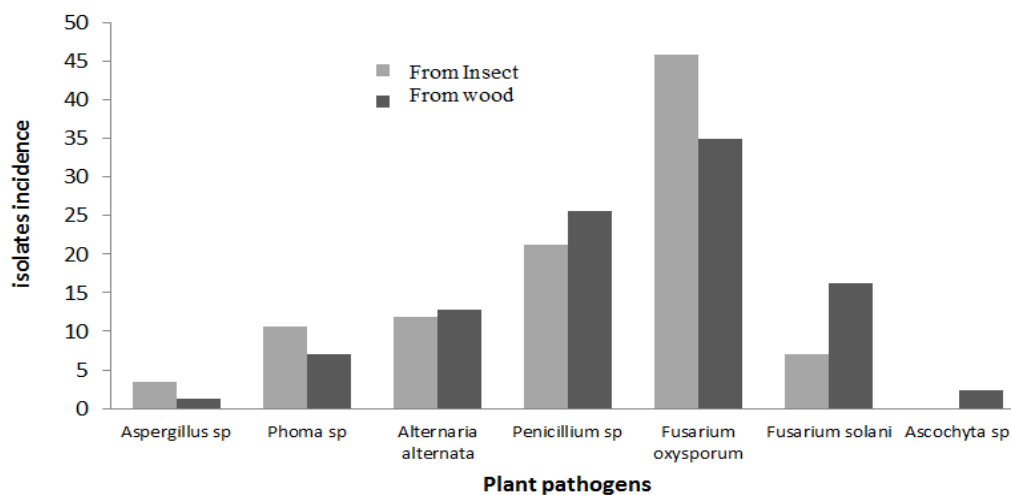


Figure 2. Fungal species found associated with *Euplatypus segnis* and diseased pecan (*Carya illinoensis*) wood collected at General Cepeda, Coahuila, Mexico.

From the samples collected in the Torreon county, sixty nine fungal stains were isolated from borer insect (*E. segnis*) body collected attacking pecan branches and trunks.

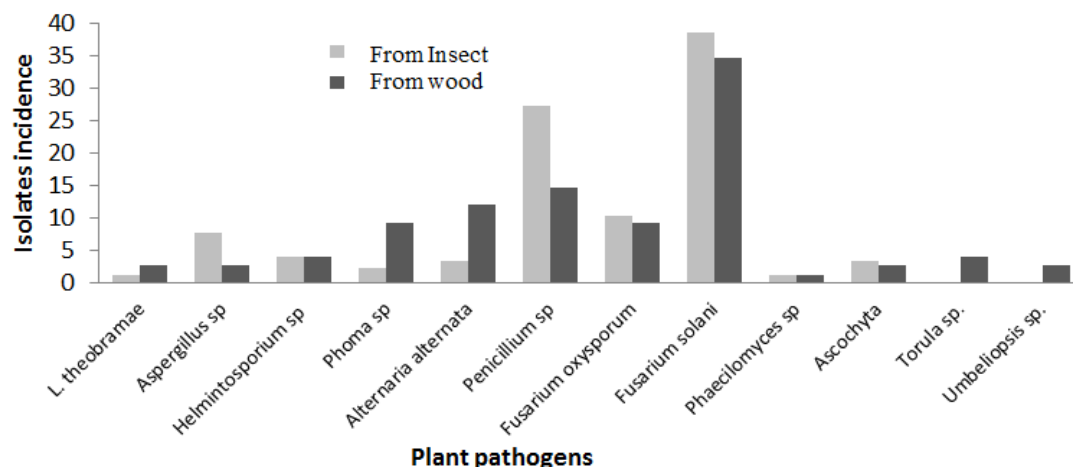


Figure 3. Fungi species found associated with *Euplatypus segnis* and diseased pecan (*Carya illinoensis*) wood collected at Torreon Coahuila, Mexico.

These strain were distributed as follow: 38.5% belongs to *Fusarium solani*, 28.6% to *Penicillium sp.*, 10.3% to *Fusarium oxysporum*, 7.7% to *Aspergillus sp.*, 4.0% to *Helminthosporium sp.* and *Alternaria alternata*, 3.3% to *Ascochyta sp.*, 2.2% to *Phoma sp.* and 1.1% to *Phaecilomyces sp.* and *Lasiodiplodia theobromae* (Figure 3), also were isolated 62 fungal strains from diseased pecan (*C. illinoensis*) wood distributed as follow 34.7% belongs to *Fusarium solani*, 14.7% to *Penicillium sp.*, 9.3% to *Fusarium oxysporum*, 7.7% to *Aspergillus sp.*, 12.0% to *Alternaria*, 9.3% to *Phoma sp.*, 4.0% to *Torula* and *Helminthosporium sp.*, and 2.7% to *Lasiodiplodia theobromae*, *Umbelliopsis sp.*, *Ascochyta sp.* and 1.3% to *Aspergillus sp.* and *Phaecilomyces sp.* (Figure 3).

Pathogenicity of fungi strains isolated from pecan trees with dieback. At 14 days after inoculation were observed the first signs of disease in some trees (Table 2). In trees inoculated with *Fusarium solani* had discharge in the drilling at 21 and 28 days, chlorosis at 42 and 49 days, wilting at 63 and 70 days and dieback after 77 days after inoculation, the inoculated trees with *Fusarium oxysporum* shown exudates at the inoculation point in the two treatments at 14 and 21 days, and brown leaves at 35 and 42 days, chlorosis at 45 and 56 days, at 63 and 70 days caused wilting and dieback at 77 and 84 days after inoculation. The inoculated trees by *Alternaria alternata* showed chlorosis at 63 days, wilting to 70 days and dieback to 84 days after inoculation. The trees infected with *Lasiodiplodia theobromae* presented leaves chlorosis at 56 days, premature abscission at 70 days, defoliation at 77 days and dieback at 84 days, the other tree shoots inoculated only presented reddish tip at 77 and chlorosis at 84 days; *Torula* sp. showed brown leaves at 77 days and defoliation at 84 days, the second treatment presented only brown leaves at 84 days, the two treatments behaved similarly. *Phoma* sp., caused wilting only 70 days to complete the evaluation at 84 days, the trees inoculated with *Phaeocylomices* sp. presented chlorotic symptoms at the end of the evaluation, *Ascochyta* sp., caused brown leaves at 63 days, wilting from 77 to 84 days, in the second treatment was observed brown leaves at 70 days and defoliation at 84 days; *Helminthosporium* sp., caused chlorosis at 77 days and wilting at 84 days, the other treatment only showed a slight chlorosis; The treatments that received a mixture of spores showed the most damaged where trees were killed at 77 and 84 days in both treatments, *Penicillium* sp and *Aspergillus* sp. *Umbeliopsis* sp and the control treatment did not cause any outward symptoms. (Table 2).

Table 2. Development of symptoms and signs in pecan trees inoculated with fungal strains isolated from *E. segnis* and damaged pecan wood.

Inoculated fungi	Symptoms after different days of inoculation												
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
<i>Helminthosporium sp</i>	s											C	C,M
<i>Botryodiplodia sp</i>	s								C		AP	M, Ar	MR
<i>Torula sp</i>	s											Hc	D
<i>Umbeliopsis sp</i>	s												NS
<i>Ascochyta sp</i>	s									Hc	Hc	M	D, M
<i>Phaecylomyces sp</i>	s												C
<i>Fusarium oxysporum</i>	s		E	E	E	Ar	Ar	C	C	M	M	MR	MR
<i>Fusarium solani</i>	s			E	E			C	C	M	M		MR
<i>Phoma sp</i>	s										M		M
<i>Alternaria alternata</i>	s									C	M		MR
<i>Penicillium sp</i>	s												NS
<i>Aspergillus sp</i>	s												NS
Spore mixture	s							C	C	M	M	MR	MR
Control (Sterile water)	s												NS

S: Health, NS: No symptoms, E: trunk exudates, Ar: reddish tip, Hc: Brown Leaves, C: Chlorosis, M: wilt, AP: Premature Abscission, D: Defoliation. MR: dieback.

DISCUSSION

Insect-fungi association. *Euplatypus segnis* is ambrosial specie with monogenic reproductive behavior [26], polyphagous in its degree of specificity with respect to the host and xylophagous by feeding habit, consuming the conidia producing by the fungi inoculated to the trees [27]. Ulloa [28] mentions that borers have the habit of feeding on fungi introduced by them in the gallery system built into the wood. These fungi appear to be relatively non-specific and need basically moist wood for their

development. Insect species that grow fungus in galleries are called beetles or ambrosia borers and they are dominant in tropical areas [29]. Most of the buildings in the tunnel systems of ragweed borer (galleries) are in the vigorous host tissues, weakened or recently dead, though some species are specialize in colonize the bone marrow, large seeds, fruits and petiole leaves [27, 30]. The term ambrosia refers to the fungi that are cultivated by beetles in the gallery walls, which are feed exclusively for insects. Beetles are necessarily dependent on fungi, from which acquired vitamins, amino acids, and essential sterols [31-32]. The fungi are the main source of food for larvae and adults and are essential to complete insect life cycle [10]. In some insect tribes, only females perform tasks inside the culture, while males are short lived and little flight [33]. After mating, females disperse to new host substrate, carrying fungi in specialized pockets called mycangia. Once inside, the founder females planted the fungi on the walls of tunnels, lay eggs, and serve the growing brood [33]. In a way not understood, the female beetles can control fungal growth and degree of multi-species composition [31, 34, 35, 36]. If the female dies, the culture is quickly contaminated by other fungi and bacteria, which ultimately leads to the brood death [33, 37]. The ambrosia fungi cultured by borers are not pure monocultures, also which consist of a mixture of fungi mycelium, yeasts, and bacteria [38-39]. Norris [40] calls these complex multi-species mixtures.

However, recent work has shown that a fungus always dominates in primary cultures of the insect [38, 41, 42 , 43]. In addition, beetles carry only the primary fungus in the mycangia (although sometimes secondary fungi are isolated from the mycangia), females tend to favor the primary fungal culture, which gives them a nutritional benefit [33, 42, 44, 45,], some auxiliary fungi also support beetle development [33]. These

observations imply the primary fungus as the primary crop, while fungi, yeasts and bacteria may be secondary "weeds" or with additional auxiliary roles to play in the cultures. The fungus growing transmission between generations of farmer's beetles is transmitted vertically from parent to offspring generations [39, 44, 46,]. Reproductive females acquire original inoculum from their crops, they take with them in specialized pockets during dispersal flights and use this as seed inoculum for their new crops.

Ambrosia borers are only associated with a particular kind of primary cultures within a specific geographic region [38, 42]. However, although most of the beetles are associated with a specific species of fungus in their primary area, ambrosia beetle species distantly related are sometimes associated with cultivating the same fungus, involving the exchange, direct or indirectly. The fungal exchange between and within species of beetles can occur when several females colonize the same tree and fungal associations contaminate adjacent galleries [42]). The primary fungi are primarily asexual [(47, 48)], while less specific auxiliary fungi are often sexual [44].

Fungi associated with Pecan in the Coahuila Southwestern region. The identification of different fungal isolates from both wood and insect body, one may infer that dieback may be associated with *Fusarium* since it is the fungal specie most frequently isolated from pecan tissue and insect body (Figure 4).

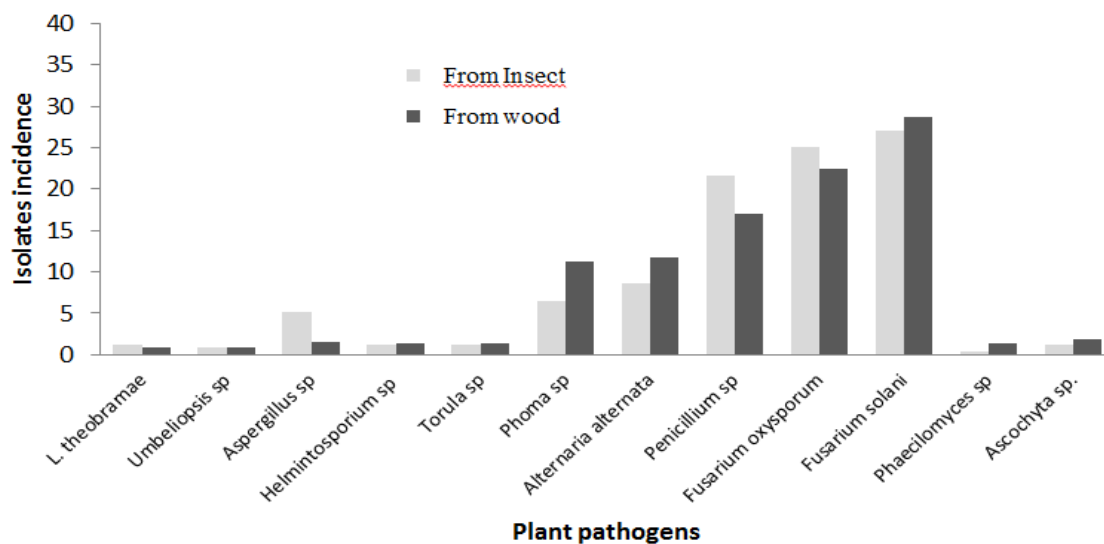


Figure 4. Fungi species isolated from the *Euplatypus segnis* collected attacking pecan branches and trunks at three Coahuila counties. Percentage of occurrence in artificial culture medium.

This association of *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* as a primary agent on pecan tree is due to exudates or gummosis presented at 14 days, later inoculated trees showed marked chlorosis and red apices, finally trees declined to dead. Inside of stalks were initially observed brown areas and when these areas were cut transversely, staining was observed in the vascular system in ring forms, this situation was observed in leaf petiole. When the fungal pathogen completely invaded the conducting vessels caused widespread of wilt and tree death. From all the isolated fungal species, *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* are highlighted in this study because they have a recognized importance as ambrosia fungus [31]. *Fusarium solani* had the highest percentage of occurrence at Parras county, 35% in insects and 38.7% in diseased wood and in Torreon county, 38.5% in insects and 34.9% in diseased wood, by this reason it is considered as the primary ambrosia fungus, in contrast *Fusarium oxysporum* was the most frequent

fungal specie at General Cepeda county, 45.9% in insects and 38.7% in diseased wood. As genera *Fusarium* are a ubiquitous necrotic parasite [49], and may tolerates pH changes [50], and host susceptibility to this fungus is directly influenced by temperature and osmotic pressure [51], *Fusarium* is widely distributed in soils and organic substrates, and it has been isolated from permafrost in the Arctic to Sahara sands, its presence is abundant in cultivated soils from temperate and tropical areas and it is the most frequently isolated fungi from plants by pathologists [17]. *Fusarium* species are commonly associated with some group of insects like Scolytidae and Platypodidae families habit in wood [52]. Regarding the association of *Fusarium* species and order Coleoptera insects in woods, Norris [33] mention *Fusarium solani* as a primary ambrosia fungus associated with species from *Xyleborus* genus, this report is consistent with the results obtained in this study, since 27.1% of our samples from the three different locations showed damage associated with insects of the Coleoptera order. Gil et al., [53] identified *Corthylus sp.* (Coleoptera: Scolytidae), causing damage to alder (*Alnus acuminata*) trees, which showed wood rot and death, in this case the insect was associated to some ambrosial fungi like *Fusarium solani*, *Fusarium sp.*, *Ceratocystis sp.*, *Verticillium sp.* and a yeast identified as *Pichia sp.* Bonello et al. [54] found that the ambrosia beetle *Xylosandrus germanus* associated with *Fusarium lateritium* and *F. oxysporum*, is related with vascular stained, cankers, wilting and dieback in black walnut (*Juglans nigra*). Tisserat et al. [55] found that the mortality of black walnut (*Juglans nigra*) in Colorado, USA, is the result of association of *Pityophthorus juglandis* (Coleoptera: Scolytidae) with *Fusarium solani* and *Geosmithia sp.* this fungus was latter isolated from trunk marginal cancer in the final stages of decline. *F. solani* has been mentioned as a primary symbiotic with the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*)

[56-57]. The immature stages of *X. ferrugineus* are unable to complete the development in absence of *F. solani* [35, 58, 59]. Ergosterol is essential for development and reproduction of *X. ferrugineus* [60-61]. This sterol is absent in wood, but *F. solani* offer it in sufficient quantities [32]. This fungus also provides to *X. ferrugineus* essential fatty acids and phospholipids [62]. Norris [33] found that *X. ferrugineus* offspring was highly associated to the primary ambrosia fungus *Fusarium solani*, but with *Cephalosporium sp.* association was reduced by 50% and with *Graphium sp.* up to 70%. *Pityophthorus juglandis* is associated with *F. solani* in black walnut (*Juglans nigra*) trees in North America and South Africa; it is believed that trees are predisposed to cancer formation by stress factors such as optimum site conditions, improper pruning and adverse weather conditions [55], such as abandoned orchards and poor management. In our study, *F. solani* and *F. oxysporum* were consistently isolated from bone, xylem, phloem, cambium and galleries, as well as all *Euplatypus segnis* body parts. This observation and pathogenicity studies suggest an important role of *F. oxysporum* and *F. solani* in the pecan tree mortality of all ages in our region.

In the pathogenicity tests, *Lasiodiplodia theobromae* induced necrotic lesions approximately 10 cm long and 1.0 cm wide, that caused necrosis in the cortical tissue and deepened to the bone in the site of inoculation, at 56 days showed a slight chlorosis followed by early abscission, leaves with red tips, wilting and dieback tree at 84 days, the slow progression of the disease coincides with Milholland [63] who mentioned that this type of fungus grow slowly and progress in living tissue host due to its saprophytic condition. Optionally, *L. theobromae* is a parasite that usually infects its host plants by penetrating through wounds and decaying tissue. occurrence of this fungus is common in

tropical and subtropical regions and in different ecological areas, where it has been identified as the cause of disease in approximately 280 species of vascular plants, including avocado, apple, mango, grapes, pine, rose, rubber, cotton, cocoa, coffee, sugar cane, peanuts, tobacco, etc. [64]. Umezurike [65] mentions that *Botryodiplodia theobromae* has cellulolytic activity in *Bombax buonopozense* wood. The fungus attacks plant cells in a similar manner to soft rot fungi, use starch and other saccharides present in the initial wood substrates before degradation of cellulose and hemicellulose, but not degrade lignin. Rajput et al. [66] mention that decline and death of mango (*Mangifera indica* L.) trees in India, are related to the presence of *Botryodiplodia theobromae*, *Alternaria alternata*, *Fusarium moniliforme*, *Cephalosporium* sp., *Chaetomium* sp. *Aspegillus ellipticus*, *A. niger*, *Penicillium* sp., *Curvularia lunata*, *Gloeosporium mangiferae*, *C. globosum*, *Daldinia* sp associated to the attack of ambrosia beetles, termites, mechanical damage to trunk, branches and pruning. Rondon [7] established the relationship between the wood borer *Xyleborus ferrugineus* F. (Coleoptera: Scolytidae) and *Botryodiplodia theobromae* Pat attacking avocado trees in Venezuela, this author found that *B. theobromae* is the most frequently isolated fungi from the body of this wood borer insect. Flores et al. [67] detected the association of *Scolytus* sp. and *Botryodiplodia theobromae* fungus, which causes circular lesions to elongated oval up to 15 cm long, dark color that can be covered by large masses of spores in dry periods, causing the death of tips, and branches of *Tectona grandis* trees in Ecuador. Masood et al. [68] identified the association of *Hypocryphalus mangiferae* (Coleoptera: Scolytidae) with *Lasioidiplodia theobromae*, *Phomopsis fimbriata* and *Ceratocystis* sp. in the sudden death syndrome in Pakistan associated with symptoms of gummosis, dry rot and vascular discoloration. Tress inoculated with *Alternaria alternata* showed at 63 days

marked chlorosis, wilting leaf area at 70 days and dieback at 84 days as external symptoms and necrotic areas, browning of tissues and a deep dehydration of inoculated area. The genus *Alternaria* contains cosmopolitan species found in a wide range of materials and products, can damage food and feed, producing biologically active compounds such as mycotoxins. As pathogens reduce crop yields or affect stored plants therefore requires a precise identification of the species because each has specific characteristics (preferences for growth, pathogenicity, and production of secondary metabolites) that predict the behavior of this fungus [69]. Armengol *et al.* [70] mentioned that *A. alternata* is normally a saprophytic fungus, but in Spain some strains have been described as pathogenic on different citrus cultivars like Fortune, Nova, and Mineola. Negrón *et al.* [71] described *Alternaria* as parasites of annual and bi-annual plants or saprophytes on organic substrates, however found that *Alternaria alternata* associated with *Scolytus schevyrewi* (Coleoptera: Scolytidae) and other fungi affect some species of elms (*Ulmus* spp) in Colorado and Utah, which showed necrotic areas, browning of xylem tissue, wilting of foliage and general death of elms, symptoms consistent with the disease progression in the pecan trees of this study inoculated with *A. alternata* in our pathogenicity tests. Reyes [77] found that 8% of fungal strains isolated from wood samples and insect remains of adult weevils (Coleoptera: Platypodidae) belong to *Alternaria alternata* and 7% to *Phoma* sp.

The fungus *Paecilomyces* sp. is a pathogen of wide host range and wide geographical distribution, which has been isolated from soil and insects of various orders such as Coleoptera, Homoptera and Collembola, Lepidoptera, Diptera, Homoptera, Hymenoptera and spiders [73]. *Paecilomyces farinosus* may inhibit some strains of

pathogenic fungi [74]. Finally, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, and *Penicillium*, have been isolated from insect gut *Triatoma sp.* [75], which has been found sporadically in pecan orchards at the Coahuila Southeast region, Mexico.

CONCLUSIONS

Twelve genera of fungi were isolated from the body of *E. segnis* and diseased pecan wood. These fungi were identified as *Phoma sp.*, *Fusarium sp.*, *Ascochyta sp.*, *Phaecylomyces sp.*, *Lasiodyplodia sp.*, *Alternaria sp.*, *Umbeliopsis sp.*, *Torula sp.*, *Helminthosporium sp.*, *Aspergillus sp.*, and *Penicillium sp.*, and inoculated into healthy pecan trees, only *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata* and *Lasiodyplodia theobromae* were highly pathogenic causing dieback at 87 days of inoculation, they were characterized morphologically and molecularly to the specie level.

In Mexico, this study is the first study that determines *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* and *Lasiodyplodia theobromae*, as the causal agent of pecan (*Carya illinoensis*) dieback in association with *Euplatypus segnis* ambrosia borer.

Fusarium solani and *F. oxysporum* were the most prevalent fungi and isolated from insects and diseased wood at all studied locations. It has been suggested that some species of fungi associated with ambrosia borer are in a symbiotic relationship with the insect. Although, there may be a symbiotic relationship between fungi and insects, there

is no conclusive evidence to show that this relationship is sufficient, due to the great diversity of fungi found in association with *E. segnis*.

REFERENCES

- [1] Equihua-Martínez, A., Burgos-Solorio (2007). Platypodidae and Scolytidae (Coleoptera) from Jalisco, Mexico. *Dugesiana* 14 (2): 59-82.
- [2] Galván, L. O. A. (2000). *Euplatypus segnis* (Chapuis): Population fluctuation and extent of damage to pecan trees in Parras, Coahuila. In: Vázquez N. J. M. (Ed.). Memory Refresher Course II pecan plant. March 10 and 11. Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM). Campus Laguna, Torreon, Coahuila. p. 45-47.
- [3] García, M. O. (1999). *Euplatypus segnis* ambrosia borer (Chapuis) of pecan (*Carya illinoensis*) trunk and branches. Proceedings of the Seventh International Symposium Nogatec Nogalera. September 23, 24 and 25th. Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM). Campus Laguna, Torreon, Coahuila. p. 39-42.
- [4] Cesaveco (2010). State Committee for State Plants of Coahuila. Bulletin, 86. 20 p.
- [5] Atkinson T.H., Fernández E.M., Céspedes E.S. and Burgos, A. S. (1986). An Platypodidae Scolytidae (Coleoptera) Associated with Low Forest and Communities Arising in the State of Morelos, Mexico. *Folia Entomol. Mex.*, 69: 41-82

- [6] Samaniego-Gaxiola, J. A., Ramírez-Delgado, M.; Pedroza-Sandoval, A. and Nava-Camberos, U. (2008). Texas Partnership rot (*Phymatotrichopsis omnivorous*) and pecan (*Carya illinoensis*) insect borers. *Agric. Téc. Mex.* 34: 21-32 p.
- [7] Rondon A., and Guevara Y. (1984). Some Aspects Related to Avocado (*Persea americana* Mill) Dieback. *Tropical Agronomy*, 3: 119-129
- [8] Kok, L. T., and Norris, D. M. J. (1972). Symbiotic interrelationships between microbes and ambrosia beetles. VI Amino-acid composition of ectosymbiotic fungi of *Xyleborus ferrugineus*. *Entomological Society of America, Annals* 65:598-602
- [9] Brignola C, Lacroix B., Lieutier F., Sauvard D., Drouet A., Claudot C., Yart A., Berryman A., Christiansen, E. (1995). Induced Responses in Phenolic Metabolism in Two Norway Spruce Inoculations with *Ophiostoma polonicum* and Bark Beetle-Associated Fungus. *Plant Physiol.*, 109: 821-827.
- [10] Morales, R. J. A. Rojas, M. G., Bhatkar, H. S., and Saldaña, G. (2000). Symbiotic Relationships Between *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) and *Fusarium solani* (Moniliales: Tuberculariaceae). *Ann. Entomol. Soc Amer*, 93: 541-547.
- [11] Kuroda, K. 2001. Responses of *Quercus* sapwood to Infection With The pathogenic fungus of a new wilt disease vectored by the ambrosia beetle *Platypus quercivorus*. *Japan Wood Society*, 47: 425-429.

- [12] Peterson, W.S., Pérez, E.J., Vega F. and Infante, F. (2003). *Brocae Penicillium*, a new species associated coffee berry borer With The in Chiapas, Mexico. *Mycologia*, 95 (1):141-147.
- [13] Alfaro, R. (2003). The big taladrillo foresters, *Platypus mutatus* (= *sulcatus*): major pest of poplar Argentina. *Forest*, 28: 17.
- [14] García, M. O. 1998. Memorias del seminario-taller “El barrenador de los troncos y ramas del nogal pecanero *Euplatypus segnis* (*Chapuis*). 55 p.
- [15] Barnett, H.L. and Hunter, B.B. (2006). *Illustrated Genera of Imperfect fungi*. Fourth edition. The American Phytopathological Society. St. Paul Minnesota. (USA) 218 p.
- [16] Hanlin, R.T. (1990). *Illustrated Genera of Ascomycetes*. APS Press. Saint Paul, Minnesota. 324-333 p.
- [17] Booth, C. (1971). *The genus Fusarium*. Commonwealth Mycological, Kew, Surrey, United kindom. 718 p.
- [18] Rotem, J. (1988). *The genus Alternaria, biology, epidemiology and pathogenicity*. APS Press St. Paul, Minnesota, USA. 326 p.
- [19] Neergaard, P. (1977). *Seed pathology*. Vol 1 and 2, Macmillan, London, 1187 p.

- [20] Sutton, B. C. (1980). The Fungi Imperfecti with Pycnidia Coellomycetes, acervuli and Stromata. Commonwealth. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 696 pp.
- [21] Wei, R.R., Sorger, P.K., and Harrison, S.C. (2005). Molecular organization of the Ndc80 complex, an essential kinetochore component. *Proc Natl Acad Sci*, 102: 5363-5367
- [22] Punithalingam, E. (1976). *Botryodiplodia theobromae*. CMI description of pathogenic fungi and bacteria. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. No. 519. 20-27 P.
- [23] Burgess, T.I., Barber, P.A., Mohali, S., Pegg, G., de Beer W. and Wingfield, M. J. (2006). Three new *Lasiodiplodia* spp. From the tropics, based on DNA sequence recognized comparisons and morphology. *Mycologia*, 98: 423-435.
- [24] Ahrens, U., and Seemüller, E. (1992). Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organisms by polymerase chain reaction amplifying a sequence of 16S rRNA gene. *Phytopathology*, 82: 828-832.
- [25] Kuroda, K. (2005). Responses of *Quercus* sapwood to infection with the pathogenic fungus of a new wilt disease vectored by the ambrosia beetle *Platypus quercivorus*. *Japan Wood Society*, 47: 425-429
- [26] Kirkendall, L. R. (1983). The evolution of mating system in bark and ambrosia beetles (Coleoptera: Scolytidae and Platypodidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 77(4): 293-352.

- [27] Wood, S. L. (1982). The Bark and Ambrosia Beetles of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae), a Taxonomic Monograph. Great Basin Naturalist Memoirs, (6): 1359.
- [28] Ulloa, M. (1991). Illustrated dictionary of mycology. First edition. UNAM. Mexico, DF. 309 p.
- [29] Flechtmann, C.A. H. (1995) Com Reflorestamentos pinheiros Scolytidae Tropicais em. Piracicaba: IPEF, 201 p.
- [30] Harrington, C.T. (2005). Ecology and evolution of mycophagous bark beetles and their fungal partners. See Vega & Blackwell 257-291.
- [31] Beaver, R.A. (1989). Insect-fungus in the bark Relationships and ambrosia beetles. In Insect fungus Interactions, 14th Symp. R. Entomol. Soc London, ed. N Wilding, N M Collins, P M Hammond, J F Webber, pp. 121-43. London: Academic Blackwell M.
- [32] Kok, L.T, Norris, D.M, and Chu, H.M. (1970). Sterol metabolism as a basis for a mutualistic symbiosis. Nature, 225:661-62.
- [33] Norris, D. M. (1979). The mutualistic fungi of xyleborine beetles. In: "Insect-Fungus Symbiosis" (L R Batra, ed.). Halsted Press, Chichester, Sussex. pp 53-63. NCBI (National Center for Biotechnology Information). 2010. www.ncbi.nlm.nih.gov/ <http://> (accessed April 2010).

- [34] French, J.R.J. and Roeper, R.A. (1972). Interactions of the ambrosia beetle *Xyleborus dispar* (Coleoptera: Scolytidae) with STI symbiotic fungus, *Ambrosiella hartigii* (Fungi Imperfecti). *Can. Entomol.*, 104:1635-41.
- [35] Kingsolver, J.G. and Norris, D.M. (1977). External morphology of *Xyleborus ferrugineus* (Fabr.) (Coleoptera: Scolytidae) I. Head and prothorax of adult male and female. *J. Morphol.*, 154:147-56.
- [36] Roeper, R.A, Treeful, L.M., O'Brien, K.M., Foote, R.A. and Bunce, M.A. (1980). Life history of the ambrosia beetle *Xyleborus affinis* (Coleoptera: Scolytidae) from in vitro culture. *Great Lakes Entomol.*, 13:141-44
- [37] Borden, J.H. (1988). The striped ambrosia beetles. In *Dynamics of Forest Insect Populations*, ed. AA Berryman, pp. 579-96. New York: Plenum. 624 pp.
- [38] Batra, L.R. (1966). Ambrosia fungi: extent of specificity to ambrosia beetles. *Science*, 153:193-95.
- [39] Haanstad, J.O. and Norris, D.M. (1985). Microbial symbionts of the ambrosia beetle *Xyloterinus politus*. *Microb. Ecol.*, 11:267-76.
- [40] Norris, D.M. (1965). The complex of fungi essential to growth and Development of *Xyleborus sharpie* in wood. *Mater. Org. Beih.*, 1:523-29.
- [41] Baker, J.M. (1963). Ambrosia beetles and their fungi, with particular reference to *Platypus cylindricus* Fab. *Symp. Soc Gen Microbiol.*, 13:232-65.

- [42] Gebhardt, M., Bergerow, D. and Oberwinkler, F. (2004). Identification of the ambrosia fungus of *Xyleborus monographus* and *X. dryographus* (Curculionidae, Scolytinae). *Mycol.*, 3:95-102.
- [43] Kinuura H. (1995). Symbiotic fungi associated with ambrosia beetles. *Jpn. Agric. Q. Res.*, 29:57-63.
- [44] Francke-Grosmann, H. (1967). Wood-inhabiting Ectosymbiosis in insects. In *Symbiosis*, ed. SM Henry, 2:141-205. New York: Academic. 443 pp.
- [45] Morelet, M. (1998). Une nouvelle *Raffaelea* spec, *Isolee cylindrus* Platypus, Coleoptera des Chenes xylomycetophage. *Extr. Ann. Soc Sci Nat Archeolo. Toulon Var* 50:185-93.
- [46] Fernandez-Marin, H., Zimmerman, J.K. and Wcislo, W.T. (2004). Ecological traits and evolutionary sequences of nest establishment in fungus growing ants (Hymenoptera, Formicidae, Attini). *J Biol Linn. Soc.*, 81:39-48.
- [47] Jones, K.G. and Blackwell, M. (1998). Phylogenetic analysis of ambrosial species in the genus based on 18S rDNA *Raffaelea* sequences. *Mycol. Res.*, 102:661-65.
- [48] Rollins, F., Jones, K.G., Krokene, P., Solheim, H. and Blackwell, M. (2001). Phylogeny of asexual fungi associated with bark beetles and ambrosia. *Mycologia*, 93:991-96.
- [49] Nicholson, P. (2001). Molecular Assays as aids in the detection, diagnosis and Quantification of *Fusarium* species in plants. *Fusarium*. Summerell eds. APS Press. St. Paul, Minnesota. 176-192.

- [50] Carrillo, L. (1990). *Fusarium* mycotoxins in fruits of deteriorated *Cucurbita ficifolia*. Argentinean Journal of Microbiology, 22: 212- 215.
- [51] Doohan, F.M., Brennan, J. and Cooke, B.M. (2003) Influence of Climatic Factors on *Fusarium* Species Pathogenic to Cereals. European Journal of Plant Pathology, 109:755-768. DOI: 10.1023 / A: 1026090626994
- [52] Cooke, R. (1977). Mutualistic symbioses with insects. In: The Biology of Symbiotic Fungi. John Wiley & Sons, London. 282 pages.
- [53] Gil P., ZN, P. Bustillo, AE, D. Gomez, DS, M. Marin, P. 2004. *Corthylus* novo sp. (Coleoptera: Scolytidae), a pest of alder in the White River basin in Colombia. International Journal of Entomology, 30:171-178.
- [54] Bonello, R., McNee, W.R., Storer, A. J., Wood, D.L. and Gordon, T. L. (2001). The role of olfactory stimuli in the location of weakened hosts by twig-infesting *Pityophthorus* sp. Ecological Entomology, 26: 8-15.
- [55] Tisserat, N., Cranshaw, W., Leatherman, D., Utley, C. and Alexander, K. (2009) Mortality in Colorado Black Walnut Caused by the Walnut Twig Beetle and Thousand cankers Plant Health Progress Disease DOI: 10.1094/PHP-2009-0811-01-RS
- [56] Morales-Ramos, J.A., Rojas, M.G. and Harrington, T. (1999). Association between the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) and *Fusarium solani* (Moniliales: Tuberculariaceae). Ann. Entomol. Soc. Amer., 92: 98-100

- [57] Morales-Ramos, J.A., Rojas, M.G., Sittertz-Bhatkar, H. and Saldaña, G., (2000). Symbiotic relationship between *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) and *Fusarium solani* (Moniliales: Tuberculariaceae). *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, 93:541-547.
- [58] Norris, D.M. and Baker, J.K. (1967). Symbiosis effects of a mutualistic fungus upon the growth and reproduction of *Xyleborus ferrugineus*. *Science*, 156:1120–1122.
- [59] Norris, D.M. and Chu, H.M. (1971). Maternal *Xyleborus ferrugineus* transmission of sterol or sterol-dependent metabolites necessary for progeny pupation. *Journal of Insect Physiology*, 17: 1741-1745.
- [60] Norris, D.M., Baker, J.K. and Chu, H.M. (1969). Symbiotic interrelationships between microbes and ambrosia beetles. III. Ergosterol as the source of sterol to the insect. *Ann. Entomol. Soc. Am*, 62:413–414.
- [61] Chu, H.M., Norris, D. M. and Kok, L.T. (1970). Pupation requirement of the beetle, *Xyleborus ferrugineus*: sterols other than cholesterol. *J. Insect Physiol.*, 16: 1379-1387.
- [62] Kok, L.T. (1979). Lipids of ambrosia fungi and the life of mutualistic beetles. In *Insect-fungus symbiosis*, ed. L. R. Batra, 33-52. Sussex: Halsted Press.
- [63] Milholland, R.D. (1970). Histology of *Botryosphaeria* canker of highbush blueberries susceptible and resistant. *Phytopathology*, 60: 70-74.

- [64] Riva, R. (1996). Technology camu camu cultivation in the Peruvian Amazon. INIA - EE - Pucallpa, Peru. 12 p.
- [65] Umezurike, G.M. (1969). Cellulolytic Activities of *Botryodiplodia theobromae* Pat. Annals of Botany, 33: 451-462
- [66] Rajput, K.S. and Rao, K.S. (2007). Death and decay in the trees of Mango (*Mangifera indica* L.). Microbiological Research, 162:229-237. doi: 10.1016/j.micres.2004.07.003
- [67] Flores, T.V., Crespo, R.G. and Cabezas, G.F. (2010). Pests and diseases in plantations of teak (*Tectona grandis* LF) in the area of Balzar, Guayas Province. Science and Technology, 3: 15-22.
- [68] Masood, A., Saeed, S., Silveira, S.F., Akem, C.N., Hussain, N. and Farooq, A.M. (2011). Of mango quick decline In Pakistan: survey and pathogenicity of fungi isolated from bark beetle and mango tree. Pak. J. Bot., 43: 1793-1798.
- [69] Andersen B et al. 2001. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. Mycological Research 105: 291-299.
- [70] Armengol, J., Sales, R., Garcia-Jimenez, J. and Alfaro-Lassala, F. (2000). First report of *Alternaria* brown spot of citrus in Spain. Plant Disease, 84:1044.
- [71] Negron, J.F., Witcosky, J.J., Cain, R.J., LaBonte, J.R., Duerr, D.A., McElwey, S.J., Lee, J.C. and Seybold, S.J. (2005). The banded elm bark beetle: A New Threat to elms in North America. American Entomologist, 51: 84-94.

- [72] Capurro, M. and Reyes, S. (2007). Fungi, insect borers Association present in samples of wood entered into the Regional Laboratory of the Agricultural and Livestock Service. Bachelor Thesis. Universidad Austral de Chile. 70 pg.
- [73] Chan–Cupul, W., Ruiz–Sánchez, E., Cristóbal–Alejo, J., Pérez–Gutiérrez, A., Munguía–Rosales, R. and Lara–Reyna, J. (2010). *In vitro* development of four *Paecilomyces Fumosoroseus* isolates and their pathogenicity on immature whitefly. *Agrociencia*, 44(5): 587-597.
- [74] Gemma, J.N., Hartmann, G.C. and Wasti, S.S. (1984). Interaction between inhibitory *Ceratocystis ulmi* and several species of entomogenous fungi. *Mycologia*, 76: 256-260.
- [75] Moraes, A. M. L. Junqueira, A. C. V., Costa, G. L., Celano, V., Oliveira, P. C. and Coura, J. R. (2000) Fungal flora of the digestive tract of triatomines of 5 species vectors of *Trypanosoma cruzi*, Chagas 1909. *Mycopathologia*, 151: 41-48.

**Secondary Metabolite Changes in Pecan (*Carya illinoensis*)
Tissue Damaged by *Euplatypus segnis* Chapuis and Associated Fungi**

¹Ramon Alvidrez-Villarreal,

¹Francisco Daniel Hernandez-Castillo,

¹Oswaldo Garcia-Martinez, ¹Rosalinda Mendoza-Villarreal,

²Raul Rodriguez Herrera and ²Cristobal N. Aguilar Gonzalez

¹Department of Agricultural Parasitology,

Universidad Autonoma Agraria “Antonio Narro”,

Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, 25315 Saltillo, Coahuila, Mexico

²Food Research Department, School of Chemistry,

Universidad Autonoma de Coahuila, 25000 Saltillo, Coahuila, Mexico

Corresponding Author: Francisco Daniel Hernandez-Castillo Department of Agricultural Parasitology, Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, 25315 Saltillo, Coahuila, Mexico Tel: +52 844 411 0326.

Abstract: Problem statement: The borer insect *Euplatypus segnis* Chapuis is associated to *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* and *Botryodiplodia theobromae* fungi which produce regressive death in pecan (*Carya illinoensis*) trees. In the Mexico northern have been reported loses estimates of more than 20% in production by the combination of insects and phytopathogen organisms. It also has been observed that some trees can survive with or without chemical treatment.

Approach: The aim of present study was to determine the biochemical changes (contained of nitrogen, crude protein, terpen, condensed and hydrolyzable tannins, cellulose, lignin and silicium) in tissue of pecan trees cv. Western colonized by Ambrosia Borer (*Euplatypus segnis* Chapuis) and associated fungi complex. Three

damaged trees and three healthy trees were sampled in three different plantations in each one of three Coahuila State localities. The responses variables were analyzed under a nested design, Tukey s test ($p < 0.05$) was used to compare mean treatment differences.

Results: Data indicated that content of: terpenes, hydrolyzables tannins, cellulose, lignin and silicium increased significantly in the damaged trees in comparison to healthy trees.

Conclusion: This results allowed inferring that these components increased as a chemical defense answer to insect invasion and to the enzymatic action of the associated phyto-pathogenic fungi.

Key words: Characterization, identification, borer insect, *Carya illinoensis*

INTRODUCTION

The Coahuila State Southern area (Parras, General Cepeda and Torreón counties), are harvested 19,345 tons of pecan nut per year in a population of 525,060 trees. In the 20% of the pecan trees planting area has been reported the attack of ambrosia borer *Euplatypus segnis*, which causes a loss in production of 773.82 tons. This insect is associated to *F. solani*, *F. oxysporum*, *A. alternata* and *B. theobromae*, which are plant pathogenic fungi to pecan trees cv. Western variety under greenhouse conditions. The observed symptoms in colonized field trees are; sawdust in entry holes, brilliant reddish to brown dark and pungent liquid excretions. Removing the tree cortex are distinguished 2 mm-diameter holes and necrotic spots with different colors with a diamond tip form. In addition, other signs have been reported like turgidity loss, yellowing, leaf drop, partial and total death of branches and trees in relatively short periods (three months to a year); however, it is important to mention that some of them may survive without any treatment. This suggests that some biochemical changes are occurring as tree defense

mechanisms and these changes may be structural or constitutive and are induced by the presence of pathogens (Vivanco *et al.*, 2005). This kind of biochemical mechanisms of defense against insect attack and pathogen infection has been reported in some conifers (Berryman, 1972; Christiansen and Fjone, 1993). Although, terpenes are most commonly associated with conifer species, have also been detected in other plants, including angiosperms (Zwenger and Basu, 2008). Eyles *et al.* (2003) reported an increase of polyphenolic compounds including hydrolysable tannins, proanthocyanidins (condensed tannins), flavonoids, glycosides in *Eucalyptus globulus* (Labill) and *Eucalyptus nitens* (Maiden) xylem after artificial injury and indicated that the diverse range of secondary metabolites found in the wound wood is a response to repair the damaged tissue. The fungal attack on the cell walls cellulose reduces flexibility and endurance, while lignin degradation affects wood compressive strength, promoting a significant loss of this resistance and occurs even before the wood rot is detected (Murace *et al.* 2006). Moreover, there are not reports that cellulose has a connection with plant defense against pathogens, but the data suggested a relationship. Wainhouse *et al.* (1998) confirmed the importance of lignin as a tree defense mechanical barrier, because when the borer insect *Dendroctonus micans* attacked Norway spruces, it was observed a negative relationship between lignin amount and adult gallery size. Also, some biomolecules such as aldehydes, terpenes, esters, monoterpenoids, cyanohydrin esters, cyanohydrins, sesquiterpenes, essential oils, furans, alkaloids and phenolic compounds (tannins) are present naturally in plants and have shown insecticidal activity or phytotoxicity during pest control (Vazquez-Luna *et al.*, 2007). The aim of this study

was to determine the biochemical changes occurring in Pecan tree tissue damaged by the ambrosia borer *Euplatypus segnis* and the associated fungi.

MATERIALS AND METHODS

Diseased and healthy pecan tree tissues were collected in three different Coahuila state locations, Parras de la Fuente (25° 22'N 102°11'W 1520 m), General Cepeda (25° 22'N 101° 28 'W 1470 m) and Torreón (25° 42 'N 103° 27'W 1120 m). Three orchards were sampled by location and in each orchard, three healthy trees and three wounded tres were sampled. 20 years old-wounded trees were chosen if they were in the of phase three of damage (50% damaged leaf area, from 25-50 inlet and presence of sawdust at the stem base). Healthy and damaged Wood samples were taken for the chemical analysis of each pecan tree, in this case the samples were obtained from a wood portion cut to 0.30 and 2.60 m from soil in accordance to the TAPPI T 257-I 76 Norm. After each portion was cut in 2 cm size slices. Wood was obtained from the center and extreme slice terminals (lower and upper) to perform the biochemical determinations, including nitrogen, crude protein, terpenes and hydrolysable tannin, cellulose, lignin and silicium. The samples were transported in black polyethylene bags of 20 kilograms of capacity in order to avoid dehydration and the dispersion of insects (larvae and adults).

Subsequently, the slices are peeled and dried in a forced circulation oven at 60°C. Slices are splintered and grounding in a Wiley type miller and passed through a No. 40 mesh (0.42 mm) for 48 h, immediately, the powder was stored at room temperature in opaque containers to avoid direct exposure to light (Salazar and Perez, 1998). Extraction of polyphenols. In Erlenmeyer flasks (1000 mL⁻¹) were added 20 mL⁻¹ of acetone 70%

(ratio 1:4) and 5 g of powdered samples of each healthy and diseased wood. The flasks were covered with aluminum foil to avoid light exposure and passing a reflux system at a temperature of 60°C for 12 h. After the reflux, the solution was filtered in tulle fabric, the recovered extract was centrifuged at 3500 rpm for 10 min. The solvent was removed with a rotary evaporator (Yamato res540) at a temperature of 60°C, avoiding exposure to light.

Quantification of hydrolysable tannins. A standard curve was determined using a solution of gallic acid at concentration 0.4 gL⁻¹. Five test tubes were labeled 0 to 4 and subsequently 0, 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4 mL⁻¹ of standard solution and 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 and 0 mL⁻¹ distilled water were added to each tube respectively.

Next, in others tubes was added 400 uL of the extract samples recovered from healthy and diseased Wood diluted to 1:100. The tubes with gallic acid and simple were added with 400 microliters of Folin Ciocalteu commercial reagent, so was stirred and left stand for 5 min. Then, were added 400 uL of sodium carbonate (0.01 m), each tube was stirred and let stand for 5 min.

Subsequently, were added 2 mL⁻¹ of distilled water and the tubes were immediately read in anUV/Visible spectrophotometer (Thermo Spectronic, Biomate3) at 725 nm to determine phenols. The readings obtained from the samples were calculated using the follow equation $Y = 5.235x - 0.0256$, obtained from the calibration curve ($R^2 = 0.9991$). The assay was performed in triplicate.

Quantification of condensed tannins. A standard curve was determined using a standard solution of catechin at a concentration 1 g L⁻¹. Five test tubes were labeled 0 to

4, then were deposited at each tube 0, 0.25, 0.50, 0.75 and 1 mL⁻¹ of standard solution, respectively and 1.0, 0.75, 0.50, 0.25 and 0 mL⁻¹ of distilled water.

On the other hand, 500 uL of each diluted 1:100 sample was added in a test tube (16'150). All tubes contented catechin and samples was added 3 mL⁻¹ of HCl-butanol 10% and 100 uL of ferric reagent. These tubes were sealed to prevent evaporation of the HCl-butanol.

After that, the tubes were placed in a boiling water bath at 100°C for 1 h, subsequently the tubes were let to cool and readings were done in an UV/Visible spectrophotometer (THERMO SPECTRONIC, Biomate3) at 460 nm absorbance. The sample data were calculated using the follow equation $Y = 1.6102x - 0.329$, obtained from the calibration curve ($R^2 = 9967$).

This test was performed in triplicate.

Quantification of nitrogen and crude protein were determined using the Kjeldhal method. Digestion was performed with one 5 g sample. In a Kjeldhal flask was placed each sample, next were added 5 glass beads, one selenium mixture tablespoon as catalyst and 30 mL⁻¹ concentrated H₂SO₄. Each flask was placed in a digester until change in tone from dark brown to light green was observed. The obtained digested solution was distilled, in a flask (500 mL⁻¹) were placed the digested solution and added 300 mL⁻¹ distilled H₂O, 5 zinc granules, 110 mL⁻¹ NaOH 45%, 50 mL⁻¹ of H₃BO₃-4% and plus 5 drops mixed indicator, it was distilled to recover 300 mL⁻¹. The degree took place at burette with H₂SO₄ at 0.11173N.

The quantification of nitrogen was obtained from the wet organic matter digestion and ammonia produced from nitrogen was quantified. Whereas, total nitrogen from protein was estimated in percentage. To quantify the crude protein was multiplied N_2 percentage times the 6.25 protein factor.

Quantification of Terpenes by the Soxhlet Method with Hexane. We used 2 g of healthy or diseased Wood per sample. Each sample was placed in a groundnecked flasks pre-weighed on electric blankets adding hexane. The extraction was performed for 12 h and after the solvent was removed in a crucible furnace and bell-shaped drying. Each flask was weighed and by difference between the initial and final weights the hexane extract percentage was calculated, corresponding to the content of terpenes per sample (Munoz-Concha *et al.*, 2004).

Quantification of lignin, cellulose and silicium by the permanganate method. From each sample was weight 1 g of each healthy and damaged wood ground sample, in a 600 mL⁻¹ Berzelius glass were added 200 mL⁻¹ of acid detergent solution and 2 mL⁻¹ of Decahydronaphthalene and then heated to boiling over grills for 1 h. The solution was filtered through a crucible vacuum on tare porous layer. The solid residue was washed twice with hot distilled water, immediately washed again with 50 mL⁻¹ of acetone until colorless, removes the residual solvent and then was placed in a drying oven at 105°C for 12 h, then samples were placed in a drying hood for 30 min to obtain the Acid Detergent Fiber (ADF), which was placed on a petri dish with cold water and then was added 25 mL⁻¹ of potassium permanganate solution at least five times for 90 min. permanganate solution was removed after filtration using a vacuum funnel. The

crucibles were placed on Petri dishes and demineralizer solution was added to half the volume of the pot, letting the solution sit for 5 min; The process was repeated twice, until the whitish residue, it quickly washed twice with 70% alcohol and dried crucibles at 105°C, leaving to cool in a desiccator to obtain the weight of lignin. The samples for the determination of lignin was burned in a furnace at 570°C, leaving to cool in a desiccator to obtain the weight of cellulose, which in turn was added to 48% boric acid and washed with acetone, were burned in muffle at 570°C, give yourself cool in letting marker to obtain the weight of silicium (Van Soest and Wine, 1968).

Statistical analysis the data were analyzed under a nested completely randomized design, where the orchards are nested in localities, the repetitions were nesting in localities by orchard, the physiological state by localities and physiological state in orchard nestled in localities. ANOVA was performed and means comparison was done using Tukey's test $p < 0.05$ (SAS V8).

RESULTS

Chemical analysis from healthy and damaged pecan wood among localities indicated non significant difference for nitrogen, crude protein, terpenes, condensed tannins and silicium content (Table 1). Meanwhile there are significant differences for Hydrolysable Tannin (TH) concentration, cellulose and lignin.

This differences in TH content was higher in Torreon (1.02 me/cat), followed by General Cepeda and Parras localities respectively. Cellulose content was higher in Torreon and Parras in relation to General Cepeda. The lignin content (Table 1) was

statistically higher in the General Cepeda locality (15.49%) than in Parras locality (13.64%).

Table 1: Biochemical composition of Pecan trees sampled in three different Coahuila state locations

Localities	N (%)	Pc (%)	T (%)	TC (me/ac. gal)	TH (me/cat)	C (%)	L (%)	S (%)
Torreón	0.55484 a	3.4678 a	3.8928 a	0.81619 a	1.01965 a	62.142 a	14.8311 ab	1.14714 a
Parras	0.52610 a	3.2881 a	4.9817 a	0.82553 a	0.87363 c	61.639 a	13.6483 b	1.17007 a
G. Cepeda	0.55537 a	3.4711 a	4.2272 a	0.79769 a	0.97114 b	57.102 b	15.4994 a	1.17108 a

Means with different letters in the same column are different ($P < 0.05$) N = nitrogen, Pc = crude protein, T = terpenes, CT = condensed tannins, TH = hydrolysable tannins, C = cellulose, L =lignin and S = silica.

Table 2: Biochemical composition of diseased and healthy walnut Pecan trees sampled in three different localities in the state of Coahuila.

Physiological state	N (%)	Pc (%)	T (%)	TC (me/ac. gal)	TH (me/cat)	C (%)	L (%)	S (%)
Healthy	0.54144 a	3.384 a	2.512 b	0.898 a	0.847 b	58.808 b	10.124 b	0.784 b
Damaged	0.54943 a	3.434 a	6.222 a	0.727 b	1.062 a	61.781 a	19.194 a	1.540 a

Means with different letters in the same column are different ($p < 0.05$). N = nitrogen and PC = Crude Protein

In Table 2 is shown the resultdifferences on chemical composition between diseased and healthy trees, where it is observed significant differences for tannins concentration, cellulose, lignin and silicium content. The content of chemical compounds was higher in damaged wood by the complex Ambrosia Borer (*Euplatypus segnis* Chapuis) and associated fungi, except for condensed tannins, which was higher in healthy trees.

DISCUSSION

The null differences between orchards from different localities for nitrogen, crude protein, terpenes, condensed tannins and silicium content, may be due to the same agro-ecological management: such as improving soil quality by incorporating organic matter and fertilization management.

Chemical composition of diseased and healthy trees indicated that Nitrogen (N) concentration was not significant, this results suggests a similar fertility level in the sampled orchards. In this sense, fertilization practices can have indirect effects on plant resistance or susceptibility to insect and diseases, changing the tree nutrients composition. On the other hand, the total nitrogen has been considered a critical nutritional factor that modifies the abundance and behavior of insects (Mattson, 1980).

The crude Protein Content (PC) in healthy trees (3.38%) and damaged trees (3.43%) was statistically similar. Torres *et al.* (2005) mentioned that different rainfall periods increases significantly the content and production of protein in the available biomass (% PC /kg h⁻¹) and not available; The proteinbased chemical defenses in trees include enzymes such as chitinases and glucanases that can degrade components of invading organisms. The enzyme as inhibitors interfere with the microorganism ability to use as food resources the invaded tissue. Other inducible enzymes such as peroxidases and laccases can induce harder cell walls by promoting lignification, which directly affect the invader microorganism. Protein-based defenses can be highly specific to a particular organism, but only a small subset of them can be regulated during the attack of a specific pathogenic fungus (Hietala *et al.*, 2004; Nagy *et al.*, 2004).

Nitrogen and crude protein content may be have not an associated response to plant defense to pest attack, also, there are association between the reporter chemical compounds with effect in plant defense such terpenes, tannins, lignin, cellulose and silicium.

Terpenes content increased significantly in damaged pecan trees attacked by the borer-fungal complex as occurring in species of conifers (Zwenger and Basu, 2008). Trapp and Croteau (2001) found that terpene content increases as a host response to insects when they drilled the trees. Terpenes have also been reported that can inhibit development of pathogens (Klepzig *et al.*, 1996). Although, there is an induced response to insects invasion, the biosynthesis of terpenes takes time and occurs after the borers have been transported to the wood, fungal hyphae and the pathogen is established, the distribution of terpenes can vary within a species (Semiz *et al.*, 2007). Thompson *et al.* (2006) found in tree samples, high terpenes concentrations in the xylem and low in the phloem, as moderate levels in the sapwood. Kessler and Baldwin (2001) demonstrated that herbivorous insects can induce the emission of plant terpenes and also make the plant emits signals to attract predatory species. These experiments provide not only evidence of the powerful role of terpenes for plant defense, but also provide a model of coevolution between plants, mites and insects.

In this study, condensed tannins concentration was lower in diseased than healthy trees. Alonso *et al.* (2001) reports that in *Calluna vulgaris* plants nitrogen concentrations increase, promote a reduction in total phenolics, condensed tannin levels and a increase of hydrolysable tannins in diseased wood in relation to healthy wood, these changes may

be a response of plants to insect-pathogen complex attack, since tannic compounds play a significant role in the resistance mechanisms to pathogenic organisms due to its antifungal properties (Singh and Kim, 1997; Morita *et al.*, 2001). Eyles *et al.* (2003) analyzed anatomically and chemically the wood produce by xylem artificially injured *Eucalyptus globulus* (Labill) and *Eucalyptus nitens* (Maiden) trees, these authors found an increase in polyphenolic compounds including hydrolysable tannins, tannins condensate, glycosides and flavonoids and mentioned that the diverse range of secondary metabolites found in the wound wood is a repair response to pest attack. Tannins have been reported to have an important role in the plant defense mechanisms against insects, decay fungi or allelopathic agent; tanins react quickly with other biomolecules forming complex products with proteins (structural and catalytic), starch, pectin substances and cellulose. By this way, the attack by fungi or bacteria metabolism can be inactivated or substantially decreased (Laredo, 1996). Some of these bioactive compounds such as tannins and terpenes play an important role in natural defense mechanisms of fruits and vegetables (Cowan, 1999; Howard *et al.*, 2000; Lombardi-Boccia *et al.*, 2004).

Cellulose content increased in a significant way in diseased wood in comparison to healthy wood; the cellulose polysaccharide is in greater proportion in the wood and is the most important substance produced by trees and the main cell wall component (Godoy *et al.*, 2007). Cellulose has different physical and mechanical properties, giving plant strength and toughness (Chowa *et al.*, 2008). Fungal attack to cell wall cellulose reduces tree flexibility, whereas lignin degradation affects compressive strength of wood, a significant loss of this resistance occurs before the rot is detected in the wood

(Murace *et al.*, 2006), there are no reports that cellulose has a relationship with plant defense against pathogens, but the data suggest an association.

Lignin concentration was higher in damaged pecan trees by insect attack. Wainhouse *et al.* (1990) mentioned that the increase of lignin content has a negative effect on wood boring insects, affecting larval survival, insect weight and growth, there are a reduction of tunnels diameter and they are deformed, adults oviposit less on trees with high lignin content.

Lignification may be a constitutive feature in some species, but may also occur as a process of strengthening the tissues when are subjected to physical damage and manifested during plant defense as local accumulation of large quantities of lignin in affected tissues. Lignin is produced by the enzymatic binding of phenylpropanoid units forming long polymers that confer impermeability and mechanical strength; in addition, lignin is resistant to degradation by many pathogens (Nicholson and Hammerschmidt, 1992).

Wainhouse *et al.* (1998) confirm the importance of lignin as a mechanical barrier developed by trees, because when the borer *Dendroctonus micans* was established in Norway spruce, there had a negative relationship between the amount of lignin and gallery size, the galleries were bigger in trees with a low lignin concentration. When *Ascolyxa abietina* infected naturally Norway spruce wood, phenolic compounds and lignin were accumulated in the cell wall Cvikrova *et al.* (2006). When *Pinus banksiana* was attacked by the fungus *Gremmeniella abietina*, the stem bark, phloem cells and vascular cambium were invaded, in response, the tree affected tissues produced lignosuberized tissues confined the pathogen within the affected area; this is the first

demonstration about anatomical mechanism of defense in conifer (Simard *et al.*, 2001). Genetically engineered trees with low lignin increases the destruction of forests and ways of life and are more susceptible not only to storm damage, but also to attacks by insects, fungi and bacteria (Frankenhuyzen and Beardmore, 2004).

In this study was found that silicium increases significantly in diseased wood compared to healthy wood. Silicium forms insoluble (phytoliths) and soluble aggregates (orthosilicic acid polymers), intertwined with cellulose and cell wall components, making them strong and flexible, thus protecting plant tissue against water, air and microorganisms action (Rodrigues and Datnoff, 2005). Vegetable physiologists consider silicium as an essential element for plants, however, has been reported that the presence of silicium benefit crops, by induction of resistance and protection against various biotic and abiotic factors attributed in part to the accumulation and polymerization in the cell walls, which constitutes a mechanical barrier against attack by pathogens and insects (Epstein, 1999). Silicium activates a series of defensive genes in rice, wheat and maize, it is confirmed that some insect predators (*Coleoptera: Coccinellidae*) feed more on plants with higher levels of silicium, which means that silicium-supplemented plants release volatile compounds that attract natural enemies of pests (Bettioli, 2006). This leads, consequently, a decrease in the preference of insects for plants (Gomes *et al.*, 2005). There are other reports that found that some biomolecules such as aldehydes, terpenes, esters monoterpenoids, cyanohydrin esters, cyanohydrins, sesquiterpenes, essential oils, furans, alkaloids and phenolic compounds (tannins) occurring naturally in plants and tested in different bioassays had showed phytotoxic insecticidal activity (Vazquez-Luna *et al.*, 2007).

CONCLUSION

Terpenes, hydrolysable tannins, cellulose, lignin and silicium concentration significantly increased in diseased trees, it can be inferred that the increase of these components is a biochemical defense response of pecan to insect invasion and to the enzymatic action of the fungal pathogens associated. The results confirm that activation of plant defense has a complex base that depends on the coordinated expression of a set of defense mechanisms. These mechanisms respond to the expression or repression of genes where the products participate in different metabolic pathways involved in plant defense.

These genes, called defense genes, form the basis of horizontal or polygenic resistance known by plant pathologists and plant breeders. The defense mechanisms of horizontal resistance, involves the production of phytoalexins, secondary metabolites, PR proteins, lignin deposition, hypersensitive reaction or SAR, which are responsible for acting against pathogen. In other words, plants defense is largely polygenic. On the other hand, the R genes form the basis of vertical resistance or monogenic or oligogenic.

Despite what its name suggests, the R genes are not directly responsible for resistance, but also act as signal receivers (Avr proteins) that originate from the pathogen. This leads to the activation of different signaling cascades that ultimately initiate the expression of genes responsible for the defense mechanisms.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was possible by the financial support of The Universidad Autonoma Agraria “Antonio Narro”. Ramón Alvidrez-Villarreal acknowledges the Consejo Nacional de Ciencia and Tecnologia (CONACYT) of Mexico for financial support during his Ph. D. Studies.

REFERENCES

- Alonso, I., S.E. Hartley and M. Thurlow, 2001. Competition between heather and grasses on Scottish moorlands: Interacting effects of nutrient enrichment and grazing regime. *J. Vegetation Sci.*, 12: 249-260. DOI: 10.2307/3236609.
- Berryman, A.A., 1972. Resistance of conifers to invasion by bark beetle-fungus association. *BioScience*, 22: 598-602.
- Bettioli, W., 2006. Productos alternativos para el manejo de enfermedades en cultivos comerciales. *Fitosanidad*, 10: 85-182.
- Chowa, P., F.S. Nakayama, B. Blahnika, J.A. Youngquist and T.A. Coffelt, 2008. Chemical constituents and physical properties of guayule wood and bark. *Indus. Crops Products*, 28: 303-308. DOI: 10.1016/j.indcrop.2008.03.006
- Christiansen, E. and G. Fjone, 1993. Pruning enhances the susceptibility of *Picea abies* to infection by the bark beetle-transmitted blue-stain fungus, *Ophiostoma polonicum*. *Scandinavian J. Forest Res.*, 8: 235-245. DOI: 10.1080/02827589309382773

- Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12: 564-582. PMID:10515903
- Cvikrova, M., J. Mala, M. Hrubcova and J. Eder, 2006. Soluble and cell wall-bound phenolics and lignin in *Ascolyx abietina* infected Norway spruces. *Plant Sci.*, 170: 563-570. DOI: 10.1016/j.plantsci.2005.10.011
- Epstein, E., 1999. Silicon. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50: 641-664. DOI:10.1146/annurev.arplant.50.1.641
- Eyles, A., N.W. Davies and C. Mohammed, 2003. Wound wood formation in *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens*: Anatomy and chemistry. *Can. J. Forest Res.*, 33: 2331-2339. DOI: 10.1139/X03-149
- Frankenhuyzen, K.V. and T. Beardmore, 2004. Current status and environmental impact of transgenic forest trees. *Can. J. Forest Res.*, 34: 1163-1180. DOI: 10.1139/X04-024
- Godoy, E.A., J.C.D.C. Rodrigues, A.M.M. Alves and D.A. Lazo, 2007. Content and quality study of the lignin by analytical pyrolysis in *pinus caribaea*. *Maderas. Cienc. Tecnol.*, 9: 179-188. DOI: 10.4067/S0718-221X2007000200008
- Gomes, F.B., J.C.D. Moraes, C.D.D. Santos and M.M. GoussainI, 2005. Resistance induction in wheat plants by silicon and aphids. *Sci. Agric.* DOI: 10.1590/S0103-90162005000600006
- Laredo, R.F.G., 1996. Preservación de madera con taninos. *Madera Bosques*, 2: 67-73.
- Hietala, A.M., H. Kvaalen, A. Schmidt, N. Johnk an H. Solheim et al., 2004. Temporal and spatial profiles of chitinase expression by Norway spruce in response to bark

colonization by *Heterobasidion annosum*. *Applied Environ. Microbiol.*, 70: 3948-3953. DOI: 10.1128/AEM.70.7.3948-3953.2004

Howard, L.R., S.T. Talcott, C.H. Brenes and B. Villalon, 2000. Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 1713-1720. DOI: 10.1021/jf990916t

Kessler, A. and I.T. Baldwin, 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, 291: 2141-2144. DOI: 10.1126/science.291.5511.2141

Klepzig, K.D., E.B. Smalley and K.F. Raffa, 1996. Combined chemical defenses against an insect-fungal complex. *J. Chem. Ecol.*, 22: 1367-1388. DOI: 10.1007/BF02027719

Lombardi-Boccia, G., M. Lucarini, S. Lanzi, A. Aguzzi and M. Capelloni, 2004. Nutrients and antioxidant molecules in yellow plums (*Prunus domestica* L.) from conventional and organic productions: A comparative study. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 90-94. DOI: 10.1021/jf03444690

Mattson, W.J. Jr, 1980. Herbivory in relation to plant nitrogen content. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 11: 119-161. DOI: 10.1146/annurev.es.11.110180.001003.

Morita, S., Y. Yasaki and G.C. Johnson, 2001. Mycelium Growth Promotion by Water Extractives from the Inner Bark of Radiata Pine (*Pinus radiata* D. Don). *Holzforchung*, 55: 155-182.

- Munoz-Concha, D., H. Vogel and I. Razmilic, 2004. Variation of chemical compounds in leaves of *Drimys* spp. (Magnoliophyta: Winteraceae) populations in Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 77: 43-50.
- Murace, M.A., M.L. Luna, G.D. Keil and N.N.D. Cristofano, 2006. Anatomical changes in Willow Wood Decayed by the brown rot fungus *Corirolellus malicola* (Basidiomycota). *Bol. Soc. Argent. Bot.*
- Nagy, N.E, C.G. Fossdal, P. Krokene, T. Krekling and A. Lonneborg et al., 2004. Induced responses to pathogen infection in Norway spruce phloem: Changes in polyphenolic parenchyma cells, chalcone synthase transcript levels and peroxidase activity. *Tree Physiol.*, 24: 505-515. PMID: 14996655
- Nicholson, R.L. and R. Hammerschmidt, 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 30: 369-389. DOI: 10.1146/annurev.py.30.090192.002101
- Rodrigues, F.A. and L.E. Datnoff, 2005. Silicon and rice disease management. *Fitopatol. Bras.* DOI: 10.1590/S0100-41582005000500001
- Salazar, J.A.H. and J.H. Perez, 1998. Determinación de componentes químicos de la madera de cinco especies de encino del estado de Puebla. *Madera Bosque*, 4: 79-93.
- Semiz, G., J. Heijari, K. Isik and J.K. Holopainen, 2007. Variation in needle terpenoids among *Pinus sylvestris* L. (Pinaceae) provenances from Turkey. *Biochem. Syst. Ecol.*, 35: 652-661. DOI: 10.1016/j.bse.2007.05.013

- Simard, M., D. Rioux and G. Laflamme, 2001. Formation of ligno-suberized tissues in jack pine resistant to the European race of *Gremmeniella abietina*. *Phytopathology*, 91: 1128-1140. DOI: 10.1094/PHYTO.2001.91.12.1128
- Singh, A.P. and Y.S. Kim, 1997. Biodegradation of Wood in Wet Environments: A Review. 1st Edn., IRG, Stockholm, pp: 30.
- Thompson, A., J. Cooper and L.L. Ingram, 2006. Distribution of terpenes in heartwood and sapwood of loblolly pine. *Forest Prod. J.*, 56: 46-48.
- Torres, A.R., E. Chacon, S. Armas and F. Espinoza, 2005. Efecto de los patrones de siembra sobre la producción de proteína cruda en bancos de *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit. *Zootecnia Trop.*
- Trapp, S. and R. Croteau, 2001. Defensive resin biosynthesis in conifers. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52: 689-724. DOI: 10.1146/annurev.arplant.52.1.689
- Van Soest, V.P.J. and R.H. Wine, 1968. Determination of lignin, cellulose and silice in Acid-Detergent fiber with permanganate. *J. Ass. Official Agric. Chem.*, 51: 780-785.
- Vazquez-Luna, A., L. Perez-Flores and R. Diaz-Sobac, 2007. Biomolecules with insecticidal activity: An alternative to improve the food safety. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 5: 306-313. DOI: 10.1080/11358120709487705
- Vivanco, J.M., E. Cosio, V.M. Loyola-Vargas and H.E. Flores, 2005. Mecanismos quimicos de defensa en las plantas. *Investigacion y Ciencia*. 12: 30-31.

- Wainhouse, D., D.J. Cross and R.S. Howell, 1990. The role of lignin as a defence against the spruce bark beetle *Dendroctonus micans*: Effect on larvae and adults. *Oecologia*, 85: 257-265. DOI: 10.1007/BF00319411
- Wainhouse, D., R. Ashburner, E. Ward and R. Boswell, 1998. The effect of lignin and bark wounding on susceptibility of spruce trees to *Dendroctonus micans*. *J. Chem. Ecol.*, 24: 1551-1561. DOI: 10.1023/A:1020915901756
- Zwenger, S. and C. Basu, 2008. Plant terpenoids: Applications and future potentials. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.*, 3: 1-7.

CONCLUSIONES GENERALES

- Doce géneros de hongos fueron aislados del cuerpo de *E. segnis* y madera enferma de nogal pecanero y caracterizados morfológicamente a nivel de género; *Phoma sp.*, *Fusarium sp1.*, *Ascochyta sp.*, *Phaecylomices sp.*, *Lasiodyplodia sp.*, *Alternaria sp.*, *Umbeliopsis sp.*, *Torula sp.*, *Fusarium sp.*, *Helmintosporium sp.*, *Aspergillus sp.*, y *Penicillium sp.*, e inoculados en nogales sanos.
- *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata* y *Lasiodyplodia theobromae* fueron altamente patogénicos causando muerte regresiva a los 87 días de inoculados, ellos fueron caracterizados morfológica y molecularmente a nivel de especie.
- En México, este estudio es el primero que determina a *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* y *Lasiodyplodia theobromae*, como agentes causales de la muerte descendente del nogal pecanero (*Carya illinoensis*) en asociación con el barrenador ambrosial *Euplatypus segnis*.
- *Fusarium solani* y *F. oxysporum* fueron los hongos más predominante y se aisló de todas las localidades estudiadas, tanto de insectos como de madera enferma. Se ha sugerido que algunas especies de hongos asociados con el barrenador ambrosial están en relación simbiótica con el insecto. Aunque es posible que exista una relación simbiótica entre estos hongos y el insecto, no existe evidencia

concluyente que demuestre que esta relación es suficiente, debido a la gran diversidad de hongos encontrados en asociación con *E. segnis*.

- La concentración de terpenos, taninos hidrolizables, celulosa, lignina y sílice aumentaron significativamente en árboles enfermos, esto permite inferir que el aumento de estos componentes es una respuesta de defensa bioquímica del hospedero a la invasión del insecto y a la acción enzimática de los hongos fitopatógenos asociados.
- Los resultados confirman que la activación de defensa en las plantas tiene una base compleja que depende de la manifestación coordinada de un conjunto de mecanismos de defensa. Estos mecanismos responden a la expresión o represión de genes cuyos productos participan en las diferentes vías metabólicas que participan en la defensa.

LITERATURA CITADA

- Alvidrez, V. R. 2000. Hongos fitopatogenos asociados al barrenador ambrosial (*Euplatypus segnis*) (Chapuis) (Coleoptera: Platypodidae) y tejido vegetal del nogal pecanero (*Carya illinoensis*) Koch. Tesis Postgrado, UAAAN. 120 p.
- Abrahamson, L.P., and Norris, D.M. 1970. Symbiotic relationships between microbes and ambrosia beetles. (Coleoptera: Scolytidae). V. Amino acid as a source of of nitrogen to the fungi in the beetle. Ann. Entomol. Soc. Am. 63: 177-180.
- Agrios N. G. 1988. Plant pathology . thirdth edition, Academic Press, N.Y.703 p.
- Alexopoulos, C. J., Mims, W. C., Blackwell, M. 1996. Introductory micology. Fourth Edition Ed. John Wiley & Sons, Inc. USA. 638 p.
- Atkinson, T. H. 1988. Effects of climate and vegetation on patterns of host use by bark an ambrosia beetles (Coleoptera: Scolytidae and Platypodidae). Environ. Ann. Entomol Soc. Am. 83, (3): 453-466.
- Atkinson, T. H., and Equihua-Martinez, A. 1986. Biology of bark and ambrosia beetles (Coleoptera:Scolytidae and Platypodidae) of tropical rainforest in southeastern Mexico with an annotated checklist of species. Ann. Entomol. Soc. Am. 79: 414-423.
- Bailey J.A. and M.J. Jerger. 1992. *Colletotrichum* biology, pathology an control CAB international Wallingford U.K. 388 p.
- Baker, J.M. 1963. Ambrosia beetles and their fungi, with particular reference to *Platypus cylindrus* Fab. Simp. Soc. Gen. Microbial. 13: 232-265.
- Barber, MS;Mitchell,HJ. 1997 Regulation of phenylpropanoidmetabolism in relation to lignin biosynthesis in plants.International Review Of Cytology - A Survey Of CellBiology 172:243-293.
- Barnett. H.L. Hunter B.B. 1998. Illustrated genera of Imperfect fungi. Fourth edition. The American Phytopatological Society. St. Paul Minnesota. (USA).218 p.

- Barras, S. J., and Perry, T. 1971. Gland cell and fungi associated with prothoracic mycangium of *Dendroctonus adjunctus* (Coleoptera: Scolytidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 64, (1): 123-126.
- Barras, S.J. 1970. Antagonism between *Dendroctonus frontalis* and the fungus *Ceratocystis minor*. Ann Entomol. Soc. Am. 63: 1187-1190.
- Batra, L. R. 1966. Ambrosia fungi: extent of specificity to ambrosia beetle. Science 153: 193-195.
- Batra, L. R. 1967. Ambrosia fungi: a taxonomic revision and nutritional studies of some species. Mycologia 59: 976-1017.
- Beaver, R. A. 1972. Biological studies of Brazilian Scolytidae and Platypodidae. Bull. Entomology. 62: 247-256.
- Beaver, R. A. 1990. Insect-fungus relationships in the bark and ambrosia beetles. Mycologia 70. 121-143.
- Benhamou, N; Mazau, D; Esquerr, Tugay, M.T. 1990. Immunocytochemical localization of hydroxyproline-rich glycoproteins in tomato root-cells infected by *Fusarium oxysporum* f sp *radicis-lycopersici* - study of a compatible interaction. Phytopathology 80:163-173.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological, Kew, Surrey, United Kingdom. 718 p.
- Borror, D. J., Tripleton, C. A., Johnson, N. F. 1989. An Introduction to the study of insects. Sixth Edition. Saunders College Publishing. New York U.S.A. 875 p.
- Browning, J.A. 1980. Genetic protective mechanism of plantpathogen populations: their coevolution and use in breeding for resistance. In Harris, M.K. Ed. Biology and Breeding for resistance to arthropods and pathogens in agricultural plants. Texas Agric. Sta. College Station, TX. P 52-75.
- Campbell L. C. and L. V. Madden 1990. Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley & Sons Inc. Ohio U.S.A. 532 p.

- Castello, J. D., Shaw, C. G. and Furniss, M. M. 1976. Inoculation of *Cryptosporium volvatum* and *Formes pinicola* from *Dendroctonus pseudotsugae*. *Phytopathology* 66: 1431-1434.
- CESAVECO 1997. Comité estatal de sanidad vegetal del estado de Coahuila. Boletín, 12. 12 p.
- CESAVECO 1998. Comité estatal de sanidad vegetal del estado de Coahuila. Boletín, 17. 12 p.
- Collinge, D.B.; Gregersen, P.; Thordal-Christensen, H. 1994. The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. *In* Mechanisms of plant growth and improved productivity, Modern approaches. Basra, A.S. Ed. New York, Marcel Dekker. p. 391-433.
- Collinge, D.B.; Borch, J.; Madriz-Ordeñana, K.; Newman, M-A. 2001. The responses of plants to pathogens. *In* Hawkesford, M.J.; Buchner, P. Molecular analysis of plant adaptation to the environment. Dordrecht, Holanda, Kluwer Academic Publishers. 391-433.
- CONAFRUT, 1973. Primer ciclo de Conferencia de Productores de Nuez de la República Mexicana. Comisión Nacional de Fruticultura S.A.G México, Serie Técnica folleto No. 10 Piedras Negras Coahuila, México. S.A.G. CONAFRUT. México. p. 1-29.
- Cuellar J. E. B. 1986. Biología de *Platypus segnis* (Chapuis) (Coleoptera: Platypodidae) barrenador de *Carya illinoensis*. Koch, en Santa María del Río S.L.P. tesis profesional, Fac. de Cienc. Biol. Univ. Aut. Nvo. León. Monterrey, Nuevo León. 87 p.
- Claridades Agropecuarias. 1994. La nuez mexicana; un cultivo de tradición en la zona norte del país. Revista No. 20
- Cypers, B.; Schmelzer, E.; Hahlbrock, K. 1988. *In situ* localization of rapidly accumulated phenylalanine ammonia-lyase mRNA around penetration sites of *Phytophthora infestans* in potato leaves. *Molecular Plant Microbe Interactions* 1:157-160.
- Darvill, A.G.; Albreim, P. 1984. Phytoalexins and their elicitors- A defence against microbial infection in plants. *Annual Review of Plant Physiology* 35:243-275.

- De Wilt ,P J. 1997. Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. Trends in Plant Science 2: 452 - 458.
- Dowding, P. 1969. The dispersal and survival of spore of fungi causing bluestain in pine. Trans. Br. Mycol. Soc. 52: 125-137.
- Elliot, H. J., and Madden, J. L. Y Blansford, R. 1983. The association of ethanol in the attack behaviour of the mountain pinhole borer, *Platypus subgranosus* Schedl (Coleoptera:Platypodidae). Entomol. Soc Aust. 22: 299-302.
- Erwin.D.C. and Ribeiro K. O. 1998. Phytophthora Disease Worldwide. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. (USA). 562 p.
- Flor, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. Annual Review of Phytopathology 9:275-296.
- French, J. R. J., and Roeper, R. A. 1972. In vitro culture of the ambrosia beetle *Xyleborus dispar* (Coleoptera: Scolytidae) with its symbiotic fungus, *Ambrosiella hartigii*. Ann. Entomol. Soc. Am. 65 (3): 719-720.
- Furniss, M. M., Woo, J. Y., Deyrup, M. A., y Atkinson T. H. 1987. Prothoracic mycangium on pine-infesting *Pityoborus* spp. (Coleoptera: Scolytidae) Ann. Entomol. Soc. Am. 80. (5): 692-696.
- Gabriel, D.W; Rolfe, BG. 1990. Working Models of Specific Recognition in Plant-Microbe Interactions. Annual Review of Phytopathology 28:365-391.
- García, M. O. 1998. Memorias del seminario-taller “El barrenador de los troncos y ramas del nogal pecanero *Euplatypus segnis* (Chapuis). 10 p.
- Gilchrist, D.G. 1998. Programmed cell death in plant disease: The purpose and promise of cellular suicide. Annual Review of Phytopathology 36: 393-414.
- Graham, K. 1967. Fungal-Insect mutualism in trees and timber. Ann. Entomol. Soc. Am. 12: 105-126.

- Haannstad, J. O ., and Norris, D.M. 1985. Microbial symbionts of the ambrosia beetle, *Xiloterinus politus*. *Microb. Ecol.* 11: 267-276.
- Hammersmidt, R . 1999. Phytoalexins : What have we learned after 60 years? *Annual Review of Phytopathology* 37:285-306.
- Hammond - Kosack , K E ; Jones, J.G. 1996 . Resistance gene dependent plant defense responses. *The Plant Cell* 8:1773- 1791.
- Hawkworth D.L., B.C. Sutton and G.C. Ainsworth. 1983. *Dictionary of the fungi. Commonwealth Mycological Institute. C.A.B. international Kew Surrey Great Britain.* 445 p.
- Heath, M.C. 2000a. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* 3:315-319.
- Heath, M. C. 2000b. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44:321-334.
- Herrera, R. R et al, 2004. Modificación al método Graham para extracción de DNA. *Memorias del XXXI Congreso Nacional de Fitopatología. L-17 Veracruz Mex.*
- Hutcheson, SW. 1998. Current concepts of active defense in plants. *Annual Review of Phytopathology* 36:59-90.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEGI).1999. *Anuario Estadístico del Estado de Coahuila. Talleres Gráficos del INEGI. Aguascalientes, Ags. México. P 1-6.*
- Jiménez, V.M.A. 1991. Incidencia del Barrenador *Platypus sp.* En Nogal en el Sudeste del Estado de Coahuila. *Tesis de Licenciatura. UAAAN. Saltillo, Coah., 39 p.*
- Keen, N. 1992. The molecular biology of disease resistance. *Plant Molecular Biology* 19:109-122.

- Kingsolver, J.G., Norris, D. M., 1977. The interaction of *Xyleborus ferrugineus* (Coleoptera:Scolytidae) behavior and initial reproduction in relation to its symbiotic fungi. *Ann. Entomol. Soc. Am.*70 (1): 1-4.
- Kok, L.T., and Norris, D. M., 1972. Symbiotic interrelationships between microbes and ambrosia beetles VI. Amino acid composition of ectosymbiotic of *Xyleborus ferrugineus*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*65. (3):598-601.
- Lamb,C. 1996. A ligand-receptor mechanism in plant-pathogen recognition.*Science* 274:2038-2039.
- Levine, A;Tenhaken,R;Dixon,RA;Lamb,C. 1994.H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583-593.
- Martin R. R., J. Delano y C. A. Levesque. 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38:207-239.
- Milholland, R.D. (1970). Histology of *Botryosphaeria* canker of highbush blueberries susceptible and resistant. *Phytopathology*, 60: 70-74.
- Morales, R. J. A. Rojas, M. G., Bhatkar, H. S., y Saldaña, G. 2000. Symbiotic relationships between *Hypothenemus hampei* (Coleoptera:Scolytidae) and *Fusarium solani* (Moniliales: Tuberculariaseae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 93, (3): 541-547.
- Nakashima, T. 1972. Notes on the mycangia of the ambrosia beetles, *Platypus severini* Blandford and *P. calamus* Blandford (Coleoptera: Platypodidae). *Appl. Entomol. Zool.* 7: 217-225.
- Neergaard, P. 1977. Seed pathology. Vol. 1 and 2 Macmillan, London, 1187 p.
- Nicholson, RL;Hammerschmidt, R.1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30: 369-389.
- Noguera, M. F.A. and Atkinson, T. H., 1990. Biogeography and biology of bark and ambrosia beetle, (Coleoptera:Scolytidae and Platypodidae) of a mesic montane

- forest in Mexico, with an annotated checklist of species. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 83, (3): 453-466.
- Nord, J. C. 1972. Biology of the columbian timber beetle, *Corthylus columbianus* (Coleoptera: Scolytidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 65 (2):350-358.
- Norris, D. M. 1979. The mutualistic fungi of Xyleborine beetle. In *Insect-Fungus Symbiosis* (L.R. Batra, ed.) Halsted Press, Chichester, Sussex. P. 53-63
- Norris, D.M., Backer, J. M., Chu, H. M. 1969. Symbiotic interrelationships between microbes and ambrosia beetles. III Ergosterol as the source of sterol to the insect. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 62. (2): 413-415.
- Nunberg, T. D. 1951. Contribution to the knowledge of prothoracic glands of Scolytidae and Platypodidae (Coleoptera) . *Ann. Mus. Zool. Pol.* 14. 261-265.
- Orozco-Cárdenas, ML; Narvez-Vsquez, J; Ryan, CA. 2001. Hydrogen Peroxide Acts as a Second Messenger for the Induction of Defense Genes in Tomato Plants in Response to Wounding, Systemin, and Methyl Jasmonate. *The Plant Cell* 13:179-191.
- Osada V. H.K. y G. Mora A. 1997. 2 Log. Un sistema logarítmico computarizado para la elaboración d escalas y diagramas de intensidad de enfermedad. Colegio de Postgraduados. Montecillo Mex. 7 p.
- Parker, JE; Coleman, M. 1997. Molecular intimacy between proteins specifying plant-pathogen recognition. *Trends in Biochemical Science* 22:291-296.
- Paxton, J D. 1981. Phytoalexins : a working redefenition. *Phytopathology* Z.101:106-109.
- Raff, M.1998. Cell suicide for beginners. *Nature* 396:119-122.
- Riva, R. e I. Gonzales. 1997. Tecnología del cultivo del camu camu *Myrciaria dubia HBK*, en la Amazonía Peruana. Convenio INIA-CTAR Ucayali, 45 p.

- Robinson R. A. 1996. Retorno a la resistencia. Fitomejoramiento de los cultivos para reducir la dependencia de plaguicidas. International development research center. Ottawa. Canadá. 240 p.
- Romero C. S., 1994. Hongos fitopatogenos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo Edo. México. 347 p.
- Rotem, J. 1988. The genus *Alternaria* biology, epidemiology and pathogenicity. APS Press St. Paul, Minnesota, USA. 326 p.
- Ryals, J.A; Neuenschwander, U H ; Willits, M G ; Molina , A ; Steiner, H-Y; Hunt,MD. 1996. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8:1009-1819.
- Samuels GJ *et al.* 2001. Perithecial species of *Fusarium*. eds. APS Press, St. Paul. pp. 122-137.
- Schneider, I., and Rudinsky, J. A. 1969. Anatomical and histological changes in internal organs of adult *Trypodendron lineatum*, *Gnathotrichum retusus*, and *G. sulcatus* (Coleoptera: Scolytidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 62.(5): 995-1003.
- Seifert K. 2001. *Fusarium* and anamorph generic concepts. APS Press. St. Paul, Minnesota. pp. 15 – 28.
- Sepúlveda-Jiménez G., Rueda-Benítez P., Porta H., Rocha-Sosa M. 2004. A red beet (*Beta vulgaris*) UDP-glucosyltransferase gene induced by wounding, bacterial infiltration and oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 56, No. 412.
- Shafer, E. C. 1999. Producción y Comercialización de Nuez pecanera en México y los Estados Unidos. Séptimo Simposium Internacional Nogalero. Memorias ITESM. Torreón, Coahuila. 60 p.
- Skalamera, D; Jibodh, S; Heath, MC. 1997. Callose deposition during the interaction between cowpea (*Vigna unguiculata*) and the monokaryotic stage of the cowpea rust fungus (*Uromyces vignae*). *New Phytologist* 136:511-524.

- Summerell B.A., J.F. Leslie, D. Backhouse, W.L. L.W. Bryden y Burgess. 2001. Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium. 1st Ed. APS Press. Saint Paul, Minnesota.
- Sutton, B. C. 1980. The Coellomycetes. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 696 pp.
- Takken, FLW; Joosten, M.H.. 2000. Plant resistance genes: their structure, function and evolution. European Journal of Plant Pathology 106: 699-713.
- Ulloa, M. 1991. Diccionario ilustrado de micología. Primera edición. UNAM. México, DF. 309 p.
- Umezurike, G.M. 1969. Cellulolytic Activities of *Botryodiplodia theobromae* Pat. Annals of Botany, 33: 451-462
- Vantten , H D ; Sanock , R.W; Wasmann , C C; Soby, S D ;Van Loon, LC; Van Kammen, RT. 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var "Samsun NN". Changes in proteins constitution after infection with tobacco mosaic virus. Virology 40:199-211.
- Vand der Plank, JE. 1968. Disease resistance in plants. New York, Academic Press. 206 p
- Weber, B. C., and McPherson, J. E. 1984. The ambrosia fungus of *Xylosandrus germanus* (Coleoptera: Scolytidae). Can. Entomol. 116: 281-283.
- Webster J. 1980. Introduction to fungi second edition. Cambridge University Press Cambridge Great Britain. 669 p.
- Whitney, H.S. 1982. Relationships between bark beetle and symbiotic organisms. In bark beetle in North American Conifers. University of Texas Press, Austin. P. 183-211.
- Wood, L., S. 1982. Bark and ambrosia beetles of north and central america (Coleoptera: Scolytidae), a taxonomic monograph, Great Basin Naturalistic. 1359 p.

Wood, L., S. 1992. Revision of the genera of Platypodidae (Coleoptera). *Great Basin Naturalistic*. 53 (3): 259-281.

Zamudio, G.,V. 1981. Organización de los núcleos humanos en la producción nogalera condición esencial para el mejor aprovechamiento de los recursos técnicos. *Memorias del ciclo de conferencias internacionales sobre el cultivo del nogal*. Confederación Nacional de Agricultores. Norte de Coahuila, México. p. 14-17.