



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

---

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

## **BÚSQUEDA DE AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO EN MUÉRDAGO DEL GÉNERO *ARCEUTHOBium***

**SERGIO HERNÁNDEZ PABLO**

**T E S I S**  
**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**

**2015**

La presente tesis titulada: **BÚSQUEDA DE AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO EN MUÉRDAGO DEL GÉNERO *ARCEUTHOBium*** realizada por el alumno: **SERGIO HERNÁNDEZ PABLO**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS  
FITOPATOLOGÍA**

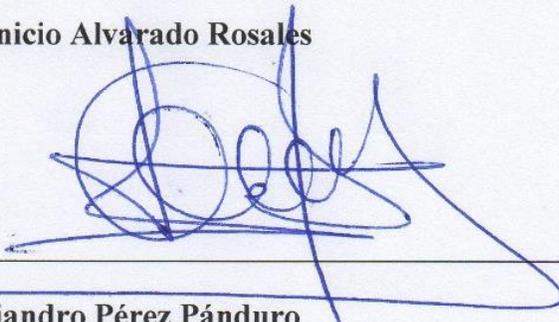
**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO



**Dr. Dionicio Alvarado Rosales**

ASESOR



**Dr. Alejandro Pérez Pánduro**

ASESOR



**MC. Victoria Ayala Escobar**

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Mayo 2015

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darme la oportunidad de realizar un sueño más en mi vida profesional y por darme la sabiduría necesaria para cumplir con esta meta.

Al Colegio de Postgraduados por ofrecerme todos los recursos y herramientas que me facilitaron la realización de mis estudios.

Al Fideicomiso Revocable de Administración 2013 No. 167304 del Colegio de Postgraduados, por el apoyo económico otorgado para llevar a cabo este proyecto.

Al personal administrativo y docentes del colegio por la oportunidad y el gran apoyo que me brindaron dentro y fuera de las aulas para concluir este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de postgrado.

A mi consejo particular, ofrecer mi admiración y gratitud por su aportación educativa, por su valioso tiempo y gran apoyo, para la elaboración de mi tesis.

Al Dr. Dionicio Alvarado Rosales, por compartir sus conocimientos, por su amistad y gran calidad humana. Por su gran dirección que permitió la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Alejandro Pérez Panduro por su colaboración en la realización de la tesis, con su acertada orientación, apoyo y aportación para realizar esta tesis.

A la M.C. Victoria Ayala Escobar, por su gran apoyo y orientación acertada para llevar a cabo este trabajo.

Al M.C. Luis Emilio Castillo Márquez por su contribución y apoyo en la parte estadística.

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a mis familiares que siempre han estado conmigo en las buenas y malas, por su apoyo incondicional y que creyeron en mí.

A mi tía María Asunción por su cariño y apoyo en todo momento.

A Valentina Moguel Hernández, por ser la niña de mis sueños, mi inspiración y por llenarme de alegría.

A mis hermanas Nereyda, Lourdes y Betzaida, por el cariño que me han brindado siempre.

A mis abuelos Efraín y Margarita, por todo el amor, cariño y comprensión que me han dado.

A la familia Altunar Cruz por el apoyo que me han brindado y son parte de mi familia.

A la familia García Altunar, Altunar Sánchez y Cruz Álvarez, por todo el apoyo y amistad que me han brindado.

A mi Profesor-Investigador Dionicio Alvarado Rosales, gracias por su amistad incondicional que me brindo y por su orientación que me proporciono, gracias.

## CONTENIDO

RESUMEN GENERAL.....	1
SUMMARY .....	2
1. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	3
2. OBJETIVOS .....	4
3. REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
3.1. Los muérdagos .....	4
3.2. Importancia mundial y en México .....	5
3.3. Descripción y biología de la planta parásita .....	6
4. LITERATURA CITADA .....	8
CAPÍTULO I. ....	11
MICROORGANISMOS ASOCIADOS A MUÉRDAGOS ENANOS DEL GÉNERO <i>ARCEUTHOBIMUM</i> SPP. (SANTALALES, VISCACEAE) EN LA CUENCA DEL VALLE DE MÉXICO.....	11
RESUMEN .....	11
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUCCIÓN .....	13
2. REVISIÓN DE LITERATURA .....	13
2.1. Organismos asociados a muérdagos enanos ( <i>Arceuthobium</i> spp) .....	13
2.1.1. Insectos .....	13
2.1.2. Hongos .....	14
2.2. Técnicas moleculares.....	15
2.2.1 Extracción de ADN.....	16
2.2.2. PCR.....	16
3. OBJETIVO .....	17
4.1. Área de estudio .....	17
4.2. Muérdagos muestreados.....	18
4.3. Descripción de las áreas de muestreo .....	18
4.3.1. Sierra de Río Frío.....	18

4.3.2. Sierra de Pachuca.....	19
4.3.3. Sierra de las Cruces.....	19
4.3.4. Sierra de Chichinautzin.....	20
4.4. Escala de daño.....	20
4.5. Fase de campo.....	21
4.5.1. Fase de laboratorio.....	23
4.5.2. Caracterización de colores.....	24
4.5.3. Identificación morfológica.....	24
4.5.4. Extracción de DNA.....	25
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
5.4.1. Por localidad.....	32
6. CONCLUSIONES.....	36
7. LITERATURA CITADA.....	37
CAPÍTULO II.....	43
PRUEBAS DE PATOGENICIDAD CON HONGOS AISLADOS DE MUÉRDAGO ENANO <i>ARCEUTHOBIUM</i> SPP. (SANTALALES, VISCACEAE), PRESENTES EN LOS BOSQUES DE CONÍFERAS DE LA CUENCA DEL VALLE DE MÉXICO.....	43
RESUMEN.....	43
ABSTRACT.....	44
1. INTRODUCCIÓN.....	45
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	46
2.1. Control biológico.....	46
2.3. Ventajas, desventajas, riesgos y beneficios del control biológico.....	46
2.3.1. Ventajas.....	46
2.3.2. Desventajas.....	46
2.3.3. Riesgos.....	47
2.3.4. Beneficios.....	47
2.4. Método de infección de hongos usados como bioplaguicidas.....	48
2.5. Limitantes de los bioplaguicidas.....	49
2.6. Control biológico de malezas.....	49

2.7. Control biológico en áreas naturales.....	54
2.7. Estrategias de control para muérdagos enanos .....	57
2.7.1. Prevención.....	57
2.7.2. Control silvícola.....	58
2.7.3. Control genético.....	59
2.7.4. Control biológico .....	59
2.7.4.1. Hongos .....	59
2.7.4.2. Insectos .....	61
2.8. Control químico .....	61
3. OBJETIVO .....	63
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
4.1. FASE DE LABORATORIO.....	63
4.1.1. Conservación de muérdagos para los ensayos de patogenicidad.....	63
4.1.2. Inoculación de plantas de muérdago.....	63
4.1.3. Análisis de datos en la conservación de las plantas y frutos de muérdago.....	64
4.1.4. Análisis de datos para la severidad de las diferentes concentraciones de conidios de <i>Alternaria</i> spp; <i>Phoma</i> spp; <i>Fusarium</i> spp.y pruebas de campo .....	64
4.2. Fase de campo.....	66
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	67
5.1. Conservación de brotes de muérdago y frutos.....	67
5.1.1. Prueba exacta de Fisher's para el análisis “in vitro” de conservación de ramas y frutos de <i>A. globosum</i> subsp. <i>grandicaule</i> .....	69
5.1.2 Inoculación en plantas de muérdago.....	71
5.2. Análisis estadístico “in vitro” de la severidad bajo diferentes concentraciones de conidios de <i>Alternaria</i> spp, <i>Phoma</i> spp y <i>Fusarium</i> spp. ....	72
5.2.1. Primer análisis entre concentraciones.....	72
5.2.2. Análisis estadístico en pruebas”in vitro” para definir la mejor cepa dentro de cada concentración .....	72
5.2.2.1. Concentraciones de $2 \times 10^4$ conidios/mL.....	72
5.2.2.2. Concentraciones de $1 \times 10^5$ conidios/mL.....	74

5.3. Resultados de los ensayos de campo .....	75
5.3.1. Análisis estadístico de las inoculaciones de campo .....	77
6. CONCLUSIONES .....	81
7. RECOMENDACIÓN .....	81
8. LITERATURA CITADA .....	82

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rodal infectado por plantas parásitas. ....	4
Figura 2. Daños causados por muérdagos en el Parque Nacional Zoquiapan. ....	6
Figura 3. Frutos de <i>Arceuthobium vaginatum</i> subsp. <i>vaginatum</i> .....	7
Figura 4. Localidades de la cuenca del Valle de México donde se llevaron a cabo las colectas de <i>A. vaginatum</i> subsp. <i>vaginatum</i> , <i>A. globosum</i> subsp. <i>globosum</i> y <i>A. abietis-religiosae</i> . ....	18
Figura 5. Escala de 6 clases de Hawksworth para evaluar la severidad del daño por <i>Arceuthobium</i> en los rodales muestreados.....	21
Figura 6. Síntomas que se observaron en los muérdagos en campo. A-B) Marchitez y necrosis en <i>Arceuthobium abietis-religiosae</i> , C-D) Marchitez y necrosis en <i>A. vaginatum</i> subsp. <i>vaginatum</i> , E-F) Marchitez y necrosis en <i>A. globosum</i> subsp. <i>grandicaule</i> , G-H) Inicio de daño en frutos de <i>A. globosum</i> subsp. <i>grandicaule</i> y <i>A. vaginatum</i> subsp. <i>vaginatum</i> . ....	23
Figura 7. A-B) Muestras de tejido con síntomas de marchitez y necrosis procesados, C-D) Necrosis e inicio de daños en frutos procesados, E) Siembra de tejido en medio PDA y F-G) Crecimiento después de 24 a 48 horas. ....	24
Figura 8. Extracción de DNA y muestras mandadas a secuenciar a MAGROGEN.....	25
Figura 9. Colores de las cepas que se obtuvieron de los síntomas de marchitez y necrosis de las muestras de muérdago enano: A) Gris oscuro; B) Rojo; C) Negro olivo, D) Rosa, E) Rojo amarillento, F) Rojo, G) Amarillo, H) Blanco, I) Olivo, J) Rosa, K) Negro, L-M) Blanco; N) verde brillante y O) Negro grisáceo.....	26
Figura 10. A) Conidios en cadena de <i>Alternaria alternata</i> , B) Conidios de <i>Epicoccum nigrum</i> , C) Picnidio de <i>Phoma glomerata</i> , D) Macroconidios de <i>Fusarium solani</i> , E) Conidióforo y conidios de <i>Aspergillus flavus</i> y F) Conidios de <i>Aspergillus niger</i> , G) Ascosporas de <i>Chaetomiium funicola</i> , H) Conidios de <i>Trichoderma viride</i> , I) Conidios de <i>Cladosporium cladosporioides</i> , J) Conidios de <i>Pestalotiopsis maculiformans</i> , K) Conidios de <i>Trichotecium roseum</i> y F) Masa de conidios de <i>Acremonium</i> sp.....	30
Figura 11. A-B) Conservación de ramas y frutos en hidrogel, agua y agar (1g/L), leche de coco y agua destilada estéril. ....	63

Figura 12. A) Aplicación de tratamientos, B) Tratamientos en bolsas, C) Temperatura y humedad que se alcanzaron en las bolsas, D) Síntomas observados en los tratamientos, desde marchitez hasta necrosis, E) Testigo y F) Re-aislado. ....	65
Figura 13. Escala de calificación de la enfermedad en plantas parásitas inoculadas con hongos. A) 0= sano, B) Escala 1= 1-25% (10% M), C) Escala 2= 26-50% (30-35% M), D) Escala 3= 51-75% (75% M) y E) Escala 4=76-100% (100% M). M= Muerto. ....	65
Figura 14. A) Distancia de 50 m entre árboles, B-C) marcado con listón y colores a los muérdagos de los diferentes tratamientos, D) transporte de los tratamientos en hielera con hielo, E) aplicación de hipoclorito de sodio al 3% durante tres minutos y F) aplicación de tratamiento con adherente 1.5mL en un litro de agua. ....	67
Figura 15. A) Tratamientos empleados para la conservación de brotes y frutos de <i>A. globosum</i> subsp. <i>grandicaule</i> . A) Hidrogel, B) Leche de coco, C) Agua destilada estéril, D) Agua y Agar (1g/L), E) Muérdago desprendido en agua destilada estéril y F) Frutos en agua destilada estéril. ....	68
Figura 16. A-F) Síntomas de marchitez y necrosis causado por <i>Fusarium solani</i> (CP-Avv-3)..	76
Figura 17. A) Necrosis causado por la cepa de <i>Alternaria alternata</i> (CP-Agg-17), B-C) Sin síntoma en aplicaciones de <i>Phoma glomerata</i> (NT-Agg-17), D) Testigo sin síntomas y E-F) Re-aislado de las muestras de campo. ....	77
Figura 18. A) Microconidios, macroconidios y conidióforos (Booth, 1971); B) Microconidioforos (Monofiálides) (Nelson <i>et al</i> ; 1927); C-D) Cepa de <i>F. solani</i> . E-F) Molifiálides produciendo microconidios; G-H) Macroconidióforos (Monofiálides) y macroconidios (1000X). ....	78
Figura 19. A) <i>Alternaria alternata</i> : Conidios y conidióforos (Simmons, 2007), B) Cepa de <i>A. alternata</i> , C) Conidios en cadena de <i>A. alternata</i> (100X), D-E) Conidios de <i>A. alternata</i> (400X). ....	78

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Muestreo realizado en diferentes partes de la cuenca del Valle de México y síntomas observados en campo. ....	22
Cuadro 2. Identificación morfológica y molecular de hongos aislados en los muérdagos del género <i>Arceuthobium</i> y comparados con la base del NCBI. ....	31
Cuadro 3. Número de aislamientos obtenidos en los sitios de muestreo. ....	32
Cuadro 4. Severidad del daño por muérdago observado en los bosques muestreados. ....	33
Cuadro 5. Frecuencia de aislamientos en las especies de muérdagos enanos con síntomas de marchitez y necrosis colectados en las áreas boscosas. ....	34
Cuadro 6. Nivel de severidad de la infección de muérdagos enanos encontrados en las áreas boscosas muestreados. ....	35
Cuadro 7. Lista de los agentes bioherbicidas registrados y no registrados o en fase de mejoramiento. ....	51
Cuadro 8. Ejemplos de agentes de control biológico con <i>Colletotrichum</i> spp., adaptado de Butt, 2000.....	55
Cuadro 9. Ejemplos de agentes que causan daños forestales, enfermedad que producen y agentes de control biológico. ....	56
Cuadro 10. Número de plantas conservadas en forma “in vitro” del muérdago enano <i>A. globosum</i> subsp. <i>grandicaule</i> . ....	68
Cuadro 11. Número de frutos conservados “in vitro” por cada tratamiento del muérdago <i>A. globosum</i> subsp. <i>grandicaule</i> .....	68
Cuadro 12. Prueba exacta de Fisher's para establecer el mejor tratamiento “in vitro” para la conservación de las plantas de muérdago. ....	69
Cuadro 13. Prueba exacta de Fisher's para establecer el mejor tratamiento “in vitro” para la conservación de frutos de muérdago.....	70
Cuadro 14. Re-aislado de los hongos que se aplicaron en forma”in vitro”. ....	71
Cuadro 15. Análisis estadístico entre concentraciones de conidios para determinar la mejor cantidad a aplicarse en campo.....	72

Cuadro 16. Comparación múltiple de medias de los rangos de los tratamientos aplicados para determinar el mejor género de hongo inoculado.....	73
Cuadro 17. Comparación múltiple de medias para determinar la mejor cepa de <i>Fusarium</i> spp. .	73
Cuadro 18. Comparación múltiple de medias para determinar la mejor cepa de <i>Alternaria</i> spp.	73
Cuadro 19. Comparación múltiple de medias para determinar la mejor cepa de <i>Phoma</i> spp. ....	74
Cuadro 20. Comparación múltiple de medias para determinar el mejor tratamiento. ....	74
Cuadro 21. Comparación múltiple de medias para determinar la mejor cepa de <i>Alternaria</i> spp.	74
Cuadro 22. Comparación múltiple de medias para determinar la mejor cepa de <i>Phoma</i> spp. ....	75
Cuadro 23. Comparación múltiple de medias de <i>Fusarium</i> spp. para determinar la mejor cepa.	75
Cuadro 24. Hongos re-aislados de las plantas de muérdago con síntomas de marchitez y necrosis de los ensayos de campo. ....	76
Cuadro 27. Comparación múltiple de medias de los hongos inoculados en campo, para determinar el mejor tratamiento que causó más enfermedad. ....	77

# BÚSQUEDA DE AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO EN MUÉRDAGO DEL GÉNERO *ARCEUTHOBIMUM*

Sergio Hernández Pablo, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015.

## RESUMEN GENERAL

Para conservar los bosques de México es necesario atender los problemas fitosanitarios que provocan la destrucción de los mismos. Uno de tantos problemas que existen en los bosques, es la enfermedad provocada por los muérdagos enanos. Los objetivos planteados en este trabajo fue la identificación de organismos asociados al muérdago enano en áreas boscosas de la cuenca del Valle de México y evaluar los organismos encontrados en asociación con el mismo, en laboratorio y campo. En el transcurso del trabajo de campo y laboratorio, únicamente se encontraron hongos asociados, provocando síntomas de marchitez, necrosis en tallos y frutos del muérdago (*Arceuthobium globosum* subsp. *grandicaule*, *A. vaginatum* subsp. *vaginatum* y *A. abietis-religiosae*). Los hongos aislados fueron identificados morfológicamente y molecularmente. Las pruebas de patogenicidad se realizaron “in vitro” con concentraciones de  $2 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  conidios/mL de *Alternaria* spp; *Fusarium* spp y *Phoma* spp. Se estableció una escala para la evaluación de los daños y los datos se analizaron con el paquete office SAS. Las cepas que resultaron ser mejores en la pruebas de patogenicidad “in vitro”, fueron llevados a campo y las concentraciones evaluadas fueron de  $1 \times 10^5$  conidios/mL de *Alternaria* spp; y  $1 \times 10^6$  conidios/mL de *Phoma* spp. y *Fusarium* spp. El mejor tratamiento de hongos inoculados en campo fue con *Fusarium solani* al presentar la mejor media, con respecto a *Alternaria alternata*, *Phoma glomerata* y el testigo.

**Palabras clave:** bosques, muérdagos enanos, hongos asociados, patogenicidad.

**BIOLOGICAL AGENTS SEARCH CONTROL IN GENDER MISTETLOE**  
***ARCEUTHOBIUM***

**Sergio Hernández Pablo, M.Sc.**  
**Colegio de Postgraduados, 2015.**

**SUMMARY**

To preserve the Mexican forests is necessary to attend the phytosanitary problems causing their destruction. One of many problems in the forest, is the disease caused by the dwarf mistletoes. The main objective of this work was to identify dwarf mistletoe agents causing its declining or mortality in the wooded areas of the Mexican Valley then to evaluate “in vitro” and field the organisms found in close association. The fungi found, causing symptoms of wilting, necrosis on stems and fruits on *Arceuthobium globosum* subsp. *grandicaule*, *A. vaginatum* subsp. *vaginatum* y *A. abietis-religiosae*. The isolated fungi were identified morphologically and molecularly. Pathogenicity tests were carried out “in vitro” by using concentrations of  $2 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  conidia/mL. A scale was established for the assessment of damages and the data were analyzed with office SAS package. The strains found to be better “in vitro” pathogenicity tests were carried to the forest to be inoculated on dwarf mistletoes (*Arceuthobium*), the spore fungi and concentrations used were  $1 \times 10^5$  conidia/mL for *Alternaria* spp.  $1 \times 10^6$  conidia/mL for *Phoma* spp; and *Fusarium* spp. The best treatment of fungus inoculated with the filed was *Fusarium solani* to present the best average with respect to *Alternaria alternata*, *Phoma glomerata* and control.

**Keywords:** forests, dwarf mistletoes, fungi associated pathogenicity.

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

México es reconocido como el cuarto país en el mundo por su gran biodiversidad, tanto de especies, como de comunidades vegetales y esta riqueza constituye un patrimonio nacional dado su capacidad para generar beneficios de tipo ecológico, social y económico. Los bosques templados de pino-encino, conforman el principal tipo de vegetación en las áreas de clima templado y semihúmedo del país, se encuentran desde el nivel del mar hasta más de 3000 m de altitud (Sarukhán *et al.*, 2009, y García *et al.*, 2006).

A pesar de su importancia ecológica y económica, poco se conoce de los daños causados por las plagas y enfermedades que se presentan en los bosques de coníferas (Méndez y Campos, 1997). Las enfermedades son componentes dinámicos y naturales de los bosques, sin embargo, bajo ciertas condiciones pueden afectarlos negativamente, disminuyendo sus tasas de crecimiento y de supervivencia, la calidad y rendimiento de madera, del hábitat silvestre y el valor recreativo, escénico y cultural de los bosques (FAO, 2007). Las preocupaciones acerca de las consecuencias de las enfermedades forestales únicamente surgen cuando el hombre comienza a invertir en el desarrollo de los montes al ver seriamente las influencias negativas (FAO, 1965).

Los bosques de coníferas y latifoliadas de México, padecen diversos grados de alteraciones por los factores abióticos y bióticos, entre los cuales se encuentran las plantas parásitas (Figura 1); un importante agente causal de enfermedad en los bosques templados, que se conocen comúnmente como muérdago enano (*Arceuthobium* spp.) (Hawksworth y Wiens, 1996). Al menos 19 pinos mexicanos son conocidos por ser atacados por muérdago enano, y de las nueve secciones de *Pinus* en México, al menos siete están parasitadas (Martínez, 1948). Desafortunadamente poco se ha podido hacer para mitigar su impacto. Considerando las ventajas que ofrece el control biológico, este estudio tuvo como objetivos los siguientes:



Figura 1. Rodal infectado por plantas parásitas.

## 2. OBJETIVOS

General.

Buscar agentes patogénicos para disminuir las poblaciones del muérdago enano (*Arceuthobium* spp.).

Particulares.

- Identificar a los organismos que se encuentren asociados al muérdago enano (*Arceuthobium* spp).
- Evaluar los organismos encontrados en asociación con el muérdago enano en forma “in vitro” y campo.

## 3. REVISIÓN DE LITERATURA

### 3.1. Los muérdagos

Dos de las principales familias de muérdago son Loranthaceae y Viscaceae. La Viscaceae se encuentra en las zonas tropicales y templadas del hemisferio norte, y la familia Loranthaceae generalmente es de clima tropical. Los géneros de mayor importancia en los bosques de América del Norte son *Arceuthobium*, *Phoradendron* y *Psittacanthus* (Geils *et al.*, 2002). En México se encuentran con mayor frecuencia los del género *Arceuthobium* (Viscaceae), conocidos comúnmente como muérdagos enanos (Queijeiro *et al.*, 2011), el cual comprende 42 especies y 21 especies son parásitos de *Pinus*, *Abies* y *Pseudotsuga* (Cibrián *et al.*, 2007).

### 3.2. Importancia mundial y en México

El mayor número de especies del género *Arceuthobium* se distribuyen en América, desde los Estados Unidos hasta Centro América (Hawksworth *et al.*, 2002). Se ha considerado uno de los patógenos más serios de las coníferas; ataca especies de *Pinus*, *Abies* y *Pseudotsuga*, resultando más afectado el primero (Hawksworth, 1980).

Los muérdagos ocupan el segundo lugar como agentes biológicos de perturbación en el bosque de clima templado. Estudios realizados sobre plantas parásitas indican la presencia de 10 géneros y 151 especies de muérdagos distribuidos en todo el país; como parásitos de coníferas están reportados cuatro géneros: *Arceuthobium* (muérdago enano) y *Phoradendron*, *Struthanthus* y *Psittacanthus* como muérdagos verdaderos (Vázquez *et al.*, 2006).

En México la superficie afectada por el muérdago rebasa un millón de hectáreas, con pérdidas económicas totales de 136 millones de nuevos pesos (Bonilla *et al.*, 1988).

Hawksworth y Wiens, en 1965 llevaron a cabo un estudio acerca de *Arceuthobium* en México, describiendo las especies en las entidades del norte del país y en 1972 demostraron que en México existen varias especies de “muérdago enano”.

Los muérdagos alteran la fisiología y morfología de su hospedero; pueden retardar el crecimiento y deformar o matar árboles de cualquier edad (Figura 2), el crecimiento de los árboles puede disminuir desde un 50 hasta un 80%, la calidad de la madera disminuye por los grandes y numerosos nudos y debido a la madera esponjosa y el veteado anormal (Geils *et al.*, 2002), causa debilitamiento de los árboles, los que son presa de insectos y otros microorganismos, y disminuyen considerablemente la producción de semillas fértiles en los árboles atacados, llegando a nulificarlos totalmente (Vega 1976, Verduzco 1976).

Vázquez en 1993, menciona que de 720 estudios dasonómicos y de manejo integral, se cuantificó que 67% del arbolado que existe en pie, estuvo libre de cualquier tipo de daño; en tanto que, en el restante se observan diferentes causas de afectación, entre las que sobresale la presencia de plantas parásitas, en 16% de la superficie arbolada. Como resultado de este último factor, se pierde un volumen promedio anual de 1.04 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>, lo que corresponde a una reducción nacional de 1.7 millones de m<sup>3</sup> de madera en rollo por año, sin considerar el volumen del arbolado muerto.

Gutiérrez en 1970, menciona los efectos del parasitismo de “muérdago enano” (*Arceuthobium* sp.), sobre el desarrollo en grosor de *Pinus montezumae* y *P. hartwegii* en el cerro Telapón, Edo.

de México; reporta que hay una disminución significativa en el incremento en diámetro de *P. hartwegii*, con una confiabilidad de 5%.

Por su parte, Andrade (1981), menciona que el efecto negativo es más evidente en altura que en diámetro del muérdago enano (*A. globosum* y *A. vaginatum*) en rodales de *P. hartwegii*, y Uribe en (1985) efectuó un estudio del efecto del muérdago enano (*Arceuthobium* spp.) sobre el crecimiento e incremento de árboles jóvenes de *P. hartwegii*, encontrando que el muérdago enano incrementa el tiempo de paso, al reducir la amplitud de los últimos anillos de crecimiento, el diámetro, la altura y el volumen.

Los muérdagos enanos son de inmensa importancia económica, ya que son el único patógeno más destructivo de árboles comercialmente maderables y valiosos de coníferas en varias regiones de México, Canadá occidental, oeste de Estados Unidos y partes de Asia (Bakshi y Puri, 1971; Hawksworth y Shaw, 1984; Zakaullah, 1977).



Figura 2. Daños causados por muérdagos en el Parque Nacional

### 3.3. Descripción y biología de la planta parásita

El género *Arceuthobium* (Viscaceae) es un grupo bien definido dentro de los muérdagos, generalmente menor de 20 cm de altura y de diferentes colores (amarillo, marrón, negro o rojo). Algunas de las características que lo hacen único entre los muérdagos son: plantas con brotes florales pequeñas, desarrolla un mecanismo explosivo de dispersión de las semillas y sus frutos son bicolors (Figura 3).

El muérdago enano se dispersa mediante la contracción hidrostática que impulsa una sola semilla madura. A diferencia de otros muérdagos que son principalmente dispersados por aves que consumen frutos maduros; los muérdagos enanos dependen casi exclusivamente de este mecanismo balístico (Geils *et al.*, 2002). Este sistema explosivo permite a la semilla viajar hasta distancias máximas de 17 m (Cibrián *et al.*, 2007). La excepción es *Arceuthobium verticilliflorum*, que se encuentra ampliamente en bosques de pinos en México (Geils *et al.*, 2002). El ciclo de germinación hasta la producción de semillas es de 4 a 6 años y la maduración de la semilla varía de 12 a 18 meses (Nájera *et al.*, 1985; Hernández *et al.*, 1992 citado por Vazquez y colaboradores (2006). La fructificación y dispersión de la semilla se presenta durante el verano y otoño, en los meses de julio a noviembre (Escudero y Cibrián, 1985).

Todos los muérdagos enanos, en su mayoría, su ciclo biológico es muy parecido, desde la emergencia de la planta hasta la generación de frutos pueden pasar seis años, pero el sistema endófito puede vivir por varios años (Cibrián *et al.*, 2007). El ciclo de vida del muérdago enano se divide básicamente en cuatro fases, que son: dispersión, que es la expulsión de tipo balístico de las semillas; establecimiento, que comprende desde la llegada de la semilla al hospedero hasta la germinación; incubación, que es cuando se desarrolla el sistema endofítico; y reproducción, que se inicia con la formación de tallos aéreos con flores (Hawksworth *et al.*, 2002, Mathiasen *et al.*, 2008).



Figura 3. Frutos de *Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum*.

La supervivencia y fecundidad de los muérdagos enanos son afectadas por el clima, sobre todo por la temperatura y la humedad (Hawksworth y Wiens, 1996), en tanto que su incidencia lo es

por la altitud y la pendiente del terreno (Queijeiro- Bolaños, 2007), ya que se encuentran más comúnmente en lugares con pendientes moderadas (de menos de 10%) que en aquellas pronunciadas (Hawksworth y Wiens, 1996), sin embargo, esto varía según el sitio.

#### 4. LITERATURA CITADA

- Andrade E., V. 1981.** Evaluación de efectos de muérdago enano (*Arceuthobium globosum* Hank y Wiens, y *A. vaginatum* Willd) en rodales de *Pinus hartwegii* Lind. Tesis UACH. Chapingo México. 88 p.
- Bakshi B., K. and N. Y. Puri. 1971.** Dwarf mistletoe on blue pine in the western Himalayas and its control. *Indian Forester*. 97: 547–552.
- Bonilla B., R. y Borja L. G. 1988.** Situación de la sanidad forestal en México. Desarrollo y perspectivas. En: IV Simposio Nacional de Parasitología Forestal. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Sociedad Mexicana de Entomología. DGSPAFSARH. México. 556 p.
- Cibrián D., Alvarado D. y García D. S. 2007.** Enfermedades forestales en México. Universidad Autónoma Chapingo. División de ciencias forestales. México. Pp. 354-395.
- Escudero M., M. y Cibrián T. D. 1985.** Determinación del periodo de dispersión de *Arceuthobium globosum grandicaule* en la región central de México. Memorias del III Simposio Nacional sobre Parasitología Forestal. Saltillo, Coah. México. pp. 342-351.
- FAO / IUFRO. 1965.** Sobre enfermedades e insectos forestales. *In* Revista de silvicultura y productos forestales Vol. 19 (3). : <http://www.fao.org/docrep/24847S/24847s0b.htm>
- Food and Agricultura Organization of the United Nations (FAO). 2007.** La Sanidad Forestal. Forest Health. Consultado en <http://www.fao.org/forestry/12297-03d1e1fe3f3b5825f2312a1f4266296c5.pdf> el 15 de marzo 2015.
- García D., S. E., Campos B. R. y Méndez M. J. T. 2006.** Curso – Taller Plagas y Enfermedades Forestales en el Estado de Durango. Guía para su reconocimiento y manejo. Durango. 98 p.
- Geils B., W. Cibrián T. J. and Moody B. 2002.** Mistletoes of North American Conifers. Gen. Tech. Rep. RMRS–GTR–98. Ogden, UT: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. 123 Pp.

- Gutiérrez R., M. 1970.** Efectos del parasitismo del muérdago (*Arceuthobium* spp.) sobre el desarrollo en grosor del fuste de *Pinus montezumae* Lamb. y *Pinus hartwegii* Lind. en el cerro Telapón, Estado de México. INIF (México). Boletín técnico No. 34, 22 p.
- Hawksworth F., G. and D. Wiens. 1965.** *Arceuthobium* in Mexico. Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station, Forest Service, USDA. Brittonia, Vol. 17, No. 3. USA, 237 p.
- Hawksworth F., G., 1980.** Los muérdagos enanos (*Arceuthobium*), y su importancia en la silvicultura de México. *In: 1º Simposium Nacional sobre Parasitología Forestal.* Sociedad Mexicana de Entomología. 207p.
- Hawksworth F., G. and Shaw C. G. III. 1984.** Damage and loss caused by dwarf mistletoes in coniferous forests of western North America. *In: Wood, R.K.S.; Jellis, G.J., eds. Plant diseases: Infection, damage and loss.* Oxford: Blackwell Scientific Publications: 285–297.
- Hawksworth F., G. and D. Wiens. 1996.** Dwarf mistletoes: Biology, pathology and systematics. Agriculture Handbook 709. United States Department of Agriculture, Forest Service. Washington, D.C. 410 p.
- Hawksworth F., G. and W. B. Geils. 1996.** Biotic associates. *In: Hawksworth, F. G. and Wiens, D. 1996. Dwarf mistletoes: Biology, pathology and systematics. Agriculture Handbook 709. United States Department of Agriculture, Forest Service. Washington, DC. U.S. Department of Agriculture, Forest Service: 73-89.*
- Hawksworth F., G. Wiens, D. and W. B. Geils. 2002.** *Arceuthobium* in North América. *In: Geils, B. W., J. Cibrián T. and B. Moody (Eds.). Mistletoes of North American conifers. Technical report general RMRS-GTR-98. United States Department of Agriculture, Forest Service. Fort Collins. 29-56 pp.*
- Hernández C., L. V. Acosta P., R. y Galindo F. G. L. 1992.** Los muérdagos enanos (*Arceuthobium* spp.) en los bosques de pino del Volcán la Malintzi, Estados de Tlaxcala y Puebla. Boletín 15. Tizatlán, Tlaxcala, México: Jardín Botánico Tizatlán. 58 p.
- Martínez M. 1948.** Los pinos mexicanos. 2da Ed. Ciudad de México. 361 pp.
- Mathiasen R., L. Nickrent D. L., Shaw D. C. and D. M. Watson. 2008.** Mistletoes. Pathology, systematics, ecology and management. *Plant Dis.* 92: 988-1006.
- Méndez M., J. T. y Campos B. R. 1997.** Las Plagas y Enfermedades en los Bosques de Noroeste del Estado de Durango. *Revista Chapingo, Serie: Ciencias Forestales. Vol III No. 1 UACH. México. P. 67.*

- Nájera M., F. González G. y Cibrián T. J. 1985.** Los muérdagos en el estado de Durango, México. In Memorias de Simposios Nacionales de Parasitología Forestal II y III. Publ. No. 46. S. A. R. H. México, D.F. pp. 592-603.
- Queijeiro B., M. E. 2007.** Interacciones entre dos especies de muérdago enano (*Arceuthobium* spp.) y *Pinus hartwegii* en el Parque Nacional Zoquiapan, Estado de México: el papel del disturbio. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 50 pp.
- Sarukhán J., Koleff P., Carabias J., Soberón J., Dirzo R., Llorente B. J., Halffter G., González R., March I., Mohar A., Anta S. y De la Maza J. 2009.** Capital natural de México. Síntesis. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 101 pp.
- Uribe G., I. 1985.** Efecto del muérdago enano *Arceuthobium* spp. en el crecimiento e incremento en árboles jóvenes de *Pinus hartwegii*, en Zoquiapan, México. Tesis. UACH. 53p.
- Vázquez C., I. 1993.** Determinación de tipo de sitio para evaluar rodales infectados por muérdago enano (*Arceuthobium globosum*, Hawksworth et Wiens). Revista Ciencia Forestal en México. Vol. 18. Núm. 73. 80 p.
- Vázquez C., I. Villa R. A. y Madrigal H.S. 2006.** Los muérdagos (Loranthaceae) en Michoacán. SAGARPA. CONAFOR. INIFAP. Libro técnico No. 2 División Forestal. Uruapan. Michoacán. México. 98 p.
- Vega R., E. 1976.** El muérdago enfermedad en bosques de coníferas y hojosas, bosques y fauna. XII. 1. Departamento de divulgación forestal. S.A.R.H. (México). 49 p.
- Verduzco J. 1976.** Protección forestal. Texcoco, México. Patena (Chapingo).120 p.
- Zakaullah B., K. 1977.** Survey of juniper dwarf mistletoe in State Forest of Baluchistan. Pakistan Journal of Forestry. 27: 39–50.

## Capítulo I.

### Microorganismos asociados a muérdagos enanos del género *Arceuthobium* spp. (Santalales, Viscaceae) en la Cuenca del Valle de México

#### RESUMEN

Los bosques de México son atacados por plantas parásitas, que con el paso del tiempo han tomado importancia por los efectos negativos que provocan en los árboles y en el bosque; es por esto que el objetivo planteado en este capítulo fue la identificación de organismos asociados al muérdago enano en áreas boscosas de la Cuenca del Valle de México. Para ello, se realizaron muestreos dirigidos a especies de muérdagos (*Arceuthobium globosum* subsp. *grandicaule*, *A. vaginatum* subsp. *vaginatum* y *A. abietis-religiosae*) que presentaban síntomas de marchitez, necrosis en tallo y frutos. Las muestras se procesaron en el laboratorio y se sembraron segmentos o secciones de tejido sano y muerto en papa-dextrosa-agar (PDA). Los hongos obtenidos fueron caracterizados morfológicamente y molecularmente. Se procesaron 76 muestras y en las tres especies de muérdagos muestreados se encontraron hongos asociados. Los hongos que se encontraron con mayor frecuencia en los diferentes síntomas fueron: *Alternaria* sp; *Epiccocum* spp; *Phoma* sp; y *Fusarium* sp.

**Palabras clave:** Bosques, plantas parásitas, muérdagos enanos, *Alternaria* spp; *Epiccocum* spp; *Phoma* spp; y *Fusarium* spp.

## ABSTRACT

Mexico's forests are attacked by parasitic plants, which over time have become increasingly important for the negative effects they have on the trees and the forest; is why the objective raised in this chapter was to identify associated agents to dwarf mistletoe in forested areas of the Mexican basin. To achieve this, sampling target species of mistletoe as performed. The sample mistletoes were: *Arceuthobium globosum* subsp. *grandicaule*, *A. vaginatum* subsp. *vaginatum* and *A. abietis-religiosae* showing with symptoms of wilting, necrosis in stem and fruits. Collected samples were processed in the laboratory and segments or sections of healthy and necrotic tissue were plated on potato-dextrose- agar (PDA). The fungi were characterized morphologically and molecularly. A total of 76 samples were collected in the forest and processed in the laboratory. The fungi most frequently associated to found the different symptoms were *Alternaria* sp; *Epiccocum* spp; *Phoma* sp; and *Fusarium* sp.

**Keywords:** Forests, parasitic plants, dwarf mistletoes, *Alternaria* spp; *Epiccocum* spp; *Phoma* spp; and *Fusarium* spp.

## 1. INTRODUCCIÓN

La familia botánica Loranthaceae incluye especies parásitas conocidas en general con la denominación de "muérdagos", de los cuales se consideran dos tipos: "verdaderos" y "enanos", siendo estos últimos de particular importancia por los daños severos que llega a causar, tanto individualmente a los tejidos de sus hospederos como globalmente a las poblaciones de éstos, principalmente cuando se trata de especies de coníferas que representan importancia económica, tal como son las especies de los géneros *Abies*, *Pinus* y *Pseudotsuga*. Los muérdagos enanos se agrupan en el género *Arceuthobium* (Rodríguez, 1985).

Los muérdagos enanos son plantas que contienen clorofila, pero obtienen la mayoría de sus carbohidratos y toda el agua, de su hospedante (Leonard, *et al*; 1965); y por lo tanto, aumentan el estrés hídrico (Glatzel y Geils 2009).

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Organismos asociados a muérdagos enanos (*Arceuthobium* spp)

Se han reportado algunos organismos asociados a los muérdagos enanos, en diferentes estudios. En México existe poca información sobre este problema y se limita principalmente a dos especies de muérdagos: *Arceuthobium globosum* y *Arceuthobium vaginatum*.

#### 2.1.1. Insectos

*Formica fusca* (Hymenoptera: Formicidae) es el principal insecto polinizador de *Arceuthobium americanum* y *Capidosom bakeri* catalogado como el himenóptero polinizador más importante de *A. vaginatum* y de *A. cyanocarpon*. Existen otros insectos dípteros y coleópteros que son importantes polinizadores del muérdago enano y podrían ser controlados para limitar la fecundación de las flores femeninas, reduciendo así la fructificación del muérdago (Penfield *et al.*, 1976).

En México se han registrado especies de insectos que se alimentan de los tallos de muérdago enano, principalmente cuando están tiernos, entre los cuales se encuentran los himenópteros *Neoborella* sp. en *Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum*; *Hemiberlesis* sp. sobre *A. vaginatum* subsp. *durangense*; *Niveaspis vulcanica*, frecuente en *A. gillii* subsp. *nigrum*, *A. strictum*, *A. vertilliflorum*, *A. vaginatum* subsp. *vaginatum*, *A. vaginatum* subsp. *durangense*, *A. globosum* subsp. *globosum* y *A. globosum* subsp. *grandicaule*, (Hawksworth *et al.*, 1970).

### 2.1.2. Hongos

Existen dos grupos de hongos que parasitan a muérdagos enanos: los generalistas que atacan brotes aéreos y los que atacan el sistema endofítico (hongos que provocan canchros) (Shamoun *et al.*, 2002).

En resultados de investigaciones internacionales, se han encontrado hongos que atacan generalmente la parte aérea, parasitan flores pistiladas, brotes y frutos de algunas especies que florecen en primavera, entre los cuales se encuentran: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cylindrocarpon (Septogloeum) gillii* y *Caliciopsis (Wallrothiella) arceuthobii* (Hawksworth y Geils 1996); aunque también se han encontrado otros hongos asociados constantemente como: *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Coniothyrium* sp., *Metasphaeria wheeleri*, *Pestalotia maculiformans*, *Pestalotia heteroerconis* y *Phoma* sp. (Gilbert 1984, Hawksworth *et al.*, 1977, Hawksworth y Wiens 1996, Kope y Shamoun 2000, Shamoun, 1998). Los hongos que provocan canchros están relacionados con el sistema endofítico debido a que atacan la corteza y el sistema endofítico del muérdago, estos son: *Neonectria neomacrospora* (Funk *et al.*, 1973, Shamoun 1998, Smith y Funk, 1980) y *Cytospora abietis* (Scharpf 1969, Scharpf y Bynum 1975, Wright 1942).

Uno de los síntomas provocados por hongos asociados al muérdago son conocidos como el síndrome de la enfermedad de la resina; donde están involucrados *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans* y *Epicoccum nigrum* (Mark y otros 1976); sin embargo, Gilbert (1984) aisló estos hongos de canchros de muérdago sin síntomas y de madera del hospedante, estos hongos por sí solos pueden no ser la única causa del síndrome.

Existen hongos que destruyen los tallos del muérdago, por lo que la plaga persiste en el interior de las ramas o tallo; entre estos se encuentran: *Wallrothiella arceuthobii*, que ataca los órganos florales femeninos evitando la dispersión de la semilla; *Colletotrichum gloeosporioides* que causa marchitez en los tallos; *Cylindrocarpon gillii* produce antracnosis (Baranyay *et al.*, 1978); *Aureobasidium pullulans* y *Alternaria alternata* que se consideran agentes de marchitez y muerte de los tallos del muérdago (Mark *et al.*, 1976).

Los trabajos realizados en México sobre hongos asociados en muérdago enano son muy pocos, estos trabajos son mencionados por los siguientes autores:

Arriola y colaboradores (2011) reportaron la presencia de micromicetos asociados a los muérdagos enanos en los Parques Nacionales de La Malinche (LM) e Izta-Popo y Zoquiapan

(PNIPZ), estos son: *Alternaria alternata* sobre *A. vaginatum* en el PNIPZ; y en ambos parques encontraron a: *Alternaria* sp. sobre *A. globosum* y *A. vaginatum*; *Mucor* sp. en *A. vaginatum*; *Penicillium* sp. sobre *A. globosum* y *A. vaginatum*.

Reséndiz *et al.*, (2012), mencionaron que el gobierno del Distrito Federal financió un estudio para el control del muérdago enano a través de la Secretaria del Medio Ambiente y se determinó un total de ocho hongos que crecen sobre el muérdago: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Pestalotia*, *Phoma*, *Trichoderma*, *Botryosphaeria* sp. y *Uromyces dactylidis*. Él y sus colaboradores llevaron a cabo otro trabajo en el Parque Nacional Nevado de Toluca sobre *Arceuthobium globosum* que infecta a *Pinus hartwegii* y encontraron los siguientes hongos: *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp.

En trabajos previos en 2012, se realizó uno relacionado con los hongos antagonistas del muérdago enano en dos aéreas naturales protegidas (Parque Nacional Iztapopo-Zoquiapan y Parque Nacional La Malinche), en el cual se determinaron tres géneros: *Alternaria*, *Fusarium* y *Cladosporium*. A través de pruebas moleculares se determinaron las especies de hongos: *Alternaria alternata*, *Fusarium proliferatum* y *Cladosporium cladosporioides* (Gijón *et al.* 2013).

Cortez y colaboradores, en el 2013, reportaron la presencia de *Alternaria alternata*, *Fusarium* spp. y *Penicillium* spp., en cinco Áreas Naturales Protegidas (Parque Nacional Nevado de Toluca, Parque Nacional Iztaccihuatl – Popocatepetl, Parque Nacional La Malinche y el Parque Nacional Desierto de los Leones. El hongo *Cladosporium* spp., se encontró en casi todos los sitios con excepción del Parque Nacional Desierto de los Leones. Los resultados obtenidos reflejan que los tres primeros hongos tienen preferencia por *A. vaginatum* independientemente de la zona.

Kope *et al* en 1997, reportaron por primera vez la presencia de *Colletotrichum gloeosporioides* en *Arceuthobium tsugense* (Rosend.) G.N. Jones subsp. *tsugense* colectado en *Pinus contorta* var. *latifolia*.

## **2.2. Técnicas moleculares**

En América Latina, los laboratorios de biología molecular han incrementado su importancia, entre otros aspectos, por el aumento de las motivaciones de los países de la región para mejorar el nivel de conocimiento acerca de la riqueza y diversidad biológica existente, con la finalidad de contribuir tanto a su conservación efectiva como a su uso bajo esquemas que garanticen su perpetua renovación. Cuando se desea comparar a dos o más individuos de una misma especie o a especies diferentes pero emparentadas filogenéticamente, o bien si se planea elaborar un mapa

genético de cierta especie, y/o ubicar genes dentro de los cromosomas; se puede acudir a varias técnicas que permiten detectar diferencias en el ADN de los individuos involucrados en el estudio (Wilches, 2004).

Las técnicas de biología molecular se basan en el análisis de los ácidos nucleicos extraídos directamente de las muestras o bien de cultivos; posteriormente a través del análisis de las secuencias de marcadores moleculares es posible identificar y realizar clasificaciones filogenéticas de los microorganismos así como inferir su presencia dentro de una comunidad. Los marcadores moleculares se pueden obtener mediante amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) (Jan y Le; 2001).

Estas técnicas están basadas en el análisis de ácidos nucleicos y detectan variaciones directas a nivel de ADN conocidas como huellas (Valadez y Kahal, 2000).

### **2.2.1 Extracción de ADN**

El ADN posee algunas diferencias con respecto al ARN, es una cadena doble, todos sus nucleótidos contienen desoxirribosa y ninguno de ellos presenta la base uracilo, sino que en lugar de este presenta Timina (Smith, 1998). En la célula los ácidos nucleicos (ADN y ARN) no se encuentran de forma libre sino asociados con complejos nucleoproteicos. Estos complejos a su vez pueden encontrarse en diversos compartimentos celulares como el núcleo, el cloroplasto y el citoplasma. Por lo anterior, es necesario todo un procedimiento que permite ir separando y desechando los diferentes componentes celulares hasta obtener el ADN puro (Ramírez y Aguilar, 2001).

En general estos métodos siguen algunos principios básicos como el uso de una solución de lisis para romper las paredes celulares y las membranas, con el fin de liberar el ADN, seguida del uso de surfactantes o agentes desnaturalizantes para la solubilización y dispersión de otras moléculas, la separación o precipitación del ADN y finalmente el lavado con etanol. Algunos métodos utilizados para la extracción de ADN de fitopatógenos son: Dellaporta (minipreparación), Doyle and Doyle (CTAB) y otros, que son proporcionados por diferentes casas comerciales (Martínez, 2000).

### **2.2.2. PCR**

La Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (por sus siglas en Inglés), fue descrita por Millis en 1985, y desde entonces ha revolucionado las ciencias biológicas en general; es una de las técnicas más usadas para amplificar una secuencia en blanco, por su gran especificidad y sencillez

(Leyva y Martínez, 2001). La PCR es una reacción enzimática en la cual un segmento de ADN de una región específica del genoma de la especie se amplifica (copia) de manera cíclica en una mezcla de reacción "in vitro". Esto permite un aumento exponencial del segmento seleccionado de ADN, llegando a obtener millones de copias que por cantidad es posible visualizar aún cuando la secuencia que se busca se encuentra en concentraciones muy bajas (Saiki, 1988) y una de las propiedades de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), principalmente en el diagnóstico es la capacidad para amplificar a una secuencia blanco a partir de una preparación cruda de ADN, es decir ADN extraído con un método estándar de extracción sin recurrir a un protocolo sofisticado de purificación (Valadez y Kahal, 2000).

En México existen pocos estudios relacionados al uso de microorganismos en las áreas forestales, ante la importancia que tienen las áreas boscosas, se han buscado métodos para el control del muérdago enano, sin embargo, han sido poco eficientes. El uso de microorganismos puede ayudar al manejo de este parásito, es por ello que se planteó el siguiente objetivo.

### **3. OBJETIVO**

Identificar organismos asociados al muérdago enano en áreas boscosas de la Cuenca del Valle de México.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Área de estudio**

Se muestrearon los 4 puntos cardinales de la cuenca del Valle de México; abarcando las sierras de: Río Frío, Pachuca, Las Cruces y Chichinautzin (Figura 4)<sup>1</sup>. Los lugares donde se realizaron muestreos fueron: Distrito Federal y Estado de México (La Marquesa, La Venta, Chico Hidalgo, Llano Grande (Río Frío), Cerro del Papayo (Parque Nacional Zoquiapan); Izta-Popo; Paso de Cortés, Nevado de Toluca y Desierto de los Leones).

---

<sup>1</sup> [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cuenca\\_de\\_Mexico\\_xxi.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cuenca_de_Mexico_xxi.svg)



encuentra el Área Natural Protegida Zoquiapan. El Área Natural Protegida “Zoquiapan y Anexas” (ANPZ) se localiza en el municipio de Tlalmanalco, Estado de México. Tiene una extensión de 19,400 ha y forma parte de la Región Terrestre Prioritaria “Sierra Nevada” (Obieta y Sarukhán, 1981; Rojas, 1983; Arriaga *et al.*, 2000). La estación meteorológica aledaña de Río Frío registra una temperatura media anual de 9.7 °C y una precipitación anual de 941 mm, con las lluvias concentradas entre junio y septiembre. El clima del sitio es templado subhúmedo con lluvias en verano y una elevación que varía de 2850 a 4150 m (Vargas, 1997).

Se han hecho numerosas observaciones acerca de la presencia de muérdagos enanos sobre *Pinus hartwegii* Lindl. (Pinaceae) en México, muchas de las cuales han sido llevadas a cabo en el Área Natural Protegida “Zoquiapan y Anexas” (ANPZ), Estado de México (Gutiérrez, 1968; Andrade y Cibrián, 1980; Madrigal *et al.*, 2007). En octubre de 2004 se encontró que en una zona cercana al cerro Papayo en el ANPZ *A. globosum* subsp. *grandicaule* Hawks & Wiens parasita hasta 70% de los árboles de *P. hartwegii* del lugar (Hernández- Benítez *et al.*, 2005), en tanto que, en julio de 2005 Queijeiro-Bolaños (2007) reportaron la presencia de *A. vaginatum* subsp. *vaginatum* (Willd.) presente en la misma zona.

#### **4.3.2. Sierra de Pachuca**

El parque nacional el Chico, se localiza al noroeste de la sierra de Pachuca, Hidalgo, entre el Poblado Carboneras y el Ejido del Cerezo, dentro de los municipios de Mineral el Chico y Pachuca de Soto, entre las coordenadas geográficas 19° 45' y 20° 42' latitud norte y 98° 27' y 98° 08' longitud oeste (Anónimo, 1988). Debido a la presencia de la sierra Madre Oriental, las altitudes sobrepasan los 2000msm (Geografía de Hidalgo, 2010).

#### **4.3.3. Sierra de las Cruces**

La Sierra de Las Cruces (SC) está delimitada por las coordenadas 18°59'–19°43' N y 99°00'–99°40'W, y constituye el límite occidental de la cuenca de México. La Sierra de Las Cruces tiene una longitud de 110 km y un ancho de 47 km a 27 km en la parte norte y sur respectivamente. Está conformada por ocho estratovolcanes traslapados, que de sur a norte son: Zempoala (3,690 msnm), La Corona (3,770 msnm), San Miguel (3,870 msnm), Salazar (3,660 msnm), Chimalpa (3,420 msnm), Iturbide (3,620 msnm), La Bufa (3,460 msnm) y La Catedral (3,780 msnm), y otros de menor dimensión como el volcán Ajusco (Romero-Terán, 2001; Osete *et al.*, 2000)

Huixquilucan es un municipio del estado de México, perteneciente a la Zona Metropolitana de la Ciudad de México, se localiza en la parte centro del Estado de México en la vertiente oriental

del monte de Las Cruces, en las coordenadas 19° 18' 07" y 19° 26' 27" de latitud norte y 99° 14' 10" y 99° 24' 15" de longitud oeste, a una altura variable que va de los 2,501 a los 3,500 msnm. Limita al norte con Xonacatlán y Naucalpan; al sur con Ocoyoacac y Acopilco Distrito Federal al oeste con Lerma y por el este con Chimalpa delegación Cuajimalpa; dentro del cual se encuentra el Parque Nacional Insurgente Miguel Hidalgo y Costilla, conocido comúnmente como la Marquesa; el cual pertenece al municipio de Huixquilucan, Estado de México (Centro Nacional de Estudios Municipales, 1987).

#### **4.3.4. Sierra de Chichinautzin**

La sierra se encuentra ubicada al norte del estado de Morelos, en la región sur del Distrito Federal y al sureste del Estado de México. El corredor está formado por las regiones terrestres de la Sierra Madre del Sur y el Eje Neovolcánico Transversal (ENT), las cuales se encuentran en la parte central del país y comprende algunos de los picos más altos en la República Mexicana, como el Popocatepetl y el Iztaccíhuatl con una altitud de 5465 y 5230 msnm, respectivamente. En el corredor biológico convergen las regiones biogeográficas Neártica y Neotropical del continente americano (Bloomfield, 1975; Ricketts *et al.*, 1999).

El parque nacional Lagunas de Zempoala se encuentra a 65 km al sur de la ciudad de México y a 38 km al norte de la ciudad de Cuernavaca. Esta localizado entre las coordenadas 19° 01' 30" y 19° 06' de latitud norte y 99° 16' 20" y 99° 21' de longitud oeste (Vargas, 1984).

Geográficamente, el parque está ubicado entre tres cuencas hidrográficas bien definidas: la de México, que lo limita por el noroeste con las sierras del Ajusco y de las Cruces; la del río Balsas por el sur, a partir de los cerros Cuautépetl, Zempoala y la Leona, empezando a descender el terreno hacia el valle de Cuernavaca; y la del río Lerma, situada al oeste de la Sierra de Ocuilán (Ramírez-Pulido, 1969).

#### **4.4. Escala de daño.**

La metodología empleada para la evaluación de daños a los árboles se basó en la escala propuesta por Hawksworth (1977) (Figura 5).



Figura 5. Escala de 6 clases de Hawksworth para evaluar la severidad del daño por *Arceuthobium* en los rodales muestreados.

#### 4.5. Fase de campo

Se realizaron ocho muestreos durante el 2013 y 2014 en las estaciones de otoño e invierno. Estos se dirigieron a árboles que presentaban muérdagos del género *Arceuthobium* spp., con síntomas de marchitez, necrosis y en algunos casos daños en los frutos (necrosis) (Figura 6).

En muestreos realizados en La Marquesa, La Venta, Cuajimalpa y el Chico Hidalgo; no se encontraron muérdagos del género *Arceuthobium* y solo en el segundo sitio se encontró la presencia de muérdagos verdaderos.

Los lugares de colecta, fechas, número de muestras, especies de muérdagos, nivel de daño, tipos de síntomas observados y claves asignados se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Muestreo realizado en diferentes partes de la cuenca del Valle de México y síntomas observados en campo.

Fecha de colecta	Lugar de colecta	Muestras	Especie de muérdago	Severidad del rodal	Síntomas	Clave
11-Agosto-2013	Llano Grande	4	<i>A. abietis-religiosae</i>	1	Necrosis	LLG-Aar
23-Agosto-2013	Cerro del Papayo	7	<i>A. globosum</i> subsp. <i>grandicaule</i>	3	Marchitez	Cp-Agg
		10	<i>A. vaginatum</i> subsp. <i>vaginatum</i>	2	Marchitez y necrosis	Cp-Avv
01-Nov-2013	Izta-Popo	11	<i>A. vaginatum</i> subsp. <i>vaginatum</i>	1	Marchitez y necrosis	Izpo-Avv
		9	<i>A. abietis-religiosae</i>	5	Marchitez y necrosis	Izpo-Aar
24-Ene-2014	Nevado de Toluca*	21	<i>A. globosum</i> subsp. <i>grandicaule</i>	4	Marchitez y necrosis	NT-Agg
		4	<i>A. vaginatum</i> subsp. <i>vaginatum</i>	4	Marchitez y necrosis	NT-Avv
12-Feb.-2014	Desierto de los Leones	10	<i>A. vaginatum</i> subsp. <i>vaginatum</i>	2	Marchitez y necrosis	DL-Avv

\*Se encontraron árboles de regeneración muertos, con muérdagos vivos.

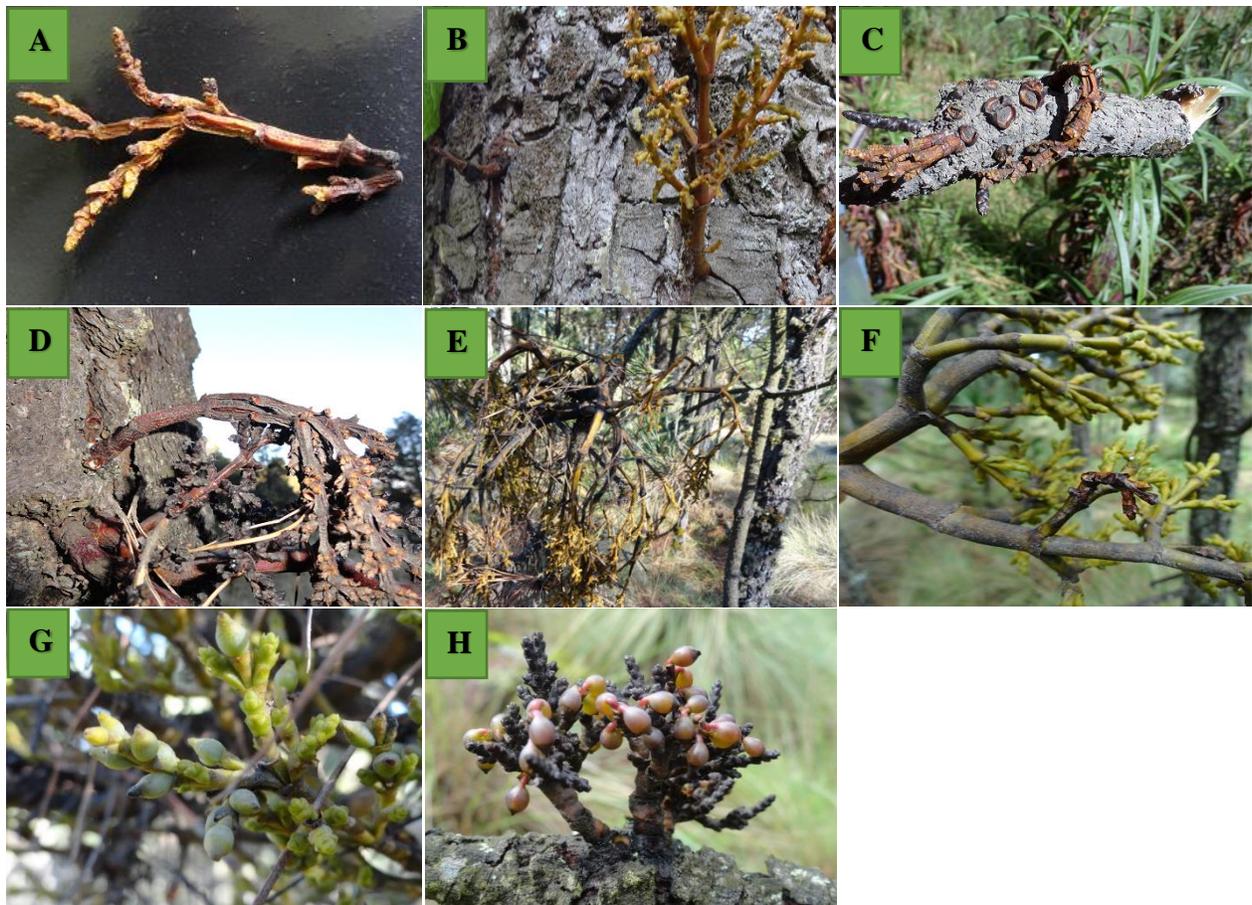


Figura 6. Síntomas que se observaron en los muérdagos en campo. A-B) Marchitez y necrosis en *Arceuthobium abietis-religiosae*, C-D) Marchitez y necrosis en *A. vaginatum* subsp. *vaginatum*, E-F) Marchitez y necrosis en *A. globosum* subsp. *grandicaule*, G-H) Inicio de daño en frutos de *A. globosum* subsp. *grandicaule* y *A. vaginatum* subsp. *vaginatum*.

#### 4.5.1. Fase de laboratorio

Las muestras colectadas en las diferentes áreas boscosas, fueron llevadas al laboratorio de Patología Forestal del Colegio de Postgraduados, donde se procesaron. Se cortaron segmentos de 1cm<sup>2</sup> (incluyendo material enfermo y sano), se desinfectaron en Hipoclorito de sodio al 3% durante 3 minutos y después se lavaron tres veces con agua destilada estéril, se secaron en una sanita cerca de los mecheros; cada segmento esterilizado se sembró en medio de cultivo de PDA (Papa-Dextrosa-Agar) (Apéndice 1) y se esperó el crecimiento durante 24 a 48 horas (Figura 7). Las condiciones de incubación fueron de 22 a 25°C. Las colonias que crecieron con mayor frecuencia respecto a características fenotípicas fueron transferidas a agua agar (AA) para realizar puntas de hifa. Las colonias obtenidas de AA (Apéndice 2) fueron transferidas a PDA y preparadas para su

caracterización morfológica; en algunos casos fue necesario establecer cámaras húmedas para la esporulación y formación de estructuras de los hongos para su identificación.

#### 4.5.2. Caracterización de colores

La coloración de las distintas cepas en medio de cultivo PDA fue identificada a los 3 a 4 días de crecimiento mediante comparación con la tabla de colores de suelo y roca, propuestos por Munsell (Munsell, 1994 y 2009), con la finalidad de hacer posible el manejo de los aislamientos, dada la gran cantidad que se obtuvieron.

#### 4.5.3. Identificación morfológica

Los hongos aislados de campo fueron identificados morfológicamente con base en reportes de los siguientes autores: Booth (1971), Nelson *et al.*; (1983); Simmons (2007), Domsch *et al.*, (1980), Dal (2008), Trapero *et al.*, (2003) y (Klich, 2002).

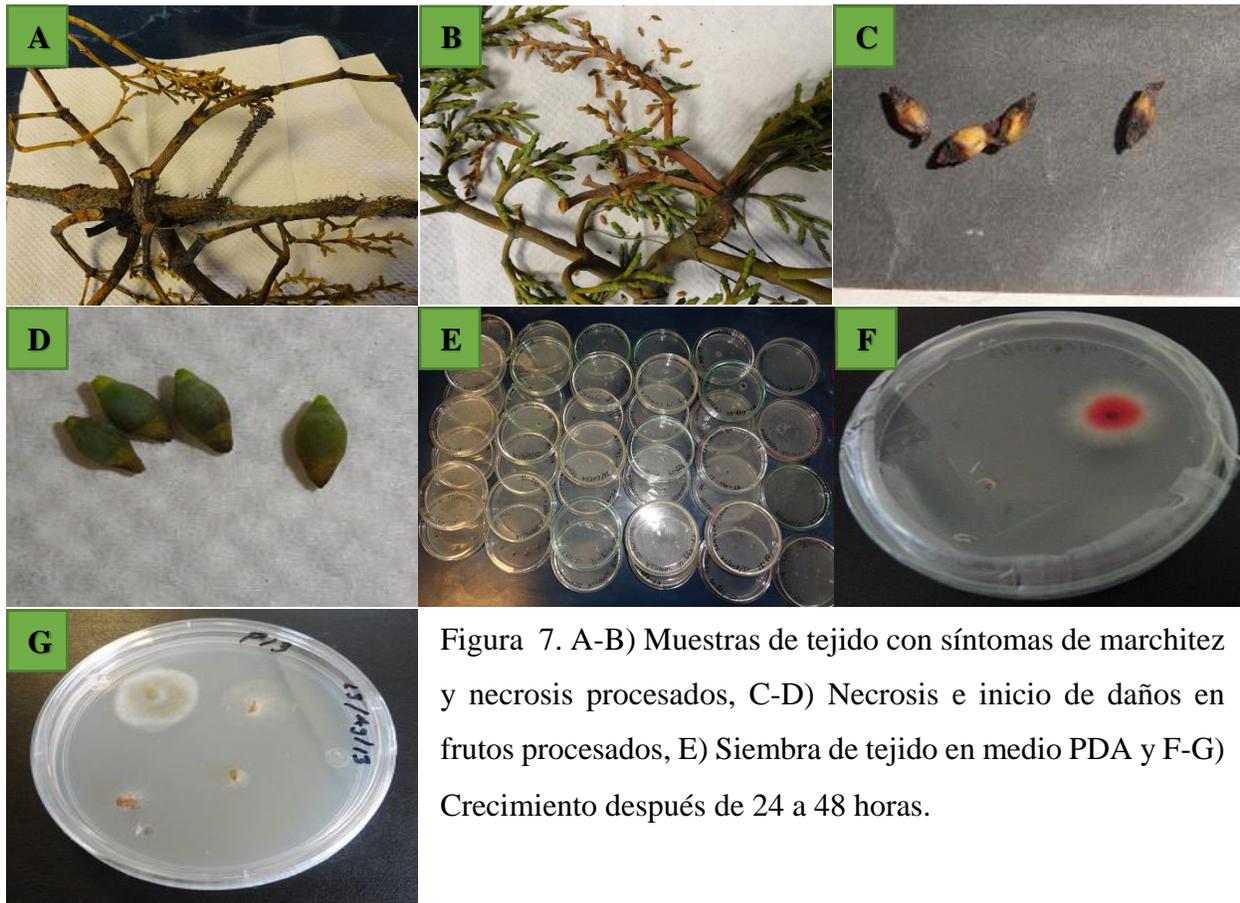


Figura 7. A-B) Muestras de tejido con síntomas de marchitez y necrosis procesados, C-D) Necrosis e inicio de daños en frutos procesados, E) Siembra de tejido en medio PDA y F-G) Crecimiento después de 24 a 48 horas.

#### 4.5.4. Extracción de DNA

Para la extracción de DNA se tomo una cepa de cada género de hongo identificado (Figura 8). Esta se hizo a través del método de QUIAGEN (Apéndice 3). La secuenciación realizada por MACROGEN. Los nucleótidos obtenidos fueron editados con el programa MEGA, y después fueron comparados con los que existen en el Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI) para la similitud e identificación de los hongos.



Figura 8. Extracción de DNA y muestras mandadas a secuenciar a MAGROGEN.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Solo cinco de las ocho áreas de estudio tuvieron presencia de muérdagos enanos, los cuales fueron: *Arceuthobium abietis-religiosae*, *Arceuthobium globosum* subsp. *grandicaule* y *Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum*.

### 5.1. Caracterización de colores

En la caracterización de los colores, se observó una gran diversidad como se ilustra en la Figura 9. Sin embargo, estos colores cambian de tonalidad cuando se transfieren nuevamente en un medio de cultivo fresco.

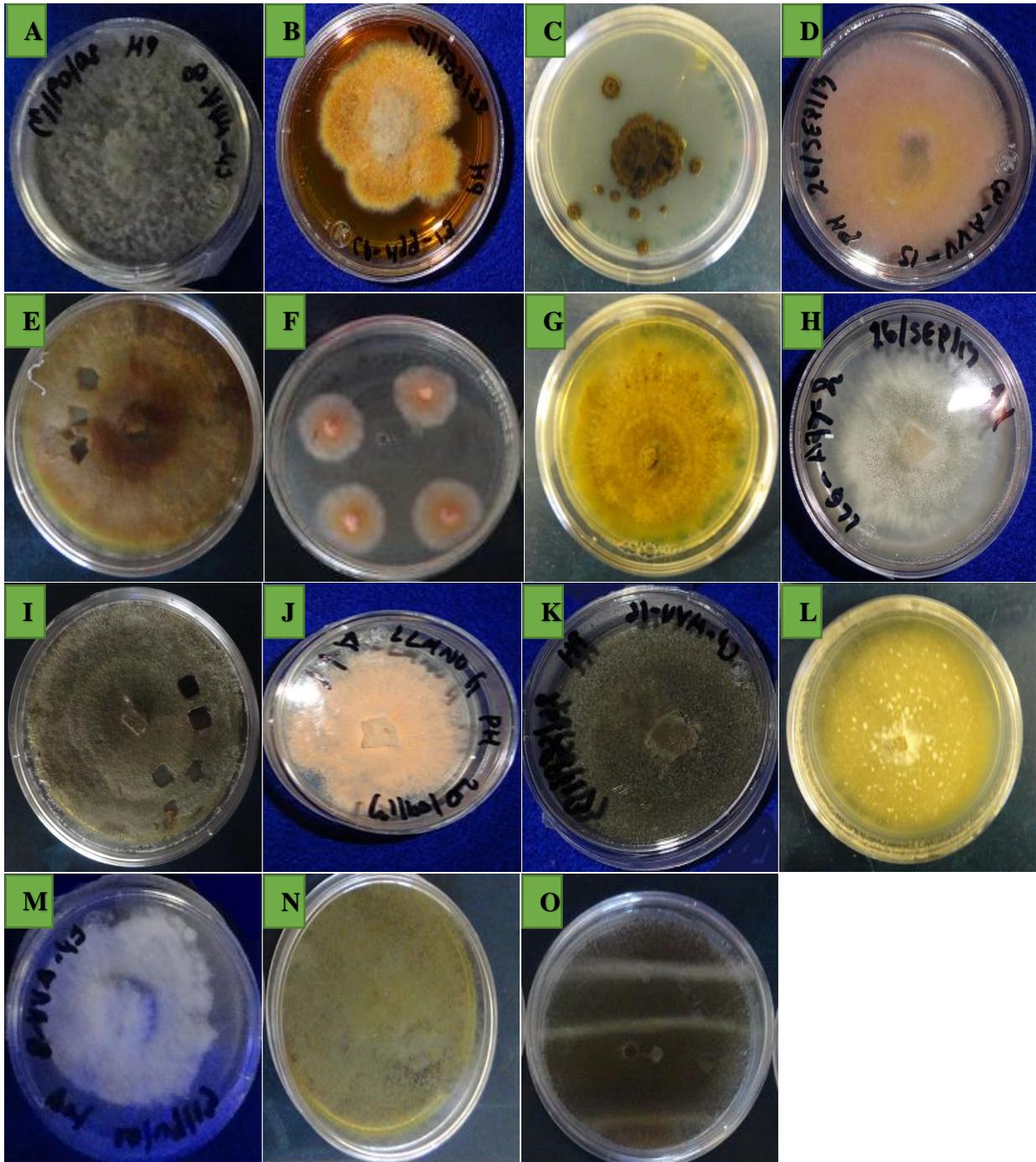


Figura 9. Colores de las cepas que se obtuvieron de los síntomas de marchitez y necrosis de las muestras de muérdago enano: A) Gris oscuro; B) Rojo; C) Negro olivo, D) Rosa, E) Rojo amarillento, F) Rojo, G) Amarillo, H) Blanco, I) Olivo, J) Rosa, K) Negro, L-M) Blanco; N) verde brillante y O) Negro grisáceo.

De las 76 muestras de muérdagos con de síntomas marchitez, necrosis de tallos y semillas se obtuvieron 209 aislados fúngicos que correspondieron a 12 especies cuya identificación se hizo morfológica y molecularmente, mismas que se enlistan a continuación: *Alternaria alternata*, *Phoma glomerata*; *Epicoccum nigrum*; *Fusarium solani*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Chaetomium funicola*, *Trichoderma viride*, *Cladosporium cladosporioides*, *Pestalotiopsis maculiformans*, *Trichothecium roseum* y *Acremonium* sp.

## 5.2. Principales características morfológicas

### 1. *Alternaria alternata* (Fries) Keissler Beith

*Alternaria alternata*, se caracteriza por presentar micelio abundante pero no denso, de 4-6 conidios en conidióforos cortos de cadenas simples y ramificadas, tal como lo reporta Simmons (2007).

En zonas expuestas a la luz de una colonia, el conidióforo primario es relativamente corto, con cadenas de 40 a 70 x 3 a 4 micras; presentando de 1 a 3 ramificaciones, con sus conidios primarios correspondientes (Simmons, 2007).

*A. alternata* produjo cadenas individuales de (10-) 15-20 conidios, generalmente los primeros dos conidios son largos y elípticos cuando maduran. Estos midieron de (-12) 25-30 (-52.5) x 5-9 (-12.5)  $\mu\text{m}$ , con (3) 4-7 (8) septos transversales y pocos o ninguno longitudinal, pero se encontraron -2 longipseptas. Los conidios siguientes son ovoides, elipsoides o subesféricos y midieron de 7 a 25 (-40) x 5 a 12  $\mu\text{m}$ , con 1 a 7 (comúnmente 3) septos transversales y muy pocos o ningún septo longitudinal. Los conidios laterales son de 30 x 3 a 4  $\mu\text{m}$ . Los conidios juveniles presentaron ornamentación en su pared, convirtiéndose en diferentes gránulos y los conidios maduros son verrucosas (Figura 10A) (Simmons, 2007).

### 2. *Epicoccum nigrum* Link ex Schelecht

*E. nigrum* produjo esporoquios como puntos negros de (90-) (100-130)  $\mu\text{m}$  de diámetro; conidios globosos a piriformes, y midieron de (13-) (15-25)  $\mu\text{m}$ , con una base en forma de embudo y una cicatriz de fijación amplia, pared de color oro-marrón a marrón oscuro, verrucoso, oscureciendo los tabiques que dividen los conidios en varias direcciones en un máximo de 15 células. Los conidios están rodeados por una verrucosis y la capa externa es pigmentada y gruesa. El pigmento en los conidios se ha caracterizado como melanina (Figura 10B), esto concuerda con lo reportado por Domsch *et al.*, (1980).

### **3. *Phoma glomerata* (Corda) Wollen & Hochapfel**

*P. glomerata*, produjo abundantes picnidios que midieron de 33.8 a 221  $\mu\text{m}$  y en promedio 102  $\mu\text{m}$  de diámetro, y con un ostiolo de 5.2 a 39  $\mu\text{m}$ , y 17.5 en promedio (Hosford, 1975). Los picnidios en su mayoría son globosos; se encontraron conidios elipsoidales de (4-) (6-7) x (2-) (3) y dictioclamidosporas (Figura 10C), coincidiendo con Domsch *et al.*, (1980).

### **4. *Fusarium solani* (Mart.) Appel & Wollenw. emend. Snyd. & Hans**

En *F. solani* se encontraron conidióforos monofialides con y sin ramificaciones. Las monofialides produjeron microconidios largos. Las fiálides son ovadas a clavadas, con un poro apical y a menudo rodeados de un collar; que miden entre (11-20) (-25) x (2.5-) (4.5-5)  $\mu\text{m}$ , como lo reporta Nelson *et al.*, (1983) y Booth (1971).

Se encontró la presencia de clamidosporas individuales y en pares, globosas que midieron entre, 8 y 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, así como lo reporta Nelson *et al.*, (1983) y Booth (1971).

Los microconidios fueron abundantes, generalmente unicelulares, ovales, en forma de riñón y con paredes gruesas (Nelson *et al.*, 1983) y midieron de (6-) (8 -12) x (2 - 4)  $\mu\text{m}$  (Booth, 1971) y se formaron a partir de conidióforos del micelio aéreo antes de la aparición de los esporodocios. Estos surgen como ramas laterales con la producción de células basales de 3 a 4 células en el ápice; estos pueden dar lugar a una nueva serie de células de ramificación, o ambos, de modo que se forma una cabeza tipo penicilado suelto (Booth, 1971), estos son abundantes y obtusos con paredes gruesas, y en general cilíndricos. La célula apical es obtusa, redondeada, en forma de pie o hendidura (Nelson *et al.*, 1983). Los macroconidios son hialinos, cilíndricos, ligeramente curvados a fusoides, con el ápice picudo y cuando maduran tienen entre cuatro y cinco septos: los de cuatro septos miden de 50 a 58 x 5  $\mu\text{m}$  y de cinco septos alcanzan de 60 a 65 x 5 a 5.5  $\mu\text{m}$ . En medios de cultivos como Agar-Papa-Zanahoria, los conidios tienden a ser más cortos con 3 a 4 septos y miden de (27-) 30 a 40 x (3-) 5  $\mu\text{m}$ , encontrándose de dos septos en PDA (Figura 10D) (Booth, 1971).

### **5. *Aspergillus flavus* Link**

*A. flavus* presentó conidios globosos a elipsoidales de 3 a 5  $\mu\text{m}$ , de color verde oscuro, verde oliva o aceituna, a veces amarillo grisáceo. Su estípote es rugoso de 8-10 x 430-720  $\mu\text{m}$  de largo, presentó vesículas esféricas de 13 a 23  $\mu\text{m}$  de ancho. La médula cubrió tres cuartas partes de la superficie de la vesícula y mide de (6) 8-10 (16) x (4) 5-7 (9)  $\mu\text{m}$  de paredes finamente rugosas y fiálides de 7-12 x 3.4  $\mu\text{m}$  (Figura 10E) (Klich, 2002).

## **6. *Aspergillus niger* Tiegh**

*A. niger* presentó conidios negros a marrón muy oscuro, globosos, ásperos y finamente rugosos de 4 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, con estípites de (5-) 12-16 x (250-) 500-800  $\mu\text{m}$ ; vesículas de (10-) 12-20  $\mu\text{m}$  de ancho, casi esféricas, presentó métulas que cubrieron casi toda la superficie de la vesícula y miden de 12-20 (40) x 3-6 micras, se encontraron fiálides de 7-10 x 3-4 micras (Figura 10F) (Klich, 2002).

## **7. *Chaetomium funicola* Cooke**

La colonia de *C. funicola* presentó poco micelio aéreo, de color blanco y una densa capa de ascomas de color negro a marrón oscuro, globosos a elipsoidales que midieron de (60-) 80-140 x (80-) 120-180  $\mu\text{m}$ , presentó setas laterales de oscuro a marrón u olivo, con puntas hialinas de 2 x 20  $\mu\text{m}$  no ramificadas, largos y rectos. Las ascosporas son pálidas a verde olivo, a veces marrón claro, son ovadas a limoniformes, con poro germinal y unicelulares, que midieron de (4-) 5-6 x (3-) 4-5  $\mu\text{m}$  (Figura 10G) (Domsch *et al.*, 1980).

## **8. *Trichoderma viride* Pers. ex Gray**

*Trichoderma viride* se caracterizó por presentar conidióforos ramificados y típicamente piramidales, es decir, ramas más cortas hacia el ápice y fiálides dispuestas en grupos divergentes presentando de 2 a 4, delgadas y dobladas de forma irregular. Los conidios fueron casi globosos, de (3-) 3.6-4.5 (-5)  $\mu\text{m}$  de diámetro y en su mayoría verrucosos (Figura 10H) (Domsch *et al.*, 1980).

## **9. *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries**

Las colonias fueron de lento crecimiento, alcanzando de 3 a 4 cm de diámetro en diez días, son color verde oliváceo, oliváceo-marrón, aterciopelado, oliváceo-negro; con conidióforos de (270-) 350 x 2-6  $\mu\text{m}$ , ramificación muy compacta y forman numerosas cadenas de conidios debajo de tabiques pero sin hinchazones, elongación simpodial. Los conidios son elipsoidales, alimonados de color marrón oliváceo, en su mayoría con paredes lisas, rara vez verrucoso, son unicelulares de 3 a 5 x 5 a 9  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 10I) (Domsch *et al.*, 1980).

## **10. *Pestalotiopsis maculiformans* (Corda) Nag Raj**

Los conidios midieron de 22 a 28 x 6 a 7  $\mu\text{m}$  y son de cinco células. La célula basal y la apical fueron hialinas, y las tres centrales están pigmentadas, siendo la cuarta célula más clara que la segunda y la tercera. Las células hialinas presentan apéndices (setas). La célula apical presenta entre uno y cuatro apéndices, aunque lo más frecuente es tres. Cada una de estas setas mide 17  $\mu\text{m}$

de longitud. La célula hialina basal tiene un solo apéndice de 6  $\mu\text{m}$  de longitud (Figura 10J) (Trapero, 2003).

### 11. *Trichotecium roseum* (Pers.) Link

El hongo presentó micelio septado, blanco al principio y luego de color rosa pálido; los conidióforos son largos, delgados, sencillos y septados. Los conidios son ovoides, y midieron de 15 a 20 x 7 a 10  $\mu\text{m}$ , con desarrollo basipétalo y pueden estar adjuntos o en grupos, pueden ser hialinos o de colores brillantes, en su mayoría son bicelulares aunque también se encontraron unicelulares (Figura 10K) (Dal, 2008).

### 12. *Acremonium* sp Link ex Fr.

La colonia fue de color crema o durazno claro, lisa, con producción de micelio aéreo corto. Los conidióforos fueron largos, con conidios unicelulares, elípticos, ovales y cilíndricos dispuestos en cabezuelas irregulares (Koneman y Roberts, 1997), y en ocasiones de dos células, son hialinos o pigmentados (Figura 10L) (Domsch *et al.*, 1980).

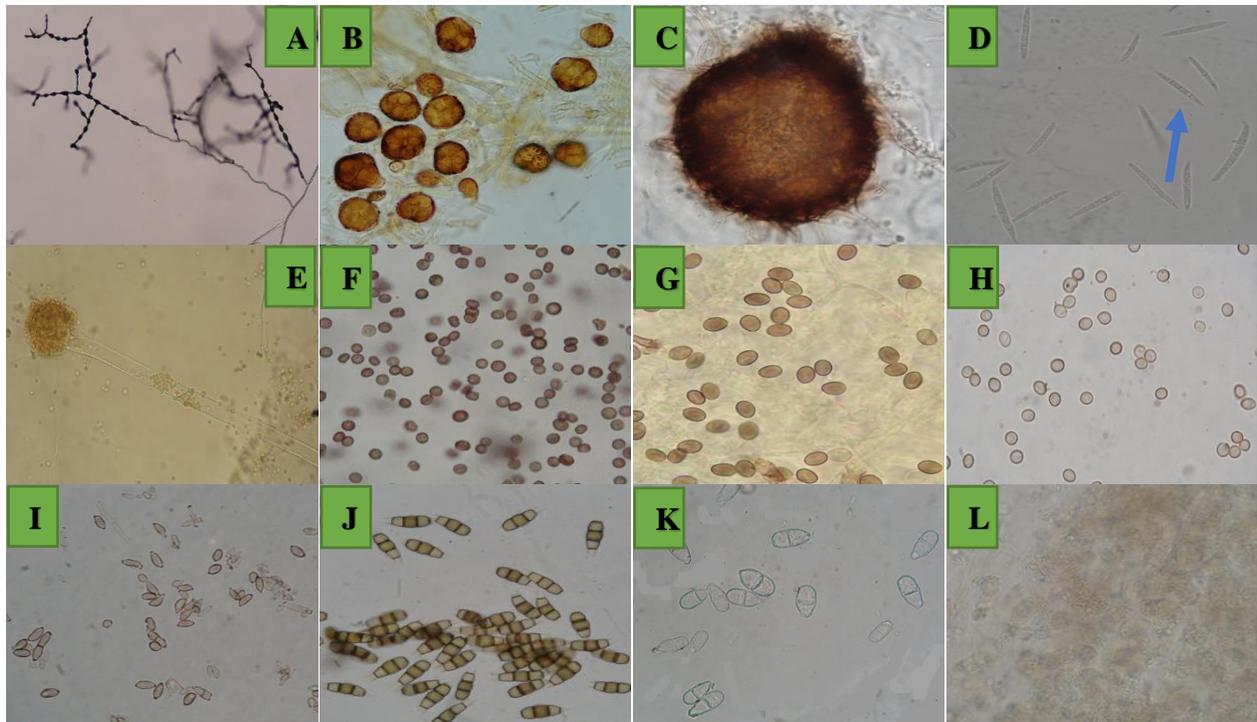


Figura 10. A) Conidios en cadena de *Alternaria alternata*, B) Conidios de *Epicoccum nigrum*, C) Picnidio de *Phoma glomerata*, D) Macroconidios de *Fusarium solani*, E) Conidióforo y conidios de *Aspergillus flavus* y F) Conidios de *Aspergillus niger*, G) Ascosporas de *Chaetomiium funicola*, H) Conidios de *Trichoderma viride*, I) Conidios de *Cladosporium cladosporioides*, J) Conidios de *Pestalotiopsis maculiformans*, K) Conidios de *Trichotecium roseum* y L) Masa de conidios de *Acremonium* sp.

### 5.3. Identificación Morfo- Molecular

Las morfo especies identificadas coincidieron con las correspondientes secuencias de nucleótidos registradas en el banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI). De las 11 muestras secuenciadas, cuatro tuvieron 100% de identidad, siete un 99% y uno solo fue identificado a nivel de género (Cuadro 2).

Cuadro 2. Identificación morfológica y molecular de hongos aislados en los muérdagos del género *Arceuthobium* y comparados con la base del NCBI.

Identificación morfológica	Clave	Número de nucleótidos	Alineación 100 %	Identidad 100%	Especie alineada	Número de acceso NCBI
<i>Alternaria alternata</i>	CP-Agg-17	576	97	99	<i>A. alternata</i>	KJ739872.1
<i>Phoma glomerata</i>	CP-Avv-16	482	100	100	<i>P. glomerata</i>	AY183371
<i>Epiccocum nigrum</i>	LLG-Aar-3	481	100	100	<i>E. nigrum</i>	KM519661
<i>Fusarium sonali</i>	CP-Avv-3	580	93	99	<i>F. solani</i>	AM412618.1
<i>Aspergillus flavus</i>	NT-Agg-5	540	100	99	<i>A. flavus</i>	JQ316529
<i>Aspergillus niger</i>	Avv-Ixpo-3	542	100	100	<i>A. niger</i>	KM361507
<i>Chaethomium funicola</i>	LLG-Arr-2	509	88	99	<i>C. funicola</i>	AB746176
<i>Trichoderma viride</i>	NT-Agg-5	546	100	100	<i>T. viride</i>	AF455432
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	NT-Agg-11	507	100	99	<i>C. cladosporioides</i>	AY361971
<i>Pestalotiopsis maculiformans</i>	CP-Avv-8	548	100	99	<i>P. maculiformans</i>	HQ608011
<i>Trichothecium roseum</i>	LLG-Aar-4	560	100	99	<i>T. roseum</i>	JQ434579
<i>Acremonium spp.</i>	NT-Agg-4	-----	-----	-----	-----	-----

## 5.4. Frecuencia de aislamientos

### 5.4.1. Por localidad

La mayoría de aislamientos se obtuvieron de las muestras del Cerro del Papayo (Parque Nacional de Zoquiapan), Nevado de Toluca e Izta-Popo (Cuadro 3), esto se atribuye a que a mayor severidad de daño tiende a disminuir la cantidad de hongos.

Cuadro 3. Número de aislamientos obtenidos en los sitios de muestreo.

Especies de hongos	Llano Grande	Cerro del papayo	Izta-Popo	Nevado de Toluca	Desierto de los Leones	Total
<i>Alternaria</i> spp	1	31	28	21	9	90
<i>Epiccocum</i> spp	3	32	9	20	3	67
<i>T. roseum</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Acremonium</i> spp	1	2	2	3	1	9
<i>Phoma</i> spp	0	3	2	9	4	18
<i>Fusarium</i> spp	0	6	4	0	3	13
<i>P. maculiformans</i>	0	1	0	0	0	1
<i>Aspergillus</i> spp.	0	0	3	1	0	4
<i>T. viride</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Cladosporium</i> spp	0	0	0	4	0	4
<i>C. funicola</i>	1	0	0	0	0	1
Total	7	75	49	58	20	209

### 5.4.2. Por especie de muérdago

El muérdago enano *Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum* tiene una amplia distribución (se encontró en cuatro lugares de los cinco donde hubo presencia del muérdago), mientras que *A. globosum* subsp. *grandicaule* solo se encontró en dos lugares. En estas dos especies de muérdago, en la severidad de daño del rodal se encontraron infecciones de 4 y 3, y en cuanto al número de aislados obtenidos son muy similares (87 y 90), siendo que en *A. vaginatum* subsp. *vaginatum* se procesaron más muestras (diferencia de 7); esto pudiera deberse que hay un complejo de hongos saprofitos asociados a *A. globosum* subsp. *grandicaule*, y que en conjunto causan las enfermedades descritas anteriormente (Cuadro 4).

Cuadro 4. Severidad del daño por muérdago observado en los bosques muestreados.

Especie de muérdago	Muestras colectadas	Hongos aislados	Severidad
<i>A. vaginatum</i> subsp. <i>vaginatum</i>	35	90	3
<i>A. globosum</i> subsp. <i>grandicaule</i>	28	87	4
<i>A. abietis-religiosae</i>	13	32	3
Total	76	209	3.3

El muestreo realizado en el Parque Nacional de Zoquiapan (PNZ) y el Nevado de Toluca, respecto a *A. globosum* subsp. *grandicaule*, se observa claramente que hay mayor cantidad de hongos en cada muestra del PNZ. Si aumentará el número de muestras del Parque Nacional de Zoquiapan, se observaría claramente el incremento de aislamientos, y que entre mayor severidad de la infección tiende a disminuir la cantidad de hongos asociados.

El muérdago *A. vaginatum* subsp. *vaginatum*, al tener mayor distribución, se obtuvo mayor cantidad de muestras y por lo tanto, mayor incidencia de las enfermedades provocadas por hongos en las plantas parásitas.

En el cuadro 5, se observa que *A. globosum* subsp. *grandicaule*, infecta la mayor parte del árbol, al tener una severidad por rodal de 4 en la escala de evaluación, comparado con *A. vaginatum* subsp. *vaginatum* con una escala de 3; y esto fue lo que se observó en campo.

En el muérdago *Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum*, existe mayor incidencia de hongos comparado con *A. globosum* subsp. *grandicaule*, de acuerdo a la severidad, y fue lo que se observó en campo.

Los muérdagos colectados de la especie *Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum* en el Izta-Popo, presentaban indicios de debilidad.

*Arceuthobium abietis-religiosae*, en campo se observó que es uno de los muérdagos con menor incidencia de enfermedades y su hospedante es muy específico, así como su agresividad fue muy notorio al tener una escala de cinco en uno de los rodales muestreados. Este es el primer reporte que se realiza en esta especie de muérdago.

Cuadro 5. Frecuencia de aislamientos en las especies de muérdagos enanos con síntomas de marchitez y necrosis colectados en las áreas boscosas.

Lugar de colecta	Muérdago	Muestras (n)	Severidad del rodal	Aislados (n)
Llano Grande.	<i>Arceuthobium abietis-religiosae.</i>	4	1	7
Izta-Popo.	<i>Arceuthobium abietis-religiosae.</i>	9	5	25
Parque Nacional de Zoquiapan.	<i>A. globosum</i> subsp. <i>grandicaule.</i>	7	3	37
Nevado de Toluca.	<i>A. globosum</i> subsp. <i>grandicaule.</i>	21	4	50
Cerro del Papayo (Parque Nacional de Zoquiapan).	<i>A. vaginatum</i> susp. <i>vaginatum.</i>	10	3	38
Izta-Popo.	<i>A. vaginatum</i> susp. <i>vaginatum.</i>	11	2	24
Nevado de Toluca.	<i>A. vaginatum</i> susp. <i>vaginatum.</i>	4	4	8
Desierto de los Leones.	<i>A. vaginatum</i> susp. <i>vaginatum.</i>	10	2	20

En *A. vaginatum* subsp. *vaginatum* se aisló a: *Alternaria alternata*, *Fusarium solani* y *Cladosporium cladosporioides*, similar a lo obtenido por Arriola *et al.*, (2011), Cortez *et al.*, (2013) y Gijón *et al.*, (2013), adicionalmente se encontraron a: *Trichoderma viride*, *Pestalotiopsis maculiformans*, *Epiccocum nigrum*, *Aspergillus niger* y *Acremonium* sp. y se consideran como los primeros reportes de estos hongos asociados a esta especie de muérdago.

En *A. globosum* subsp. *grandicaule* se aisló a *Epiccocum nigrum*, *Acremonium* sp, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusarium solani*, *Phoma glomerata*, *Cladosporium cladosporioides* y *Alternaria alternata*, los resultados difieren con lo obtenido por Reséndiz *et al.*, (2012) y Arriola *et al.*,

(2011) quienes aislaron únicamente *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., y *Penicillium* sp., por lo cual se está reportando por primera vez nuevos hongos asociados a este muérdago enano.

También se considera como el primer reporte lo encontrado en *A. abietis-religiosae*, donde se aisló a: *Alternaria alternata*, *Phoma glomerata*, *Epicoccum nigrum*, *Trichotecium roseum*, *Acremonium* sp; *Chaetomium funicola*, *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani*, y este es el primer estudio que se realiza en esta especie de muérdago enano.

*Alternaria alternata*, *Pestalotia maculiformans* y *Phoma* sp., son mencionados por Gilbert (1984), Hawksworth *et al.*, (1977), Hawksworth and Wiens (1996), Kope and Shamoun (2000), Shamoun (1998) y *Epicoccum nigrum* (Mark *et al.*, 1976, Gilbert 1984), sin embargo, estos autores no hacen referencia al muérdago de donde se aislaron. Cabe mencionar que, *Alternaria alternata* y *Epicoccum nigrum* fueron aislados también del conjunto de síntomas llamado el síndrome de la resina mencionado por Mark *et al.*, (1976) y Gilbert (1984).

De las áreas boscosas muestreadas, el Nevado de Toluca fue el que presentó mayor incidencia y severidad de infección por el muérdago enano. En Llano grande se encontró una baja incidencia y severidad del muérdago, así como también en el Desierto de los Leones (Cuadro 6).

Cuadro 6. Nivel de severidad de la infección de muérdagos enanos encontrados en las áreas boscosas muestreados.

Área boscosa	Muestras (n)	Aislamientos (n)	Severidad
Llano Grande	4	7	1
Cerro del Papayo (Parque Nacional de Zoquiapan)	17	75	3
Izta-Popo	20	49	3
Nevado de Toluca	25	58	4
Desierto de los Leones	10	20	2
Total	76	209	2.6

## 6. CONCLUSIONES

Se encontraron una gran cantidad de hongos asociados al muérdago enano.

En total se obtuvieron 209 aislados de 76 muestras procesadas: de *Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum* 90, *A. globosum* subsp. *grandicaule* 87 y *A. abietis-religiosae* 32.

De las áreas muestreadas; en el Parque Nacional de Zoquiapan (Cerro del Papayo) fue donde se obtuvo la mayor cantidad de aislados 75, seguido del Nevado de Toluca y e Izta-Popo con 58 y 49, respectivamente.

Los hongos aislados con mayor frecuencia fueron: *Alternaria* spp., *Epiccocum* spp., *Phoma* spp., y *Fusarium* spp., los cuales estuvieron asociados con síntomas de marchitez y necrosis.

En este trabajo se reporta por primera vez la asociación de los hongos *Alternaria alternata*, *Phoma glomerata*, *Epiccocum nigrum*, *Trichotecium roseum*, *Acremonium* sp., *Chaetomium funicola*, *Aspergillus flavus*, y *Fusarium solani* con *A. abietis-religiosae*.

Se identificaron nuevos hongos asociados a *A. vaginatum* subsp. *vaginatum*, estos fueron: *Trichoderma viride*, *Pestalotiopsis maculiformans*, *Epiccocum nigrum*, *Aspergillus niger* y *Acremonium* spp.

En *A. globosum* subsp. *grandicaule* se reportan estos nuevos hongos: *Aspergillus flavus* y *A. niger*, *Fusarium solani*, *Phoma glomerata*, *Cladosporium cladosporioides* y *Alternaria alternata*. Los últimos dos hongos ya se habían reportado hasta nivel de género en estudios anteriores.

## 7. LITERATURA CITADA

- Andrade V. y Cibrián T. D. 1980.** Evaluación de poblaciones de muérdago enano (*Arceuthobium globosum* Hawks. y Wiens y *A. vaginatum* Willd.) en bosques de *Pinus hartwegii* Lindl. en Zoquiapan, Edo. de México. Sociedad Mexicana de Entomología. In: Memoria primera. Simposio Nacional sobre Parasitología Forestal. 18 y 19 de febrero de 1980. Uruapan, Michoacán. pp. 238–253.
- Anónimo. 1988.** Los Municipios de Hidalgo. Secretaria del Gobierno y Gobierno del estado de Hidalgo. México, D.F. 303 p.
- Arriola P., V. J. Reséndiz M. J. F. y Olvera C. L. P. 2011.** Hongos Asociados a muérdago enano en áreas naturales protegidas de México. Memoria Forestal. México. VI Reunión Nacional de Innovación Forestal. León Guanajuato, México. pp.100.
- Baranyay J., A. and F. R. Khutson 1978.** Wood parasites causing tree decay in British Columbia. Ca. Dept. Environment For. Serv. Res. Pap. RM-199, 26 pp.
- Bloomfield K. 1975.** The age and significance of the Tenango Basalt, Central México. Bulletin of Volcanology, 37: 586-595.
- Booth C. 1971.** The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 237 p.
- Centro Nacional de Estudios Municipales, Gobierno del Estado de Huixquilucan.** Los Municipios de Huixquilucan, en “Colección: Enciclopedia de los Municipios de México”, Talleres Gráficos de la Nación, México, 1987.
- Cibrián D., Alvarado D. y García D. S. 2007.** Enfermedades forestales en México. Universidad Autónoma Chapingo. División de ciencias forestales. México. Pp. 354-395.
- Cortez H., M. A. Reséndiz M. J. F., García V. V. B. y Pérez S. M. 2013.** Estudio comparativo de la distribución de micromicetos asociados con muérdago enano *Arceuthobium vaginatum* (Will.) en Cuatro Parques Nacionales de México. VIII Reunión Nacional de Innovación Forestal. Veracruz, México. pp. 86.
- Dal B., G. 2008.** First report of *Trichothecium roseum* causing postharvest fruit rot of tomato in Argentina. Australasian Plant Disease Notes 3: 103-104
- Domsch K., H. Gams W. and A. T. Heidi. 1980.** Compendium of Soil Fungi. Academic Press. USA. Vol. 1.

- Funk A., Smith R. B. and A. J. Baranyay. 1973.** Canker of dwarf mistletoes swellings on western hemlock caused by *Nectria funkiana* var. *macrospora*. Can. J. For. Res. 3: 71-74.
- Geografía de Hidalgo.** Explorando México, 2010.
- Gijón H., A. R., Arriola P. V. J., Reséndiz M. J. F. y Cortez H. M. 2013.** Caracterización molecular de hongos antagonistas del muérdago enano (*Arceuthobium vaginatum*). VIII Reunión Nacional de Innovación Forestal. Veracruz, México. pp. 84.
- Gilbert J., A. 1984.** The biology of dwarf mistletoes (*Arceuthobium* spp.) in Manitoba. Winnipeg: University of Manitoba. 138 p. Thesis.
- Glatzel G. and Geils B. W. 2009.** Mistletoe ecophysiology: host-parasite interactions. Ann Bot 87: 10–15.
- Gutiérrez R., M. 1968.** Efecto del parasitismo del muérdago enano (*Arceuthobium* spp.) sobre el desarrollo en grosor del tronco de *Pinus montezumae* y *P. hartwegii* en el cerro Telapón, Estado de México. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 28 pp.
- Hawksworth F., G. and D. Stevens. 1970.** New taxa and nomenclatural changes in *Arceuthobium* (*Visceae*). Brittonia 22:265-269.
- Hawksworth F., G. 1977.** The 6 class dwarf mistletoe rating system. Res. Note RM-48. Fort Collins, CO: USDA Forest Service Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station. 7 p.
- Hawksworth F., G. Wincker E. F. and F. R. Scharpf. 1977.** Fungal parasites of dwarf mistletoes. Gen. Tech. Rep. RM-36. Fort Collins, CO: U. S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station. 14 p.
- Hawksworth F., G. and D. Wiens. 1996.** Dwarf mistletoes: Biology, pathology and systematics. Agriculture Handbook 709. United States Department of Agriculture, Forest Service. Washington, D.C. 410 p.
- Hawksworth F., G. and W. B. Geils. 1996.** Biotic associates. In: Hawksworth, F. G. and Wiens, D. 1996. Dwarf mistletoes: Biology, pathology and systematics. Agriculture Handbook 709. United States Department of Agriculture, Forest Service. Washington, DC. U.S. Department of Agriculture, Forest Service: 73-89.

- Hernández C., L. V. Acosta P., R. y Galindo F. G. L. 1992.** Los muérdagos enanos (*Arceuthobium* spp.) en los bosques de pino del Volcán la Malintzi, Estados de Tlaxcala y Puebla. Boletín 15. Tizatlán, Tlaxcala, México: Jardín Botánico Tizatlán. 58 p.
- Hernández B., R. Z. Cano S. y Castellanos V. I. 2005.** Incidencia de infestación de *Arceuthobium globosum grandicaule* (Hawks. y Wiens) en *Pinus hartwegii* (Lindl.). Cienc. For. Méx. 30: 79–86.
- Hosford Jr., M. R. 1975.** *Phoma glomerata*, a new pathogen of wheat and triticales, cultivar resistance related to wet period. Phytopathology 65:1236-1239.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2008.**
- Jan J. y Le B. S. 2001.** Uso de técnicas moleculares para realizar estudios de biodiversidad microbiana en ambientes petroleros. BioTecnología Vol. 5 No. 3. Pp. 7.
- Klich A., M. 2002.** Identification of Common *Aspergillus* Species. United States Department of Agriculture. Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences. USA. 46-62 pp.
- Kope H., H. Shamoun S. F. and C. Oleskevich. 1997.** First report of *Colletotrichum gloeosporioides* on *Arceuthobium tsugense* subsp. *tsugense* in Canada. Plant. Dis. 81: 1095.
- Kope H., H. and F. S. Shamoun. 2000.** Mycoflora associates of western hemlock dwarf mistletoe plants and host swellings collected from southern Vancouver Island, British Columbia. Canadian Plant Disease Survey. 80:144-147.
- Leonard O., A. and J. R. Hull. 1965.** “Traslocation relationship in and between mistletoes and their host”. Hilgardia 37: (4) 115-153.
- Leyva L., N. E. y Martínez S. J. P. 2001.** Manual de procedimientos. Curso Fitopatología Molecular. Congreso Nacional de Sociedad Mexicana de Fitopatología. CINVESTAV-DGSV. México D. F. p 7.
- Madrigal S. Vázquez I. y Velasco. E. 2007.** Obtención de parámetros dasométricos para evaluar el efecto causado por *Arceuthobium vaginatum* en *Pinus hartwegii* del Nevado de Colima. Memorias del VII Congreso Mexicano de Recursos Forestales. 28 al 31 de octubre de 2005. Morelia, Michoacán. pp. 1–7.
- Mark W., R. Hawksworth F. G. and N. Oshima. 1976.** Resin disease: a new disease of lodgepole pine dwarf mistletoe. Can. J. For. Res. 6:415-424.

- Martínez S., J. P. 2000.** Perspectivas de la biología molecular para el diagnóstico fitosanitario en México y diseño de primers para PCR. Identificación de patógenos de importancia cuarentenaria mediante técnicas moleculares. CINVESTAV. IPN. México. 1-10 pp.
- Munsell. 2009.** Geological Rock-Color Chart. With genuine Munsell® color chips. Produced by Munsell color x-rite. Pp. 9.
- Munsell. 1994.** Munsell® Soil Color Charts. U.S. Dept. Agriculture Handbook 18-Soil Survey Manual. Pp. 29.
- Nelson P., E. Toussoun T. A. and W. F. O. Marasas. 1983.** Fusarium species, An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press. 193 pp.
- Obieta M., C. y Sarukhán J. 1981.** Estructura y composición de la vegetación herbácea de un bosque uniespecífico de *Pinus hartwegii*. I. Estructura y composición florística. Bol. Soc. Bot. Méx. 41: 75–124.
- Osete M., L. Ruiz M. V.C., Caballero C., Galindo C., Urrutia F. J. and Tarling D.H. 2000.** Southward migration of continental volcanic activity in the Sierra de Las Cruces, Mexico: paleomagnetic and radiometric evidence: Tectonophysics, 318, 201-215.
- Penfield F., B. Stevens E. R. and F. G. Hawksworth. 1976.** Pollination ecology of three Rocky Mountain dwarf mistletoes. For. Sci. 22:473-484.
- Queijeiro B., M. E. 2007.** Interacciones entre dos especies de muérdago enano (*Arceuthobium* spp.) y *Pinus hartwegii* en el Parque Nacional Zoquiapan, Estado de México: el papel del disturbio. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 50 pp.
- Ramírez P., J. 1969.** Nuevos Registros de murciélagos para el estado de Morelos, México. 40 Zool. (1): Pp. 123-127.
- Ramírez R., V. R. y Aguilar J. R. 2001.** Manual de procedimientos. Curso Fitopatología Molecular. Congreso Nacional de Sociedad Mexicana de Fitopatología. CINVESTAV-DGSV. México D. F. p 11.
- Reséndiz M., J. F. Pérez S. M., Olvera C. L. P., Arriola P. V. J. y Cortez H. M. A. 2012.** Hongos asociados a muérdago enano (*Arceuthobium globosum* Hawksw & Wiens), en el Parque Nacional de Nevado de Toluca. VII Reunión Nacional de Innovación Forestal. Querétaro, México. pp. 104.

- Ricketts T., E. Dinerstein D. M., Olson C. J., Loucks W., Eichbaum D., DellaSala K., Kavanagh P., Hedao P. T., Hurley K. M., Carney R. A. and S. Walters. 1999.** Terrestrial Ecoregions of North America. A conservation assessment. Island Press. Washington D.C. 485 pp.
- Rodríguez A., A. 1985.** Infestación del muérdago enano (*Arceuthobium vaginatum* (Willd.) Presl. subsp. *vaginatum*) en el Repoblado de *Pinus hartwegii* Lindl. Del Parque Nacional Zoquiapan, Estado de México. Bol. Téc. Inst. Nal. Invest. For. No. 122, México.
- Rojas M., C. 1983.** Distribución de *Arbutus* spp. y su relación con *Abies religiosa*, *Alnus firmifolia* y *Pinus* spp. en la Estación Experimental Zoquiapan. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 101 pp.
- Romero T., E. 2001.** Geología del Complejo Volcánico San Miguel al sur-poniente de la Cuenca de México: México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México Posgrado en Ciencias de la Tierra. Tesis de maestría, 63 p.
- Saiki R., K. 1988.** Primer-directed enzymatic amplification of the DNA with Thermostable DNA polymerase. Science. 239: 487-491.
- Shamoun S., F. 1998.** Development of biological control strategy for management of dwarf mistletoes. In: Sturrock, R., comp. Proceedings 45th Western International Forest Disease Work Conference; 1997 September 15-19; Prince George, BC. Victoria, BC: Canadian Forest Service, Pacific Forestry Centre. 36-42.
- Shamoun S., F. and L. E. Dewald. 2002.** Management Strategies for Dwarf Mistletoes: Biological, Chemical and Genetic Approaches. USDA Forest Service Gen. Tech. Rep. RMRS-GTR-98.
- Scharpf R., F. 1969.** *Cytospora abietis* associated with dwarf mistletoe on true firs in California. Phytopathology. 59: 1657-1658.
- Scharpf R., F. and H. H. Bynum. 1975.** *Cytospora* canker of true firs. Forest Pest Leaflet 146. Washington, DC: U. S. Department of Agriculture, Forest Service. 5 p.
- Simmons E., G. 2007.** *Alternaria* an Identification Manual. CBS Fungal Biodiversity Centre Utrecht, the Netherlands An institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences. Fully Illustrated and with Catalogue Raisonné 1796-2007.
- Smith C., A. y E. J. Wood. 1998.** Biología molecular y biotecnología. Addison-Wesley Iberoamericana, S. A. Delaware, E. U. A. Pp 247.

- Smith R., B. and A. Funk. 1980.** Assessing *Nectra macrospora* as a biological control agent for hemlock dwarf mistletoe. Bimonthly Progress Report. Ottawa: Canada Department of Forestry. 36 (3):11-12.
- Trapero A. Romero M. A., Varo R. and E. M. Sánchez. 2003.** First report of *Pestalotiopsis maculans* causing necrotic leaf spots in nursery plants of *Arbutus unedo* and *Ceratonia siliqua* in Spain. Plant Dis. 87: 1263.
- Valadez M., E. y Kahal. G. 2000.** Huellas de ADN en genomas de plantas (Teoría y Protocolo de Laboratorio). Editorial Mundi-Prensa México, S. A. de C. V. 147p.
- Vargas M., F. 1984.** Parques Nacionales de México y Reservas Equivalentes. Pasado, presente y futuro. Colección: Grandes Problemas Nacionales. Serie: Los Bosques de México. Instituto de Investigaciones Económicas. UNAM. 266 p.
- Vargas M., F. 1997.** Parques Nacionales de México. Vol. I. Zonas Centro, Occidente y Oriente. Instituto Nacional de Ecología. México, D.F. 331 pp.
- Wilches M., A. V. 2004.** Descripción de algunas herramientas moleculares y sus aplicaciones. Universidad Rafael Landívar. Facultad de ciencias ambientales y Agrícolas. Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente. Guatemala. Serie técnica No. 15. Pp. 31.
- Wright E. 1942.** *Cytospora abietis*, the cause of a canker of true firs in California and Nevada. J. Agric. Res. 65:143-153.

## Capítulo II

### **Pruebas de patogenicidad con hongos aislados de muérdago enano *Arceuthobium* spp. (Santalales, Viscaceae), presentes en los bosques de coníferas de la Cuenca del Valle de México**

#### **RESUMEN**

Los muérdagos enanos causan grandes problemas de destrucción de los bosques naturales, se han buscado alternativas de manejo y control, y hasta el momento no se ha encontrado ningún producto que sea eficiente. Por ello se planteó el siguiente objetivo: Evaluar la patogenicidad de los hongos obtenidos de muérdagos enanos en la Cuenca del Valle de México bajo condiciones de campo. Se evaluaron cepas de hongos que fueron aisladas de los muérdagos colectados que presentaron síntomas de marchitez y necrosis. Se realizaron dos experimentos, uno en laboratorio y otro en campo. El experimento en laboratorio y campo se hizo con 4 tratamientos, incluyendo el testigo; con 4 repeticiones en el primer experimento; y 10 repeticiones en las pruebas de campo. Se hicieron aplicaciones de  $2 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  conidios/mL de *Alternaria* spp; *Fusarium* spp y *Phoma* spp, respectivamente. El experimento “in vitro” se estableció por 12 días y el de campo se evaluó por dos meses. Se estableció una escala para la evaluación de los daños y los datos del experimento “in vitro” se analizaron con Statistix 8.1 para la Prueba exacta de Fisher's y el de campo con el paquete office SAS con la prueba de Kruskal-Wallis. En aplicaciones de conidios en suspensión de  $2 \times 10^4$ , estadísticamente no hubo diferencias significativas en cepas de *Phoma* spp y *Alternaria* spp, pero sí en *Fusarium* spp. En aplicaciones de  $1 \times 10^5$ , no hubo diferencia significativa en cepas de *Fusarium* pero sí en *Phoma* y *Alternaria*. En campo el mejor tratamiento fue el de *Fusarium solani*. *Alternaria alternata*, *Phoma glomerata* y el testigo estadísticamente fueron iguales.

**Palabras clave:** Muérdagos enanos, patogenicidad, hongos.

## ABSTRACT

Therefore, this study was carried out with the objective to evaluate the pathogenicity of fungi isolated from dwarf mistletoes are considered one of the major problems in the destruction of natural forests. Alternatives for management and control, have been searched, product has been successful. Therefore, this dwarf mistletoe in the basin of Mexico under field conditions. The evaluated strains were isolated from the collected mistletoe with symptoms of wilting and necrosis. Two experiments perform one laboratory and one field. The laboratory and field experiment was done with four treatments, including the control; with four repetitions in the first experiment and ten repetitions in the field tests. Applications were  $2 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  conidia / mL of *Alternaria* spp; *Fusarium* spp and *Phoma* spp, respectively. In vitro experiment was set for twelve days and the field was evaluated for two months. Establishing a scale for the assessment of the damage and the experiment data were analyzed in vitro with 8.1 Statistix for Fisher's exact test and field office with SAS package with the Kruskal-Wallis. Applications conidia suspension of  $2 \times 10^4$  there was no statistically significant difference in strains of *Phoma* spp and *Alternaria* spp, but if *Fusarium* spp. Applications of  $1 \times 10^5$ , no significant difference in strains *Fusarium* but if *Phoma* and *Alternaria*. In field the best treatment was to *Fusarium solani*. *Alternaria alternata*, *Phoma glomerata* and the witness were statistically equal.

**Keywords:** dwarf Mistletoes, pathogenic fungi.

## 1. INTRODUCCIÓN

México es uno de los países con más especies de *Arceuthobium* que presentan rasgos primitivos, intermedios y avanzados, y se distribuyen prácticamente en todas las áreas de coníferas de México (Anónimo, 1983).

A pesar de la problemática que representan estas plantas parásitas en áreas con regeneración natural, no existe un método de control rápido y económico que permita manejar este problema (Quintana, 2008).

Las plantas parásitas son aquellas que poseen estructuras especializadas para obtener de sus hospederos el soporte y los nutrientes necesarios para su desarrollo. Pueden ocasionar infestaciones severas y hasta la muerte (Comisión Nacional Forestal, 2007). Gill (1935) citado por Uribe (1985), divide el sistema endofítico en dos partes: la cortical que se desarrolla en la corteza del hospedante y la de los haustorios que se desarrollan en el xilema del hospedante.

El sistema cortical incluye los haustorios primarios con ramificaciones bajo la corteza, distribuidos irregularmente. Los haustorios crecen más longitudinalmente que lateralmente. El desarrollo cortical se efectúa en el tejido activo del floema de la hospedante y su crecimiento es centrípeto (Gill *et al.*, 1961).

Las especies del género *Arceuthobium* requieren para su desarrollo de abundante luz solar, estos requerimientos varían de acuerdo con el desarrollo mismo de la planta. La abundancia de luz solar, condición que se presenta en montes aclarados, es sumamente favorable para el desarrollo y disseminación del parásito (Valderrama *et al.*, 2002).

A pesar de la trascendencia del “muérdago enano”, son pocos los estudios que se han realizado en México, por lo que no se han difundido de una manera amplia los daños que llega a ocasionar en los bosques (Valderrama *et al.*, 2002).

En la década de los setenta muchos países comenzaron a preocuparse del estado decadente del medio ambiente y en la Conferencia de Estocolmo de 1972 se planteó la necesidad de prever el impacto de nuestras acciones sobre los sistemas naturales y sociales en su conjunto, a partir de entonces la UNESCO ha sido precursora de intercambio de información entre países (Clemencia *et al.*, 2008).

El control biológico fue concebido a inicios del siglo XIX cuando algunos naturistas de diferentes países reseñaron el importante papel de los organismos entomófagos en la naturaleza y

con el empleo de estos controladores biológicos se intenta restablecer el perturbado equilibrio ecológico, mediante la utilización de organismos vivos o sus metabolitos, para eliminar o reducir los daños causados por organismos perjudiciales (Badii *et al.*, 2000).

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. Control biológico**

El control biológico fue originalmente definido como "la acción de parásitos, depredadores o patógenos que mantienen poblaciones de otros organismos a un nivel más bajo de lo que pudiera ocurrir en su ausencia" (DeBach, 1977). Como tal, el control biológico se distingue de otras formas de control de plagas por actuar de una manera denso dependiente, esto es, los enemigos naturales se incrementan y destruyen una gran porción de la población cuando la densidad de esta población se incrementa (DeBach *et al.*, 1991).

Actualmente se desarrollan agentes de control biológico, organismos vivos como hongos, bacterias, virus e insectos que reducen la población de insectos plagas y patógenos que afectan a los cultivos. Los hongos en particular despiertan el interés de empresas e instituciones de investigación por su papel en el control de insectos y enfermedades, sin dañar el medio ambiente y la salud (Clemencia *et al.*, 2008).

### **2.3. Ventajas, desventajas, riesgos y beneficios del control biológico**

#### **2.3.1. Ventajas**

El control biológico cuando funciona posee muchas ventajas (Clemencia *et al.*, 2008; Summy and French, 1988) entre las que se pueden destacar: Poco o ningún efecto nocivo colateral de los enemigos naturales hacia otros organismos incluido el ser humano, la resistencia de las plagas es muy rara, el control con frecuencia es a largo plazo, pero permanente, el tratamiento con insecticidas es reducido de forma sustancial, la relación costo/beneficio es favorable, evita plagas secundarias y no existen problemas con intoxicaciones.

#### **2.3.2. Desventajas**

Ignorancia sobre los principios del método, falta de apoyo económico, para la adquisición de equipos indispensables para la producción y comercialización, falta de personal especializado, no está disponible en la gran mayoría de los casos, problemas con umbrales económicos bajos, los enemigos naturales son más susceptibles a los plaguicidas; y estos se incrementan con retraso en

comparación a las plagas que atacan, por lo cual, no proveen una supresión inmediata (Clemencia *et al.*, 2008).

### **2.3.3. Riesgos**

La introducción de agentes de control biológico frecuentemente es ambientalmente segura y sin riesgos, sin embargo, existen evidencias que indican que esta aseveración no es del todo cierta, tal como lo discute Howarth (1983,1991). Según Funasaki *et al.*, (1988), hasta 1985 en Hawai se habían introducido 679 especies para el control de insectos, malezas y otros organismos; de 243 que se establecieron, el 8.2% (20 casos) se ha reportado atacando especies nativas hacia los cuales no iba dirigido el control, incluso un 7% atacando organismos benéficos. La mayoría de los fracasos de control biológico se han debido a errores por la carencia de planificación y pobre evaluación de los enemigos naturales antes de una introducción. En algunos casos los errores han sido tan desfavorables que se ha provocado la extinción de otras especies. Actualmente se reconoce que algún riesgo es inherente en los programas de control biológico como en cualquier otra estrategia de control. Para evitar o reducir el riesgo de la entrada de enemigos naturales, deben seguirse procedimientos científicamente comprobados (Funasaki *et al.*, 1988; Howarth, 1991).

### **2.3.4. Beneficios**

Desde el punto de vista ecológico, el éxito en control biológico es difícil de medir. Puede llamarse éxito cuando una especie introducida se establece por sí misma en la nueva área geográfica. Mientras que, desde el punto de vista de control de la plaga, la única forma de medir el éxito es la económica (Hokkanen, 1985). Según, DeBach, (1968) el éxito en control biológico ha sido clasificado en tres tipos: Éxito completo, cuando el control biológico se obtiene y mantiene contra una plaga importante sobre un área extensa, a tal magnitud que la aplicación de insecticidas se vuelve rara. Éxito sustancial, en este caso la plaga controlada o el cultivo, son menos importantes, esta situación se presenta también porque el área cultivada es pequeña, o porque ocasionalmente se requiere del uso de insecticidas y el éxito parcial que en cuyo caso el control químico permanece como necesario, sólo reduciéndose el número de aplicaciones, también se aplica a casos donde el éxito se obtiene en una pequeña porción del área infestada con la plaga.

En términos económicos, los beneficios cuando los hay, son tan buenos como los ecológicos, se ha calculado un retorno aproximado por cada dólar invertido en control biológico clásico de una plaga en relación 30:1, mientras que para el control químico la relación es de 5:1 (DeBach, 1977; Hokkanen, 1985).

El análisis económico demuestra que la proporción beneficio/costo para el control biológico exitoso es muy alto y puede exceder 145:1 (Jetter *et al.*, 1997, Gutierrez *et al.*, 1999), mostrando los beneficios de los programas de control biológico. En las últimas décadas se aprecia que el número de éxitos completos se está incrementando, lo cual es un reflejo del conocimiento que se ha generado en relación a los procesos ecológicos y a una sólida experiencia empírica, puede decirse que la disciplina está madurando (Hokkanen, 1985).

A nivel nacional, las áreas afectadas por plantas parásitas en los diferentes escenarios de: bosques bajo manejo, bosques sin manejo, áreas naturales protegidas, plantaciones con fines de restauración, arbolado urbano, entre otras, presentan diversos niveles de infección, siendo necesario implementar acciones de diagnóstico, manejo, prevención, combate y control (Comisión Nacional Forestal, 2007).

La protección al medio ambiente y el desarrollo humano sustentable van de la mano. Sin embargo, uno de los problemas importantes a nivel mundial es la conservación del ambiente y la salud humana, por lo que resulta innegable la necesidad de ampliar en la agricultura la investigación sobre la creación y utilización de métodos biológicos para la protección de los cultivos (Clemencia *et al.*, 2008.).

#### **2.4. Método de infección de hongos usados como bioplaguicidas**

La espora conidial es el estado infectivo más comúnmente usado en los plaguicidas microbiales fungosos. Otras estructuras son los fragmentos miceliales y blastosporas que han sido investigadas pero sin aplicaciones significativas. Los micoplaguicidas comerciales están basados principalmente en los conidios de los Deuteromycota. La entrada al hospedero usualmente es a través del integumento (cutícula). La mayoría de los hongos no invaden hospederos a través del aparato digestivo aún si los conidios son ingeridos. El rango de hospederos de los hongos varía desde el estrecho (pocas especies) hasta el amplio, pero algunas especies con rangos amplios pueden contener una serie de patotipos más específicos (Van *et al.*, 2007).

Las infecciones fungosas empiezan después que los conidios u otros estados infecciosos hacen contacto al azar con el hospedante susceptible, al ser movidos por viento, lluvia o animales o, en el caso de los bioplaguicidas, por la aplicación directa a la plaga. Enseguida del contacto, debe ocurrir la adhesión y germinación de los conidios en el hospedante. Las propiedades físicas y químicas de la cutícula del hospedante afectan este proceso, influyendo en el rango de hospederos del hongo. La adhesión de los conidios a menudo es ayudada por materiales mucilaginosos. El

conidio, después de ser depositado en la cutícula del hospedante y bajo humedad apropiada, produce un tubo germinal que abre brecha en el integumento del hospedante. La penetración de la hifa (tubo germinativo) ejerce presión física sobre un área parcialmente degradada por la liberación previa de enzimas digestivas sobre la cutícula (Van *et al.*, 2007).

## **2.5. Limitantes de los bioplaguicidas**

La limitación de los patógenos fungosos no es el rango de hospederos, ya que muchas especies son polífagas, sino por la falla de los conidios aplicados (concentración de conidios por mililitro) para germinar e inducir un alto nivel de infección en los hospederos. En parte, éste es un problema de cubrimiento ya que suficientes conidios deben llegar e introducirse en la cutícula de cada hospedero. Una de las condiciones más limitante para el uso de los bioplaguicidas son las condiciones desfavorables para la germinación de los conidios. Aunque los requerimientos exactos para la germinación de conidios varían entre las especies y cepas de hongos entomopatógenos, muchas especies requieren alta humedad (>80%) por períodos relativamente largos (12-24 horas). Consecuentemente, los patógenos fungosos no trabajan muy bien en áreas que rutinariamente no tienen alta humedad (Van *et al.*, 2007).

## **2.6. Control biológico de malezas**

Las malezas estropean los jardines y sus efectos son leves, sin embargo, obstruyen las vías fluviales, destruyen hábitats de vida silvestre e impiden la agricultura. Su propagación desenfrenada elimina las zonas de pastoreo y es responsable de un tercio de todas las pérdidas de cosechas en el mundo. Los cultivos y otras plantas deseadas pueden morir debido a que las malezas compiten por agua, nutrientes y luz solar o interfieren con el riego y la cosecha puede verse obstaculizada (Gary, 1991).

Ciertos hongos, bacterias y virus pueden ser producidos en masa y utilizarse como herbicidas biológicos para el control de malas hierbas en cultivos. Este es conocido como bioherbicida o la estrategia de control “inundativa” biológica, y se basa en la capacidad de manipular ciertos sistemas de las malezas que causan niveles muy dañinos en las epidemias de enfermedades durante los periodos críticos de la maleza y de esta manera disminuir los impactos presentes en los campos de cultivo (Charudattan, 2005).

Se cree que la primera introducción exitosa de un agente biológico fue a mediados de 1800, para el control de cactus (*Opuntia vulgaris*) en la India, con el insecto *Dactylopius ceylonicus* (Hemiptera: Dactylopiidae), un enemigo natural de la planta. Desde ese entonces, los insectos han

sido usados para limitar la proliferación de más de 30 especies de malas hierbas en diversas partes del mundo. La mayoría de los microbios que se estudian para el control de las malezas son los hongos, porque son patógenos muy comunes en plantas, pero también se están examinando virus, bacterias y nematodos (Gary, 1991).

El interés en el uso de fitopatógenos como agentes de control biológico de malezas se desarrolló después de 1970, basado en varios proyectos anteriores, en los que patógenos introducidos controlaron malezas invasoras (Van *et al.*, 2007). En 1971 y posteriormente, cepas de la roya *Puccinia chondrillina* Bubak & Sydow fueron llevadas desde Europa hasta Australia, donde controlaron dos de tres formas genéticas de la hierba esqueleto *Chondrilla juncea*, una plaga en campos de trigo (Hasan y Wapshere, 1973; Hasan, 1981).

La industria química está ahora tratando de desarrollar herbicidas de manera racional, estos normalmente tienen compuestos fenoxi y cuando son mal usados pueden dañar a los cultivos. Los microbios producen sustancias y las malas hierbas perjudiciales producen fitotoxinas. La aplicación de tales compuestos evitaría la necesidad de asegurar que los microbios permanezcan viables después de que se formulan y se pongan en almacenamiento o aplicados a las malas hierbas Gary (1991). Las fitotoxinas producidas por microorganismos es una alternativa promisorio por las posibilidades que tiene de incluirse en el manejo integrado de malezas como control biológico mediante la aplicación de bioherbicidas (Díaz de Villegas *et al.*, 2005).

Durante muchos años, la investigación sobre el control biológico de malezas, fue relativamente limitada y desorganizada; sin embargo, los avances en la investigación de fitotoxina y estudios de campo exitosos ha llamado la atención (Gary, 1991). Las especies de malezas exóticas son capaces de prosperar en nuevas áreas, debido en parte, a la ausencia de enemigos naturales. La búsqueda de agentes de control biológico para ser utilizados en el enfoque clásico, se realiza generalmente en el rango geográfico de origen de la maleza. Agentes con potencial se investigan para la virulencia y se introducen en la nueva región, con la expectativa de que se establecerán para proporcionar supresión de la maleza y de esta manera se espera que la población del patógeno y la maleza se equilibren (Watson, 1991).

Roskopf y colaboradores en 1999, mencionan que existen varios proyectos que conducen a la liberación intencional de fitopatógenos exóticos para el control de malezas y que existe un gran número considerable de proyectos dirigidos a agentes de control biológico clásico en desarrollo y de bioherbicidas registrados y no registrados (Cuadro 7).

Cuadro 7. Lista de los agentes bioherbicidas registrados y no registrados o en fase de mejoramiento.

Maleza	Patógenos (registrado o nombre de marca)	Cultivo (s) objetivo	País <sup>a</sup>	Estatus <sup>b</sup>
<i>Abutilon theophrasti</i>	<i>Colletotrichum coccodes</i>	Soya	Canadá	4*
<i>Acacia mearnsii</i>	<i>Cylindrobasidium laeve</i> (Stumpout®)	Plantaciones de árboles	Sudáfrica	5
<i>Aeschynomene virginica</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> f. sp. <i>aeschynomene</i> (Collego®)	Arroz y soya	EE.UU., Arkansas	5
<i>Amaranthus</i> spp.	<i>Phomopsis amaranthicola</i>	Verduras	EE.UU., Florida	3
<i>Chenopodium album</i>	<i>Ascochyta caulina</i>	Varios	Holanda	4
<i>Cuscuta</i> spp.	<i>Alternaria</i> sp.	Arándano	EE.UU., Florida	4
<i>Cyperus</i> spp.	<i>Dactylaria higginsii</i>	Varios	EE.UU., Florida	3
<i>Cyperus esculentus</i>	<i>Puccinia canaliculata</i> (Dr. BioSedge®)	Varios	EE.UU., Georgia	5*
<i>Cyperus rotundus</i>	<i>Cercospora caricus</i>	Varios	Brasil, Israel	3
<i>Cytisus scoparius</i>	<i>Fusarium tumidum</i>	Plantaciones de árboles	Nueva Zelanda Canadá	3 3
<i>Echinochloa</i> spp.	<i>Exserohilum monoceras</i>	Arroz	Australia, Japón, Filiinas-Canadá <sup>C</sup>	3 3
<i>Eichhornia crassipes</i>	<i>Cercospora rodmanii</i>	Hábitos acuáticos	EE.UU., Florida Sudáfrica; Egipto, India, SE de Asia	4* 3 3
<i>Euphorbia heterophylla</i>	<i>Helminthosporium</i> sp.	Varios	Brasil	3

Malezas gramineas	<i>Drechslera</i> spp. <i>Exserohilium</i> spp.	y Cereales	Vietnam- Australia	2
		Cítricos	EE.UU., Florida	3
<i>Hakea sericea</i>	<i>Colletotrichum</i> <i>gloeosporioides</i>	Plantaciones de árboles	Sudáfrica	4
<i>Imperata</i> <i>cylindrica</i>	<i>Colletotrichum caudatum</i>	Varios	Malasia	1
<i>Malva pusilla</i>	<i>Colletotrichum</i> <i>gloeosporioides</i> f. sp. <i>malvae</i> (BioMal®)	Varios	Canadá	5*
<i>Mikania</i> <i>micrantha</i>	<i>Cercospora mikaniicola</i>	Cultivos de plantación	Malasia	2
<i>Morrenia odorata</i>	<i>Phytophthora palmivora</i> (De Vine®)	Cítricos	EE.UU., Florida	5
<i>Poa annua</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>poae</i> (Comperico®)	Pastos de céspedes	Japón	4
<i>Pteridium</i> <i>aquilinum</i>	<i>Ascochyta pteridis</i>	Pastos	Escocia-U.K.	3
<i>Rottboellia</i>	<i>Sporisorium ophiuri</i>	Cereales	Tailandia-U.K.	3
<i>chochinchinensis</i>	<i>Colletotrichum</i> sp. nov. Nr. <i>graminícola</i> .	Cereales	Tailandia-U.K.	3
<i>Sagittaria</i> spp.	<i>Rhynchosporium</i> <i>alismatis</i>	Arroz	Australia	2
<i>Senecio vulgaris</i>	<i>Puccinia lagenophorae</i>	Varios	U. K.-Suiza	4
<i>Senna obtusifolia</i>	<i>Alternaria cassiae</i>	Soya	Brasil	3
<i>Sesbania exaltata</i>	<i>Colletotrichum</i> <i>truncatum</i>	Soya y arroz	EE.UU., Mississippi	4
<i>Solanum viarum</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>solanacearum</i> <i>Colletotrichum</i> spp.	Citrico y césped	EE.UU., Florida Brasil-U.S., Florida	3 2

<i>Sphenoclea zeylanica</i>	<i>Alternaria</i> spp.	Arroz	Filipinas	2
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Arroz	Malasia	2
<i>Striga hermonthica</i>	<i>Fusarium nygamai</i>	Varios	Sudan-Alemania	3
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cereales	Oeste de Africa-	3
	<i>Fusarium semitectum</i> var. <i>majus</i>	Sorgo	Canadá Sudan- Alemania	3
<i>Taraxacum officinale</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Césped y jardín	Canadá	4
<i>Ulex europaeus</i>	<i>Fusarium tumidum</i>	Cultivos de plantación	Nueva Zelanda	3
Varias malezas anuales	<i>Myrothecium verrucaria</i>	Varios	EE.UU., Maryland	3
Varios árboles de hoja ancha	<i>Chondrostereum purpureum</i> (Biochon™) (ECO-clear™)	Plantaciones de árboles	Holanda Canadá	5 4
Varias malezas compuestas	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tagetis</i>	Varios	EE.UU., Canadá	4
<i>Xantium</i> spp.	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	Varios	Australia	4*

*a*= Trabajo cooperativo en curso entre los países indicados. Los países indicados están comprometidos en el trabajo independiente.

*b*= Status: 1, Fase exploratoria; 2, de laboratorio y / o pruebas de efecto invernadero en marcha, 3, ensayos de campo en curso; 4, en fase de desarrollo comercial o práctica temprana; 4 \*, intento de desarrollo comercial, pero el registro incierto; 5, disponible para uso comercial o práctico; 5 \*, Registrados como herbicida microbiano disponible, pero no está disponible para su uso por razones económicas.

<sup>c</sup>Los países unidos por un guión están comprometidos en un proyecto de cooperación para desarrollar el agente bioherbicida.

## 2.7. Control biológico en áreas naturales

Los muérdagos enanos y enfermedades en especies forestales son difíciles y caros de controlar; en la mayoría de los casos las plagas forestales pueden ser imposible de controlar con métodos tradicionales. Los productos químicos al no ser selectivos en las áreas forestales puede dañar las plantas que no son el objetivo de control y pueden filtrarse a los suelos y además no deben de usarse sobre las malas hierbas que crecen cerca de cuerpos de agua. Otros motivos de preocupación con el uso de productos químicos incluyen la contaminación del suelo y alimentos; así como daños a especies en peligro de extinción. El control biológico de las plagas con sus enemigos naturales puede reducir nuestra dependencia de los productos químicos y puede llegar a ser un método alternativo de control plagas y enfermedades forestales (Charudattan 1989, Templeton 1989, Green *et al.*, 1998 citado por Askew, 2007).

Un ejemplo de control biológico clásico exitoso en un bosque fue la introducción de *Septoria passiflorae* Syd. para el control biológico de la maleza exótica poka de plátano (*Passiflora tripartita* (Juss.) Poir var. *tripartita* Holm-Nie. Jorg. Law), en diferentes sitios de bosques en Hawaii con la reducción de la biomasa por encima del 50 por ciento de la maleza después de 3 años de inoculaciones (Trujillo *et al.*, 2001).

Otro ejemplo de control biológico inundativo con éxito es *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. Sacc. f. sp. *malvae*, bajo el nombre comercial BioMal™, que se utiliza para controlar la maleza de hoja ancha malva-ronda (*Malva pusilla* Sm.) en cultivos de campo de fresa (Makowski *et al.*, 1989; Mortensen 1989; Mortensen y Makowski 1990).

*Phlebiopsis gigantea*, se utiliza para controlar *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. que es una enfermedad forestal (Barnard 1999; Roy *et al.*, 2003.). *H. annosum* es una enfermedad que se transmite principalmente a través de las infestaciones de los tocones y raíces, el contacto de raíces entre los tocones permiten que el hongo se extienda a mayor área (Barnard 1999; Roy *et al.*, 2003; Berglund 2005). En investigación sobre el agente de biocontrol *P. gigantea* por Roy *et al.*, (2003) utilizaron tocones de pino rojo y los inocularon con *H. annosum* y *P. gigantea*. El agente de control biológico *P. gigantea* inhibió la colonización por *H. annosum*, *P. gigantea* está registrada como Rotstop™ en Finlandia, Suecia, Noruega, Suiza y el Reino Unido para el uso comercial (Roy *et al.*, 2003, Berglund 2005).

El agente de control biológico *Hypholoma fasciculare* (Huds. Ex Fr.) ha sido estudiado para el control de *Armillaria ostoyae* (Romagn.) Henk., que es una enfermedad de la raíz grave en el sur de Columbia Británica, Canadá, y en todo el mundo (Allen *et al.*, 1996).

En los bosques canadienses, aislamientos nativos de *Chondrostereum purpureum* (Pers: Fr) se utilizan para controlar arbustos leñosos no deseados, *C. purpureum* también se utiliza en Europa como BioChon™, en Sudáfrica como Stumpout™ (Morris *et al.*, 1999) y en el este de Canadá, Myco-Tech™ (Askew, 2007). *C. purpureum* cepa PFC 2139 ha sido registrada en los Estados Unidos como Chontrol™. Este producto registrado fue utilizado en sitios de repoblación de coníferas y para control de malezas latifoliadas (Shamoun *et al.*, 1998; Harper *et al.*, 1999; Shamoun y De Wald 2002).

Askew en 2007, cita ejemplos de agentes de control biológico para el manejo de malezas agrícolas y bosques donde se ha visto un cierto grado de éxito (Cuadro 8 y 9).

Cuadro 8. Ejemplos de agentes de control biológico con *Colletotrichum* spp., adaptado de Butt, 2000.

Nombre común	Maleza objetivo	Agente causal	Áreas de cultivos infestados	de Empresa agente	o
Collego	Northern jointvetch	<i>C. gloeosporioides</i> f. sp. <i>aeschynomene</i>	El arroz y soya	Ecogen, Inc	
BioMal	Malva de hojas redondas	<i>C. gloeosporioides</i> f. sp. <i>malvae</i> (Penz) Penz And Sacc	Campo de cultivo	Philombios	
Burr anthracnose	<i>Xanthium spinosum</i> (LINN.)	<i>C. xanthii</i> Halst	Pastizales, Austria	en Bruce Auld	
Velgo	<i>Abutilon theophrasti</i> Medic. (Velvet leaf)	<i>C. coccodes</i> (Wallr.) S. Hughes	Habas	Alan K. Watson	
Lubao1	<i>Dodder</i>	<i>C. gloeosporioides</i> f. sp. <i>cuscutae</i> T.-Y. Zhang	Campo cultivo	de Dr. Li Yanghan	

Cassia	<i>Cassia occidentalis</i> L. (coffe senna)	<i>Colletotrichum dematium</i> (Pers: Fr) Grove	Pasto Hawaii	en Dr. Gadauska
Sida	<i>Sida spinosa</i> L. (prickly sida)	<i>Colletotrichum malvarium</i> (Braun and Casp) Southw	Algodón soya	y Kirkpatrick

Cuadro 9. Ejemplos de agentes que causan daños forestales, enfermedad que producen y agentes de control biológico.

Hongos objetivo	Enfermedades	Hongo que ejerce biocontrol	Autores y productos	
<i>Chondrostereum purpureum</i>	<i>C. purpureum</i> y otros patógenos del suelo y foliar	<i>Trichoderma viride</i> Pers ex. Gray	Trichodowels, Trichoscal, Agrimms Biológicos en Nueva Zelanda y otros (Butt <i>et al.</i> , 2001)	Trichoject,
<i>Armillaria mellea</i> (Vahl ex Fr.) Kumm	Enfermedad de la raíz: árboles	<i>Trichoderma viridae</i>	Raziq and Fox 2003	
<i>Armillaria ostoyae</i>	Enfermedad de la raíz: árboles	<i>Hipholoma fasciculare</i>	Chapman and Xiao 2000	
<i>Heterobasidium annosum</i>	Enfermedad de la raíz: árboles	<i>Trichoderma viridae</i>	Binab T, Bioinnovation Sweden (But <i>et al.</i> , 2001)	
<i>Heterobasidium annosum</i>	Enfermedad de la raíz: árboles	<i>Phlebiopsis gigantea</i> (nombre antiguo <i>Peniophora gigantea</i> )	Rotspot, Kermira, Agro Oy, Finland (Butt <i>et al.</i> , 2001)	
<i>Pythium</i> spp. Schrot.	J. Damping off: plantulas	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	T22, and T22HB, Biotrek. Root Shield (TGT) Genena, USA (Butt <i>et al.</i> , 2001)	

<i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands	Pudrición de la raíz: árboles y hierbas	<i>Leucopaxillus</i> (Cost. & Duf.)	spp. Marx 1969
<i>Cronartium ribicola</i> J. C. Fish	Roya: Pinos	<i>Tuberculina</i> Rostris	<i>maxima</i> Kimmey 1969
<i>Cronartium</i> spp	Roya: Pinos	<i>Sphaerellopsis</i> (Biv.) B. Sutton	<i>filum</i> Yuan et al. 1999, Miyagawa and Unoue 1996
Madera dura, malezas y vegetación que compiten en los sitios de coníferas	Enfermedades de las maderas duras en América del Norte	<i>Chondrostereum purpureum</i>	MYCO-TECH™ and Chontrol™ and PFC 2139 Shamoun 2003; EPA Pesticides-Fact sheet
<i>Acacia</i> spp., control de especies de malezas	Mala hierba exótica en Sudáfrica	<i>Chondrostereum purpureum</i>	Stumpout®, Morris et al., 1999
<i>Ophiostoma novo-ilmi</i> (Buisman) Nannf	Tizón del castaño	<i>Ophiostoma</i> (hypovirulent fungi)	<i>ulmi</i> Bernier et al., 1996
<i>Gremmeniella abietina</i> (Lagerb.)	Tizón del brote del pino	<i>Phaeothecea dimorphospora</i>	Yang et al., 1993 y 1995

---

## 2.7. Estrategias de control para muérdagos enanos

Los muérdagos enanos así como los árboles que infestan son parte integral de los ecosistemas de bosques naturales. Debido a que tampoco puede ser erradicado, lo mejor que se puede esperar es reducir las pérdidas provocadas a niveles aceptables. El manejo integrado de la plaga depende de las medidas de control (químicas, biológicas y silviculturales) aplicadas (Parmater, 1976).

### 2.7.1. Prevención

La prevención es el método más económico y eficiente de reducir el impacto del muérdago enano; para prevenir la dispersión desde su inicio, todos los árboles infectados deben ser extraídos

y quemados en cada área de regeneración, antes de que pueda extenderse a un nuevo rodal (Vázquez *et al.*, 2006). Esto puede llevarse a cabo por el completo aislamiento de los árboles parasitados mediante las siguientes operaciones:

Zonas de protección. Estas zonas deben ser como brechas, franjas, caminos o zonas libres de árboles susceptibles, estas nunca deben ser menores de 15 metros de ancho aún en terrenos planos. En áreas con declive pronunciado donde los árboles infectados se encuentran en la parte alta de la zona protectora se debe aumentar de 30 a 50 cm la anchura por cada grado de pendiente (León, 1983).

Otra medida preventiva es plantar especies no susceptibles al ataque del muérdago en zonas adyacentes al arbolado infectado y que también sirva de barrera para evitar reinfecciones (León, 1983).

### **2.7.2. Control silvícola**

Los muérdagos enanos pueden ser controlados por prácticas silvícolas (Quick 1964, Hawksworth y Stevens 1970, Hawksworth *et al.*, 1977). El mejor medio de controlar a los muérdagos enanos es mediante la eliminación física del parásito. Esto se hace al podar las ramas infectadas o al cortar los árboles completos que ya han sido infectados (Geils, 2002).

El manejo de sitios infectados por muérdago enano involucra detección, evaluación, prevención y supresión del patógeno. Esas acciones deben seguir una secuencia bien planeada para la reducción exitosa de la enfermedad (Hawksworth y Johnson, 1989).

El muérdago enano es un parásito obligado que requiere de un hospedero vivo para desarrollarse. Una vez que el árbol infectado o la rama son cortados el muérdago muere. El muérdago enano está confinado a una sola especie de hospedero o a un grupo de especies relacionadas cercanamente, por lo que especies inmunes o raramente infectadas pueden ser favorecidas durante los tratamientos al sitio (Hawksworth y Wiens, 1996).

El manual de la CONAFOR (2006) indica que para aplicar un control es necesario podar todas las ramas con muérdago; en el caso de *Pinus* no debe exceder el 50% de la copa, pues en este caso el árbol muere; procurando también podar las ramas que puedan presentar una infección. En caso de que el muérdago se encuentre en el tronco, el arbolado se debe remover y a su vez realizar una reevaluación del rodal cada dos años para evitar nuevamente una reinfección por este parásito (Flores, 2008).

### 2.7.3. Control genético

Estas especies son seleccionadas mediante la manipulación de las masas infectadas eliminando los árboles infectados y dejando aquellos cuyas características les han permitido resistir o evitar la infección permitiendo la proliferación de progenies mejoradas. La evidencia ocasional de resistencia a muérdago enano ha sido observada en varias combinaciones de parásito hospedero. *Arceuthobium vaginatum* en *Pinus ponderosa*, *A. campylopodum* en *P. ponderosa*, *P. jeffreyi*, *A. americanum* en *P. contorta*, *A. tsugense* en *Tsuga heterophylla* y *A. chinense* en *Keetleeria evelynianab* (Hawsworth y Wiens, 1996).

### 2.7.4. Control biológico

A pesar de que se conocen organismos patógenos o depredadores del muérdago enano ninguno se ha estudiado lo suficiente para considerar su desarrollo como agente de control biológico (Hawsworth y Wiens, 1972). Los insectos y algunos hongos son a menudo altamente destructivos de muérdagos enanos en algunas áreas en ciertos años. Sin embargo, sus efectos totales sobre las poblaciones son probablemente insignificantes. La probabilidad de desarrollar insectos u hongos como agentes prácticos del control en el futuro cercano parece alejada (Hawsworth y Wiens, 1996).

#### 2.7.4.1. Hongos

*Septogloeum gilli*. Parásito de varias especies, no requiere heridas para iniciar su ataque. Causa antracnosis y muerte prematura de un gran número de tallos y frutos, Las plantas masculinas son más susceptibles que las femeninas. Prefiere temperaturas de 11° a 22.7°C y su ciclo va de 6 a 8 semanas para que aparezcan las lesiones (Vega, 1976 y De la Paz, 1976).

*Colletotrichum gloeosporioides*. Causa la esterilización de las ramas, mata rápidamente los tallos en todas sus fases de desarrollo, invadiendo también el sistema endofítico y las condiciones en que se desarrolla el hongo son en extremas condiciones de temperatura y humedad. Desde la infección inicial hasta la aparición de síntomas, le toma de 2 a 3 semanas (Vega, 1976 y De la Paz 1976).

*Wallrthiela arceuthobii*. Ataca en forma intensa principalmente los órganos florales pistilados evitando el desarrollo de la semilla, pero es difícil obtener material de reproducción (Vega, 1976 y De la Paz 1976).

*Fusarium* spp.- Encontrados por Ellis Don en el material botánico de Gill (*A. campilodum*), ataca las plantas masculinas (Vega, 1976).

Tres parásitos fungosos parecen ser muy promisorios en el control biológico de muérdagos enanos (*Arceuthobium spp*), los cuales son los principales patógenos de las coníferas del Oeste de Norte América. Estos son los hongos *Septogloeum gillii*, *Wallrothiella arceuthobii* y *Colletotrichum gloeosporioides*. *C. gloeosporioides* tiene la ventaja sobre los otros patógenos del muérdago de que puede crecer más fácilmente en cultivos y la enfermedad se desarrolla más rápidamente en el huésped. El sistema endofítico del huésped es invadido por *C. gloeosporioides*, lo cual no parece ser el caso con *S. gillii* y *W. arceuthobii* (Charles, 1969).

Se han hecho pocos trabajos referentes al control del muérdago enano con hongos que pueden servir como agentes de control biológico; y los trabajos existentes, se han hecho con *Colletotrichum gloeosporioides*, como se reportan en estos trabajos:

Se usaron 5 aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* en brotes y frutos de muérdagos. Las ramas se colocaron en lana de roca con nutrientes y los brotes de muérdago fueron inoculados con la suspensión de conidios. Los niveles de daños variaron entre 40 y 60% en los brotes y de 60 a 80% en los frutos. Se encontraron diferencias significativas entre los aislamientos aplicados y el testigo ( $p = 0,02$  y  $0,001$ , respectivamente), y no se observaron diferencias entre los aislamientos para los brotes y frutos (Askew *et al.*, 2009).

Uno de los aislados de *Colletotrichum gloeosporioides* que se obtuvo en *Arceuthobium americanum* fue seleccionado para la evaluación sobre la base de su crecimiento y la esporulación. El hongo fue formulado por el método de 'Stabileze' y se inoculó en *A. americanum* en condiciones de campo. Hubo mayor incidencia de *C. gloeosporioides* en los muérdagos tratados que en el testigo. En algunas repeticiones el tratamiento redujo la producción de fruto, lo que lleva a una disminución en la capacidad reproductiva del muérdago enano; sin embargo la eficacia es muy variable y no significativa (Ramsfield *et al.*, 2005).

En un estudio similar, realizado por Askew *et al.*, (2011) con *Colletotrichum gloeosporioides*, éste fue probado para el control biológico de *Arceuthobium tsugense* en cicuta occidental (*Tsuga heterophylla*) en Canadá. Se realizó un ensayo en campo con tres tratamientos. Los tratamientos consistieron de *C. gloeosporioides* formulado con 'Stabileze' (incorporación de hongos en una matriz de almidón absorbente de agua con aceite y sacarosa, a continuación, la granulación de la matriz con sílice hidratada), que se pulverizó sobre (1) hinchazones de muérdago intacto, (2) hinchazones en el que todos los brotes de muérdago habían sido cortadas a 0.5 cm de la base del tallo y (3) *C. gloeosporioides* formulado en una preparación de sacarosa y gelatina rociado en

hinchazones de muérdago intactas. Los tratamientos 'Stabileze' y sacarosa-gelatina formulados con *C. gloeosporioides* redujeron la cosecha de frutos en un 36.8 y 40.5%, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Mientras que los resultados para los brotes parecen prometedores, la contaminación en los controles, limita la capacidad de detectar los efectos del tratamiento de manera clara. El cultivo de varios tejidos vivos, así como muertos mostró que *C. gloeosporioides* fue incapaz de invadir y matar el sistema endofítico del muérdago en el xilema y el floema del huésped.

Quintana en el 2008, reporta que el uso del Muérdago Killer® en dosis de 7.5 % ejerce un buen control para el muérdago enano, en regeneración de *Pinus pseudostrobus*. Además de ser un producto biológico, que no causa daño al medio ambiente ni al hospedante y recomienda que se hagan aplicaciones periódicas, (cada tres o cuatro meses), ya que estos productos no eliminan el sistema endofítico.

Uno de los beneficios que se puede tener en la aplicación de hongos a los muérdagos, es que al tener daños en los tallos o brotes de los muérdagos, se puede reducir la producción de fruto y así disminuir la capacidad de dispersión del mismo y de la planta parásita.

#### **2.7.4.2. Insectos**

Existen insectos que se alimentan de los tallos ocasionándole serios daños, entre estos: *Clastoptera obtusa* (Cercopidae, Homóptera), *Neoborella tumida* (Miridae, Hemiptera), *Mitoura spinetoeum* (Theclinae, Lepidoptera), *Dasypyga alternosguamella* (Pyralidae), *Galechia nacalls* (Gellechidae) y *Peronea* sp. (Tortricidae) (Vega, 1976).

No obstante, la existencia de enemigos naturales como los mencionados anteriormente, ninguno de ellos parece tener una importancia de consideración como posible agente de control, el daño que causan, en la mayoría de los casos es mínimo en relación con la magnitud de distribución de la plaga (Vega, 1976). Tanto hongos como insectos proveen de un control limitado destruyendo solo las partes aéreas. Pero aunque no erradican el parásito, si reducen su capacidad de dispersión o intensificación (De la Paz, 1974).

#### **2.8. Control químico**

Existen numerosos estudios sobre el manejo del muérdago a través de productos químicos.

El muérdago enano ha sido tratado con diversos compuestos químicos, principalmente herbicidas, lográndose eliminar los tallos, pero no el sistema endofítico. Los mejores resultados han sido obtenidos con el uso de 2, 4-D, MCP 4-2-metil-4-cloro-fenoxi y Ethephon; en arbolado joven y renuevo. Las experiencias en México con el uso del Ethephon son en los estados de México

y Michoacán, en *Pinus hartwegii* y *P. pseudostrobus* parasitados por *Arceuthobium globosum*, en ambos casos se logra un excelente control con dosis de más de 2000 ppm del producto disuelto en agua y asperjado sobre la planta parásita (Alvarado y Cibrián, 1991).

Hawksworth y Johnson (1988), mencionan que en Estados Unidos de Norteamérica y Canadá, se han llevado a cabo más de 260 pruebas para control químico, sin que se obtenga resultados favorables, puesto que dañan al hospedante y no se elimina el sistema endófito del muérdago enano.

Nicholls *et al.*, 1986 y Nicholls, 1988, citan que se realizaron pruebas durante tres años en *Pinus contorta* y *P. ponderosa* parasitados con *A. americanum* y *A. vaginatum* subsp. *cryptopodum*, utilizando Ethepon en dosis de 2500 ppm mostrando un control efectivo del 74 y 100 % de abscisión de la planta parásita, la mayoría de la abscisión se presentó entre las 2 y 5 semanas; el producto no elimina el sistema endofítico, pero se reduce la dispersión de la semilla por más de 4 años, se sugiere realizar una nueva aplicación después de 5 años.

Beatty *et al.*, 1988; Frankel y Adams, (1988); Nicholls, (1988); Parks y Hoffman, (1988); Hawksworth y Wiens (1996), mencionan que las dosis aplicadas de Ethepon varían de 500 a 5000 ppm; sin embargo, los mejores resultados obtenidos es con 1250 ppm para el control de *Arceuthobium* y de 2500 ppm para el control de *Phoradendron*, el impacto se observa entre las 2 y 3 semanas después de realizar la aplicación. La abscisión de la parte aérea de la planta (33 a 100%) varía con la dosis utilizada. En ninguno de los casos hay eliminación del sistema endofítico del muérdago. El producto se ha utilizado en diversas especies de muérdago enano (*A. americanum*, *A. douglasii*, *A. pusillum*, *A. vaginatum*, *A. divaricatum*, *A. laricis* y *A. campylopodum*), en diferentes especies de hospedantes (*Pinus eludis*, *P. ponderosa*, *P. contorta*, *P. banksiana*, *P. jeffreyi*, *Picea mariana*, *Pseudotsuga menziesii* y *Larix occidentalis*).

Robbins *et al.*, 1989 citado por Vázquez *et al.*, 2006, señalan que la aspersión realizada con equipo terrestre es muy efectiva, mientras que en forma aérea es ineficaz, pues no se pone suficiente producto en contacto con el muérdago para causar la muerte de la planta.

En México no existen trabajos sobre control biológico en el muérdago enano. Este trabajo tuvo en principio la búsqueda de agentes de control biológico y después de los resultados obtenidos se planteó el siguiente objetivo.

### 3. OBJETIVO

Evaluar la patogenicidad de los hongos obtenidos de muérdagos enanos en la Cuenca del Valle de México bajo condiciones de campo.

### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Los aislados se obtuvieron de los muérdagos enanos: *Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum*, *A. globosum* subsp. *globosum* y *A. abietis-religiosae*, colectados en los bosques de coníferas de la Cuenca del Valle de México descritos en el capítulo anterior y que fueron identificados morfo-molecularmente.

#### 4.1. Fase de laboratorio.

##### 4.1.1. Conservación de muérdagos para los ensayos de patogenicidad.

Para poder realizar las pruebas "in vitro", era necesario poder conservar los muérdagos; para eso se estableció un experimento que duró 12 días y se probaron los siguientes tratamientos: agua y agar (1g/L), agua destilada estéril, hidrogel y leche de coco. Cada tratamiento consistió de 9 repeticiones (las ramas de pino con muérdagos se cortaron en segmentos de 10 cm, aprox.), también se utilizaron muérdagos desprendidos del hospedante y se hicieron pruebas con frutos (5 frutos por cada tratamiento) (Figura 11).

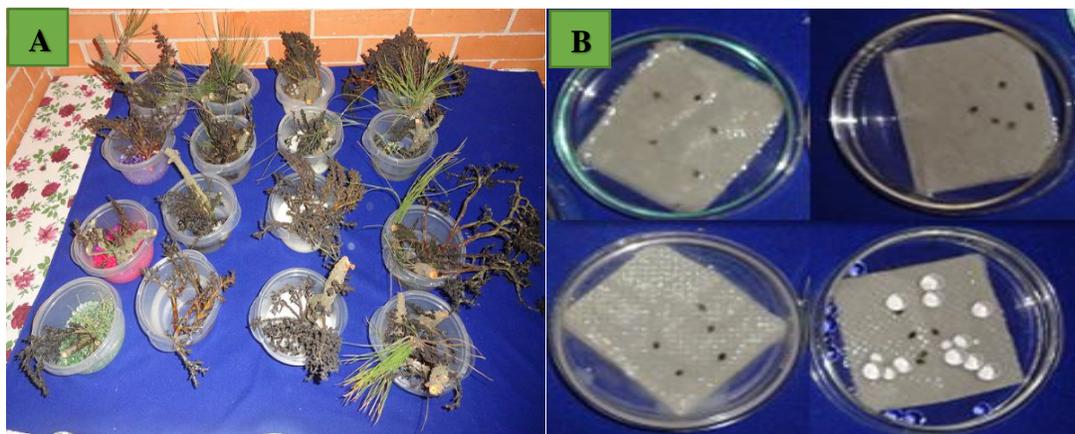


Figura 11. A-B) Conservación de ramas y frutos en hidrogel, agua y agar (1g/L), leche de coco y agua destilada estéril.

##### 4.1.2. Inoculación de plantas de muérdago

Con base en los resultados anteriores, se utilizaron ramas de pino con muérdago y se inocularon las cepas de los hongos aislados en campo. Antes de la aplicación de los tratamientos, las ramas

fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 3% durante 3 minutos, y se hizo un triple lavado con agua destilada estéril; posteriormente se esperó que se secaran. Las ramas con muérdagos fueron colocados en un contenedor que contenía agua y agar (1g/L), en cada contenedor se colocaron 4 ramas. En total se aplicaron 19 tratamientos y se probaron dos suspensiones de conidios  $2 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$  de las cepas de *Fusarium* spp. (CP-Avv-3, Avv-Ixpo-3, Aar-Ixpo-8); *Alternaria* spp. (Cp-Agg-17, DL-Avv-2, Aar-Ixpo-9) y *Phoma* spp. (Cp-Avv-16, NT-Agg-14, NT-Agg-17), más el testigo que únicamente se le aplicó agua destilada estéril. Las ramas se colocaron en el contenedor y se les aplicó los tratamientos hasta punto de goteo; cada contenedor se colocó encima de un recipiente que contenía agua destilada estéril con el objetivo de formar una cámara húmeda, cada tratamiento se colocó dentro de una bolsa y se cerró. La temperatura y humedad relativa que se alcanzó en las bolsas fue de 23°C y 90%; los tratamientos se dejaron durante 48 como periodo de incubación y posteriormente se les quitó la bolsa (Figura 12). Se evaluó el experimento durante 12 días. Para la evaluación de los tratamientos se utilizó una escala arbitraria (Figura 13). El experimento fue un diseño completamente al azar.

#### **4.1.3. Análisis de datos en la conservación de las plantas y frutos de muérdago**

Por el tamaño del experimento y número de repeticiones que se utilizaron, los datos fueron analizados por el programa Statistix 8.1, en particular la prueba exacta de Fisher's. El experimento duró 12 días y se evaluó la turgencia en las ramas y vigorosidad en frutos.

#### **4.1.4. Análisis de datos para la severidad de las diferentes concentraciones de conidios de *Alternaria* spp; *Phoma* spp; *Fusarium* spp.y pruebas de campo**

Los datos tomados con la escala que se propuso, fueron analizados en el software SAS 9 (Sistema de Análisis Estadístico) y por ser datos no paramétricos se hizo con la Prueba de Kruskal-Wallis y se hizo una comparación múltiple de medias de los rangos para elegir el mejor tratamiento.



Figura 12. A) Aplicación de tratamientos, B) Tratamientos en bolsas, C) Temperatura y humedad que se alcanzaron en las bolsas, D) Síntomas observados en los tratamientos, desde marchitez hasta necrosis, E) Testigo y F) Re-aislado.

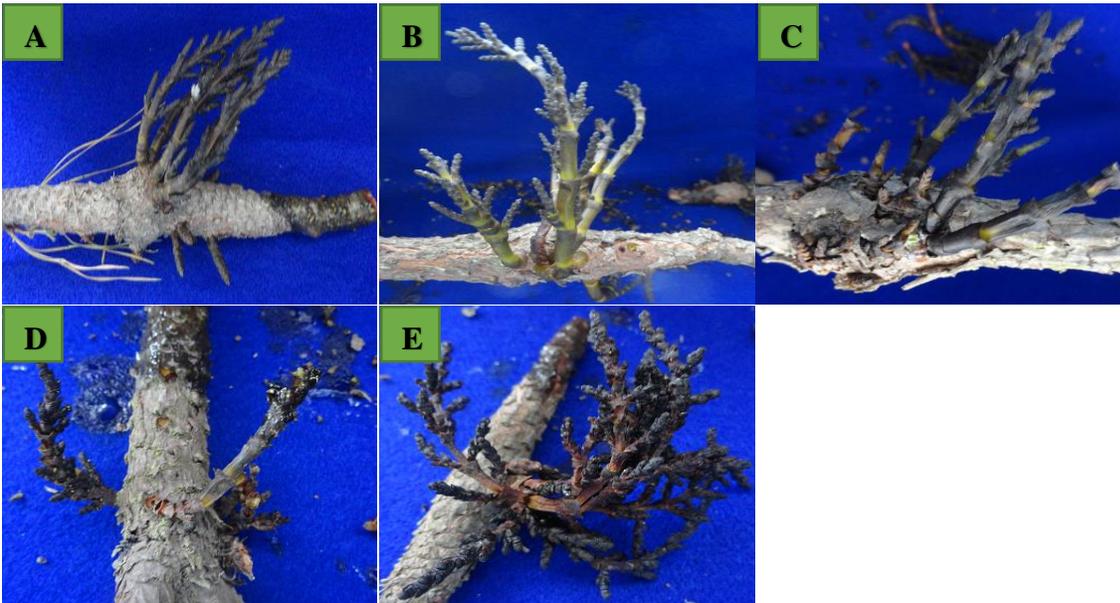


Figura 13. Escala de calificación de la enfermedad en plantas parásitas inoculadas con hongos. A) 0= sano, B) Escala 1= 1-25% (10% M), C) Escala 2= 26-50% (30-35% M), D) Escala 3= 51-75% (75% M) y E) Escala 4=76-100% (100% M). M= Muerto.

## 4.2. Fase de campo

Los mejores tratamientos “in vitro”, se llevaron a campo. El experimento se estableció en el Parque Nacional Zoquiapan (PNZ). Antes de la aplicación, se etiquetaron los arboles con un listón y con diferentes colores a los muérdagos que se les aplicó los tratamientos. Los árboles que se utilizaron para el experimento se encontraban separados 50m aproximadamente con el fin de evitar contaminación entre los tratamientos. Las concentraciones de conidios que se ocuparon fueron  $1 \times 10^6$  conidios/mL para *Fusarium solani* y *Phoma glomerata*;  $1 \times 10^5$  conidios/mL para *Alternaria alternata*., al agua destilada estéril se le agregó un adherente de nombre comercial Datplus (1.5mL/L de Agua) alcanzando un P.H. de 5.5; el material biológico se preparó en el Laboratorio de Patología Forestal del COLPOS, y se transportó a campo en una hielera con hielos, esto con el fin de bajar la temperatura y así evitar la germinación de los conidios. Una vez en campo, se desinfectaron las plantas de muérdago previamente seleccionados; esto se realizó con la aplicación de hipoclorito de sodio al 3% durante tres minutos y un lavado con suficiente agua destilada estéril; se esperó que se seicara por unos minutos y enseguida se les aplicó a punto de goteo (aproximadamente 10mL de suspensión de conidios por repetición). Al testigo únicamente se le aplicó agua destilada estéril con adherente. Se hicieron dos aplicaciones, la segunda se llevó acabo 15 días después (Figura 14). Las evaluaciones se hicieron cada ocho días, durante dos meses, a través de la escala que se estableció en el experimento “in vitro” (Figura 13). El experimento fue un diseño completamente al azar.

Una vez que se observó el primer síntoma en los muérdagos, se esperó dos semanas más hasta observar la mayor cantidad de síntomas posibles en los diferentes muérdagos y de los diferentes tratamientos. El material colectado se trajo al Laboratorio de Sanidad Forestal del COLPOS; donde se procesaron las muestras, siguiendo el mismo procedimiento como se mencionó anteriormente.



Figura 14. A) Distancia de 50 m entre árboles, B-C) marcado con listón y colores a los muérdagos de los diferentes tratamientos, D) transporte de los tratamientos en hielera con hielo, E) aplicación de hipoclorito de sodio al 3% durante tres minutos y F) aplicación de tratamiento con adherente 1.5mL en un litro de agua.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Conservación de brotes de muérdago y frutos

En la prueba de conservación de ramas de pino con plantas de muérdago, los mejores tratamientos fueron: agua y agar (1g/L) y agua destilada estéril (Figura 15), donde sobrevivieron 6 plantas por cada tratamiento a los 12 días después de haberse establecido el experimento (Cuadro 10).

En muérdagos desprendidos de las ramas, no fue posible la conservación, estos se secaron al tercer día después de haberse establecido el experimento.

Cuadro 10. Número de plantas conservadas en forma “in vitro” del muérdago enano *A. globosum* subsp. *grandicaule*.

Tratamiento	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Muérdago desprendido
Leche de coco	0	0	0	0
Agua-Agar (1g/L)	2	2	2	0
Agua destilada estéril	2	2	2	0
Hidrogel	0	0	0	0

En la conservación de frutos de *A. globosum* subsp. *grandicaule*, los mejores tratamientos fueron: agua y agar (1g/L) e hidrogel, donde se conservaron al menos 4 frutos por tratamiento después de 12 días (Cuadro 11).

Cuadro 11. Número de frutos conservados “in vitro” por cada tratamiento del muérdago *A. globosum* subsp. *grandicaule*.

Tratamiento	Número de frutos	Frutos sanos
Leche de coco	5	0 (5 contaminados)
Agua-Agar (1g/L)	5	4 (1 contaminado)
Agua destilada estéril	5	2 (3 secos)
Hidrogel	5	4 (1 contaminado)

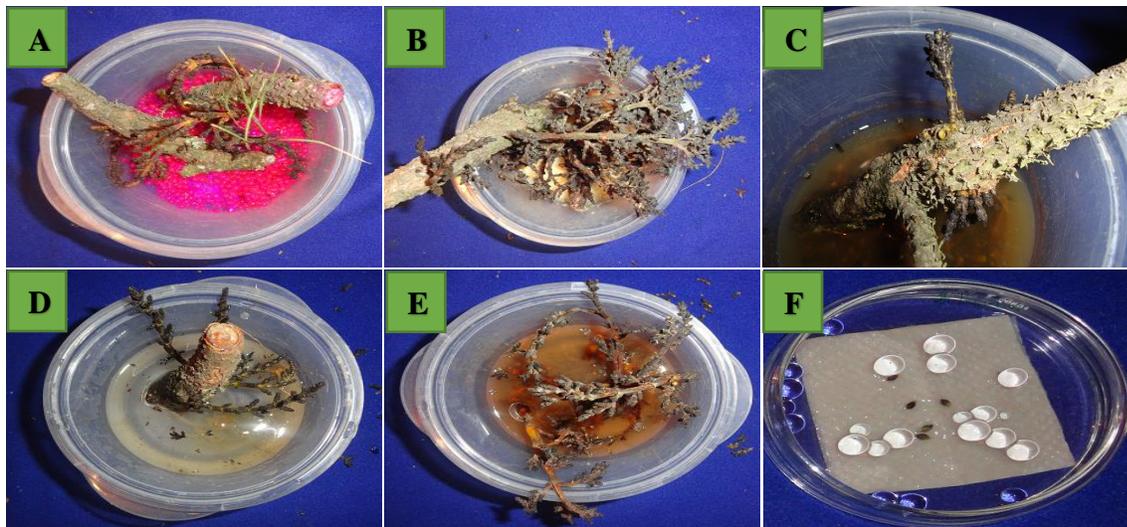


Figura 15. A) Tratamientos empleados para la conservación de brotes y frutos de *A. globosum* subsp. *grandicaule*. A) Hidrogel, B) Leche de coco, C) Agua destilada estéril, D) Agua y Agar (1g/L), E) Muérdago desprendido en agua destilada estéril y F) Frutos en agua destilada estéril.

**5.1.1. Prueba exacta de Fisher's para el análisis “in vitro” de conservación de ramas y frutos de *A. globosum* subsp. *grandicaule***

En la prueba exacta de Fisher's, de acuerdo al número de éxitos obtenidos en la conservación de los muérdagos, los mejores tratamientos fueron: agua y agar (1g/L) y agua destilada estéril, comparados con los otros tratamientos; sin embargo, al comparar mediante la prueba exacta de Fisher's a ambos tratamientos no se encontró diferencia significativa (Cuadro 12), pero en agua y agar la turgencia de los muérdagos se vió mejor favorecida.

Cuadro 12. Prueba exacta de Fisher's para establecer el mejor tratamiento “in vitro” para la conservación de las plantas de muérdago.

Tratamiento	Tamaño de muestra	Éxitos	Proporción entre dos tratamientos	Fisher's Exact
Leche de coco	9	0	Leche de coco-Agua y Agar (1g/L) (0-6). 0.0-0.6667	0.0090
Agua y Agar (1g/L)	9	6	Leche de coco-Agua destilada estéril (0-6). 0.0-0.6667	0.0090
Agua destilada estéril	9	6	Agua y Agar (1g/L)-Agua Destilada Estéril (6-6). 0.6667-0.6667	1.0000
Hidrogel	9	0	Agua y Agar (1g/L)-Hidrogel (6-0). 0.6667-0.0	0.0090
-----	-----	-----	Agua destilada estéril-Hidrogel (6-0). 0.6667-0.0	0.0090

En la conservación de los frutos de muérdago, los mejores tratamientos en base a los resultados obtenidos en la prueba exacta de Fisher's, fueron: agua y agar (1g/L) e hidrogel, comparados con los otros tratamientos; sin embargo, en la comparación de ambos tratamientos no se encontró diferencia significativa (Cuadro 13), y en hidrogel los frutos se vieron más favorecidos en cuanto a turgencia 12 días después de haberse establecido el experimento.

Cuadro 13. Prueba exacta de Fisher's para establecer el mejor tratamiento “in vitro” para la conservación de frutos de muérdago.

Tratamiento	Tamaño de muestra	de Éxitos	Proporción	Fisher's Exact
Leche de coco.	5	0	Leche de coco-Agua y Agar (1g/L) (0-4). 0.0-0.8	0.0476
Agua y Agar (1g/L)	5	4	Leche de coco-Hidrogel (0-4). 0.0-0.8	0.0476
Agua destilada estéril	5	2	Leche de coco-Agua destilada estéril (0-2). 0.0-0.4	0.4444
Hidrogel	5	4	Agua Destilada Estéril-Agua y Agar (1g/L) (2-4). 0.4-0.8	0.5238
-----	-----	-----	Agua destilada estéril - Hidrogel (2-4). 0.4-0.8	0.5238
			Agua Agar (1g/L)-Hidrogel (4-4). 0.8-0.8	1.0000

Los resultados obtenidos para la conservación de plantas concuerdan en ciertos aspectos con los obtenidos por Kope *et al.*, 1997. El menciona que las ramas con muérdagos se conservan mejor en una solución nutritiva de Hoagland, sin embargo en este trabajo se encontró que una manera de conservar los muérdagos es usando Agua-Agar (1g/L) y agua destilada estéril; sin embargo, en el primero los muérdagos se muestran más vigorosos, esto tal vez se debe a la diferencia de temperatura que existe entre el agua agar y agua destilada estéril (2°C de diferencia).

Askew y colaboradores (2009), reportaron que los muérdagos no pueden conservarse “in vitro” al ser desprendidas de la rama ya que a la semana se deterioraron y se fragmentaron; esto se corroboró cuando se quiso conservar los muérdagos desprendidos de ramas y al tercer día los se secaron y se fragmentaron al quererlos conservar en agua y agar (1g/L), leche de coco, hidrogel y agua destilada estéril.

### 5.1.2 Inoculación en plantas de muérdago

De las cepas seleccionadas de *Fusarium* spp. *Alternaria* spp. y *Phoma* spp. (3 de cada género) y el testigo, se realizó el re-aislado de los hongos inoculados a los siete días después de haberse establecido el experimento y una vez que se observaron los síntomas (Cuadro 14).

Cuadro 14. Re-aislado de los hongos que se aplicaron en forma "in vitro".

Hongo	Clave	Síntomas	Re-aislado 20,000 conidios			Re-aislados 100,000 conidios		
			<i>Fusarium</i> spp	<i>Alternaria</i> spp	<i>Phoma</i> spp	<i>Fusarium</i> spp	<i>Alternaria</i> spp	<i>Phoma</i> spp
<i>Fusarium</i> spp.	Avv-Ixpo-3	Marchitez y necrosis	2			4		
<i>Fusarium</i> spp.	Cp-Avv-3	Marchitez y necrosis	3			7		
<i>Fusarium</i> spp.	Aar-Ixpo-8	Necrosis	4			7		
<i>Alternaria</i> spp.	Cp-Agg-17	Marchitez y necrosis		4			4	
<i>Alternaria</i> spp.	DL-Avv-2	Marchitez		4			4	
<i>Alternaria</i> spp.	Aar-Ixpo-9	Marchitez		2			4	
<i>Phoma</i> spp.	Cp-Avv-16	Marchitez y necrosis			7		1	2
<i>Phoma</i> spp.	NT-Agg-14	Marchitez			2			3
<i>Phoma</i> spp.	NT-Agg-17	Necrosis		1	2			2
Testigo	-----	Sin síntomas		2	-----	-----	-----	-----

## 5.2. Análisis estadístico “in vitro” de la severidad bajo diferentes concentraciones de conidios de *Alternaria spp*, *Phoma spp* y *Fusarium spp*.

Los síntomas fueron visibles al cuarto día después de haberse llevado a cabo la inoculación y se evaluaron a través de la escala propuesta. Los datos se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis y se ajustaron las medias para encontrar la mejor cepa y la cantidad de inóculo a aplicarse en campo para obtener un mejor control del muérdago enano. Los análisis estadísticos se presentan en los cuadros 15 al 22.

### 5.2.1. Primer análisis entre concentraciones

Para la evaluación de la severidad, se compararon las dos concentraciones de conidios aplicados ( $2 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$  conidios/mL); estas comparaciones se llevaron a cabo al cuarto día después de observar los síntomas; con el único objetivo de determinar la cantidad de inóculo adecuado para tener un mejor control de las plantas de muérdago.

En la prueba de Kruskal-Wallis se encontró que existe diferencia significativa con un pi-valor de 0.04, y una confiabilidad del 95%, encontrándose que  $1 \times 10^5$  conidios/mL ejerce mejor control del muérdago enano (Cuadro 15).

Cuadro 15. Análisis estadístico entre concentraciones de conidios para determinar la mejor cantidad a aplicarse en campo.

Día	Tratamiento	Media de rangos	Agrupación Kruskal-Wallis
4	20,000 conidios/mL	36.0250000	A
4	100000 conidios/mL	44.9750000	B

### 5.2.2. Análisis estadístico en pruebas “in vitro” para definir la mejor cepa dentro de cada concentración

Dentro de cada concentración, fue necesario determinar la mejor cepa de hongo de cada género inoculado en las plantas de muérdago.

#### 5.2.2.1. Concentraciones de $2 \times 10^4$ conidios/mL

Se encontró que existe diferencia entre los tratamientos con un pi-valor de 0.0001 en la prueba de Kruskal-Wallis, encontrándose que los tres géneros de hongos inoculados son iguales pero diferentes al testigo (Cuadro 16).

Cuadro 16. Comparación múltiple de medias de los rangos de los tratamientos aplicados para determinar el mejor género de hongo inoculado.

Tratamiento	Hongo	Media de rangos	Agrupación Kruskal-Wallis
T2	<i>Phoma</i> spp	351.26	A
T3	<i>Fusarium</i> spp	330.67	A
T1	<i>Alternaria</i> spp	324.55	A
T4	Testigo	147.50	B

Al encontrar diferencias entre los tratamientos. Se compararon los datos de severidad, para determinar la mejor cepa en cada uno de los hongos aplicados.

Para *Fusarium* spp, se encontró que existe diferencia entre cepas y se obtuvo un pi-valio de 0.0022 con una confiabilidad del 95%. Las mejores cepas fueron: Avv-Ixpo-3 y CP-Avv-3 (Cuadro 17).

Cuadro 17. Comparación múltiple de medias para determinar la mejor cepa de *Fusarium* spp.

Tratamiento	Clave	Hongo	Media de rangos	Agrupación Kruskal-Wallis
T7	Avv-Ixpo-3	<i>Fusarium</i> spp	83.43	A
T9	CP-Avv-3	<i>Fusarium</i> spp	77.87	A
T8	Aar-Izpo-8	<i>Fusarium</i> spp	56.18	B

Para las cepas de *Alternaria* spp. y *Phoma* spp. no se encontraron diferencias entre ellas de acuerdo a la prueba de Kruskal-Wallis; con pi-valios de 0.32 y 0.59 respectivamente (Cuadro 18 y 19).

Cuadro 18. Comparación múltiple de medias para determinar la mejor cepa de *Alternaria* spp.

Tratamiento	Clave	Hongo	Media de rangos	Agrupación Kruskal-Wallis
T1	CP-Agg-17	<i>Alternaria</i> spp	79.07	A
T2	DL-Avv-2	<i>Alternaria</i> spp	71.58	A
T3	Aar-Izpo-9	<i>Alternaria</i> spp	66.85	A

Cuadro 19. Comparación múltiple de medias para determinar la mejor cepa de *Phoma* spp.

Tratamiento	Clave	Hongo	Media de rangos	Agrupación Kruskal-Wallis
T4	NT-Agg-17	<i>Phoma</i> spp	76.38	A
T5	NT-Agg-14	<i>Phoma</i> spp	73.18	A
T6	CP-Avv-16	<i>Phoma</i> spp	67.94	A

#### 5.2.2.2. Concentraciones de $1 \times 10^5$ conidios/mL.

Entre los géneros de hongos inoculados no se encontraron diferencias significativas, pero sí respecto al testigo con un *pi*-valio de 0.0001 (Cuadro 20).

Cuadro 20. Comparación múltiple de medias para determinar el mejor tratamiento.

Tratamiento	Hongo	Media de rangos	Agrupación Kruskal-Wallis
T2	<i>Phoma</i> spp	578.10	A
T1	<i>Alternaria</i> spp	552.55	A
T3	<i>Fusarium</i> spp	538.65	A
T4	Testigo	204.50	B

Al encontrar diferencias entre tratamientos, se compararon las tres cepas de cada hongo, con el objetivo de determinar la mejor cepa para el control del muérdago enano.

En cepas de *Alternaria* spp. se encontró diferencia con un *pi*-valio de 0.0034, y la mejor fue: CP-Agg-17 (Cuadro 21), de la misma forma se encontró diferencias en cepas de *Phoma* spp. con un *pi*-valio de 0.0001 y las mejores fueron: NT-Agg-17 y NT-Agg-14 (Cuadro 22).

Cuadro 21. Comparación múltiple de medias para determinar la mejor cepa de *Alternaria* spp.

Tratamiento	Clave	Hongo	Media de rangos	Agrupación Kruskal-Wallis
T1	CP-Agg-17	<i>Alternaria</i> spp	87.29	A
T2	DL-Avv-2	<i>Alternaria</i> spp	70.60	B
T3	Aar-Ixpo-9	<i>Alternaria</i> spp	59.60	B

Cuadro 22. Comparación múltiple de medias para determinar la mejor cepa de *Phoma* spp.

Tratamiento	Clave	Hongo	Media de rangos	Agrupación Kruskal-Wallis
T4	NT-Agg-17	<i>Phoma</i> spp	83.87	A
T5	NT-Agg-14	<i>Phoma</i> spp	81.73	A
T6	CP-Avv16	<i>Phoma</i> spp	51.88	B

En las cepas de *Fusarium* spp, no se encontraron diferencia al obtener un pi-valio de 0.21 (Cuadro 23).

Cuadro 23. Comparación múltiple de medias de *Fusarium* spp. para determinar la mejor cepa.

Tratamiento	Clave	Hongo	Media de rangos	Agrupación Kruskal-Wallis
T7	Avv-Izpo-3	<i>Fusarium</i> spp	76.81	A
T8	Aar-Izpo-8	<i>Fusarium</i> spp	64.10	A
T9	CP-Avv-3	<i>Fusarium</i> spp	76.59	A

### 5.3. Resultados de los ensayos de campo

Los síntomas en campo se observaron ocho días después de haberse llevado a cabo la inoculación. Las cepas de *Fusarium solani* y *Alternaria alternata*, mostraron síntomas de marchitez y necrosis. La mayor incidencia de la enfermedad se observó en aplicaciones de *Fusarium solani* (CP-Avv-3). Tres semanas después de la primera inoculación aparecieron los síntomas de *Alternaria alternata* (CP-Agg-17), la cepa de *Phoma glomerata* (NT-Agg-17) y el testigo no causaron síntoma alguno (Figuras 16 y 17).

El siguiente paso fue el procesamiento de los tejidos con síntomas de marchitez y necrosis colectados de las inoculaciones realizadas. Los hongos reaislados se muestran en el cuadro 24.

Cuadro 24. Hongos re-aislados de las plantas de muérdago con síntomas de marchitez y necrosis de los ensayos de campo.

Tratamiento	# de muestras	Hongos aislados		
		<i>Fusarium solani</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria spp</i>
<i>Fusarium solani</i>	8	16	3	
<i>Alternaria alternata</i>	3	3	6	
Testigo	3	-----	-----	3



Figura 16. A-F) Síntomas de marchitez y necrosis causado por *Fusarium solani* (CP-Avv-3).

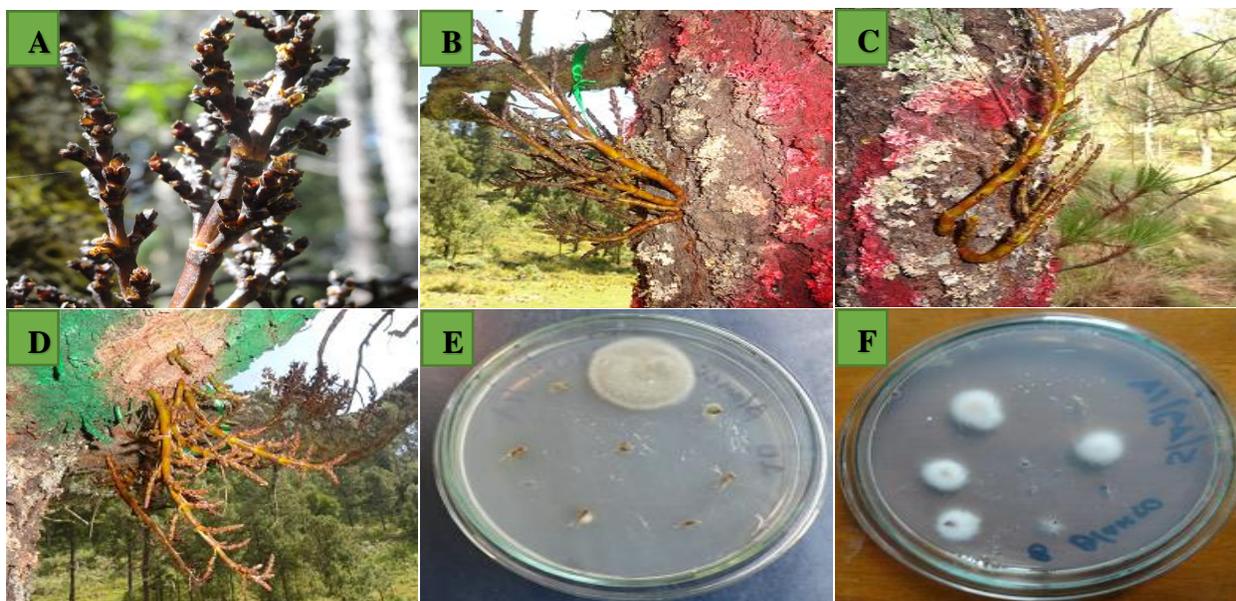


Figura 17. A) Necrosis causado por la cepa de *Alternaria alternata* (CP-Agg-17), B-C) Sin síntoma en aplicaciones de *Phoma glomerata* (NT-Agg-17), D) Testigo sin síntomas y E-F) Reaislado de las muestras de campo.

### 5.3.1. Análisis estadístico de las inoculaciones de campo

Las evaluaciones de la severidad llevadas a cabo en campo se hicieron con ayuda de la escala propuesta (Figura 25) y los datos se tomaron durante dos meses.

Se aplicaron cuatro tratamientos, y en la prueba de Kruskal-Wallis con pi-valio de 0.0001 y en la comparación multiple de medias se encontró que existe diferencia entre los mismos. La cepa que resultó ser virulenta y que causó más enfermedad al evaluarse la severidad con la escala propuesta con anterioridad, fue la de *Fusarium solani* (CP-Avv-3) como se muestra en el cuadro 27.

Cuadro 25. Comparación multiple de medias de los hongos inoculados en campo, para determinar el mejor tratamiento que causo más enfermedad.

Tratamiento	Hongo	Media de rangos	Agrupación Kruskal-Wallis
T1	<i>Fusarium solani</i>	130.00	A
T2	<i>Alternaria alternata</i>	96.00	B
T3	<i>Phoma glomerata</i>	88.00	B
T4	Testigo	88.00	B

En el re-aislamiento de los hongos aplicados y en síntomas observados, se corroboró que los aislamientos de *Fusarium solani* y *Alternaria alternata*, fueron los mismos que se inocularon para las pruebas de patogenicidad (Figura 18 y 19).

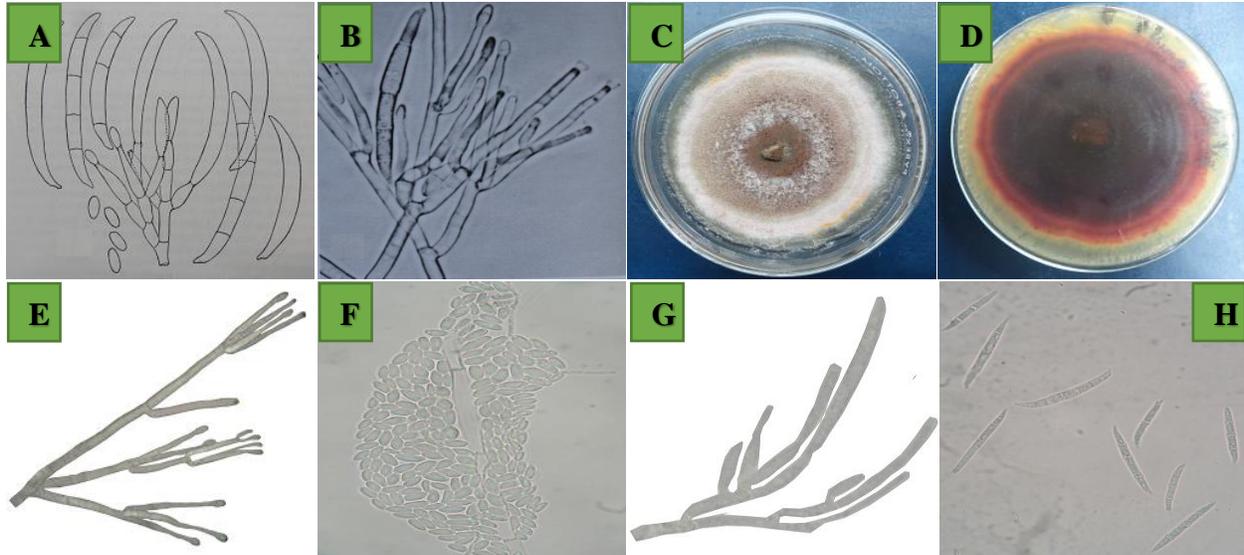


Figura 18. A) Microconidios, macroconidios y conidióforos (Booth, 1971); B) Microconidioforos (Monofialides) (Nelson *et al*; 1927); C-D) Ceca de *F. solani*. E-F) Molifialides produciendo microconidios; G-H) Macroconidioforos (Monofialides) y macroconidios (1000X).

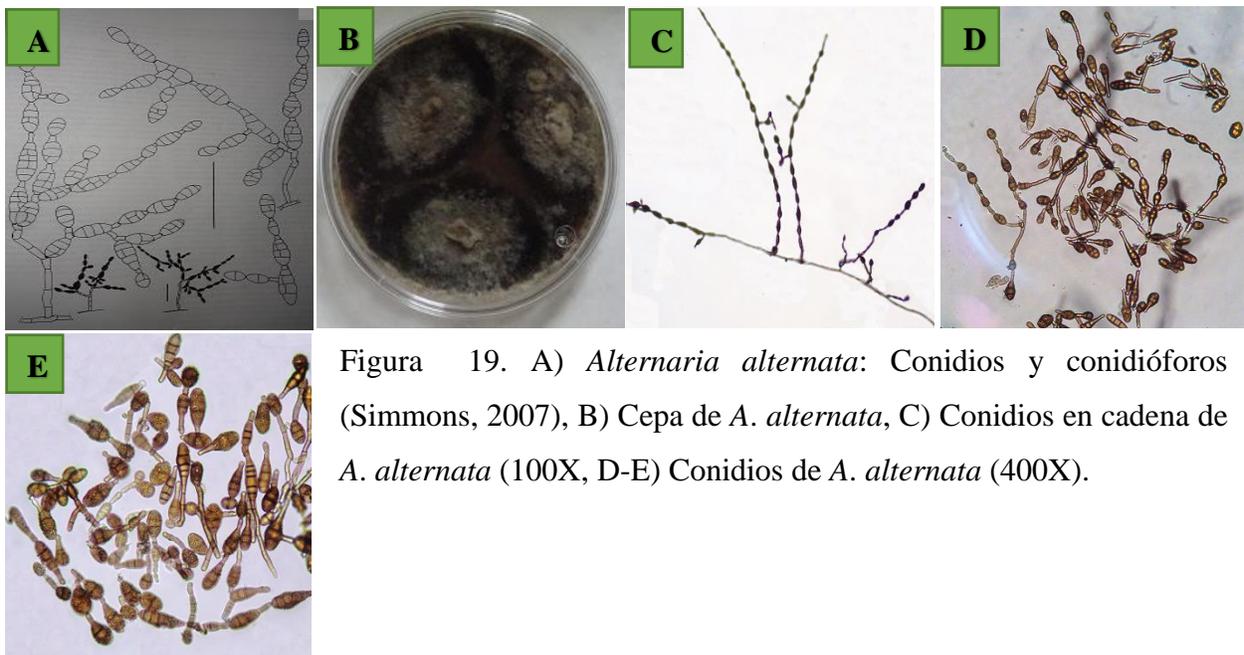


Figura 19. A) *Alternaria alternata*: Conidios y conidióforos (Simmons, 2007), B) Ceca de *A. alternata*, C) Conidios en cadena de *A. alternata* (100X, D-E) Conidios de *A. alternata* (400X).

Kope *et al.*, 1997, mencionan que las plantas de muérdagos con ramas fueron inoculadas bajo invernadero con una humedad relativa del 55%; mientras que en nuestros ensayos se alcanzó una temperatura de 23°C y 90% de HR dentro de bolsas de plástico que contenían ramas con muérdagos. Ellos mismos, reportan una suspensión de esporas de  $1 \times 10^6$  conidios/mL ocupando de 8 a 10 ramas, cada una con un grupo de  $> 5$  brotes, mientras que nosotros usamos concentraciones de  $2 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$  y 4 ramas por repetición. El hongo fue re-aislado de acérvulos (*Colletotrichum gloeosporioides*) que se desarrollaron en brotes inoculados después de 14 días, y en este estetrabajo el re-aislado se hizo al séptimo día; donde se obtuvieron los mismos hongos aplicados (*Fusarium solani* y *Alternaria alternata*) excepto en aplicaciones de *Phoma glomerata* y el testigo. En estos dos tratamientos se obtuvieron aislados de *Alternaria* spp., esto se debe a que existen hongos endofíticos presentes en las plantas de muérdago, esto fue corroborado en los aislados que se obtuvieron en el muestreo que se llevó a cabo en la cuenca del Valle de México en material aparentemente sano donde se obtuvieron los mismos aislados. Los autores concluyen que tal vez en un futuro *C. gloeosporioides* pueda usarse como agente de control.

Existen pocos trabajos de campo referente al control biológico del muérdago enano, por lo cual nuestra única referenica es el realizado por Ramsfield *et al.*, (2005) quienes trabajaron con *Colletotrichum gloeosporioides* empleando 45 plantas de *Arceuthobium americanum* por tratamiento y todas ellas estaban libres de alguna enfermedad; tratando tanto plantas masculinas como femeninas, inocularon varias plantas de un mismo árbol con el objetivo de evitar contaminaciones. La cantidad de inóculo que utilizaron fue de  $1 \times 10^7$  y cuando hicieron la aplicación de los tratamientos el día estaba nublado y con una temperatura de 22°C; para comprobar los efectos de la humedad relativa, pusieron a prueba 22 repeticiones de cada tratamiento dentro de una bolsa de polietileno, después de 48 horas haberse llevado a cabo la inoculación y utilizaron una escala de 5 valores. La evaluación del efecto de los tratamientos se llevó a cabo durante un año midiendo la producción de frutos y muerte la planta de muérdago.

En nuestro trabajo se utilizaron 10 plantas por tratamiento (4 tratamientos) y se inocularon con *A. vaginatum* subsp. *vaginatum*, utilizando plantas masculinas y femeninas, se utilizaron 2 plantas de muérdago por árbol y con tratamientos diferentes, también se tuvo el cuidado de que las plantas no estuvieran enfermas. La cantidad de inóculo utilizado fue de  $1 \times 10^5$  en *Alternaria alternata* y  $1 \times 10^6$  en *Fusarium solani* La temperatura no fue registrada, sin embargo el día estaba nublado y

posteriormente hubo precipitación y fue necesario una re-inoculación a los 15 días. La escala de evaluación utilizado en este estudio coincide con lo utilizado por Ramsfield *et al.*, 2005.

Los autores concluyen que la eficacia de *Colletotrichum gloeosporioides* es muy variable y no significativa en campo. Lo cual no difiere mucho con nuestros resultados obtenidos en campo, debido a que la severidad no fue mayor de acuerdo con la escala que se utilizó “in vitro” y los niveles no pasaron la escala 1.

Askew *et al.*, 2011, mencionan que *C. gloeosporioides* reduce la capacidad de producción de fruto y no concluye claramente sobre la reducción de los brotes del muérdago enano y también menciona que el hongo no es capaz de invadir y matar el sistema endofítico, lo cual difiere con lo que reporta Vega, 1976.

Los niveles de severidad causados por los hongos inoculados en campo sobre los muérdagos fueron muy bajos en este estudio (escala 1), esto debiera ser por el corto tiempo de evaluación, comparado con el trabajo hecho por Ramsfield *et al.*, 2005, sin embargo, el tampoco encontró diferencias significativas entre sus tratamientos, en su trabajo detalla imágenes que podrían calificarse con un valor de 5 de acuerdo a nuestra escala propuesto; donde la planta muere completamente, y su evaluación fue por un año. Ellos mismos mencionan que la época de aplicación puede influir en los resultados, y que las condiciones ambientales también influyen en el resultado; considerando estos datos, se puede decir que nuestras cepas evaluadas CP-Agg-17 y CP-Avv-3 en el Cerro del Papayo del Parque Nacional de Zoquiapan, no están limitadas al ataque del muérdago en esta zona, porque fueron aisladas de este lugar, sin embargo la época de aplicación pudo haber influido en los resultados, en el caso de la cepa CP-Agg-17, quizás este limitado únicamente al muérdago *Arceuthobium globosum* subsp. *globosum*, y las inoculaciones se realizaron en *A. vaginatum* subsp. *vaginatum*, o a la especificidad de los hongos al ataque de los muérdagos.

Ramsfield *et al.*, 2005, mencionan que usaron  $1 \times 10^7$  conidios/mL de *C. gloeosporioides*, quizás esto sea un factor que influyo en la incidencia y severidad de la enfermedad en nuestros ensayos de campo donde se usó  $10^6$  conidios/mL para *Fusarium solani* donde si hubo una incidencia del 80 % de las plantas inoculadas pero con una severidad de daño bajo (escala 1); pero otros autores han realizado pruebas de patogenicidad con una suspensión de conidios de  $10^5$  conidios/mL<sup>-1</sup> de *Fusarium* spp. en cultivo de arroz en campo (Rivera y Gómez, 2012) y Fraire *et al.*, (2010) realizaron pruebas”in vitro” de patogenicidad con *Fusarium oxysporum*, con una suspensión de

10<sup>5</sup> conidios/mL, lo cual nos permite pensar que existen otros factores que influyeron en la incidencia y severidad de la enfermedad en el muérdago como lo menciona Ramsfield y colaboradores (2005).

Para el caso de *Alternaria* spp. en este trabajo se usó una suspensión de conidios de 10<sup>5</sup> conidios/mL; sin embargo otros autores han realizado pruebas de patogenicidad “in vitro” con una suspensión de conidios de 10<sup>5</sup> en brócoli, pera y manzana (Fraire *et al.*, 2010, Guillen *et al.*, 2004). Tatiana y colaboradores (2010) mencionan que usaron 10<sup>3</sup> conidios/mL de *Alternaria solani*, en cultivo de papa y tomate. Gaetan y Madia en (1998), usaron 4 x 10<sup>4</sup> conidios/mL en cultivo de colza; todos estos estudios han encontrado que *Alternaria* es responsable de los síntomas que provocan en sus hospedantes de donde fueron aislados; por lo cual una vez mas se retoma lo dicho por Ramsfield *et al.*, (2005) en su trabajo realizado con *C. gloeosporioides* sobre *Arceuthobium americanum*.

## 6. CONCLUSIONES

*Fusarium solani* mostró ser patógeno, causó síntomas de marchitez y necrosis en plantas de muérdago inoculadas en campo a los ocho días después de haberse llevado a cabo la inoculación.

*Alternaria alternata* mostró los mismos síntomas un mes después de haberse llevado a cabo la inoculación, pero estadísticamente y de acuerdo a la prueba de Kruskal-Wallis, son iguales con *Phoma glomerata* y el testigo donde no hubo síntomas.

*Fusarium solani* es el mejor hongo al provocar mayor severidad e incidencia de la enfermedad en las plantas de muérdago enano. Este hongo, puede ser de gran utilidad en el manejo del muérdago enano, sin embargo, se tendrían que hacer nuevos estudios.

## 7. RECOMENDACIÓN

Es necesario hacer más pruebas de campo, para descartar cualquier situación o consecuencia negativa que puede traer el uso del hongo en un bosque natural, así como también incrementar la cantidad de inóculo y hacer las inoculaciones en diferentes estaciones del año y en las especies de muérdagos de donde se aislaron los hongos.

## 8. LITERATURA CITADA

- Askew E., S. 2007.** Assessment of *Colletotrichum gloeosporioides* as a biological control of hemlock dwarf mistletoe (*Arceuthobium tsugense*). The University of British Columbia. Pp. 155.
- Askew S., E. Shamoun S. F. y J. B. Van Der Kamp. 2009.** An “in vitro” method for screening *Colletotrichum gloeosporioides* as a biological control agent for western hemlock dwarf mistletoe. Forest Pathology. Volumen 39. Issue 4. 279-288 p.
- Askew S., E. Shamoun S. F. y J. B. Van der Kamp. 2011.** Assessment of *Colletotrichum gloeosporioides* as a biological control agent for management of hemlock dwarf mistletoe (*Arceuthobium tsugense*). Forest Pathology. Volumen 41. Issue 6. 444-452 p.
- Allen E. Morrison D. y G. Wallis. 1996.** Common tree diseases of British Columbia, Canadian Forest Service, Pacific Forestry Centre, BC.
- Alvarado R., D. y Cibrián T. J. 1991.** Efecto del Ethepon sobre muérdago (*Arceuthobium globosum* subsp. *grandicaule*) en arboles de *Pinus hartweggi*. Resúmenes del VI Simposio Nacional sobre Parasitología Forestal. Soc. Mex. de Entomología. Chapingo, México. 78 p.
- Badii M. Tejada L., Flores A., López C. y Quiroz H. 2000.** Historia, fundamentos e importancia. Pp. 3-17. UANL. Monterrey. N. L.
- Barnard E., L. 1999.** Annosum Root Rot of Pines in Florida. Fla. Dept. Agric. & Consumer Services, Division of Plant Industry, Plant Pathology Circular No. 398, Nov/Dec 1999.4 pp.
- Beatty J., S. Maffei H., Collins E., y M. Christian. 1988.** Ethepon tests for ponderosa pine dwarf mistletoe in New Mexico. In: Proc. 36 Annual Western International Forestry Disease Work Conference. Utah, USA. pp. 39-40.
- Berglund M. 2005.** Infection and growth of *Heterobasidion* spp. in *Picea abies*. Control by *Phlebiopsis gigantea* stump treatment. Doctoral thesis, Swedish University of Agriculture, Alnarp, Sweden. 41 pp.
- Charles, L. W. 1969.** Use of Plant Pathogens in Weed Control. Annual Review of Phytopathology 7:411-434.
- Charudattan R. 2005.** Use of plant pathogens as bioherbicides to manage weeds in horticultural crops. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 118:208-214.
- Clemencia G., Carmen C., Cañizales L. y Olivar R. 2008.** Control biológico: Una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. Venezuela. Academia TRujillo. ISSN 1690-3226- Vol. VII. (13) 50 – 74 p.
- Comisión Nacional Forestal. 2006.** Manual de Tratamientos Fitosanitarios. Coordinación General de Conservación y Restauración. Gerencia de Sanidad Forestal. México. pp. 32-39.
- Comisión Nacional Forestal. 2007.** Manual de Sanidad Forestal. Coordinación General de Conservación y Restauración. Gerencia de Sanidad Forestal.
- DeBach P. 1968.** Éxitos, tendencias y posibilidades futuras. pp. 789-831. In: P.DeBach, (ed.), Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. CECSA, México.
- DeBach P. 1977.** Lucha biológica contra los enemigos de las plantas. Ed. Mundi-Prensa, Madrid. 399 p.
- DeBach P. y D. Rosen. 1991.** Biological control by natural enemies, 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press.

- De la Paz P. O. C. 1974.** Anatomía de la madera de cinco especies de encinos de Durango. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. Boletín Técnico No. 43. 35 pp. México.
- Díaz de Villegas D., V. M.E., Bell G. A., Altuna S. B., González S. M. A., García C. R., Paredes R. E., Gallardo I. R., Torres C. E. y Carbonero G. M. 2005.** Influencia del PH y la temperatura en la producción de las fitotoxinas producidas por las *Pseudomonas aeruginosa* pss. Evaluación de su efectividad en el control de malezas. Instituto de Investigación de Sanidad Vegetal. Fitosanidad, vol. 9, núm. 3. pp. 41-48
- Fraire C., M. L. Nieto A. D y Cárdenas S. E. 2010.** *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum*. Hongos causantes de la pudrición del florete de brócoli. Revista Mexicana de Fitopatología. Volumén 28, número 1. pp. 33.
- Flores V., M. 2008.** Evaluación del efecto que causa el muérdago enano (*Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum*) en el crecimiento de *Pinus cooperi* en Pueblo Nuevo, Durango. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Durango, Dgo. 145 p.
- Frankel S. and D. Adams. 1988.** Ethephon test for dwarf mistletoes in California. In: Proc. 36 Annual Western International Forestry Disease Work Conference Utah, USA. 41-42 p.
- Funasaki G., Lai P., Nakahara L., Beardsley J. and A. Ota. 1988.** A review of biological control introductions in Hawai. Proc. Hawaii. Entomol Soc., 28:105-160.
- Gaetan A., S. y Madia S. M. 1998.** La mancha negra de la hoja (*Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltsh.) en cultivos de colza canola de Buenos Aires y Santa Fe, Argentina. Bol. San. Veg. Plagas, 24: 573-580.
- Gary A., S. 1991.** Biological Control of Weeds: Insects and microorganisms are already serving as commercial weed killers, and other biological approaches show promise. The goal: environmentally compatible alternatives to chemical herbicides. Scientific American. Pp. 72-78.
- Geils B., W. Cibrián T. J. and B. Moody. 2002.** Mistletoes of North American Conifers. Gen. Tech. Rep. RMRS-GTR-98. Ogden, UT: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. 123 Pp.
- Gill L., S. y Hawksworth F. G. 1961.** The mistetloe: a literature review U.S.D.A. Tech. bull No. 1242, 87 p.
- Gutierrez A., P., Caltagirone L. E. and W. Meikle. 1999.** Evaluation of results: economics of biological control. Pp. 243-252. En: Bellows, T.S. y Fisher, T. W. eds. Handbook of Biological Control. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Guillen S., D. Hernández T. J. C., Nieto A. D., Acosta R. M., López M. V., Tejacal A. I. y Acosta D. C. M. 2004.** Patogenicidad de *Rhizopus* sp. y *Alternaria* sp. en frutos de pera y manzana durante postcosecha. Investigación Agropecuaria. Vol. 2. p. 43-49.
- Harper G., J. Comeau P. G., Hintz W., Wall R. E., Prasad R. and E. M. Becker. 1999.** *Chondrostereum purpureum* as a biological control agent in forest vegetation. II Efficacy on Sitka alder and aspen in western Canada. Can. J. Plant Pathol. 23:13-18.
- Hasan S. 1981.** A new strain of the rust fungus *Puccinia chondrilla* for biological control of skeleton weed in Australia. Annals of Applied Biology 99: 119-124.
- Hasan S. y A. J. Wapshere. 1973.** The biology of *Puccinia chondrilla*, a potential biological control agent of skeleton weed. Annals of Applied Biology 74: 325-332.
- Hawksworth F., G. y Stevens D. 1970.** New taxa and nomenclatural changes in *Arceuthobium* (*Visceae*). Brittonia 22:265-269.

- Hawksworth F., G. and D. Wiens. 1972.** Biology and classification of dwarf mistletoes (*Arceuthobium*). USDA Forest Service, Agriculture Handbook 401. Washington, dc. 234 p.
- Hawksworth F., G. 1977.** The 6 class dwarf mistletoe rating system. Res. Note RM-48. Fort Collins, CO: USDA Forest Service Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station. 7 p.
- Hawksworth F., G. and D. W. Johnson. 1988.** Mistletoe control with Ethephon. In: Proc 36 Annual Western International Forestry Disease Work Conference. Utah, USA. Pp. 29-31.
- Hawksworth F., G. and D. W. Johnson. 1989.** Mistletoe control with ethephon. In: van der Kamp, B.J., comp. Proceedings, 36th Annual Western International Forest Disease Work Conference; 1988 September 19-23; Park City, UT. Vancouver, BC: University of British Columbia, Department of Forest Sciences:29-45 pp.
- Hawksworth F., G. and D. Wiens. 1996.** Dwarf mistletoes: Biology, pathology and systematics. Agriculture Handbook 709. United States Department of Agriculture, Forest Service. Washington, D.C. 410 p.
- Hokkanen H., M. T. 1985.** Success in classical biological control. CRC Crit. Rev. Plant. Sci. 3:35-72.
- Howarth F., G. 1983.** Classical biocontrol: panacea o Pandora´s box. Proc. Hawaii Entomol. Soc. 2/3:239-244.
- Howarth F., G. 1991.** Environmental impacts of classical biological control. Annu. Rev. Entomol., 36:485-509.
- Jetter K. Klonsky K. and Pickett C. H. 1997.** A cost/benefit analysis of the ash whitefly biological control program in California. Journal of Arboriculture. 23: 65-72.
- Kope H., H. Shamoun S. F. and C. Oleskevich. 1997.** First report of *Colletotrichum gloeosporioides* on *Arceuthobium tsugense* subsp. *tsugense* in Canada. Plant Dis. 81: 1095.
- Makowski R., M. and I. N. Mortensen. 1989.** The biology of Canadian weeds. Can. J. of Plant Science 69: 861-879.
- Mortensen K. and R. M. D. Makowski 1990.** Field efficacy at different concentrations of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* as a bioherbicide from round leaved mallow. Cited from *Colletotrichum: Biology, Pathology, and Control*. Bailey J. A. and Jeger, M. J. 1992.
- Mortensen K. 1989.** Biological control of weeds using microorganisms. pp. 223-248-in Plant-Microbe Interactions Academic Press, New York, USA.
- Morris M., J. Wood A. R. and A. Breeyen Den. 1999.** Plant pathogena and biological control of weeds in South Africa: a review of projects and progress during the last decade. African Entomology Memoir 1, 129-137.
- Nicholls T., H. Egeland L., Hawksworth F. G. and D. W. Johnson. 1986.** Control of dwarf mistletoe with ethephon. In: Proc. 34 Annual Western International Forestry Disease Work Conference. Juneau, Alaska: pp. 78-85.
- Nicholls T., H. 1988.** Ethephon tests for lodgepole pine dwarf mistletoe in Colorado. In Proc 36 Annual Western International Forestry Disease Work Conference. Utan, USA. pp. 34-37.
- León R., J. M. 1983.** Evaluación de los daños causados por muérdago enano (*Arceuthobium* spp.) al bosque de *Pinus hartwegii* Lindl en el Parque Nacional Nevado de Colima. Escuela de Agricultura. Universidad de Guadalajara. Jalisco México. Pp.168.

- Parks C. y J. T. Hoffman. 1988.** Ethephon tests for douglas-fir larch and ponderosa pine dwarf mistletoe in the northwest. In: Proc. 36 Annual Western International Forestry Disease Work Conference. Utah, USA. pp. 4-40.
- Parmarter and Uvanholt. 1976.** In dwarf mistletoe control through forest management. In: Proceeding of the symposium Gen. Tech. Rep. Psw. 31. 1975. April 11-13., Berkeley, CA. Departament of Agriculture, Forest Service, Pacific Porthwest Forestal and range Experiment Station. 188-190 pp.
- Quick C., R. 1964.** Experimental herbicidal control of dwarfmistletoe on some California conifers. Research Note PSW-47. BerkeleyCA; U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station. 9 p.
- Quintana L., R. 2008.** Evaluación del muérdago- killer (Diatomeas) para el control del muérdago enano (*Arceuthobium globosum*) en *Pinus pseudostrobus* Lindl. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”. Uruapan Michoacán. México. Pp.61.
- Ramsfield T., D. Shamoun S. F. and B. J. Van der Kamp. 2005.** Infection of *Arceuthobium americanum* by *Colletotrichum gloeosporioides* and its potential for inundative biological. For. Pathol. Volumen 35, Issue 5, 332-338 p.
- Anónimo. 1983.** Revista del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. Ciencia forestal. Subsecretaria Forestal. Vol. 8. No. 45.
- Rivera V., M. y Gómez C. L. 2012.** Identificación y patogenicidad de *Fusarium* spp y *Rhizoctonia solani* en cultivos de arroz del cesar. Revista Colombiana de Microbiología Tropical. Vol. 2 N° 2. Pp. 5.
- Roskopf E., N. Charudattan R. and J. B. Kadir. 1999.** Use of plant pathogens in weed control. Handbook of Biological control. Chapter 35. Academic Press.891-917.
- Roy G. Laflamme B. G. y M. Dessureault. 2003.** Field test son biological control *Heterobasidium annosum* by *Phaeothecea dimorphospora* in comparison with *Phlebiopsis gigantean*. Forest Pathology 33:127-140.
- Shamoun S., F. 1998.** Development of biological control strategy for management of dwarf mistletoe. In: Sturrock, R. (Tech Coord.). Proceedings 45<sup>th</sup> western international forest disease work conference; 1997 Sept 15-29; Prince George, B.C. Canadian Forest Service, Pacific Forestry Centre, Victoria, B.C.
- Shamoun S., F. and L. E. DeWald. 2002.** Management strategies for dwarf mistletoes: biological, chemical and genetic approaches. In: Mistletoe of Nort American Conifers. Geils B. Tovar J. C. and Moody B. (technical co-coordinators). U.S. Department of Agriculture Forest Service Rocky Mountain Research Station, Ogden, Utah. General Technical Report RMRS-GTR pp. 67-82.
- Summy K., R. and J. V. French. 1988.** Biological control of agricultural pests: concepts every producer should understand. J. Rio Grande Valley Hort. Soc. 41:119-133.
- Strobel G., A. 1991.** Biological control of weeds. Insects microorganisms are already serving as commercial weed killers, and other biological approaches show promise. The goal: environmentally compatible alternatives to chemical herbicides. Scientific American. 72-78 pp.
- Tatiana T., M. S. Rodrigues L. A. Maffia O. D. D. and S. G. E. Mizubuti. 2010.**”In vitro” production of conidia of *Alternaria solani*. Tropical Plant Pathology, vol. 35, 4, 203-212

- Trujillo E., E. Kadooka C., Tanimoto V., Bergfeld S., Shishido G. y G. Kawakami. 2001.** Effective biomass reduction of the invasive weed species banana poka by *Septoria leaf spot*. Plant Dis. 85:357-361.
- Uribe G., I. 1985.** Efecto del muérdago enano *Arceuthobium* sp. (Humbolt) en el crecimiento e incremento de árboles jóvenes de *Pinus hartwegii* Lind. En Zoquiapan, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. 54p.
- Valderrama B., J. y Medina R. O. M. 2002.** Evaluación de muérdago enano ("*Arceuthobium spp.*") en rodales del género *Pinus spp.* y propuesta de manejo en la Estación Forestal Experimental Zoquiapan. Tesis Profesional. Universidad Autónoma Chapingo. México. Pp.77.
- Van D., R. G. Hooddle M. S. and T. D. Center 2007.** Biological control: control de plagas y malezas por enemigos naturales. Forest Health Technology Enterprise Team. Technology Transfer. USDA. Pp.751.
- Vázquez C., I. Villa R. A. y S. H. Madrigal. 2006.** Los muérdagos (Loranthaceae) en Michoacán. SAGARPA. CONAFOR. INIFAP. Libro técnico No. 2 División Forestal. Uruapan. Michoacán. México. 98 p.
- Vega R., E. 1976.** El muérdago enfermedad en bosques de coníferas y hojosas, bosques y fauna. XII. 1. Departamento de divulgación forestal. S.A.R.H. México. 49 p.
- Watson A., K. 1991.** The classical approach with plant pathogens. In "Microbial Control of Weeds" (D. O. TeBeest, Ed.), pp.3-23. Chapman & Hall. New York.

## **APÉNDICE**

### **Apéndice 1. Medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA)**

Para elaborar un litro:

- 200.0 g de papa
- 20.0 g de Dextrosa
- 15.0 g de agar

La papa se corto en trozos y fueron colocados en un matraz Erlenmeyer de 1L, se le agregaron de 250- 300 mL de agua destilada y se esterilizo a 15 lb durante 15 min en la autoclave. Se filtró la mezcla con una manta de cielo a otro matraz y se le agregó la Dextrosa; se mezcló perfectamente y se aforo a un litro. La mezcla se repartió en dos matraces de un litro, cada uno con 500 mL y se le agregaron a cada matraz 7.5 g de agar. Nuevamente se metieron a esterilizar en la autoclave por 20 min a 15 lb de presión.

### **Apéndice 2. Medio Agua-Agar (AA)**

Para elaborar un litro:

- 15.0 g de agar
- 1 L de agua destilada

Se repartió el agua destilada a dos matraces de 1 L, posteriormente se agregaron a cada matraz 7.5 g de agar, una vez disuelto el agar se metió a la autoclave para esterilizarlo a 15 lb de presión durante 20 min.

### **Apéndice 3. Extracción de ADN por el método de QUIAGEN.**

- Macerar la cepa con el micelio y/o estructuras del hongo y transferir el macerado en tubo Eppendorf.
- Colocar el tubo Eppendorf al ultracongelador a -82°C durante 30 minutos.
- Macerar el contenido del tubo Eppendorf con una punta estéril y se le agrega 400 µl de Buffer AP1 y 40 µl de RNAsa, e incubarlo a 65°C por 15 minutos (agitar cada cinco minutos).
- Agregar 130 µl del Buffer AP3 y dejaron los tubos Eppendorf por cinco minutos en hielo.
- Centrifugar los tubos Eppendorf a 14,000 (rpm) por cinco minutos.

- Transferir el sobrenadante de los tubos Ependorff a las columnas moradas y centrifugar a 14,000 rpm durante 2 minutos.
- El producto obtenido, transferir 400 µl en un tubo de ependorff esterilizado y agregar 600 µl del Buffer AW1 y agitarlo por inversión.
- La mezcla del producto anterior, transferirlo a la columna de color blanco y centrifugar a 8000 rpm durante un minuto.
- Quitar la columna blanca y color otro del mismo color, y se le agrega 500 µl del Buffer AW2 y se centrifuga a 8000 rpm por un minuto. Enseguida se le agrega 300 ml del Buffer AW2 y se centrifuga nuevamente a 14,000 rpm durante dos minutos.
- Quitar la columna blanca que se colocó al último y colocar un tubo Ependorff estéril y agregar 100 µl del Buffer AE y dejar incubando a temperatura ambiente (15-25°C) por cinco minutos y centrifugar a 8000 rpm durante un minuto.
- Tirar la columna blanca para dejar únicamente el ADN.
- Guardar las muestras en el congelador.