



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO**

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, MOLECULAR E  
HISTOPATOLOGÍA DE HONGOS OPHIOSTOMATOIDES  
ASOCIADOS AL PINO DE LAS ALTURAS (*Pinus hartwegii* Lindl).

**OMAR ALEJANDRO PÉREZ VERA**

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2009

La presente tesis titulada: Caracterización morfológica, molecular e histopatología de hongos ophiostomatoides asociados al pino de las alturas (*Pinus hartwegii* Lindl), realizado por el alumno: Omar Alejandro Pérez Vera, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

FITOPATOLOGIA

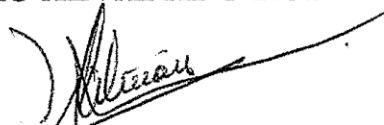
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. DIONICIO ALVARADO ROSALES

ASESOR:



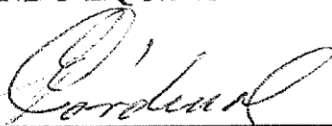
DR. DAVID CIBRIÁN TOVAR

ASESOR:



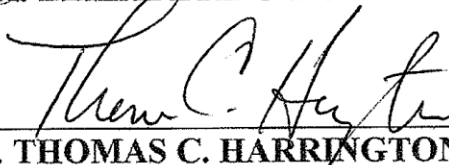
DR. ARMANDO EQUIHUA MARTÍNEZ

ASESOR:



DRA. ELIZABETH CARDENAS SORIANO

ASESOR:



DR. THOMAS C. HARRINGTON

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Noviembre de 2009.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por financiamiento y apoyo otorgado para realizar mis estudios de doctorado.

Al Colegio de Postgraduados (CP) por brindarme la oportunidad de alcanzar una meta más en mi formación académica.

A la Universidad Autónoma Chapingo y en particular el área de Entomología y Patología Forestal de la División de Ciencias Forestales (DICIFO) por brindarme el apoyo para la realización de esta investigación.

Al Dr. Dionicio Alvarado Rosales por la dirección de la presente investigación, por su amistad y por su gran paciencia.

Al Dr. David Cibrián Tovar por sus consejos y atinadas observaciones, tanto en la realización de mi investigación como en mi formación como estudiante de doctorado.

Al Dr. Armando Equihua Martínez por sus consejos y la disposición tan atenta en la revisión del presente trabajo.

A la Dra. Elizabeth Cárdenas Soriano por sus sugerencias y revisiones a mi trabajo de investigación.

Al Dr. Thomas C. Harrington por sus valiosos comentarios e interés en la presente investigación.

A la Biol. Greta y M.C. Jorge Valdez por ayudarme en el trabajo de microscopía electrónica

A la M.C. Silvia Edith García por haber compartido conmigo su conocimiento acerca de los hongos forestales y por su amistad.

A todo el personal de Fitosanidad que siempre me ayudaron desinteresadamente durante mis estudios.

Al Departamento de Parasitología Agrícola de la UACh, en especial al M.C. Dimas Mejía Sánchez por haberme compartido sus conocimientos en el área de biología molecular.

*Dedicatoria*

*A mi esposa Marina Estrada y mi hijo Herick Alejandro*

*A mi madre Edelmira Vera Cruz por haberme enseñado a  
caminar por este largo camino de la vida.*

*A mis hermanos José Arnulfo, Flor del Carmen y Adriana  
Guadalupe por apoyarme en todo momento*

## CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vi
RESUMEN GENERAL .....	1
GENERAL SUMMARY .....	2
REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
Plagas y enfermedades .....	3
Hongos ophiostomatoides .....	4
<i>Ceratocystis</i> .....	10
<i>Ophiostoma</i> .....	13
<i>Ceratocystiopsis</i> .....	14
Descortezadores .....	16
Asociación descortezador-hongo .....	17
LITERATURA CITADA .....	21
CAPITULO I. <i>Ophiostoma ips</i> ASOCIADO AL DESCORTEZADOR <i>Dendroctonus adjunctus</i> (Blandford), EN EL PINO DE LAS ALTURAS ( <i>Pinus hartwegii</i> Lindl.) .....	28
RESUMEN .....	28
ABSTRACT .....	29
INTRODUCCIÓN .....	30
MATERIALES Y MÉTODOS .....	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	37
CONCLUSIONES .....	44
LITERATURA CITADA .....	45
CAPITULO II. IDENTIFICACIÓN Y PRUEBAS DE PATOGENICIDAD DE HONGOS OPHIOSTOMATOIDES AISLADOS DE GALERÍAS DE <i>Dendroctonus adjunctus</i> (Blandford) EN EL PINO DE LAS ALTURAS .....	49
RESUMEN .....	49
ABSTRACT .....	50
INTRODUCCIÓN .....	51
MATERIALES Y MÉTODOS .....	53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	58
CONCLUSIONES .....	74
LITERATURA CITADA .....	75

CAPITULO III. HISTOPATOLOGÍA DEL PINO DE LAS ALTURAS ( <i>Pinus hartwegii</i> Lindl.) INOCULADO CON TRES HONGOS OPHIOSTOMATOIDES .....	
RESUMEN .....	80
ABSTRACT .....	81
INTRODUCCIÓN .....	82
MATERIALES Y MÉTODOS .....	83
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	86
CONCLUSIONES .....	99
LITERATURA CITADA .....	100
CONCLUSIONES GENERALES .....	105

## LISTA DE CUADROS

	Página
REVISION DE LITERATURA	
1 Sinopsis de la taxonomía de <i>Ceratocystis</i> , <i>Ophiostoma</i> y <i>Ceratocystiopsis</i> .	6
2 Aspectos de historias de vidas de insectos descortezadores y tipo de asociación con hongos.	20
CAPITULO I	
1 Aislamientos de <i>Graphilbum</i> y <i>Ophiostoma ips</i> obtenidos de galerías y del insecto descortezador <i>Dendroctonus adjunctus</i> en <i>P. hartwegii</i> de la EFEZ, México.	32
2 Aislamientos del hongo Ophiostomatoide a partir de galerías y cuerpo del insecto descortezador <i>Dendroctonus adjunctus</i> en <i>Pinus hartwegii</i> .	36
CAPITULO II	
1 Análisis de varianza de la respuesta del aislamiento al efecto de la luz en el crecimiento de aislamientos de hongos ophiostomatoides aislados de galerías del insecto descortezador <i>Dendroctonus adjunctus</i> , colectados en el municipio de Zoquiapan, México.	67
2 Comparación de medias de la respuesta del aislamiento al efecto de la luz de los aislamientos de hongos ophiostomatoides aislados de galerías del insecto descortezador <i>Dendroctonus adjunctus</i> , colectados en el municipio de Zoquiapan, México.	68
3 Caracterización molecular por alineamiento de las secuencias reportadas en el banco de genes con las secuencias intergénicas (ITS) de los genes ADNr de los hongos aislados de <i>Pinus hartwegii</i> .	70

## LISTA DE FIGURAS

Página

### CAPITULO I

- 1 Características culturales y microscópicas (microscopia de luz y microscopia de barrido) de *Ophiostoma ips* y *Graphilbum* sp. A y B) Color café amarillento a gris oscuro en EMA al 2%. C y D) Conidióforos sinematosos de *Graphilbum* sp. E y F) Células conidiogénicas de proliferación percurrente aparentemente simpodial. E, F, G y H) Conidias cilíndricas a ovoides. I, J y K) Peritecios sin hifas ostiolares. L) Ascosporas cuadrangulares. 38
- 2 Árbol filogenético que muestra el agrupamiento del hongo ophiostomatoide asociado a *Dendroctonus adjunctus* en *Pinus hartwegii* amplificados por PCR-ITS rADN con los iniciadores ITS1-F e ITS4, y sus secuencias agrupadas con el software MEGA 4. El árbol filogenético se construyó con el método de Neighbor-Joining, modelo p-distance. 0.02 indica la distancia génica por el método Neighbor-Joining. 43

### CAPITULO II

- 1 Características culturales y microscópicas (microscopia de luz y microscopia de barrido) de *Leptographium guttulatum* y *Graphium* sp. (*Pesotum* sp.). A) Aislamiento café claro a café oliváceo en EMA al 2% a los 12 días. B) Conidióforos solitarios. C) Aparato conidiogénico con 2 a 4 ramas. D) Células conidiogénicas de proliferación percurrente. E) Conidias unicelulares. F) Colonia de *Pesotum* sp. café, café olivo, gris en EMA al 2% a los 15 días. G) Conidióforos sinematosos de *Graphium* sp. H) Células conidiogénicas de proliferación percurrente. I) Conidias elipsoides a ovoides. 60
- 2 Características culturales y microscópicas (microscopia de luz y microscopia de barrido) de *Ophiostoma olivaceapinii* y *O. nigrocarpum* sp (*Pesotum* sp). A) Aislamiento café claro, café oscuro en cultivos jóvenes a grisáceo en EMA al 2% a los 15 días. B) Sinema. C) Conidios elipsoides a ovoides. D) Peritecios con hifas ostiolares. E) Ascosporas reniformes. F) Peritecios de *O. nigrocarpum* en bloques de madera de *Pinus hartwegii*. G) Aislamiento blanco cremoso con peritecios de *O.*



- nigrocarpum*. H, I) Peritecio J) Ascosporas reniformes. K) Conidias elipsoides a cilíndricas. 62
- 3 Características culturales y microscópicas (microscopia de luz y microscopia de barrido) de *Ophiostoma angusticollis*. A) Aislamiento blanco cremoso en cultivos en EMA al 2% a los 15 días. B) Peritecios de *O. angusticollis* en bloques de madera de *Pinus hartwegii*. C) Peritecios sin hifas ostiolares. D) Masas de ascosporas contenidas en una matriz gelatinosa. E) Ascosporas reniformes. 65
- 4 Porcentaje de plantas vivas y muertas inoculadas con cuatro especies de *Ophiostoma* y el género *Pesotum* sp. en *Pinus hartwegii* de tres años de edad. 72
- 5 Digestión del ADN con la enzima *Hind*III amplificado con el par de primers ITS1-F e ITS4 de cinco hongos ophiostomatoides en un gel de agarosa al 2%. 1: *Leptographium guttulatum*, 2: *Ophiostoma olivaceapinii*, 3: *Graphium*, 4: *O. nigrocarpum* y 5: *O. angusticollis*. M: marcador molecular de 100 pb (Promega). 73
- 6 Digestión del ADN con la enzima *Kpn*I amplificado con el par de primers ITS1-F e ITS4 de cinco hongos ophiostomatoides en un gel de agarosa al 2%. 1: *Leptographium guttulatum*, 2: *Ophiostoma olivaceapinii*, 3: *Graphium*, 4: *O. nigrocarpum* y 5: *O. angusticollis*. M: marcador molecular de 100 pb (Promega). 74

### CAPITULO III

- 1 Fotomicrografías al microscopio de luz de cortes transversales de tallo sano de pino (*Pinus hartwegii*). A) Observe la peridermis (pe), corteza (co) y canales resiníferos (cr) conteniendo polifenoles (pol). B). Floema (fl) y cambium vascular (cv) con polifenoles, xilema (xi), rayos (r). C). Xilema (xi) con canales resiníferos, radios y médula (me) con polifenoles. 88
- 2 Plantas inoculadas de *Pinus hartwegii* mostrando los síntomas que indujeron los hongos ophiostomatoides aislados de galerías y del cuerpo del insecto descortezador *Dendroctonus adjunctus* a los 60 ddi. A. *Leptographium guttulatum*. B. *Ophiostoma olivaceapini*. C. *Ophiostoma ips*. 90

- 3 Fotomicrografías de las alteraciones de los tejidos del tallo del pino de las alturas (*Pinus hartwegii*) inoculado (parte alta) con *Ophiostoma olivaceapnii* a los 60 días. A) Colapso de células e hipertrofia (hp) y degradación de polifenoles de color rojo en la corteza y la peridermis (pe). B) Colapso en floema (fl) y cambium vascular (cv). C) Necrosis en médula (me) con presencia de micelio entre las células y no se observan polifenoles. 92
- 4 Fotomicrografías de las alteraciones de los tejidos del tallo del pino de las alturas (*Pinus hartwegii*) inoculado con *Leptographium guttulatum* a los 60 días. A) Necrosis e hipertrofia de células de la corteza (co). B) Colapso celular en floema (flo), cambium vascular (cv) y los canales resiníferos (cr) de la corteza invadidos con hifas del hongo (hi). C) radios (r) y canales resiníferos (cr) del xilema invadidos por hifas del hongo. D) Necrosis en médula (me) e hifas del hongo (hi). 94
- 5 Fotomicrografías de las alteraciones de los tejidos del tallo del pino de las alturas (*Pinus hartwegii*) inoculado con *Ophiostoma ips* a los 60 días. A) peridermis (pe), corteza (co) necrosada. B) Necrosis en floema (fl) y cambium vascular (cv). C) radios del xilema (rx) y canales resiníferos (cr) invadidos por hifas del hongo (hi). D) necrosis en médula (me) con hifas del hongo. 96

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, MOLECULAR E HISTOPATOLOGÍA DE HONGOS OPHIOSTOMATOIDES ASOCIADOS AL PINO DE LAS ALTURAS (*Pinus hartwegii* Lindl).

OMAR ALEJANDRO PÉREZ VERA, Dr.  
COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2009

Los descortezadores (Coleóptera: Curculionidae: Scolytinae) son vectores de especies de *Ophiostoma* spp. que causan el manchado azul de la madera y contribuyen a la muerte de árboles en coníferas y angiospermas. En México, *Dendroctonus adjunctus* es uno de las principales plagas de bosques de pino, Sin embargo, los hongos simbioses que introduce en sus galerías y las alteraciones que pueden ocasionar en el sistema de conducción de agua del árbol se desconocen. Las especies del género *Ophiostoma* son difíciles de identificar por características morfológicas; por ello, recientemente se ha utilizado la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuencias de ADN. Por lo anterior, los objetivos de la presente investigación fueron: a) Identificar y caracterizar las especies de *Ophiostoma* asociadas al descortezador *Dendroctonus adjunctus* en *Pinus hartwegii*; b) Identificar y probar la patogenicidad de cinco hongos ophiostomatoides asociados con *D. adjunctus* en *P. hartwegii*; y c) Identificar las alteraciones histológicas en *P. hartwegii* causadas por tres especies de hongos ophiostomatoides. En material sin desinfección se aisló a *Ophiostoma ips* (teleomorfo) de galerías y a *Graphilbum* sp., de galerías y del cuerpo de *D. adjunctus*. En material desinfestado se aisló a *Leptographium guttulatum*, *Ophiostoma nigrocarpum*, *O. angusticollis*, *O. olivaceapinii* y *Pesotum* sp. Los aislamientos que causaron clorosis, muerte de follaje y necrosis en plantas de pino fueron: *Leptographium guttulatum*, *O. nigrocarpum* y *O. olivaceapinii*, sin embargo, en nivel de mortalidad de plantas no fue estadísticamente significativa. Los principales cambios estructurales inducidos por *Leptographium guttulatum* y *O. olivaceapinii* fueron la metabolización de polifenoles que se depositaron en las paredes de las células de la corteza, el floema, cambium y médula. En cuanto a *O. ips*, este causó necrosis en corteza, floema, cambium y médula. Las hifas de los tres hongos penetraron en las traqueidas y avanzaron longitudinalmente por las puntuaciones aereoladas y se distribuyeron radialmente por las células parenquimatosas y radios en el xilema.

Palabras clave: ascosporas, secuencias ITS, ciclohexamida, patogenicidad.

MORPHOLOGICAL, MOLECULAR CHARACTERIZATION AND  
HISTOPATHOLOGY OF THE OPHIOSTOMATOID FUNGI ASSOCIATED TO  
HARTWEG PINE (*Pinus hartwegii* Lindl).

OMAR ALEJANDRO PÉREZ VERA, Dr.  
COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2009

Bark beetles (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) are vectors of the *Ophiostoma* spp. fungi which may be causal agents of the blue-stained wood and contribute also to the death of conifers and angiosperm trees. In Mexico, *Dendroctonus adjunctus* is one of the major pests of pine forests, however, the symbiotic fungi introduced into galleries and their effect on the water conduction system of the host are unknown. *Ophiostoma* species are difficult to identify by morphological characteristics, so recently the use of polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing are being used. For these reasons, the objectives of this research were: a) To identify and to characterize the *Ophiostoma* species associated with the bark beetle *Dendroctonus adjunctus* in *Pinus hartwegii*, b) To identify and test the pathogenicity of five ophiostomatoid fungi associated with *D. adjunctus* to *P. hartwegii*, and c) To determine the histological alterations in *P. hartwegii* caused by three species of ophiostomatoid fungi. In material without surface disinfection, *Ophiostoma ips* (teleomorph) was isolated from galleries and *Graphilbum* sp. from galleries and body of *D. adjunctus*. In disinfected material, *Pesotum* sp., *Leptographium guttulatum*, *Ophiostoma nigrocarpum*, *O. angusticollis*, and *O. olivaceapinii* were isolated. *Leptographium guttulatum*, *O. nigrocarpum* and *O. olivaceapinii* caused chlorosis and mortality of inoculated pine seedlings, although the level of mortality was not statistically significant. The main structural changes induced by *Leptographium guttulatum* and *O. olivaceapinii* was the accumulation of polyphenols in the cell walls of the innerbark (phloem), vascular cambium, and pith. *O. ips* caused necrosis in the innerbark, vascular cambium and pith. Hyphae of the three fungal species penetrated into the tracheids and moved longitudinally through the bordered pits and radially through parenchymatous cells of the rays.

Keywords: asexual spores, ITS sequences, cycloheximide, pathogenicity.

## REVISIÓN DE LITERATURA

La especie *Pinus hartwegii* se distribuye en Chiapas, Colima, Distrito Federal, Estado de México, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Tamaulipas, Tlaxcala y Veracruz (Perry, 1991a). En otros países como Guatemala, en los departamentos de Huehuetenango, Totonicapan, Quetzaltenango, Quiché, Sololá, San Marcos, Chimaltenango y Sacatepéquez. Otros reportes han sido en El salvador, Honduras y entre la frontera Honduras-El Salvador (Perry, 1991a). Es la única especie que se encuentra a una altitud de 3 000 a 3 700 m (Perry, 1991a; Campos, 1993). *Pinus hartwegii* se encuentra en climas templados, subhúmedos a mesotermos, con temperaturas medias anuales de 12°C, y con precipitaciones anuales de 700 a 1200 mm, con junio y julio como los meses más lluviosos y marzo el más seco (Santillán, 1991). Esta especie crece en suelos profundos, ricos en materia orgánica, con textura migajón arenoso y con pH de 5 a 6.9 (Santillán, 1991; Zavala 1984; Rzedowski, 1978).

### Plagas y enfermedades

*Pinus hartwegii* es susceptible a las siguientes plagas y enfermedades, los insectos *Dendroctonus approximatus*, *D. valens*, *D. adjunctus*, *Ips bonansea*, *I. mexicanus*, *I. integer*, *Pytyophtorus* spp. y *Synanthedon cardinalis*, que se alimentan de floema y cambium vascular; los insectos que se alimentan de brotes y yemas: *Conophthorus ponderosae* y *Eucosma* sp. Los insectos que atacan conos y semillas: *Leptoglossus occidentalis*, *Megastigmus albifrons*, *Apolychrosis synchysis*, *Cydia montezumae* y *Dioryctria pinicolla* y los que se alimentan de madera húmeda: *Gnathotrichus sulcatus* (Cibrián *et al.*, 1986; Cibrián, 1995).

Los muérdagos *Arceuthobium globosum* y *A. vaginatum* reducen la tasa de crecimiento (Cibrián, 1986). Entre los hongos que causan pudrición de maderas están *Trichaptum*

*abietinum*, *Phellinus pini* y entre los que causan enfermedades de raíz: *Armillaria gallica*, *Ganoderma* spp. y *Heterobasidium annosum* = *Fomes annosus* (Cibrián, 1986; Cibrián *et al.*, 2007).

Entre los hongos que causan enfermedades del follaje se ha reportado a *Ploioderma lethale* causando la caída de acículas, comúnmente en bosque natural bajo tratamientos silvícolas. A nivel de vivero se reporta a *Lophodermium* spp. Entre las royas que causan daños en troncos, ramas, follaje y conos se reportan, la roya de las acículas de los pinos (*Coleosporium* spp.); la roya estalactiforme (*Peridermium stalactiforme*); la roya agalladora de los conos de pinos (*Cronartium conigenum*) y *Cronartium quercuum* causante de la roya esférica pino-encino (Cibrián *et al.*, 2007).

De los hongos manchadores se han reportado a *Ceratocystiopsis collifera* asociado con *Dendroctonus valens*, *Ophiostoma picea*, *O. piliferum* asociado con *D. frontalis* y *Leptographium* sp. (Marmolejo y Butin, 1993; Marmolejo, 1991) y otros 13 hongos ophiostomatoides en diferentes especies de coníferas y latifoliadas (Marmolejo, 1989; Marmolejo y Butin, 1993; Zhou *et al.*, 2004a; Cibrián *et al.*, 2007). Además, se ha reportado el nematodo agallador (*Meloidogyne communis*), el nematodo lesionador de raíces (*Pratylenchus* sp) y el nematodo de la raíz de tocón (*Trichodorus* sp.), transmisores de virus fitopatógenos del género *Tobravirus* (Cibrián *et al.*, 2007).

### Hongos ophiostomatoides

Definir taxonómicamente el término hongo ophiostomatoide es difícil, debido a que involucra varios caracteres en su clasificación. Upadhyay (1993, 1981) y Malloch y Blackell (1993), reconocen que son Ascomicetes caracterizados por presentar un ascocarpo (peritecio)

globoso a subgloboso, o en forma de botella, de color café claro, negro y hialino en el ápice del cuello, base bulbosa con o sin ornamentaciones, cuellos largos con el ápice ostiolado con o sin hifas ostiolares o cerrado (tipo cleistotecio). Las ascas son clavadas, subesféricas, esféricas o fusiformes y son de tipo evanescente creciendo irregularmente en el centrum del ascocarpo. Las ascosporas son de forma variable, aseptadas (rara vez bicelular), hialinas, con o sin la vaina mucilaginosa, ausencia del poro de germinación y embebidas en una matriz mucilaginosa (Upadhyay, 1993). Las masas de conidios y de ascosporas contenidas en una matriz mucilaginosa “esporas en gotas”, las ascosporas exudadas a través del ápice del cuello del peritecio. Este mucilago de esporas les permite adherirse más fácilmente sobre la superficie de los insectos y facilitando su dispersión a nuevos hospedantes sanos. Los hongos ophiostomatoides agrupan a 110 especies de ascomicetes en cuatro géneros: *Ceratocystis sensu stricto* Ellis & Halst., *Ophiostoma* Syd.& P. Syd., *Ceratocystiopsis* H. P. Upadhyay & W. B. Kendr. y *Gondwanamyces* Marais & M. J. Wingf. (Upadhyay y Kendrick, 1975; Upadhyay, 1993; Upadhyay, 1981). Estos hongos, en su mayoría saprofiticos y con un número reducido como patógenos primarios, se distribuyen en regiones templadas, tropicales a subtropicales del mundo causando pérdidas económicas en cultivos agrícolas (higo, piña, plátano, camote, nuez, frijol, mango, caña de azúcar, cítricos, algodón, tabaco, café y cacao), forestales (coníferas, olmos, encinos, eucaliptos y hule) y algunos causan enfermedades en humanos y animales (Upadhyay, 1981; Wingfield, 1993; Kile, 1993). A continuación se presenta aspectos relevantes de la evolución taxonómica de *Ceratocystiopsis*, *Ceratocystis* y *Ophiostoma* que conforman el mayor número de especies de hongos ophiostomatoides (Cuadro 1).

Cuadro 1. Sinopsis de la taxonomía de *Ceratocystis*, *Ophiostoma* y *Ceratocystiopsis*.

Año	Historia	Referencia
1890	Ellis y Halsted establecieron el género <i>Ceratocystis</i> .	Perry (1991b)
1919	Sydow y Sydow establecieron el género <i>Ophiostoma</i> .	Perry (1991b)
1932	Nannfeldt propone a la familia Ophiostomataceae donde considera a <i>Ophiostoma</i> congénico con <i>Ceratocystis</i> .	Upadhyay (1993)
1934	Melin y Nannfeldt dividen el género <i>Ophiostoma</i> en dos secciones: la sección <i>Brevirostrata</i> que presentan peritecios con cuellos cortos y la sección <i>Longirostrata</i> caracterizados por presentar peritecios con cuellos largos; la sección <i>Longirostrata</i> se divide en base al tipo de conidio (exógeno y endógeno).	Perry (1991b)
1951	Bakshi considera a <i>Ophiostoma</i> , <i>Endoconidiophora</i> , <i>Rostrella</i> , <i>Linostoma</i> y <i>Grosmannia</i> como sinónimos del género <i>Ceratocystis</i> .	Upadhyay (1981, 1993)
1956	Ubica el género <i>Ceratocystis</i> en el orden Plectomycetes y consideró a <i>Endoconidiophora</i> , <i>Grosmannia</i> y <i>Ophiostoma</i> como sinónimos de <i>Ceratocystis</i> . Además, lo divide en dos grupos en base al estado conidial de sus anamorfos: exoconidio ( <i>Leptographium</i> ) y endoconidio ( <i>Chalara</i> ).	Hunt (1956)
1961	Wright y Cain enfatizan que la morfología de la ascospora es un carácter fundamental para la separación de especies de <i>Ceratocystis</i> . Además, afirman que la forma y tamaño del peritecio, ascospora, la vaina gelatinosa (cuando presente), estados imperfectos y las características culturales son importantes para la identificación de especies.	Upadhyay (1981)
1974	Consideran a <i>Endoconidiophora</i> , <i>Grosmannia</i> y <i>Ophiostoma</i> como sinónimos de <i>Ceratocystis</i> . A su vez agruparon a <i>Ceratocystis sensu lato</i> en cuatro grupos en base a la forma de la ascospora: (I) Grupo minuta: ascospora elongada a curva con una vaina hialina, (II) Grupo ips: ascospora cilíndrica o mancuerna con una vaina en forma de almohada, (III) Grupo fimbriata: ascospora en forma de luna a curva con una vaina uniforme o variable que se extiende a los extremos, con apariencia de sombrero, media luna, campanulado o cuculado y (IV) Grupo pilífera: ascospora cilíndrica, ovoide, curvada y sin la vaina mucilaginosa.	Olchowecki y Reid (1974)



Cuadro 1. Sinopsis de la taxonomía de *Ceratocystis*, *Ophiostoma* y *Ceratocystiopsis*.

Año	Historia	Referencia
1974	Divide a <i>Ceratocystis sensu lato</i> en dos grupos en base a la morfología del estado conidial, asignándole a <i>Ceratocystis</i> como anamorfos a <i>Chalara</i> Peyronel, <i>Chalaropsis</i> Peyronel y <i>Thielaviopsis</i> Went. Para el género <i>Ophiostoma</i> los anamorfos <i>Sporothrix</i> Hektoen & Perkins ex Nicot & Mariat, <i>Verticicladiella</i> S. Hughes, <i>Leptographium</i> Lagerberg Melin, y <i>Graphium</i> Corda.	De Hoog (1974)
1975	Proponen dividir a <i>Ceratocystis sensu lato</i> y establecen a <i>Ceratocystiopsis</i> Upadhyay & Kendrick como un nuevo género en base a lo propuesto por Olchowcki y Reid en 1974, en el grupo minuta que se caracteriza por tener ascosporas falcadas, ascocarpos con cuellos cortos y lo clasifica en Plectomicetes, orden Microascales y familia Ophiostomataceae. Los mismos autores consideran a <i>Sporothrix</i> , <i>Hyalorhinocladiella</i> y <i>Verticicladiella</i> como sus anamorfos de <i>Ceratocystis</i> . Además, incluyen para <i>Ceratocystis</i> cuatro nuevos géneros como anamorfos: <i>Hyalorhinocladiella</i> , <i>Graphilbum</i> , <i>Hyalopesotum</i> y <i>Pachnodium</i> .	Upadhyay y Kendrick (1975)
1980	Benny y Kimbrough proponen el orden Ophiostomatales con la familia Ophiostomataceae que incluye a los géneros <i>Ophiostoma</i> , <i>Ceratocystis</i> , <i>Ceratocystiopsis</i> y <i>Shaeronaemella</i> .	Perry (1991)
1981	Menciona que la ciclohexamida ayuda a separar a los géneros <i>Ceratocystis sensu stricto</i> (anamorfo: <i>Chalara</i> ) y <i>Ophiostoma</i> . <i>Ceratocystis</i> carece de quitina, celulosa y ramnosa en las paredes de sus células y es altamente sensible a ciclohexamida comparado con <i>Ophiostoma</i> que es altamente resistente a ciclohexamida.	Harrington (1981)
1981	Clasifica a <i>Ceratocystis</i> en cuatro secciones en base a la morfología de la ascospora. Sección ophiostoma ( <i>Ophiostoma piliferum</i> ), Sección ips ( <i>Ceratocystis ips</i> ), Sección <i>ceratocystis</i> ( <i>C. fimbriata</i> ), y Sección <i>endoconidiophora</i> ( <i>C. coerulescens</i> ), separando a <i>Ceratocystiopsis</i> por presentar ascoporas intermedias entre falcadas y media luna.	Upadhyay (1981)

Cuadro 1. Sinopsis de la taxonomía de *Ceratocystis*, *Ophiostoma* y *Ceratocystiopsis*.

Año	Historia	Referencia
1984	Transfieren a <i>Ceratocystis sensu stricto</i> a las especies que presentan a <i>Chalara</i> como anamorfo, sensibles a ciclohexamida y las que presentan un anamorfo diferente a <i>Chalara</i> son puestas en el género <i>Ophiostoma</i> .	De Hoog y Sheffer (1984)
1988	Von Arx y Van Der Walt aceptan el orden Ophiostomatales e incluyen en la familia Ophiostomataceae a <i>Ceratocystiopsis</i> y <i>Ophiostoma</i> , y proponen a familia Pyxidiophoraceae donde ubican a <i>Ceratocystis</i> por tener a <i>Chalara</i> como anamorfo y la ausencia de celulosa en sus pared celular.	Perry (1991b)
1990	Van Wyk y Wingfield revisan el estatus taxonómico de <i>Ceratocystis</i> , <i>Ceratocystiopsis</i> y <i>Ophiostoma</i> con respecto al desarrollo de las ascas, ascosporas y estructura del centrum. Además, sugieren estudios estructurales para clarificar estas relaciones.	Perry (1991b)
1993	Separa a <i>Ceratocystis</i> de <i>Ophiostoma</i> por la ausencia de celulosa, quitina, ramnosa y el tipo de desarrollo del conidio.	Samuels (1993)
1993	Wingfield propone otra revisión de la separación de <i>Ceratocystiopsis</i> de <i>Ceratocystis</i> y <i>Ophiostoma</i> , debido a que el género fue separado en base a la forma de la ascospora. Hausner <i>et al.</i> comparan los tres géneros a nivel molecular y concluyen que <i>Ceratocystiopsis</i> y <i>Ophiostoma</i> pueden ser sinónimos a excepción de <i>Cp. falcata</i> se considera un género distinto. En el orden Ophiostomatales Benny & Kimbr ubica a <i>Ophiostoma</i> .	Hausner <i>et al.</i> (1993); Jacobs y Wingfield (2001)
1994	Reportan que las especies de <i>Ceratocystis sensu stricto</i> con anamorfos del género <i>Chalara</i> no son capaces de crecer en medio con cicloheximida mientras que las especies de <i>Ophiostoma sensu stricto</i> con sus anamorfos <i>Graphium</i> , <i>Leptographium</i> , <i>Sporothrix</i> , <i>Hyalorhinocladiella</i> y <i>Knoxdaviesa</i> son resistentes a este compuesto.	Mouton <i>et al.</i> (1994)
1996	Con estudios a nivel molecular, por la comparación de secuencias de ADNr, se ha separa <i>Ceratocystis</i> de <i>Ophiostoma</i> , ya que no están filogenéticamente relacionados	Wingfield <i>et al.</i> (1996)

Cuadro 1. Sinopsis de la taxonomía de *Ceratocystis*, *Ophiostoma* y *Ceratocystiopsis*.

Año	Historia	Referencia
1999	Confirma la separación de <i>Ceratocystiopsis falcata</i> de <i>Ceratocystis</i> y <i>Ophiostoma</i> por medio de RFLP y hibridación de DNA propuesto por Hausner <i>et al.</i> (1993).	Viljoen <i>et al.</i> (1999)
2000	Transfieren a <i>Ceratocystiopsis falcata</i> en el género <i>Cornuvesica</i> con <i>Chalara</i> como anamorfo.	Viljoen <i>et al.</i> (2000)
2001	Acomoda al género <i>Ophiostoma</i> en el orden Ophiostomatales, está integrada por Kathistaceae y Ophiostomataceae. <i>Ceratocystis</i> pertenece al orden Microascales integrada por tres familias: Ceratocystaceae, Chadaudiellaceae y Microascaceae.	Kirk <i>et al.</i> (2001)
2002	Reporta que <i>Ceratocystis</i> presenta a <i>Thielaviopsis</i> con conidiogénesis enteroblastica como anamorfo y en el orden Microascales Luttr. ex Benny & Kimbr.	Paulin-Mahady <i>et al.</i> (2002)
2006	Consideran a cinco géneros para formar el grupo de hongos ophiostomatoides donde se incluye a: <i>Ceratocystiopsis</i> , <i>Ceratocystis</i> , <i>Cornuvesica</i> , <i>Gondwanamyces</i> y <i>Ophiostoma</i> .	Marín y Wingfield (2006)
2006	Reportan que <i>Ophiostoma</i> incluye a <i>Pesotum</i> J. L. Crane & Schokn., y <i>Sporothrix</i> Hektoen & C.F. Perkins como anamorfos, <i>Ceratocystiopsis</i> H.P. Upadhyay y W.B. Kendr. con <i>Hyalorhinocladiella</i> H.P. Upadhyay y W.B. Kendr como su anamorfo, y <i>Grosmannia</i> Goid. con <i>Leptographium</i> Lagerb. & Melin.	Zipfel <i>et al.</i> (2006)

## *Ceratocystis*

El género *Ceratocystis* pertenece a la clase Ascomycetes en el orden Microascales, integrada por tres familias: Ceratocystaceae, Chadaudiellaceae y Microascaceae, con 67 especies (Kirk *et al.*, 2001), y fue propuesto por Ellis y Halsted en 1890 en base a la especie *C. fimbriata* (Upadhyay, 1981). La familia Ceratocystaceae esta conformada por dos géneros y 16 especies; la familia Chadaudiellaceae por dos géneros y tres especies, y la familia Microascaceae por ocho géneros y 43 especies (Kirk *et al.*, 2001). En el 2007, Lumbsch y Huhndorf consideran al orden Microascales como un orden no definido y lo conforman cinco géneros: *Ceratocystis* Ellis & Halst., *Cornuvesica* C.D. Viljoen, M.J. Wingf. & K. Jacobs, *Gondwanamyces* Marais & M.J. Wingf., *Sphaeronaemella* P. Karst. y *Viennotidia* Negru & Verona ex Rogerson (Lumbsch y Huhndorf, 2007).

El género se caracteriza por presentar un ascocarpo globoso a subgloboso o en forma de matraz y es de color café, café oscuro a negro. Además, algunas especies presentan ornamentaciones como *C. radicola*, *C. paradoxa*, *C. moniliformis*, *C. multiannulata* y *C. coerulescens* (Upadhyay, 1981). Las estructuras de reproducción sexual se forman en el floema y cambium vascular, creciendo en forma solitaria o agregada en forma superficial o inmersa. Las ascas se desarrollan en una línea adyacente de la pared del peritecio no en medio del centrum del ascocarpo; las ascosporas son en forma de sombrero contenidas en una matriz gelatinosa en la punta del ostiolo del cuello (Upadhyay, 1981; Van-Wyk *et al.*, 1993). Además, *Ceratocystis* carece de quitina, celulosa y ramnosa en las paredes de sus células, es altamente sensible a ciclohexamida y esta prueba se considera un carácter taxonómico para separar *Ceratocystis* del género *Ophiostoma* (Harrington, 1981; Van-Wyk, *et al.*, 1993; Samuels, 1993). *Ceratocystis sensu stricto* presenta a *Thielaviopsis* como anamorfo con

conidiogénesis enteroblastica basado por análisis de secuencias del ARN ribosomal (ARNr), anteriormente *Chalara* (Corda) Rabenh era considerado el anamorfo (Upadhyay, 1993; Paulin *et al.*, 2002).

Especies de este grupo de hongos producen metabolitos volátiles que atraen una amplia variedad de insectos a los tejidos vegetales infectados, sin embargo, el grado de asociación entre los insectos y los diferentes especies de *Ceratocystis* es altamente variable, presentándose asociaciones mutualistas con insectos descortezadores (Coleoptera; Scolytinae) y relaciones no específicas con nitidúlidos (Coleoptera: Nutidulidae), moscas (Diptera: Drosophilae) y escarabajos ambrosiales (Kile, 1993; Marín y Wingfield, 2006). El género *Ceratocystis s.s* incluye hongos fitopatógenos que ataca plantas angiospermas y gimnospermas en diversas regiones del mundo (Kile, 1993). Entre las principales enfermedades causadas por estos hongos están: marchitamientos vasculares, manchado de maderas, canchros y pudriciones radiculares en tallos y frutos (Kile, 1993; Marín y Wingfield, 2006). En este grupo de hongos se encuentra *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Haist causante de marchitamientos vasculares y canchros en América central, Asia, Estados Unidos, Europa, India y Sudamérica. Además, existen dos formas especiales de *C. fimbriata* como *Ceratocystis fimbriata* forma especial *platani* causando el cancro en *Platanus acerifolia*, *P. occidentalis* y *P. orientalis* en Norte América y Europa (Santini y Capretti, 2000), y *Ceratocystis cacaofunesta* Engelbrecht et Harrington (anteriormente *C. fimbriata*) causando el marchitamiento vascular en cacao (*Theobroma cacao* L.), el cual difiere de *C. fimbriata* en patogenicidad y la producción de endoconidias doloriformes en cadena (Baker y Harrington, 2005; Engelbrecht *et al.*, 2007). Otros aislados de *C. fimbriata* en cultivos como camote (*Ipomea batatas*) y sicomoro (*Platanus* spp.) se han considerado formas especiales con la amplificación de las regiones

internas ITS (Internal Transcribed Spacer) entre los genes ribosomales (rADN) (Baker *et al.*, 2003). *C. fagacearum* (Bretz.) Hunt causa marchitamiento en encinos (*Quercus* spp.) en Estados Unidos (Sinclair y Lyon, 2005); *C. polonica* (Siemaszko) Moreau presenta niveles altos de virulencia en *Picea abies* L. Karst (Baker y Harrington, 2005). En caña de azúcar *Ceratocystis paradoxa* (Dade), *C. adiposa* (Hedgcock) Moreau y *C. radicola* (Bliss) Moreau en *Phoenix dactylifera*, las tres especies de hongos causan pudriciones en raíz (Marín y Wingfield, 2006).

Entre las especies que causan manchado en madera esta el complejo de *C. coerulescens* (Müch) en coníferas, *C. douglasii* (Davidson) en *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, *C. virescens* (Davidson) C. Morou en *Acer Saccharum* Marsh y *C. eucalypti* en *Eucalyptus* spp. Estos hongos no afectan las propiedades estructurales de la madera pero reducen las ganancias económicas al reducir el valor de los productos industrializados en coníferas de la familia Pinaceae (Seifert, 1993; Marín y Wingfield, 2006; Harrington *et al.*, 1996). La clasificación de las siete especies del complejo *C. coerulescens* se ha hecho en base a la comparación de secuencias ITS, isoenzimas, morfología y el hospedante que atacan. *C. coerulescens* (Müch) Bakshi causa el manchado en *Picea* y *Pinus* y *C. pinicola* Harrington & Wingfield en *Pinus*, ambos hongos reportados en Europa y Norte América, *C. resinifera* Harrington & Wingfield entra por heridas en *Picea* y se distribuye en Europa y Norte América, *C. polonica* Siemaszko reportado en *Picea abies* y *C. laricicola* Redfern & Minter en *Picea*, ambas especies se encuentra en Europa y Asia, y asociados con el insecto descortezador del género *Ips*, *C. rufipenni* Wingfield, Harrington & Solheim asociado con *Dendroctonus rufipennis* en *Picea engelmannii* y *Picea glauca*, y *C. douglasii* (Davidson) Wingfield & Harrington en

*Pseudotsuga*. Ambas especies se distribuyen en Norteamérica (Harrington y Wingfield, 1998; Witthuhh *et al.*, 1999.).

### *Ophiostoma*

El género *Ophiostoma* pertenece a la clase Ascomycetes en el orden Ophiostomatales integrada por la familia Kathistaceae y Ophiostomataceae, con 110 especies (Kirk *et al.*, 2001) y fue propuesto en 1919 por Sydow y Sydow (Samuels, 1993). En la familia Kathistaceae, sólo se encuentra el género *Kathistes* Malloch & M. Blackw y en la familia Ophiostomataceae, los géneros *Ceratocystiopsis* H.P. Upadhyay & W.B. Kendr., *Fragosphaeria* Shear, *Grosmannia* Gold., *Klasterskya* Petr., *Ophiostoma* Syd. & P. Syd., *Spumatoria* Masse & E.S. Salmon y *Subbaromyces* Hesselt. (Lumbsch y Huhndorf, 2007).

*Ophiostoma* se caracteriza por presentar un ascocarpo de color negro en forma de botella, con cuello usualmente largo y el desarrollo del asca es en la base del centrum del ascocarpo (Malloch y Blackwell, 1993). Las ascosporas son unicelulares contenidas en una masa mucilaginosa en el ostiolo del cuello (Upadhyay, 1981; Wingfield *et al.*, 1993; Malloch y Blackwell, 1993; Jacobs *et al.*, 2000). En el floema crece solitario y superficialmente o parcialmente inmerso. En medio de cultivo artificial es tolerante a la cicloheximida y las paredes de las células contienen celulosa y ramnosa (Harrington, 1981). El asca es globosa, oval o clavada contiene ocho esporas formadas en cadenas y son de tipo evanescente (Upadhyay, 1981; Hanlin, 2000). Las ascosporas son hialinas, aseptadas, cilíndricas, semilunares, alantoides, reniformes, en forma de almohadas, pero algunas veces aparentemente de color amarillento en masas de ascosporas de forma asimétrica. Sus anamorfos se encuentran en varios géneros como *Leptographium*, *Pesotum*, *Sporothrix*,

*Hyalorhinocladiella* y *Knoxdaviesia* (Jacobs y Wingfield, 2001; Wingfield *et al.*, 1993; Seifert *et al.*, 1993). Sin embargo, Zipfel *et al.* (2006) proponen que el género *Leptographium* es anamorfo del género *Grosmannia*, las relacionadas con *Hyalorhinocladiella* con el género *Ceratocystiopsis* y por último las asociadas con *Pesotum* y *Sporothrix* con *Ophiostoma*. Este estudio se realizó mediante la comparación de secuencias de ADN con los genes LSU y  $\beta$ -tubulin con 50 especies de *Ophiostoma*. Estos anamorfos se caracterizan por contener masas de conidias en un mucilago pegajoso en el ápice de los conidióforos lo que permite su fácil dispersión por insectos (Jacobs *et al.*, 2000).

En su mayoría, las especies agrupadas en este género causan manchas en la madera y algunas pueden llegar a matar árboles vivos solas o asociadas con alguna especie del insecto descortezador Curculionidae: Scolytinae, como *Ophiostoma ulmi* y *O. novo-ulmi*, responsables de la enfermedad del olmo holandés en Europa y Norte América. Algunas especies de *Leptographium* causan enfermedades en coníferas como *L. wagneri* responsable del manchado negro de la raíz en Norteamérica. Esta especie presenta tres variedades: *L. wagneri* var. *wagneri* ataca a *Pinus monophylla*, *P. aedulis*; *L. wagneri* var. *pseudotsuga* en *Pseudotsuga menziesii* y *L. wagneri* var. *ponderosum* en *P. ponderosa*, *P. contorta* y *P. jeffreyi* (Harrington, 1993)

### *Ceratocystiopsis*

*Ceratocystiopsis* pertenece a la clase Ascomycetes, orden Ophiostomatales y en la familia Ophiostomataceae (Kirk *et al.*, 2001; Lumbsch y Huhndorf, 2007) y fue propuesto por Upadhyay y Kendrick (1975) por presentar ascosporas falcadas diferentes al género *Ceratocystis* y lo ubican en Plectomycetes, Microascales, Ophiostomataceae. Upadhyay



(1981) lo considera como un nuevo género. Sin embargo, Wingfield (1993), Hausner *et al.* (1993) y De Hoog y Scheffer (1984) consideran a *Ceratocystiopsis* en base a su ecología, caracteres moleculares y sus anamorfos como sinónimo de *Ophiostoma*. Zipfel *et al.* (2006) separan del género *Ophiostoma* a *Ceratocystiopsis* y *Grosmannia*, mediante un estudio filogenético con la amplificación del gen  $\beta$ -tubulina y características morfológicas. Hausner *et al.* (1993) secuenciaron la subunidad ribosomal pequeña (ARNr) de especies de *Ceratocystiopsis* y concluyen que la mayoría de las especies pertenecen al género *Ophiostoma*, a excepción de *Cp. falcata* que no se relaciona filogenéticamente con *Ophiostoma* y *Ceratocystis*. Viljoen (1996) confirma lo reportado por Hausner *et al.* (1993), usando RFLP e hibridación de ADN. Sin embargo, Viljoen *et al.* (2000) transfiere a *Cp. falcata* al género *Cornuvesica* Viljoen, Wingf. & Jacobs nombrándola como *Cornuvesica falcata* (Wright & Cain) Viljoen, Wingf. & Jacobs y sugieren que el anamorfo es distinto al género *Chalara*. Nag y Kendrick (1993) ubican *Cp. falcata* dentro de *Ceratocystis* por poseer a *Chalara* como anamorfo. En 1984, De Hoog y Scheffer ubican a *Cp. falcata* en el género *Pyxidiophora* Bref. & Tav. por presentar un peritecio con cuello corto y la ascospora con dos células.

El género presenta peritecios con cuellos cortos, ascosporas falcadas y es sensible a cicloheximida (De Hoog y Scheffer, 1984). Ascas hialinas, fusiformes, clavadas o elipsoides con ocho ascosporas. Ascosporas hialinas, aseptadas, elongadas o falcadas (Zipfel *et al.*, 2006). Las especies de *Ceratocystiopsis* tiene como anamorfos a *Chalara*, *Hyalorhinocladiella*, *Sporothrix* y *Knoxdaviesia*; *Hyalorhinocladiella*, *Sporothrix* y *Knoxdaviesia*, con conidiogénesis holoblastica y *Chalara* con conidiogénesis enteroblastica presente en *Ceratocystis falcata* Wright & Cain, Upadhyay (Wingfield *et al.*, 1988; Wingfield,

1993), pero Zipfel *et al.* (2006) consideran a *Hyalorhinocladiella* y en forma ocasional a similares de *Sporothrix* como anamorfos. El género consta con 15 especies y como especie tipo a *Ceratocystiopsis minuta* (Upadhyay, 1981). *C. minuta* fue descrita por primera vez por Siemazko en 1939 en *Picea abies* atacado por *Ips typographus*, en el Sur de África se ha asociado con *Hylastes angustatus* e *Hylurgus ligniperda* (Zhou *et al.*, 2001), y en *Pinus radiata* atacado por *H. ligniperda* (Zhou *et al.*, 2004a).

### Descortezadores

Los insectos descortezadores del género *Dendroctonus* Erichson (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) son de gran importancia económica por ser plaga forestal (Farrell *et al.*, 2001). Este género se distribuye en Norteamérica, Europa, Asia y la mayoría de las especies, excepto *Dendroctonus approximatus* Hopkins, son relativamente agresivas llegando a matar al árbol. Algunas especies de insectos descortezadores llegan a matar decenas, cientos a miles de árboles en un periodo corto de años (Six y Klepzig, 2004).

Los insectos descortezadores construyen sus galerías en el floema pero no en el xilema de la familia Pinaceae. Además, presentan estrategias de ataque como facultativos (colonizan árboles moribundos o recién muertos), parásitos (atacan árboles vivos) y saprofiticos (colonizan árboles muertos). El número de especies agresivas que matan árboles es menor de un 2% de las 500 especies de descortezadores descritas en el Norte América. Los escarabajos ambrosiales no se alimentan del tejido de la planta sino se alimentan de los hongos asociados. Otros escolítidos se alimentan del floema y del cambium vascular de la planta o combinando su alimentación con el tejido de la planta y estructuras del hongo (Six, 2003; Paine *et al.*, 1997).

## Asociación descortezador-hongo

Los insectos descortezadores se asocian con hongos filamentosos en Ascomycotina y Basidiomycotina donde se presenta una simbiosis y además puede haber una relación de antagonismo, comensalismo, mutualismo o obligado a facultativo (Six, 2003). La mayoría de los hongos asociados con *Dendroctonus* son del género *Ophiostoma*, *Ceratocystiopsis* y *Ceratocystis*, estos hongos presentan características morfológicas similares. *Ceratocystis* posee a *Thielaviopsis*, anteriormente *Chalara*, como anamorfo (Zipfel *et al.*, 2006); *Ophiostoma* posee varios anamorfos como *Leptographium*, *Graphium*, *Hyalorhinocladiella*, *Sporothrix* y *Knoxdaviesia* y *Ceratocystiopsis* incluyen los anamorfos *Hyalorhinocladiella* y *Sporothrix* (Jacobs y Wingfield, 2001; Paulin *et al.*, 2002; Seifert *et al.*, 1993; Upadhyay, 1993; Wingfield *et al.*, 1993). Estos hongos llamados comúnmente “hongos ophiostomatoides” se dispersan fácilmente por artrópodos, al producir masas de esporas contenidas en un mucilago que facilitan la adherencia en diferentes partes del cuerpo del escarabajo como los élitros o micangio que es una invaginación en el exoesqueleto con glándulas o células secretoras especializada para la adquirir y transportar el hongo y permite crecer propágulos del hongo por la presencia de ácidos grasos, esteroles y aminoácidos (Six y Paine, 1998; Klepzig y Six 2004), Además, asegura que no sean fácilmente removidos durante el tránsito del insecto hacia nuevos hospedantes. La cubierta mucilaginosa se dispersa en la resina del hospedante pero no fácilmente en el agua, esto asegura que las esporas sean depositadas en un nuevo hospedante (Wingfield *et al.*, 1993). Six y Kleezig (2004) clasifican 19 especies de *Dendroctonus* en cinco grupos en base a linaje filogenético, historia de vida y asociaciones con hongos de cada una de las especies de descortezadores (Cuadro 1). En el Grupo I: Las especies *D. ponderosae* y *D. jeffreyi* poseen características morfológicas y

genéticas muy similares. Estos insectos descortezadores presentan un micangio mutualista para *O. clavigerum*. Además, *D. ponderosae* se asocia con *Ophiostoma montium* como un segundo hongo micangial considerado como un antagonista débil o mutualista. Estos descortezadores se caracterizan por la presencia de un saco micangial maxilar, desarrollo de la larva solitario en el floema y matan el árbol (Cuadro 1). Ambas especies completan una generación en un año. Grupo II: Este grupo de descortezadores se caracterizan por presentar una saco micangial pronotal glandular, y son capaces de matar el árbol y la larva se alimentan en el floema en primera etapa y después se mueve hacia la corteza. Estas especies de descortezadores se alimentan de los hongos asociados para completar sus requerimientos nutricionales presentando varias generaciones por año de adultos (Cuadro 1). Grupo III. Los descortezadores *Dendroctonus valens* y *D. terebrantis* se alimentan del floema, rara vez matan el árbol y *D. rhizophagus* y *D. parallelcollis* matan a su hospedante (Cuadro 1). Las cuatro especies de insectos descortezadores son oportunistas por atacar tocones o la base de árboles recién muertos. Las larvas de *D. valens*, *D. terebrantis* y *D. rhizophagus* se agrupan y alimentan del floema de la base o raíces del árbol. *D. parallelcollis* raramente mata al árbol antes de depositar sus huevos, sus larvas se alimentan en solitario en el floema de las raíces y la base del árbol (Cuadro 1). Grupo IV: Las especies de descortezadores de este grupo presentan una amplia variedad en el patrón de alimentación y colonización en los hospedantes. *Dendroctonus micans*, *D. punctatus* y *D. murrayanae* colonizan a *Picea*; *D. rufipennis* a *Pinus*; *D. simplex* atacan a *Larix* y *D. pseudotsugae* a *Pseudotsuga*. Las larvas de *D. micans* y *D. punctatus* se alimentan en forma gregaria en árboles vivos, *D. murrayanae* mata al hospedante mientras que la larva se alimenta en forma gregaria y las tres especies restantes del grupo IV matan al hospedante y las larvas se alimentan en forma solitaria. La asociación

de las especies de descortezadores de este grupo con hongos es poco conocida. Sin embargo, en *D. micans* se asocia más comúnmente con *Ophiostoma canum* (Cuadro 1). Grupo V: Se reporta únicamente la especie asiática *Dendroctonus armandi* que se alimenta en *Pinus* y complementa su requerimientos nutricionales con hongos. La biología del descortezador es similar a las especies del grupo I. Además, transporta a *Leptographium terebrantis* y *O. minus* en las puntuaciones del pronoto.

Además, existen asociaciones con la clase Basidiomycetes como: *Gloeocystidium ipidophilum* Siemako en galerías de *Ips typographus* L., *Sebacina* en la cámara pupal de *I. avulsus* (Eichoff) y un basidiomycete artroconidial en la cámara pupal de *Dendroctonus ponderosae* Hopkins. El género *Entomocorticium* es el Basidiomycete más común asociado al insecto descortezador *I. avulsus*, y tiene un efecto simbiote en el estado larvario. En *D. ponderosae* asociado con un ascomicete y *Entomocorticium dendrotoni* en la cámara pupal contribuye en la nutrición del insecto. En *D. jeffreyi* se ha encontrado en la cámara pupal a *Entomocorticium* sp. A (SJB122), fue el primer Basidiomycete aislado del micangio del insecto descortezador y es común encontrarlo en el micangio de *D. frontalis* y *D. brevicomis* (Six, 2003).

Cuadro 2. Aspectos de historias de vidas de insectos descortezadores y tipo de asociación con hongos.

Grupo	Descortezador	Tipo de micangio	Hospedante	Hábito	Hongo micangial	Localización en el hospedante	Tipo de asociación	Hongos con distribución restringida
I	<i>D. ponderosae</i>	Saco maxilar	<i>Pinus</i>	Polífagos	<i>O clavigerum</i> <i>O montium</i>	Floema Floema	Mutualista Antagonista	<i>Entomocorticium dendroctoni</i> <i>Entomocorticium</i> sp.
	<i>D. jeffeyi</i>	Saco maxilar		Monófagos	<i>O clavigerum</i>	Floema	Mutualista	<i>Entomocorticium</i> sp.
	<i>D. vitei</i>	Desconocido	<i>Pinus</i>	Olifagos	Desconocido	Floema	Desconocido	
	<i>D. mexicana</i>	Saco pronotal	<i>Pinus</i>	Polífagos	Desconocido	Floema	Desconocido	
	<i>D. frontalis</i>	Saco pronotal	<i>Pinus</i>	Polífagos	<i>Entomocorticium</i> sp. <i>Ophlostoma ranaculosum</i>	Floema	Mutualista Mutualista	
II	<i>D. adjunctus</i>	Saco pronotal	<i>Pinus</i>	Olifagos	<i>Ophlostoma</i> sp. <i>Ophlostoma minus</i>	Floema	Antagonista Desconocido	
	<i>D. brevicornis</i>	Saco pronotal	<i>Pinus</i>	Olifagos	<i>Leptographium pyrinum</i>	Floema	Mutualista	
	<i>D. approximatus</i>	Saco pronotal	<i>Pinus</i>	Polífagos	<i>Entomocorticium</i> sp. <i>Ophlostoma brevicornis</i>	Floema	Mutualista Desconocido	
					<i>Phelopsis gigantea</i> <i>Leptographium</i> spp.			
III	<i>D. rhizophagus</i>	Desconocido	<i>Pinus</i>	Olifagos	Desconocido	Floema	Desconocido	
	<i>D. valens</i>	Desconocido	<i>Pinus</i>	Polífagos	<i>Ophlostoma ips</i> <i>Leptographium terabrantis</i>	Floema	Desconocido	<i>Leptographium procerum</i>
IV	<i>D. terabrantis</i>	Desconocido	<i>Pinus</i>	Polífagos	<i>Leptographium terabrantis</i>	Floema	Desconocido	<i>Leptographium procerum</i> y <i>O. ips</i>
	<i>D. paratlellocollis</i>	Desconocido	<i>Pinus</i>	Olifagos	<i>Leptographium terabrantis</i>	Floema	Desconocido	
	<i>D. micans</i>	Desconocido	<i>Picea</i>	Polífagos	Desconocido	Floema	Desconocido	
	<i>D. punctatus</i>	Desconocido	<i>Picea</i>	Olifagos	<i>Ophlostoma canum</i>	Floema	Desconocido	
	<i>D. murrayanae</i>	Desconocido	<i>Picea</i>	Olifagos	Desconocido	Floema	Desconocido	
	<i>D. rufipennis</i>	Desconocido/Puntuaciones	<i>Pinus</i>	Polífagos	<i>Leptographium abietinum</i>	Floema	Desconocido	<i>Caratocystis rufipenni</i>
	<i>D. simplex</i>	Desconocido	<i>Larix</i>	Monófagos	<i>Ophlostoma americanum</i>	Floema	Desconocido	<i>Leptographium terabrantis</i> y <i>Pesolium</i> sp.
	<i>D. pseudotsugae</i>	Puntuaciones	<i>Pseudotsuga</i>	Olifagos	<i>Ophlostoma americanum</i> <i>Ophlostoma pseudotsugae</i> <i>Leptographium abietinum</i>	Floema	Desconocido	
					<i>Leptographium terabrantis</i>			
	V	<i>D. armandi</i>	Puntuaciones	<i>Pinus</i>	Polífagos	<i>Leptographium terabrantis</i> <i>Ophlostoma minus</i>	Floema	Desconocido

## LITERATURA CITADA

- Baker, C.J., T.C. Harrington, U. Krauss, A.C. Alfenas, 2003. Genetic variability and host specialization in the Latin American clade of *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology* 93:1274-1284.
- Baker, E.C.J., T.C. Harrington, 2005. Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. *Mycologia* 97:57-69.
- Campos, J.L., 1993. Claves para la determinación de los pinos mexicanos. Universidad Autónoma Chapingo, México. 70 p.
- Cibrián, T.D., 1986. Insectos de conos y semillas de las coníferas de México. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos/ Department of Agriculture, Forest Service. South Eastern Forest Experiment Station. 110 p.
- Cibrián, T.D., D.A. Rosales, S.E.G. Díaz, 2007. Enfermedades Forestales de México/Forest Diseases in México. Universidad Autónoma Chapingo; CONAFOR-SEMARNAT, México; Forest Service USDA, E.U.A.; NRCA Forest Service, Canadá y Comisión Forestal de América del Norte, COFAN, FAO. Chapingo, México. 587 p.
- Cibrián, T.D., J.T. Méndez. M, R.C. Bolaños, H.O. Yates III, J. F. Lara, 1995. Insectos Forestales de México. Universidad Autónoma Chapingo. SFFS-SARH, México; Forest Service USDA, E.U.A.; NRCA Forest Service, Canadá y Comisión Forestal de América del Norte, COFAN, FAO. Chapingo, México. 453 p.
- De Hoog, G.S., 1974. The genera *Blastobotrys*, *Sporothrix*, *Calcarisporium* and *Calcarisporiella* gen. nov. *Studies in Mycology* 7:1-84.
- De Hoog, G.S., R.J. Scheffer, 1984. *Ceratocystis* versus *Ophiostoma*: a reappraisal. *Mycologia* 76:292-299.

- Engelbrecht, C.J., T.C. Harrington, A. Alfenas, 2007. *Ceratocystis* wilt of cacao - A disease of increasing importance. *Phytopathology* 97:1648-1649.
- Farrrell, B.D., A.S. Sequeira, B.C. O'Meara, B.B. Normark, J.H. Chung, B.H. Jordal. 2001. The evolution agriculture in beetles (Curculionidae: Scolytinae and Platypodinae). *Evolution* 55:2011-2027.
- Hanlin, R.T., 2000. Illustrated genero of Ascomycetes. Vol. II. The American Phytopathological Society. St Paul, Minesota. 258 p.
- Harrington T.C., 1993. Diseases of conifers caused by species of *Ophiostoma* and *Leptographium*. In: M.J. Wingfield, K.A. Seifert, J.F. Webber. (eds.). *Ceratocystis* and *Ophiostoma*. Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minesota. pp. 161-172.
- Harrington, T. C., J. Steimel, M.J. Wingfield, G.A. Kile, 1996. Isozyme variation and species delimitation in the *Ceratocystis coerulescens* complex. *Mycologia* 88:104-113.
- Harrington, T.C., 1981. Cycloheximide sensitivity as a taxonomic character in *Ceratocystis*. *Mycologia* 73:1123-1129.
- Harrington, T.C., M.J. Wingfield, 1998. The *Ceratocystis* species on conifers. *Canadian Journal Botany* 76: 1446-1457.
- Hausner, G., Reid, J. Klassen, G.R., 1993. *Ceratocystiopsis*: a reappraisal based on molecular criteria. *Mycological Research* 97:625-633.
- Hunt, J., 1956. Taxonomy of the genus *Ceratocystis*. *Lloydia* 19:1-59.
- Jacobs K., M.J. Wingfield, 2001. *Leptographium* species: Tree Pathogens, Insect Associates, and Agents of Blue-Stain. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 207 p.



- Jacobs, K., Wingfield, M.J., P. W. Crous, 2000. *Ophiostoma europhioides* and *Ceratocystis pseudoeurophioides*, synonyms of *O. piceaperdum*. Mycological Research 104:238-243.
- Kile, G.A., 1993. Plant diseases caused by species of *Ceratocystis sensu stricto* and *Chalara*. In: Wingfield, M.J., K.A. Seifert, J.F. Webber (eds.), *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, ecology and pathogenicity. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota. pp 173-184.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C., and Stalpers, J.A. 2001. Dictionary of the fungi. 9<sup>th</sup> edition. CABI Bioscience. 655 p.
- Lumbsch, H.T. and S.M. Huhndorf. 2007. Outline of Ascomycota - 2007. Myconet 13:1-58.
- Malloch, D., Blackwell, M, 1993. Dispersal biology of the ophiostomatoid fungi. In: Wingfield, M.J., K.A. Seifert, J.F. Webber (eds.), *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, ecology and pathogenicity. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota. pp. 173-184.
- Marín, M.M., M.J. Wingfield, 2006. A review of *Ceratocystis sensu stricto* with special reference to the species complexes *C. coerulescens* and *C. fimbriata*. Revista Nacional Agronomica de Medellin 1:3045-3075.
- Marmolejo, J.G., 1991. El manchado azul de la Madera en Nuevo León. Reporte científico No. 27. Facultad de ciencias forestales. Linares, Nuevo León, México 59 p.
- Marmolejo, J.G., H. Butin, 1993. Las especies de *Ophiostoma* y *Ceratocystiopsis* (Ascomycetes, Microascales) conocidas de Nuevo León, México. Reporte científico especial No. 13. Facultad de ciencias forestales. Linares, Nuevo León, México. pp. 155-170.
- Marmolejo-Moncivais, J.G., 1989. Forstpathologische untersuchungen zur Pilzflora Nordost-Mexikos. PhD dissertation, Universität Göttingen. 136 p.

- Mouton, M., M.J. Wingfield, P.S. Wyk, 1994. Conidium development in anamorphs of *Ceratocystis sensu lato*: a review. South African Journal of Science 90:293-298.
- Nag Raj, T.R., W.B. Kendrick, 1993. The anamorph as generic determinant in the holomorph: the *Chalara* connection in the Ascomycetes, with special reference to the ophiostomatoid fungi. *In*: Wingfield, M.J., K.A. Seifert, J.F. Webber (eds.), *Ceratocystis* and *Ophiostoma*. Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. pp. 61-70.
- Olchowecki, A., J. Reid, 1974. Taxonomy of the genus *Ceratocystis* in Manitoba. Canadian Journal of Botany 52:1675-1711.
- Paine, T.D., K.F. Raffa, T.C. Harrington, 1997. Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. Annual Review Entomology 42:179-206.
- Paulin, M.A.E., T.C. Harrington, D.L. McNew, 2002. Phylogenetic and taxonomic evaluation of *Chalara*, *Chalaropsis* and *Thielaviopsis* anamorphs associated with *Ceratocystis*. Mycologia 94:62-72.
- Perry, J.P., 1991a. The pines of Mexico and Central America. Timber Press, Inc. 231 p.
- Perry, T.J., 1991b. A Synopsis of the taxonomic revisions in the genus *Ceratocystis* including a review of blue-staining species associated with *Dendroctonus* bark beetles. General Technical Report. USDA, Forest Service. New Orleans, Louisiana. 16 p.
- Rzedowski J. (1978). Vegetación de México. Limusa. México, D. F. 432 p.
- Samuels, G.J., 1993. The case for distinguishing *Ceratocystis* and *Ophiostoma*. *In*: Wingfield, M.J., K.A. Seifert, J.F. Webber (eds.), *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, ecology and pathogenicity. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota. pp. 15-20.

- Santillán, P.J., 1991. Silvicultura de las coníferas de la región central. Tesis de Maestría. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Mexico. 305 p.
- Santini, A., P. Capretti, 2000. Analysis of the Italian population of *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani* using RAPD and minisatellite marker. *Plant Pathology* 49:461-467.
- Seifert, K.A., 1993. Sapstain of commercial lumber by species of *Ophiostoma* and *Ceratocystis*. *In*: Wingfield, M.J., K.A. Seifert, J.F. Webber (eds.), *Ceratocystis* and *Ophiostoma*. Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. pp. 141-150
- Seifert, K.A., M.J. Wingfield, W.B. Kendrick, 1993. Nomenclator for described species of *Ceratocystis*, *Ophiostoma*, *Ceratocystiopsis*, *Ceratostomella* and *Sphaeronaemella*. *In*: Wingfield, M.J., K.A. Seifert, J.F. Webber (eds.), *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, ecology and pathogenicity. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota. pp. 269-287.
- Sinclair, W.A., H.H. Lyon, 2005. Diseases of trees and shrubs 2nd Edition. Cornell University Press: Ithaca, London: pp. 232-241.
- Six, D.L., 2003. Bark beetle-fungus symbioses. *In*: Bourtzis, K., T. Miller (eds.), *Insect symbiosis*. CRC Press. Boca Raton. E.U. 97-113.
- Six, D.L., K.D. Klepzig, 2004. *Dendroctonus* bark beetles as model systems for studies on symbiosis. *Simbiosis* 37:1-25.
- Upadhyay, H.P., 1981. A monograph of *Ceratocystis* and *Ceratocystiopsis*. University of Georgia Press. Athens. Georgia. 176 p.

- Upadhyay, H.P., 1993. Classification of the Ophiostomatoid fungi. *In*: Wingfield, M.J., K.A. Seifert, J.F. Webber (eds.), *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, ecology and pathogenicity. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota. pp. 7-13.
- Upadhyay, H.P., W.B. Kendrick, 1975. Prodrumus for a revision of *Ceratocystis* (Microascales, Ascomycetes) and its conidial states. *Mycologia* 67:798-805.
- Van-Wik, P.W.J., M.J. Wingfield, P.S. Van-Wik, 1993. Ultrastructure of centrum and ascospore development in selected *Ceratocystis* and *Ophiostoma* species. *In*: Wingfield, M.J., K.A. Seifert, J.F. Webber (eds.), *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, ecology and pathogenicity. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota. pp. 133-138.
- Viljoen, C.D., 1996. A taxonomic study of *Ophiostoma sensu lato* with special reference to species associated with *Protea infructescences* in southern Africa. Ph.D. Thesis, University of the Free State, Bloemfontein, South Africa.
- Viljoen, C.D., B.D. Wingfield, M.J. Wingfield, 2000. Computer aided systematic evaluation of morphological characters of the ophiostomatoid fungi. *Mycotaxon* 74: 217-239.
- Viljoen, C.D., M.J. Wingfield, B.D. Wingfield, 1999. *Cornuvesica*, a new genus to accommodate *Ceratocystiopsis falcate*. *Mycological Research* 104:365-367.
- Wingfield, M.J., 1993. Problems in delineating the genus *Ceratocystiopsis*. *In*: Wingfield, M.J., K.A. Seifert, J.F. Webber (eds.), *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, ecology and pathogenicity. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota. pp. 21-25.

- Wingfield, M.J., C. De Beer, C. Visser, B.D. Wingfield, 1996. A new *Ceratocystis* species defined using morphological and ribosomal DNA sequence comparisons. *Systematic and Applied Microbiology* 19:191-202.
- Wingfield, M.J., P.S. Vanwik, W.F.O. Marasas, 1988. *Ceratocystis protea* sp. Nov., with a new anamorph genus. *Mycologia* 80:23-30.
- Witthuhh, R.C., B.D. Wingfield, M.J. Wingfield, T.C. Harrington, 1999. PCR-based identification and phylogeny of species of *Ceratocystis sensu stricto*. *Mycol. Res.* 103:743-749.
- Zavala, C.F., 1984. Sinecología de la vegetación de la Estación de Enseñanza e Investigación Forestal Zoquiapan, Estados de México y Puebla. Tesis Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, 164 p.
- Zhou, X.D., W.Z. De Beer, B.D. Wingfield, M.J. Wingfield, 2001. Ophiostomatoid fungi associated with three pine-infesting bark beetles in South Africa. *Sydowia* 53:290-300.
- Zhou, X.D., Z.W. De Beer, D.C. Tovar, B.D. Wingfield, M.J. Wingfield, 2004a. Characterisation of *Ophiostoma* species associated with pine bark beetles from Mexico, including *O. pulvinisporum* sp. nov. *Mycological Research* 108:690-698.
- Zhou, X.D., Z.W. De Beer, R. Ahumada, B.D. Wingfield, M.J. Wingfield, 2004. *Ophiostoma* and *Ceratocystiopsis* spp. associated with two pine-infesting bark beetles in Chile. *Fungal Diversity* 15:261-274.
- Zipfel, R.D. Z.W. de Beer, K. Jacobs, B.D. Wingfield, M.J. Wingfield, 2006. Multi-gene phylogenies define *Ceratocystiopsis* and *Grosmannia* distinct from *Ophiostoma*. *Studies in Mycology* 55:75-97.

CAPITULO I. *Ophiostoma ips* ASOCIADO AL DESCORTEZADOR *Dendroctonus adjunctus* (Blandford), EN EL PINO DE LAS ALTURAS (*Pinus hartwegii* Lindl.).

OMAR ALEJANDRO PÉREZ VERA, Dr.

COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2009

RESUMEN

En el “pino de las alturas” (*Pinus hartwegii* Lindl) se ha reportado la presencia del descortezador *Dendroctonus adjunctus* asociado al género *Ophiostoma* spp., causante del manchado azul de la madera en coníferas. El objetivo del presente estudio fue identificar y caracterizar las especies de *Ophiostoma* asociadas al descortezador *D. adjunctus* en *P. hartwegii*. Se colectaron galerías e insectos en la Estación Forestal Experimental Zoquiapan (EFEZ) de la Universidad Autónoma Chapingo, en el Estado de México. Se aisló a *Graphilbum* sp., en galerías e insectos y *Ophiostoma ips* solamente en galerías. Además, se caracterizaron molecularmente mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El análisis molecular corroboró la identificación morfológica. Se concluye que el hongo corresponde a *Ophiostoma ips* (teleomorfo) y *Graphilbum* sp. su anamorfo. Este es el primer reporte en México de *O. ips* asociado a *P. hartwegii*.

Palabras clave: anamorfo, micangio, peritecio, floema.

CHAPTER I. *Ophiostoma ips* ASSOCIATED WITH THE BARK BEETLE *Dendroctonus adjunctus* (Blandford) IN HARTWEG PINE.

OMAR ALEJANDRO PÉREZ VERA, Dr.  
COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2009

ABSTRACT

In the "pino de las alturas" (*Pinus hartwegii* Lindl.) it has been reported that the bark beetle *Dendroctonus adjunctus* is associated with the genus *Ophiostoma* spp., some species of which cause the blue-stain of conifer sapwood. The objective of this study was to identify and characterize the *Ophiostoma* species associated with the bark beetle *D. adjunctus* in *P. hartwegii*. Galleries and insects were collected in the Zoquiapan Experimental Forest Station (ZEFS) of the Universidad Autónoma Chapingo in Zoquiapan, State of Mexico. *Graphilbum* sp. was isolated from galleries and insects, and *Ophiostoma ips* from galleries only. In addition, molecular characterization was developed using the polymerase chain reaction (PCR). The PCR analysis confirmed the morphological identification. It was concluded that the *Graphilbum* species was the anamorph of *Ophiostoma ips*. This is the first report of *O. ips* in Mexico associated with *P. hartwegii*.

Keywords: anamorph, mycangia, perithecia, phloem.

## INTRODUCCIÓN

El “pino de las alturas” (*Pinus hartwegii* Lindl.) se encuentra distribuido en 15 estados de la República Mexicana con clima semifrío, a una temperatura media de 12°C, precipitaciones medias anuales de 850 a 1,500 mm y altitudes de 3, 000 a 4, 000 msnm. Esta especie también se ha reportado en Guatemala, Honduras y entre la frontera de Honduras-El Salvador (Musálem y Solís, 2000; Perry, 1991a). Los bosques de pino en México son atacados por los descortezadores *Dendroctonus adjunctus*, *D. approximatus*, *D. mexicanus*, *D. parallelcollis*, *D. valens*, *Ips bonanseai*, *I. integer*, *I. mexicanus*, *Pissodes zitacuarencense* e *Hylurgus* spp., que se alimentan del floema y del cambium vascular del árbol (Cibrián *et al.*, 1995; Musálem y Solís, 2000). Este grupo de insectos son plagas en bosques de coníferas (Paine *et al.*, 1997), con excepción del último (Cibrián *et al.*, 1995). En particular, *D. adjunctus*, ataca a 16 especies de pino, dentro de los cuales está *P. hartwegii* y cuyo daño se acentúa especialmente en los Parques Nacionales del centro de México (Cibrián *et al.*, 1995).

La mayoría de las especies de insectos descortezadores actúan como vectores de hongos del género *Ceratocystis* y *Ophiostoma* y (Perry, 1991b; Harrington, 1993; Paine *et al.*, 1997). Muchos de ellos son patógenos primarios y agentes causantes del manchado azul de la madera (Harrington, 1988; Paine *et al.*, 1997). En el mundo se han reportado 195 especies del género *Ophiostoma* en diferentes hospedantes (index fungorum, 2008). Para el caso de México se han reportado a *Ceratocystiopsis collifera*, *Ophiostoma picea*, *O. piliferum* y *Leptographium* sp asociados a *Pinus hartwegii* (Marmolejo y Butin, 1993; Marmolejo, 1991) y otros 13 hongos ophiostomatoides en coníferas y latifoliadas (Marmolejo, 1989; Marmolejo y Butin, 1993; Zhou *et al.*, 2004a; Cibrián *et al.*, 2007). Dada la poca información que existe de estos hongos en México y que las especies del género *Ophiostoma* no son fáciles de identificar por características



morfológicas y que solo algunos hongos ophiostomatoides como *Ceratocystiopsis minuta*, *O. galeiformis*, *O. pluriannulatum*, *O. pulvinisporum* y *Sporothrix* spp. se ha identificado con comparaciones de secuencias de ADNr asociados con *Dendroctonus mexianus* y *Ips calligraphus* en dos especies de *Pinus* (Zhou *et al.*, 2004a), el presente estudio tuvo como objetivo identificar y caracterizar las especies de *Ophiostoma* asociada al descortezador *D. adjunctus* en *P. hartwegii*.

## MATERIALES Y METODOS

### Colecta de muestras

Los sitios de colecta se ubicaron en la Estación Forestal Experimental Zoquiapan (EFEZ) de la Universidad Autónoma Chapingo, municipio de Zoquiapan, Estado de México, México (Cuadro 1). Se recolectaron 22 muestras de corteza de 10 x 10 cm<sup>2</sup> de *Pinus hartwegii*, con galerías de *Dendroctonus adjunctus*, además, se recolectaron 35 adultos del insecto descortezador. Todas las muestras se etiquetaron y trasladaron al laboratorio de Patología Forestal del Campus Montecillo-Texcoco, Edo. de México, donde se conservaron a 4 °C para su posterior análisis.

### Aislamiento del hongo

Las muestras de corteza se colocaron en cámaras con humedad relativa de 95 a 100% durante 30 días. Masas de conidias acumuladas en la punta de conidióforos fueron cuidadosamente colectadas con una aguja de disección estéril y transferidas a cajas Petri con medio de cultivo selectivo extracto-malta-agar (EMA) al 2%, adicionado con Cicloheximida (0.1 g) y Sulfato de estreptomicina (0.02 g). De cada muestra se hicieron cinco siembras en dos cajas Petri con medio, en total se sembraron 44 cajas.

Los 35 insectos adultos se sembraron directamente en EMA adicionado con Cicloheximida y Sulfato de estreptomicina descrito anteriormente. Todas las cajas se incubaron en luz natural, a una temperatura de  $25 \pm 1$  °C durante 15 días. Posteriormente, cada aislamiento fue purificado en EMA al 2%. Todos los aislamientos obtenidos para este estudio se conservaron en tubos inclinados con EMA al 2% y se cubrieron con aceite mineral estéril.

Cuadro 1. Aislamientos de *Graphilbum* y *Ophiostoma ips* obtenidos de galerías y del insecto descortezador *Dendroctonus adjunctus* en *Pinus hartwegii* de la EFEZ, México.

Sitio	Hospedante/Insecto	Galerías/insectos en EMA	No. de Aislamientos <sup>a</sup>	Clave <sup>d</sup>
I. San Martín	<i>P. hartwegii</i>	8	31	ZOQ1
		1	4	ZOQ3 <sup>e</sup>
II. Cañada	<i>P. hartwegii</i>	1	6	ZOQ4
		6	43	ZOQ7
III. Área Semillera	<i>P. hartwegii</i>	2	20	ZOQ10
		2	20	ZOQ11
IV. Papayo	<i>P. hartwegii</i>	2	20	ZOQ14
Total:		22 <sup>b</sup>	144	
II. Cañada	<i>D. adjunctus</i>	35 <sup>c</sup>	12	ZOQ18
			156	ZOQ19
Total				ZOQ20

<sup>a</sup>Aislamientos agrupados en base a características culturales y morfológicas, <sup>b</sup>Total de muestras de corteza, <sup>c</sup>Insectos procesados, <sup>d</sup>Asignada en el laboratorio, <sup>e</sup>Crecimiento del teleomorfo de *O. ips* y el anamorfo *Graphilbum* sp obtenido de galerías.

## Identificación morfológica

### Microscopía de luz

Con el propósito de identificar a nivel género, de cada uno de los aislamientos obtenidos, se hicieron cultivos monoconidiales en agar-agua al 1.8% y se incrementaron en EMA al 2%. Los aislamientos de galerías e insectos se agruparon en base al sitio de colecta, coloración en medio de cultivo, tipo de crecimiento, tipo de micelio y presencia del teleomorfo o anamorfo para

facilitar el uso de claves. Para este tipo de microscopía se seleccionaron siete aislamientos de galerías (ZOQ1, ZOQ3, ZOQ4, ZOQ7, ZOQ10, ZOQ11 y ZOQ14), y tres de insectos (ZOQ18, ZOQ19 y ZOQ20). Los montajes permanentes se hicieron en glicerol a 50% acidificado con HCl y se midieron 200 ascosporas y conidios, 50 sinemas y 30 peritecios de cada aislamiento con objetivos de 100X y 10X respectivamente. Las claves usadas para la identificación fueron las de Jacobs y Wingfield (2001); Upadhyay (1981) y Hunt, (1956).

### Microscopia de barrido

Con el fin de observar el tipo de conidiogénesis y forma de los conidios, se utilizó este tipo de microscopía; para esto se utilizaron cuatro cultivos monoconidiales de 15 a 20 días de edad (ZOQ1, ZOQ3, ZOQ4 y ZOQ19) cultivados en EMA al 2% (Cuadro 1). Con un sacabocado, se tomaron discos de 0.5 cm de diámetro y se fijaron en glutaraldehído al 3% con pH 7.2 durante 24 h. Las muestras se lavaron tres veces con el amortiguador de fosfatos por un minuto. Después, cada muestra se deshidrató en una serie de soluciones graduales de etanol (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%); las últimas tres soluciones dos veces por 15 min en cada una. Las muestras se secaron a punto crítico con CO<sub>2</sub> en una secadora Sandri-780A<sup>®</sup> (TOUSIMIS Research Corporation, Rockville, USA), se colocaron sobre un portamuestras usando una cinta doble adhesiva de cobre (o carbón) y se recubrieron con oro durante 4 minutos en una ionizadora JFC-1100<sup>®</sup> (JEOL LTD, Tokio, Japan). Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido JSM-35C<sup>®</sup> (JEOL LTD, Tokio, Japan) en el laboratorio de Microscopia Electrónica del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México.

## Caracterización molecular

Diez aislamientos fueron utilizados para la caracterización molecular (Cuadro 1), los cuales fueron primeramente agrupados e identificados morfológicamente. Los cultivos monoconidiales de *Graphilbum* en AA al 1.8%, y se incrementaron en EMA al 2%. Cada aislamiento fue cultivado en matraces con 50 mL de medio líquido de extracto-malta al 2% a una temperatura de 25 °C y oscuridad por 25 días. La extracción de ADN fue con el método AP (Sambrook y Russell, 2001). La calidad del mismo se evaluó por electroforesis en gel de agarosa 1%. Las regiones internas ITS1 e ITS2 entre los genes ribosomales (rADN) 18S-5.8S y 5.8S-18S fueron amplificadas por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con los iniciadores ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGGAAGTAA-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). La reacción de PCR por muestra estuvo compuesta por: 12.5 µl agua libre de nucleasas, 2.5 µl de Buffer 5X, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2.5 µl; 200 µM de dNTPs, 0.5 µl; 0.8 µM de cada uno de los iniciadores ITS1-F e ITS4, 1 µl; 2 U de Taq-DNA polimerasa (Promega, USA), 0.5 µl y 10 ng de ADN problema, 2 µl. Se utilizó un termociclador Applied Biosystems<sup>TM</sup> (Mod. Thermal Cycler 2720) con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 59 seg; alineamiento a 55 °C por 59 seg, y extensión a 72 °C por 1 min, y una extensión final de 72 °C por 8 min. (Zhou *et al.*, 2004a). Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, y se tiñó con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron en un fotodocumentador (Bio-Imagen Systems Mini Bis Pro). Los productos de la PCR fueron tomados directamente del gel y purificados con Wizard SV (Promega, USA). El producto de PCR fue secuenciado en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México con un secuenciador Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystem Corp).

Las secuencias obtenidas con el iniciador ITS1-F se alinearon con las secuencias disponibles en el banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de U.S.A. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). De los valores cuantitativos generados, solo se bajaron las secuencias con el valor más alto para su comparación con las secuencias en estudio y otras secuencias de *Ophiostoma adjuncti*, *O. montium*, *O. pulvinisporum* que morfológicamente son similares (Cuadro 2). Las secuencias fueron alineadas con Clustal W versión 1.6 y un análisis filogenético fue realizado con el software MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Tamura, *et al.* 2007) por el método de Neighbor-Joining, modelo p-distance. En el árbol se usó como raíz una secuencia de *O. quercus* del banco de genes con número de acceso (AF493239). Las secuencias de este estudio fueron depositadas en el Banco de Genes para obtener su número de acceso (Cuadro 2).

Cuadro 2. Aislamientos del hongo Ophiostomatoide a partir de galerías y cuerpo del insecto descortezador *Dendroctonus adjunctus* en *Pinus hartwegii*.

Especie	Aislamiento	No. de Acceso GenBank	Hospedante/ Insecto	Origen
<i>Ophiostoma adjuncti</i> <sup>a</sup>	CMW135	AY546696	<i>P. ponderosa</i>	EE.UU.
<i>Graphilbum</i> sp	Z0 Q1 <sup>b</sup>	FJ178362	<i>P. hartwegii</i>	México
<i>O. ips</i>	Z0 Q3 <sup>b</sup>	FJ178363		
<i>Graphilbum</i> sp	Z0 Q4 <sup>b</sup>	FJ178364		
	Z0 Q7 <sup>b</sup>	FJ178365		
	Z0 Q10 <sup>b</sup>	FJ178366		
	Z0 Q11 <sup>b</sup>	FJ178367		
	Z0 Q14 <sup>b</sup>	FJ178368		
	Z0 Q18 <sup>b</sup>	FJ178369	<i>Dendroctonus adjunctus</i>	
	Z0 Q19 <sup>b</sup>	FJ178370		
	Z0 Q20 <sup>b</sup>	FJ178371		
<i>O. ips</i> <sup>a</sup>	CMW312	AY546699	<i>P. resinosa</i>	EE.UU.
	CMW5089	AY546701	<i>P. radiata</i>	Chile
	CMW6402	AY546697		
	CMW6418	AY546702	<i>P. elliotii</i>	Sur África
	CMW6463	AY546703		
	CMW9005	AY546698	<i>P. sylvestris</i>	Suecia
	CMW13217	AY546707	<i>P. resinosa</i>	Canadá
	MW13218	AY546708	<i>P. palustris</i>	EE.UU.
	CMW13219	AY546709		
	KUC2120	AY172021	<i>Pinus</i> sp	
	CCMA33	AY934507	<i>Pinus pinaster</i>	España
<i>O. montium</i> <sup>a</sup>	CMW13220	AY546710	<i>P. contorta</i>	Canadá
	CMW13221	AY546711	<i>P. ponderosa</i>	EE.UU.
	CMW13222	AY546712	<i>P. contorta</i>	Canadá
<i>O. pulvinisporum</i> <sup>a</sup>	CMW13216	AY546717	<i>P. contorta</i>	Canadá
	CMW9020	AY546713	<i>P. pseudostrobus</i>	México
	CMW9022	AY546714		
	CMW9026	AY546715	<i>P. maximinoi</i>	México
	CMW9493	AY546716		
<i>O. quercus</i> <sup>a</sup>	CMW7650	AF198238	<i>Quercus</i> sp.	Reino Unido

<sup>a</sup>Secuencias del banco de datos NCBI. <sup>b</sup> Aislamientos usados para el análisis de secuencias obtenidos de la Estación Experimental Forestal Zoquiapan, Universidad Autónoma de Chapingo, México.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aislamientos

Se obtuvieron 156 aislamientos de galerías e insectos, de estos, 144 fueron de galerías y el resto del cuerpo de *Dendroctonus adjunctus* (Cuadro 1).

### Identificación de los aislamientos

#### Caracterización morfológica

Los resultados de los estudios de microscopia de luz y microscopia de barrido indicaron la presencia del anamorfo *Graphilbum* sp y el teleomorfo *O. ips* en galerías y cuerpo de insectos de *D. adjunctus* en *P. hartwegii* (Figura 1), un mayor porcentaje fue *Graphilbum* (galerías e insectos), y únicamente en la muestra de galerías de ZOQ3 se formó el teleomorfo y el anamorfo. *Graphilbum*, *Hyalorhinocladiella* y *Acremonium* son anamorfos reportados para *O. ips*, considerado un hongo pleomórfico (Upadhyay, 1981; Hutchison y Reid, 1988; Benade *et al.*, 1995). Harrington (1988) menciona a *Leptographium* y *Graphium* como anamorfos de *O. ips*. Otros han considerado a *Graphium* como sinónimo de *Pesotum*, sin embargo, Harrington *et al.* (2001) restringe a *Pesotum* al complejo de *O. picea*. Por otro lado, Hunt (1956) menciona que el anamorfo de *O. ips* es una transición entre *Leptographium* y *Graphium*. Sin embargo, en nuestros aislamientos únicamente se obtuvo a *Graphilbum* como anamorfo de *O. ips*.

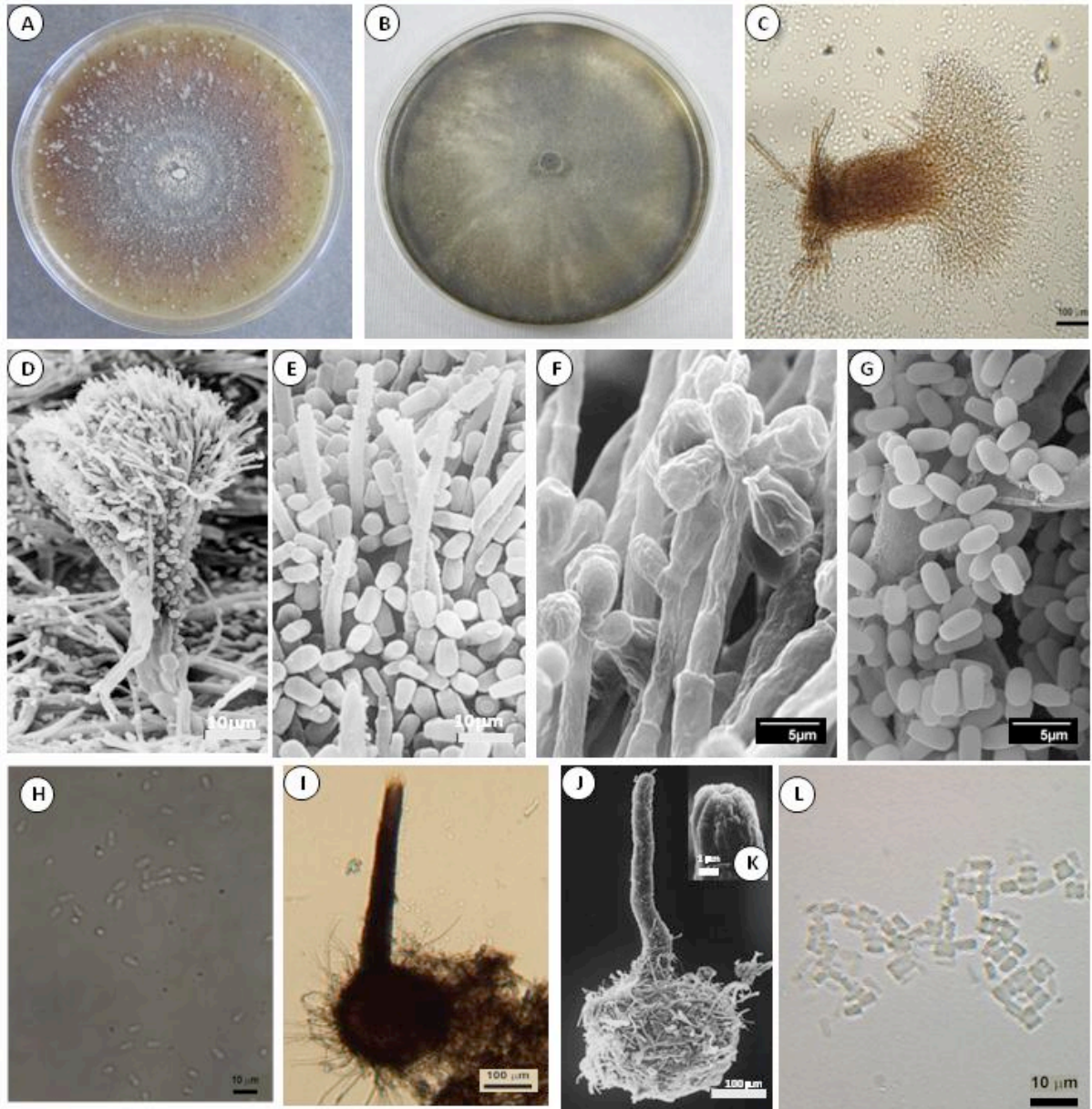


Figura 1. Características culturales y microscópicas (microscopia de luz y microscopia de barrido) de *Ophiostoma ips* y *Graphilbum* sp. A y B) Color café amarillento a gris oscuro en EMA al 2%. C y D) Conidióforos sinuatosos de *Graphilbum* sp. E y F) Células conidiogénicas de proliferación percurrente aparentemente simpodial. E, F, G y H) Conidias cilíndricas a ovoides. I, J y K) Peritecios sin hifas ostiolares. L) Ascosporas cuadrangulares.

El crecimiento en medio de cultivo fue radial y alcanzó un diámetro de ocho cm en 12 días para los aislamientos de *Graphilbum* y *O. ips*. En *Graphilbum* la coloración de la colonia fue



blanca cremosa a café claro a los tres días, tornándose a café amarillento en cultivos de mayor edad (Figura 1A). En los aislamientos con teleomorfo y anamorfo juntos de *O. ips* la coloración fue color café oscuro a grisáceo y de café a café oscuro al reverso de la caja Petri (Figura 1B).

En *Graphilbum* el micelio fue café oscuro, septado, inmerso y raso, y el micelio aéreo fue hialino poco abundante. Conidióforos sinematosos dominante en el medio de cultivo. En general, la masa de conidias es contenida en un mucilago de color cremoso viscoso con la edad. Hutchison y Reid (1988). Hunt (1956) y Upadhyay (1981), concuerdan en que *Graphilbum* presenta una variabilidad en coloración de la colonia de hialina, café claro, café amarillento, café oliváceo, gris claro o gris oscuro. Además, Hunt (1956) y Upadhyay (1981) mencionan abundancia de micelio inmerso y aéreo septado de color hialino a café. Hutchison y Reid (1988) reportan por primera vez la formación de clamidosporas y blastosporas del micelio, esto dependiendo del aislamiento y las condiciones de crecimiento *in vitro*.

Los conidióforos de *Graphilbum* fueron sinematosos, de (235-)296(-329)  $\mu\text{m}$  de largo incluyendo aparato conidiogénico (Figura 1C,D). Los sinemas fueron solitarios o agrupado de 2 a 6, hialinos a color crema a los tres a cuatro días y tornándose a café claro a los 10 a 12 días para aislamientos de galerías e insectos (Figura 1C). Los Conidióforos presentaron de 3 a 5 ramas. Las células conidiogénicas de proliferación percurrente, anelaciones de apariencia simpodial, cilíndrica e hialina de (8.5-)13.8(-14.5)x(0.8-)2.0(-2.2)  $\mu\text{m}$  (Figura 1E,F). La conidiogénesis de *Graphilbum* en este estudio, concuerda con lo descrito por Upadhyay y Kendrick (1975). Sin embargo, Benade *et al.* (1995) observaron con microscopía electrónica de barrido (MEB) y microscopía electrónica de transmisión (MET) una conidiogénesis percurrente de apariencia simpodial muy similar a *Hyalorhinocladiella*. Hutchison y Reid (1988), mencionan que la conidiogénesis es fialídica y percurrente para *Graphilbum*. Mientras, que Wingfield y Marasas

(1980) reportan que la conidiogénesis es filídica de apariencia simpodial sin asignar un anamorfo. Los conidios son hialinos, unicelulares, cilíndricos a ovoides, con el ápice redondeado y la base truncada de (3.6-)5.5(-8.9)x(1.0-)1.5(-2.6)  $\mu\text{m}$  (Figura 1E,F,G,H). La forma de los conidios fue similar a lo reportado por Hunt (1956) y Wingfield y Marasas (1980), pero Upadhyay (1981); Rumbold (1931) y Hutchison y Reid (1988) mencionan la presencia de conidios globulares, limoniformes, oblongos a elipsoides.

*Ophiostoma ips* es morfológicamente similar a *O. adjuncti*, *O. montium* y *O. pulvinisporum*. Harrington (1988), considera a *O. adjuncti* como sinónimo de *O. ips*. Estas especies presentan el ascocarpo oscuro, hifas ostiolares ausentes en el ápice y las ascosporas de tipo almohada en vista frontal y con diferentes formas de la cubierta mucilaginosa en cada una de las especies (Hunt, 1956, Upadhyay, 1981; Zhou *et al.*, 2004b; Davidson, 1978). Del cuerpo del descortezador *Dendroctonus adjunctus* se han identificado a *Ophiostoma adjuncti* Davidson y *Leptographium pyrinum* Davidson provenientes de árboles de *Pinus ponderosa* en Nuevo México.

Los peritecios crecen superficialmente inmersos en medio de cultivo, desarrollándose a los 25 días solitarios a agrupados. Su base es globosa, oscuros, de 131 a 263  $\mu\text{m}$  de diámetro usualmente ornamentados con hifas aseptadas de color café claro de (1.8-)3.7(-4.9)  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 1I,J). El cuello del peritecio es café oscuro a negro de 301 a 766  $\mu\text{m}$  de largo y (19-)24(-38)  $\mu\text{m}$  de ancho de la base. El ápice del cuello ligeramente curvado y más claro, de (10-)13(-21) de ancho e hifas ostiolares ausentes (Figura 1J,K). A diferencia de Hutchison y Reid (1988); Wingfield y Marasas (1980); Hunt (1956); Upadhyay (1981) y Rumbold (1931) mencionan que la longitud del cuello y base del peritecio son mayores. Sin embargo, estas dimensiones son semejantes a las descritas por Marmolejo y Butin (1993). Las ascas son de tipo evanescentes.

Ascosporas hialinas, aseptadas, de forma aparentemente rectangular o de forma de almohada, y provistas de una cubierta mucilaginosa, de 4.0-5.9 x 1.8-2  $\mu\text{m}$  (Figura 1L). En cuanto al tamaño de las ascosporas, en este estudio fue variable, comparado con Hutchison y Reid (1988), Wingfield y Marasas (1980), Hunt, 1956, Upadhyay (1981), Rumbold (1931), Marmolejo y Butin (1993).

### Caracterización molecular

En general, la banda del producto de PCR fue de un peso aproximado de 700 pb con los primers ITS1-F e ITS4. Al comparar las diez secuencias de nucleótidos obtenidas de galerías y del cuerpo de *Dendroctonus adjunctus* identificadas morfológicamente, con las disponibles en el GenBank resultó que los diez aislamientos correspondieron a *Ophiostoma ips*. Sin embargo, nueve aislamientos se alinearon con *O. ips* con número de acceso AY172021 y el aislamiento ZOQ10 se alineó con *O. ips* con número de acceso AY546697. En general, se presentó una identidad de 96 a 99%. Cada secuencia se depositó en el banco de genes y se obtuvo un número de acceso (Cuadro 2). El resultado del alineamiento múltiple de las secuencias resultó en 803 pb para la construcción del árbol filogenético, usando la secuencia de *O. quercus* obtenida del Banco de Genes con número de acceso (AF198238). El árbol mostró un claro agrupamiento de tres grupos (Figura 2). El primer grupo correspondió a *O. ips*, con aislamientos de galerías e insecto de *D. adjunctus* en *P. hartwegii* en México y los aislamientos de *O. ips* reportados en el banco de genes con hospedantes del subgénero *Pinus* (Perry, 1991a), en este grupo se incluye *O. adjuncti* (número de acceso CMW135), como única secuencia en el banco de genes lo que hace necesario realizar estudios genéticos más específicos que demuestren la separación de las dos especies. Además, se confirma la identificación morfológica donde se presentó el teleomorfo y

*Graphilbum* considerado como anamorfo de *O. ips* (Hutchison y Reid, 1988 y Upadhyay, 1981). El segundo grupo corresponde a *O. pulvinisporum* con el subgénero *Diploxylon* (Perry, 1991a; Martínez, 1948). El tercer grupo lo constituye *O. montium* con los hospedantes del subgénero *Diploxylon* y *Pinus* (Perry, 1991a; Martínez, 1948).

*O. ips* ha sido reportado como patógeno en coníferas y asociado a varias especies de descortezadores (Zhou *et al.*, 2007). En el Hemisferio Norte, se ha reportado en *Pinus echinata*, *P. sylvestris* y *P. rigida* asociado a *Ips calligraphus* (Perry, 1991b). En el hemisferio Sur se ha reportado en Australia en galerías de *Ips grandicollis* en *Pinus taeda* (Wingfield y Marasas, 1980; Zhou *et al.*, 2001), y en Nueva Zelandia en *Pinus elliotii* y *P. radiata* (Hutchison y Reid, 1988). En Sudáfrica asociado con *Orthotomicus erosus*, *Hylurgus angustatus* e *H. ligniperda* en *P. radiata*, *P. patula* y *P. elliotii* (Wingfield y Marasas, 1980; Zhou *et al.*, 2001). En Chile se ha asociado con *H. ligniperda* en *P. patula* (Zhou *et al.*, 2004b). En este estudio, el hongo fue aislado del cuerpo de *Dendroctonus adjunctus* y galerías en *Pinus hartwegii* y se identificó por características morfológicas y moleculares. En México, previamente se reportó a *O. ips* asociado con *D. mexicanus* e *Ips* sp., en *Pinus teocote* y *P. pseudostrobus* identificados morfológicamente (Marmolejo, 1989; Marmolejo y Butin, 1993).

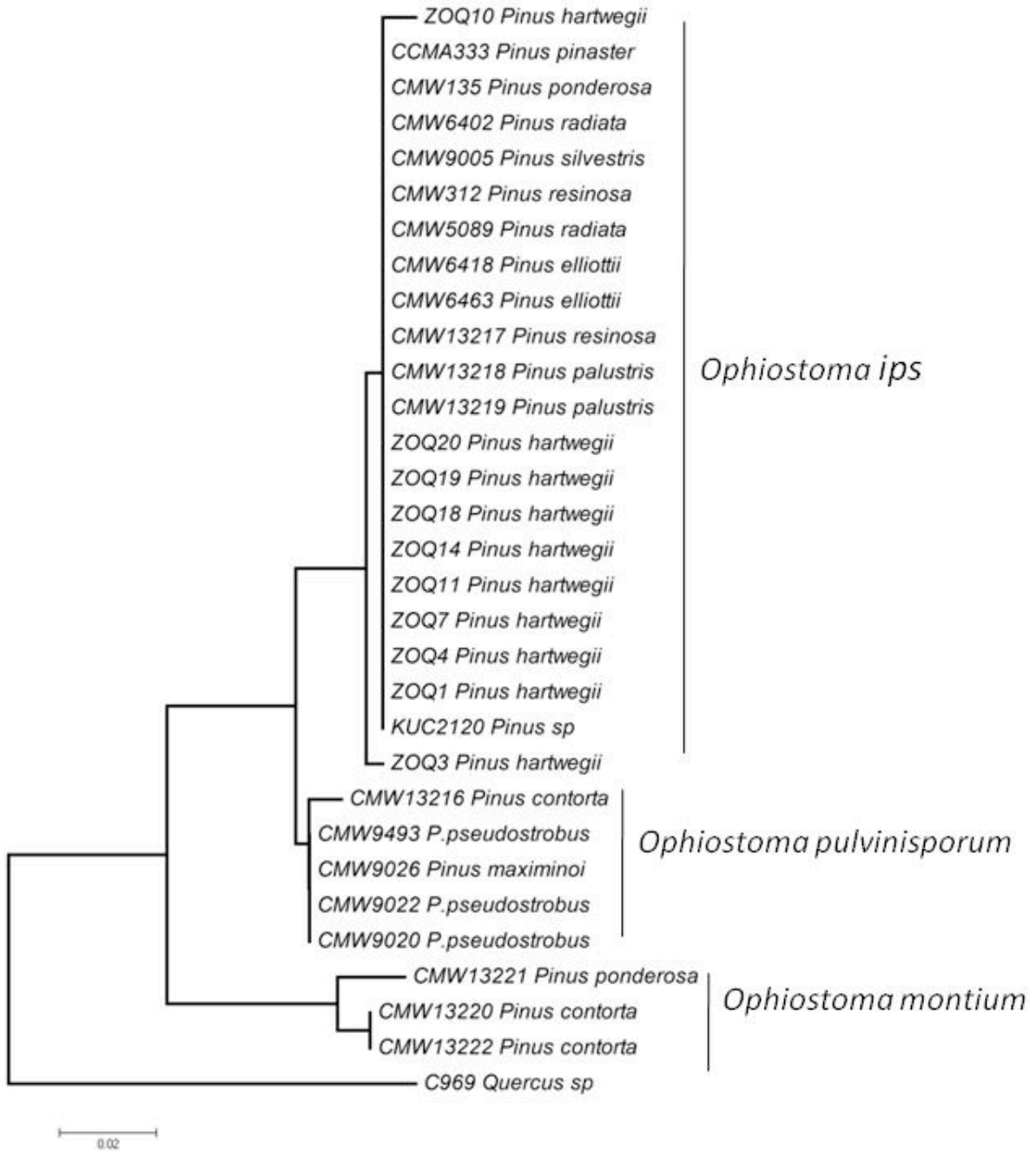


Figura 2. Árbol filogenético que muestra el agrupamiento del hongo ophiostomatoide asociado a *Dendroctonus adjunctus* en *Pinus hartwegii* amplificados por PCR-ITS rADN con los iniciadores ITS1-F e ITS4, y sus secuencias agrupadas con el software MEGA 4. El árbol filogenético se construyó con el método de Neighbor-Joining, modelo p-distance. 0.02 indica la distancia génica por el método Neighbor-Joining.

## CONCLUSIONES

Con base en los resultados morfológicos y análisis molecular de los aislamientos obtenidos de galerías e insecto descortezador *Dendroctonus adjunctus* en *Pinus hartwegii*, se concluye que el hongo corresponde a *Ophiostoma ips* (teleomorfo) de galerías y el anamorfo (*Graphilbum* sp.) de galerías y del cuerpo del insecto, el cual se reporta por primera vez asociado a este insecto en *Pinus hartwegii* en México.

## LITERATURA CITADA

- Benade, E., M.J. Wingfield, P.S. Van Wyk, 1995. Conidium development in the *Hyalorhinocladiella* anamorph of *Ophiostoma ips*. *Mycologia* 87:298-303.
- Cibrián, T.D., D.A. Rosales, S.E.G. Díaz, 2007. Enfermedades Forestales de México/Forest Diseases in México. Universidad Autónoma Chapingo; CONAFOR-SEMARNAT, México; Forest Service USDA, E.U.A.; NRCA Forest Service, Canadá y Comisión Forestal de América del Norte, COFAN, FAO. Chapingo, México. 587 p.
- Cibrián, T.D., J.T. Méndez. M, R.C. Bolaños, H.O. Yates III, J. F. Lara, 1995. Insectos Forestales de México. Universidad Autónoma Chapingo. SFFS-SARH, México; Forest Service USDA, E.U.A.; NRCA Forest Service, Canadá y Comisión Forestal de América del Norte, COFAN, FAO. Chapingo, México. 453 p.
- Davidson, R., 1978. Staining fungi associated with *Dendroctonus adjunctus* in pines. *Mycologia* 70:35-41.
- Jacobs, K., M.J. Wingfield. 2001. *Leptographium* species: tree pathogens, insect associates, and agents of blue-stain. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 207 p.
- Harrington, T.C., 1988. *Leptographium* species, their distributions, hosts and insect vectors. *In*: Harrington, T.C., F.W. Cobb (eds.), *Leptographium* root diseases on conifers. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. pp. 1-39.
- Harrington, T.C., 1993. Disease of conifers caused by species of *Ophiostoma* and *Leptographium*. *In*: Wingfield, M.J., K.A. Seifert, J.F. Webber (eds.), *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, ecology and pathogenicity. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota. pp. 161-172.

- Harrington, T.C., D. McNew, J. Steimel, D. Hofstra, R. Farrell, 2001. Phylogeny and taxonomy of the *Ophiostoma piceae* complex and the Dutch elm disease fungi. *Mycologia* 93:111-136.
- Hunt, J. 1956. Taxonomy of the genus *Ceratocystis*. *Lloydia* 19:1-59.
- Hutchison, L.J., J. Reid, 1988. Taxonomy of some potential woodstaining fungi from New Zealand. *Ophiostomataceae*. *New Zealand Journal of Botany* 26: 63-81.
- Index fungorum. 2008. CABI Bioscience Databases.  
<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>
- Marmolejo, J.G., 1991. El manchado azul de la Madera en Nuevo León. Reporte científico No. 27. Facultad de ciencias forestales. Linares, Nuevo León, México 59 p.
- Marmolejo, J.G., H. Butin, 1993. Las especies de *Ophiostoma* y *Ceratocystiopsis* (Ascomycetes, Microascales) conocidas de Nuevo León, México. Reporte científico especial No. 13. Facultad de ciencias forestales. Linares, Nuevo León, México. pp. 155-170.
- Marmolejo-Moncivais, J.G., 1989. Forstpathologische untersuchungen zur Pilzflora Nordost-Mexikos. PhD dissertation, Universität Göttingen. 136 p.
- Martínez, M., 1948. Los pinos mexicanos. Segunda edición. Botas. México. 361 p.
- Musálem, S.M.A., M.A. Solís, 2000. Monografía de *Pinus hartwegii*. SAGAR. INIFAP. CIRSE Campo Experimental Valle de México. Libro Técnico No. 3. Chapingo, Estado de México. 96 p.
- Paine, T.D., K.F. Raffa, T.C. Harrington, 1997. Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. *Annual Reviews in Entomology* 42:179-206.
- Perry, J.P., 1991a. The pines of Mexico and Central America. Timber Press, Inc. 231 p.



- Perry, T.J., 1991b. A Synopsis of the taxonomic revisions in the genus *Ceratocystis* including a review of blue-staining species associated with *Dendroctonus* bark beetles. General Technical Report. USDA, Forest Service. New Orleans, Louisiana. 16 p.
- Rumbold, C.T., 1931. Two blue-stain fungi associated with bark beetle infestation of pines. *Journal of Agricultural Research* 43:847-873.
- Sambrook, J., D.W. Russell, 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Third edition. 1:1.32-1.34. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Tamura, K., J.N. Dudley, S. Kumar, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Upadhyay, H.P., 1981. A monograph of *Ceratocystis* and *Ceratocystiopsis*. University of Georgia Press. Athens. Georgia. 176 p.
- Upadhyay, H.P., W.B. Kendrick, 1975. Prodrumus for a revision of *Ceratocystis* (Microascales, Ascomycetes) and its conidial states. *Mycologia* 67: 798-805.
- Wingfield, M.J., O.F.W. Marasas, 1980. *Ceratocystis ips* associated with *Orthomicus erosus* (Coleoptera: Scolytidae) on *Pinus* spp. in the Cape Province of South Africa. *Phytophylactica* 12:65-69.
- Zhou, X., I.T. Burgess, W. De Beer, F. Lieutier, A. Yart, K. Klepzig, A. Carnegie, M.J. Portales, D.B. Wingfield, M.J. Wingfield, 2007. High intercontinental migration rates and population admixture in the sapstain fungus *Ophiostoma ips*. *Molecular Ecology* 16:89-99.
- Zhou, X.D., W.Z. De Beer, B.D. Wingfield, M.J. Wingfield, 2001. Ophiostomatoid fungi associated with three pine-infesting bark beetles in South Africa. *Sydowia* 53:290-300.

- Zhou, X.D., Z.W. De Beer, D.C. Tovar, B.D. Wingfield, M.J. Wingfield, 2004a. Characterisation of *Ophiostoma* species associated with pine bark beetles from Mexico, including *O. pulvinisporum* sp. nov. *Mycological Research* 108:690-698.
- Zhou, X.D., Z.W. De Beer, R. Ahumada, B.D. Wingfield, M.J. Wingfield, 2004b. *Ophiostoma* and *Ceratocystiopsis* spp. associated with two pine-infesting bark beetles in Chile. *Fungal Diversity* 15:261-274.

CAPITULO II. IDENTIFICACIÓN Y PRUEBAS DE PATOGENICIDAD DE HONGOS OPHIOSTOMATOIDES AISLADOS DE GALERÍAS DE *Dendroctonus adjunctus* (Blandford) EN EL PINO DE LAS ALTURAS.

OMAR ALEJANDRO PÉREZ VERA, Dr.

COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2009

RESUMEN

El objetivo de este capítulo fue identificar y probar la patogenicidad de cinco hongos ophiostomatoides asociados al pino de las alturas (*Pinus hartwegii* Lindl.). Se identificó a *Leptographium guttulatum*, *Ophiostoma nigrocarpum*, *O. angusticollis*, *O. olivaceapinii* y *Pesotum* sp. La identificación morfológica se corroboró molecularmente y sus secuencias fueron registradas en el banco de genes del NCBI. *L. guttulatum*, *O. nigrocarpum* y *O. olivaceapinii* causaron la muerte de árboles de tres años de edad, aunque el nivel de mortalidad no fue estadísticamente significativa con el control.

Palabras clave: conidióforos, inoculación, PCR, taxonomía.

CHAPTER II. IDENTIFICATION AND PATHOGENICITY TESTS OF  
OPHIOSTOMATOID FUNGI ISOLATED FROM GALLERIES OF *Dendroctonus  
adjunctus* (Blandford) IN HARTWEG PINE.

OMAR ALEJANDRO PEREZ VERA. Dr.  
COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2009

ABSTRACT

The main purpose of this chapter was to identify and test the pathogenicity of five ophiostomatoid fungi associated with hartweg pine (*Pinus hartwegii* Lindl.). The fungi identified were *Pesotum* sp., *Leptographium guttulatum*, *Ophiostoma nigrocarpum*, *O. angusticollis* and *O. olivaceapinii*. The morphological identifications were confirmed molecularly, and DNA sequences were registered in the NCBI GenBank. *L. guttulatum*, *O. nigrocarpum* and *O. olivaceapinii* were able to kill three-years-old seedlings, although the level of mortality was not statistically significantly compared with the controls.

**Keywords:** conidiophores, inoculation, PCR, taxonomy.

## INTRODUCCIÓN

Las especies de *Ceratocystis sensu lato* Ellis & Halst., son denominados hongos ophiostomatoides e incluyen más de 110 especies de ascomicetes que presentan características morfológicas similares y adaptados a dispersarse por artrópodos (Upadhyay, 1993; Malloch y Blanckwell, 1993). Varias especies de ophiostomatoides son patógenos importantes en coníferas y angiospermas (Wingfield *et al.*, 1993, Jacobs y Wingfield, 2001), otros pueden causar un manchado en troncos y la madera recién cortada (Wingfield *et al.*, 1993), o afectar cultivos agronómicos como algodón, batata, cacao, café, caña de azúcar, guayaba, mango, piña, plátano, tabaco, zanahoria (Kile, 1993). Las esporas son producidas en las galerías del insecto y transportados en el exoesqueleto, micangios o aparato digestivo del insecto descortezador (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), obteniendo un mutuo beneficio (Paine *et al.*, 1997). Se ha reportado que el hongo ophiostomatoide ayuda a matar el árbol por la reducción de agua, azúcares y acumulación de monoterpénoides potencialmente tóxicos en el floema y xilema (Popp *et al.*, 1995; Croise *et al.*, 2001). *Ophiostoma ulmi* y *O. novo-ulmi* Brasier son responsables de la pandemia de la enfermedad del olmo Holandés que mató millones de árboles en Europa y el América del Norte (Wingfield *et al.*, 1993). Las tres variedades de *Leptographium wageneri* son responsables de la enfermedad del teñido oscuro de raíces en coníferas en Estado Unidos y Canada (Harrington, 1988; Wingfield y Knox- Davies, 1980). Estas variedades son *L. wageneri* var. *wageneri* presente en pinos piñoneros (*Pinus monophylla*, *P. edulis*), *L. wageneri* var. *pseudotsuga* en *Pseudotsuga menziesii* y *L. wageneri* var. *ponderosum* presente en pinos duros (*P. ponderosa*, *P. contorta* y *P. jeffreyi*) (Harrington, 1988). En México se han reportado 17 hongos ophiostomatoides asociados con insectos que se alimentan del floema y cambium vascular como *Conophthorus cembroides*, *D. mexicanus*, *D. mexicanus*, *Ips calligraphus*, *D.*

*valens*, *Dendroctonus mexicanus*, *Ips* spp. y *Pseudohylesinus* spp. (Marmolejo y Butin, 1993; Marmolejo, 1991; Zhou *et al.*, 2004a; Cibrián *et al.*, 2007). Las especies más frecuentes que causan manchado en la madera son *Ophiostoma piliferum* (Fr.) H & P. Syd. y *O. ips* (Rumb.) Nannf. (Marmolejo y Butin, 1993; Marmolejo, 1991). *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted se reporta como un hongo vascular en *Hevea brasiliense* al causar la muerte del árbol o manchados en la madera recién cortada y reduce la cosecha de goma en plantaciones forestales (Cibrián *et al.*, 2007). Las tres especies han sido reportadas como patógenos en muchas partes del mundo (Seifert, 1993). Los hongos han sido aislados de insectos y sus galerías e identificados en base a características morfológicas (Zhou *et al.* 2001). Sin embargo, pueden no llegar a formar el estado sexual, lo cual dificulta su identificación a nivel de especie Zhou *et al.*, 2001. Las secuencias de las regiones ITS de los genes ribosomales (rADN) han sido usadas con éxito para determinar las relaciones filogenéticas entre los hongos ophiostomatoides (Hausner *et al.*, 1993; Wingfield *et al.*, 1994) y se ha considerado la morfología de la ascosporas como un carácter taxonómico no confiable para este grupo (Hausner *et al.*, 1993; Wingfield *et al.*, 1994). Zhou *et al.* (2001) amplificaron las regiones internas ITS de los genes rRNA permitiendo la identificación a nivel de especie de *Ophiostoma pulvinisporum* y *Sporothrix* sp. en México. El objetivo del presente trabajo fue identificar y probar la patogenicidad de cinco hongos ophiostomatoides asociados con el pino de las alturas (*Pinus hartwegii* Lindl).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo en campo

Se colectaron 20 muestras de corteza de *Pinus hartwegii* con galerías del insecto descortezador *Dendroctonus adjunctus* en cuatro sitios de muestro de la Estación Forestal Experimental Zoquiapan, Estado de México, México. El material recolectado fue etiquetado, colocado en bolsas de polipapel y trasladado al Laboratorio de Patología Forestal del Campus Montecillo-Texcoco, Edo. de México, donde se conservaron a 4 °C hasta su posterior análisis.

### Aislamiento del hongo

El material se lavó con agua destilada, se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial al 1.5% durante 2 min, se lavaron tres veces con agua destilada estéril, se secaron con papel estéril y finalmente se colocaron en cámaras húmedas. Las cámaras con corteza se incubaron a  $25\pm 2$  °C en oscuridad durante 30 días para inducir la formación de estructuras sexuales o asexuales. Masas de ascosporas o conidios en el ápice de las estructuras reproductivas se transfirieron con una aguja de disección estéril a cajas de extracto-malta-agar 2% adicionado con Cicloeximida (0.1g) y Sulfato de estreptomycinina (0.02g) e incubaron a  $25\pm 2$ °C en luz natural durante 20 días. Se hicieron cultivos puros al transferir fragmentos del hongo a nuevas cajas Petri con extracto-malta-agar al 2% (EMA) e incubaron a las mismas condiciones del aislamiento. Se hicieron cultivos monoconidiales o monoascospóricos en cajas con agar-agua (AA) y se incubaron a  $25\pm 2$  durante 24 hr. Las conidias y ascosporas germinadas se transfirieron individualmente a cajas con EMA (2%) y se incubaron hasta que se formara la estructura sexual o asexual de los hongos. Todos los aislamientos se conservaron en tubos inclinados de EMA (2%) y cubiertos con aceite mineral.

## Identificación morfológica

Se sembraron 10 cultivos monoconidiales o monoascopóricos crecidos en EMA (2%) a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 40 días y se identificaron a nivel género con las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998) y Handlin (2001), y para especie, las de Upadhyay (1981) y Jacobs y Wingfield (2001). Las variables evaluadas fueron: tipo de crecimiento, color de la colonia, tipo de micelio, tipo de estructura reproductiva, tipo y forma de conidios o ascosporas, largo y ancho de 200 ascosporas y conidios, y 30 peritecios o sinemas. Para observar el desarrollo de conidios y tipo de ascosporas, se tomaron discos con crecimiento fungal de 0.5 cm de diámetro. Las muestras se fijaron en glutaraldehído 3% con amortiguador de fosfatos Sorensen's 0.1M, pH 7.2 durante 24 h. Posteriormente, las muestras se lavaron tres veces con el amortiguador de fosfatos Sorensen's por un minuto y se deshidrataron en una serie de soluciones de etanol (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%, las últimas tres soluciones dos veces) por 15 min en cada cambio. Los discos se colocaron en una secadora de punto crítico de  $\text{CO}_2$  Samdri-780A<sup>®</sup> (TOUSIMIS Research Corporation, Rockville, USA) a  $31.1^{\circ}\text{C}$  y 1073 psi; posteriormente, los discos se pegaron en un portamuestras de latón de 9 mm de diámetro con cinta adhesiva-conductiva de cobre y se recubrieron con oro durante 4 minutos en una ionizadora JFC-1100<sup>®</sup> (JEOL LTD, Tokio, Japan). Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido JSM-35C<sup>®</sup> (JEOL LTD, Tokio, Japan) operado a 15 Kv en el laboratorio de Microscopia Electrónica del Colegio de Postgraduados.

## Caracterización cultural

### Inducción de peritecios

La producción de estructuras sexuales se hizo inoculando probetas de madera de  $0.5\text{ cm}^2$  de *Pinus hartwegii*, previamente infiltrados con extracto-malta al 2% y esterilizados durante 20



minutos. Diez probetas se colocaron en cada vial de vidrio con 3 ml de EMA al 2% para un total de 20 viales de vidrio, se esterilizaron e inocularon por aislamientos dos viales. Los aislamientos fueron incubados bajo condiciones de laboratorio a una temperatura de  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Las observaciones se realizaron cada 3 días durante 60 días.

### Ambiente de crecimiento

Se evaluó la velocidad de crecimiento de 10 aislamientos con cultivos monoascospóricos y uno monoconidial) sembrados en cajas de Petri con medio EMA al 2%. El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial; tres ambientes de crecimiento (I-luz natural de laboratorio, II-luz blanca y III-luz negra), 10 aislamientos (ZOQ2, ZOQ5, ZOQ6, ZOQ8, ZOQ9, ZOQ12, ZOQ13, ZOQ15, ZOQ16, ZOQ17) y cinco repeticiones por tratamiento. Las cajas fueron incubadas a una temperatura de  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , se hicieron lecturas del crecimiento del diámetro de cada aislamiento cada dos días durante 20 días. Los datos de crecimiento fueron analizados usando el análisis de varianza y el método de comparación de media de Tukey ( $\alpha = 0.05\%$ ) con el paquete estadístico SAS<sup>®</sup> v8.1.

### Patogenicidad

Se evaluó la patogenicidad de 10 aislamientos: dos de *Leptographium guttulatum*, uno de *Pesotum* sp. (= *Graphium* sp.), tres de *Ophiostoma olivaceapinii*, tres de *Ophiostoma angusticollis* y uno de *Ophiostoma nigrocarpum* en un diseño experimental completamente al azar con 5 repeticiones por aislamiento, la unidad experimental constó de un árbol. Un total de 50 árboles de *Pinus hartwegii* de tres años de edad fueron inoculados. El método de inoculación consistió en desinfectar con alcohol al 70% la zona de inoculación y lavar con agua destilada

estéril, posteriormente hacer una herida de 0.5 cm<sup>2</sup> con la ayuda de un bisturí levantando la corteza e introducir un disco con crecimiento micelial de 0.5 cm de diámetro con 20 días de edad en el zona de inoculación. Los discos se depositaron a los 6 cm de la base del tallo principal. En 5 árboles testigo se colocaron discos de EMA al 2% sin inoculó. Las zonas inoculadas con el hongo y los testigos se cubrieron con algodón humedecido con agua destilada estéril, gaza estéril y se sellaron con Parafilm. Para evitar la pérdida de humedad se inyectó agua destilada estéril cada cinco días. Después de la inoculación, los árboles fueron trasladados al invernadero de la División de Ciencias Forestales (DICIFO) de la Universidad Autónoma Chapingo y mantenidos durante 11 meses a una temperatura de 26 ±2°C., con un periodo de dos meses a acondicionamiento, previo a la inoculación. Se evaluó la sintomatología y número de plantas muertas. Se tomo el número de plantas muertas y sanas al final del experimento y se analizó con la prueba proc logistic con el paquete estadístico SAS<sup>®</sup> v8.1.

### Caracterización molecular

El ADN de los 10 aislamientos se obtuvo por el método AP (Sambrook y Russell, 2001), se cultivaron en matraces con 50 mL de medio líquido de extracto de malta (EM: 20 g de extracto de malta, 1000 mL de agua destilada estéril), a una temperatura de 25 °C y oscuridad por 25 días. La calidad del ADN se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. La amplificación de las regiones ITS1 e ITS2 de los genes ribosomales (rRNA), localizadas entre las subunidades pequeñas 18S-5.8S y 5.8S-18S, se realizó mediante la técnica de PCR con los iniciadores universales ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGGAAGTAA-3') y ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). Cada reacción de PCR fue de un volumen final de 25 µl de la mezcla de 12.5 µl agua libre de nucleasas, 2.5 µl de Buffer 5X, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2.5 µl; 200 µM de

dNTPs, 0.5  $\mu$ l; 0.8  $\mu$ M de cada uno de los iniciadores ITS1-F e ITS4, 1  $\mu$ l; 2 U de Taq-DNA polimerasa (Invitrogen <sup>TM</sup>), 0.5  $\mu$ l y 10 ng de ADN problema, 2  $\mu$ l. Se utilizó un termociclador Applied Biosystems <sup>TM</sup> (Mod. Termal Cycler 2720) con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 59 seg; alineamiento a 55 °C por 59 seg, y extensión a 72 °C por 1 min, y una extensión final de 72 °C por 8 min. (Zhou *et al.*, 2004). Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, y se tiñó con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron en un fotodocumentador (Bio-Imagen Systems Mini Bis Pro). Los productos de la PCR fueron tomados directamente del gel y purificados con Wizard SV (Promega, USA). El producto de PCR fue secuenciado en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México con un secuenciador Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystem Corp). Las secuencias obtenidas con el iniciador ITS1-F se alinearon con las secuencias disponibles en el banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de U.S.A. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). De los valores generados, se consideraron las secuencias con el valor más alto para su comparación con las secuencias en estudio.

#### Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción o RFLP

Del producto de PCR, 10  $\mu$ L fueron digeridos con las enzimas *Hind*III y *Kpn*I (Fermentas<sup>®</sup>) en un termociclador (Applied Biosystems 2720), bajo el siguiente programa: *Hind*III y *Kpn*I a 65°C durante 20 hr. Los productos de la digestión fueron analizados en un gel de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio y se analizaron en un fotodocumentador (Bio-Imagen Systems Mini Bis Pro).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aislamientos e identificación morfológica

Se obtuvieron un total de 50 aislamientos de galerías del insecto descortezador *Dendroctonus adjunctus* de *Pinus hartwegii*. En total se identificaron cuatro hongos a nivel especie (*Leptographium guttulatum*, *Ophiostoma angusticollis*, *O. nigrocarpum* y *Ophiostoma olivaceapinii*) y una no identificada del género *Pesotum* sp.

*Leptographium guttulatum* presentó un crecimiento de 80 mm en 10 a 12 días a una temperatura de  $26 \pm 1$  °C en condiciones de laboratorio y en medio de cultivo de extracto-malta-agar al 2%, una coloración de color café claro a café oliváceo y al reverso de la caja una tonalidad café oscuro. El micelio del hongo inmerso en el medio de cultivo fue de color café claro a café oliváceo y micelio aéreo hialino cuando joven (Figura 1A). Conidióforos simples de color café oliváceo de (210-)500.33(-815.60)  $\mu\text{m}$  de longitud y con rizoides ausentes, emergiendo del medio de cultivo. Estípites café oliváceo, cilíndricos con siete septas de (115.20-)270.40(-650.60)  $\mu\text{m}$  de longitud y 5.5 a 11  $\mu\text{m}$  de ancho. Célula apical y basal no hinchadas (Figura 1B). Aparato conidiogénico de (62.55-)150(-195.80)  $\mu\text{m}$  de longitud con ramificación tipo B con 2 a 4 ramas (Figura 1C). Células conidiogénicas de proliferación percurrente, cilíndricas de 2 a 3, con el ápice ligeramente agostado y redondeado (Figura 1D). Conidias hialinas, aseptadas, oblongas a ovoides con gutulas prominentes de (5.59-)6.74(-11.62) x 2.0-3.0  $\mu\text{m}$  de apariencia simpodial en la base de las células conidiogénicas (Figura 1D,E). Las conidias están contenidas en una gota mucilaginosa y transparente que cubre todo el aparato conidiogénico en aislamientos jóvenes de 10 a 20 días. En aislamientos de *L. guttulatum* de mayor de 30 días las gotas mucilaginosas se tornan de color crema. Estas características morfológicas correspondieron a la especie *L. guttulatum* M.J. Wingf. et K. Jacobs sp. nov., de acuerdo a las claves y descripciones de Jacobs et

al. (2001ab). Los autores, Barras y Perry (1971) aislaron del micangio de *Dendroctonus adjunctus* a *Leptographium* sp. Six y Paine (1996) identifican por características morfológicas, secuencias de ADNmt y RFLP al hongo micangial *L. pyrinum* asociado a *D. adjunctus*. *L. pyrinum* puede ser fácilmente distinguido de otras especies de *Leptographium* por la conidia ovoide y la presencia de material granular sobre las hifas (Jacobs y Wingfield, 2001a).

La colonia de *Pesotum* creció 80 mm en 15 días a una temperatura de  $\pm 26$  °C en condiciones de laboratorio y en medio de cultivo de extracto de malta agar al 2% con una coloración café, café olivo a gris a los 70 días, al reverso de la caja es café oscuro (Figura 1F). Micelio inmerso de color café y sobre la superficie micelio aéreo hialino. Sinemas café oscuro a negro oscuro de  $(450.16-236.99)(-150.40) \times (37.60-22.65)(-9.40)$   $\mu\text{m}$  (Figura 1G). Célula conidiogénica percurrente, anélido, cilíndrica, hialina (Figura 1H). Conidia holoblástica, hialina, unicelular, elipsoide a ovoide de  $(7.64-4.82)(-1.97) \times (6.33-2.65)(-1.37)$   $\mu\text{m}$ , acumulándose la masa de conidias en el ápice del sinema (Figura 1I), las características correspondieron a la del género *Pesotum* sp. (= *Graphium* sp. Corda) de acuerdo a las claves y descripción de Barnett y Hunter (1972) y Upadhyay (1981).

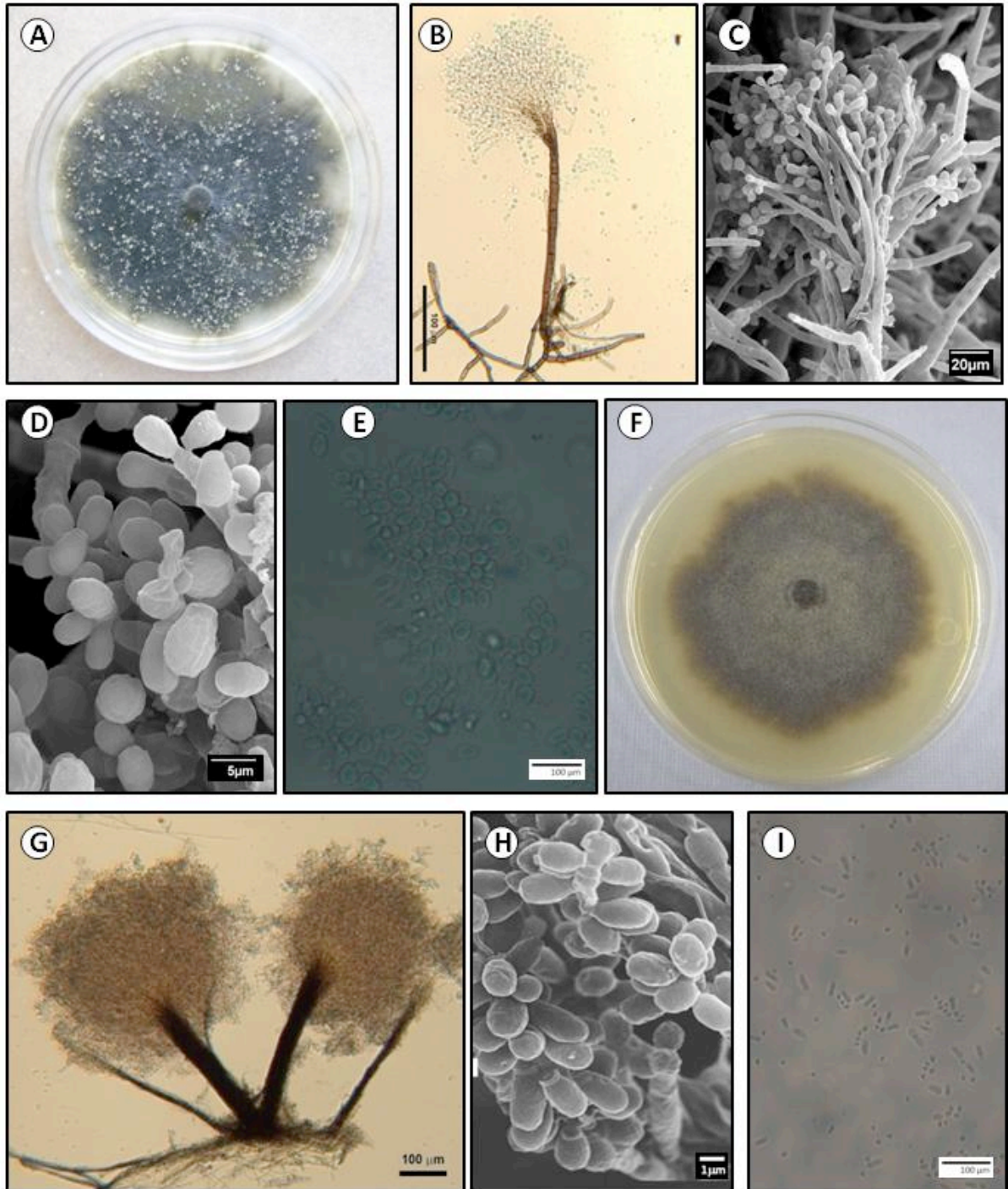


Figura 1. Características culturales y microscópicas (microscopia de luz y microscopia de barrido) de *Leptographium guttulatum* y *Pesotum* sp. (= *Graphium* sp.). A) Aislamiento de *L. guttulatum* café claro a café oliváceo en EMA al 2% a los 12 días. B) Conidióforos solitarios. C) Aparato conidiogénico con 2 a 4 ramas. D) Células conidiogénicas de proliferación percurrente. E) Conidias unicelulares. F) Colonia de *Pesotum* sp. café, café olivo, gris en EMA al 2% a los 15 días. G) Conidioforos sinematosos H) Células conidiogénicas de proliferación percurrente. I) Conidias elipsoides a ovoides. 60

La especie *Ophiostoma olivaceapinii* presentó un crecimiento radial en medio EMA al 2% y alcanzó un diámetro de 45 mm a los 15 días a una temperatura de  $26 \pm 1$  °C. La coloración de la colonia fue café claro, café oscuro en cultivos jóvenes y café grisáceo a los 30 días. El micelio inmerso de color café (Figura 2A). Conidióforos sinematosos de color café a café oscuro, de 480 a 560  $\mu\text{m}$  de largo incluyendo el aparato conidiogénico. Los sinemas solitarios o agrupados de 2 a 6, de color café a café oscuro a los 10 a 12 días (Figura 2B). Células conidiogénicas aparentemente con proliferación percurrente y anelaciones de apariencia simpodial, cilíndrica y hialina (Figura 2C). Los conidios son hialinos, unicelulares, elipsoides a ovoides, de  $(7.64-4.82(-1.97) \times (5.33-2.65(-1.37) \mu\text{m}$  (Figura 2C). La masa de conidios contenidos en un mucilago hialino a grisáceo en el ápice del sinema, dependiendo la edad del cultivo. Los peritecios crecen superficiales o ligeramente inmersos en medio de cultivo, desarrollándose a los 25 días solitarios a agrupados. Su base es globosa, oscuros, de 190 a 200  $\mu\text{m}$  de diámetro. El cuello del peritecio es café oscuro a negro de 250 a 618  $\mu\text{m}$  de largo sin incluir hifas ostiolares, de  $(20-26(-38)$  de ancho de la base y de ancho del ápice de  $(13-16(-21) \mu\text{m}$  y ligeramente curvo el ápice del cuello. Hifas hialinas de 20 a 25  $\mu\text{m}$  de largo y de  $(1-1.5(2.0) \mu\text{m}$  de ancho (Figura 2D, F). Las ascas son de tipo evanescentes. Ascosporas hialinas, reniformes (Figura 2E), las características morfológicas correspondieron a *Ophiostoma olivaceapinii* Davidson, de acuerdo a las claves y descripciones de Barnett y Hunter (1972); Upadhyay (1981) y Mouton *et al.* (1993).

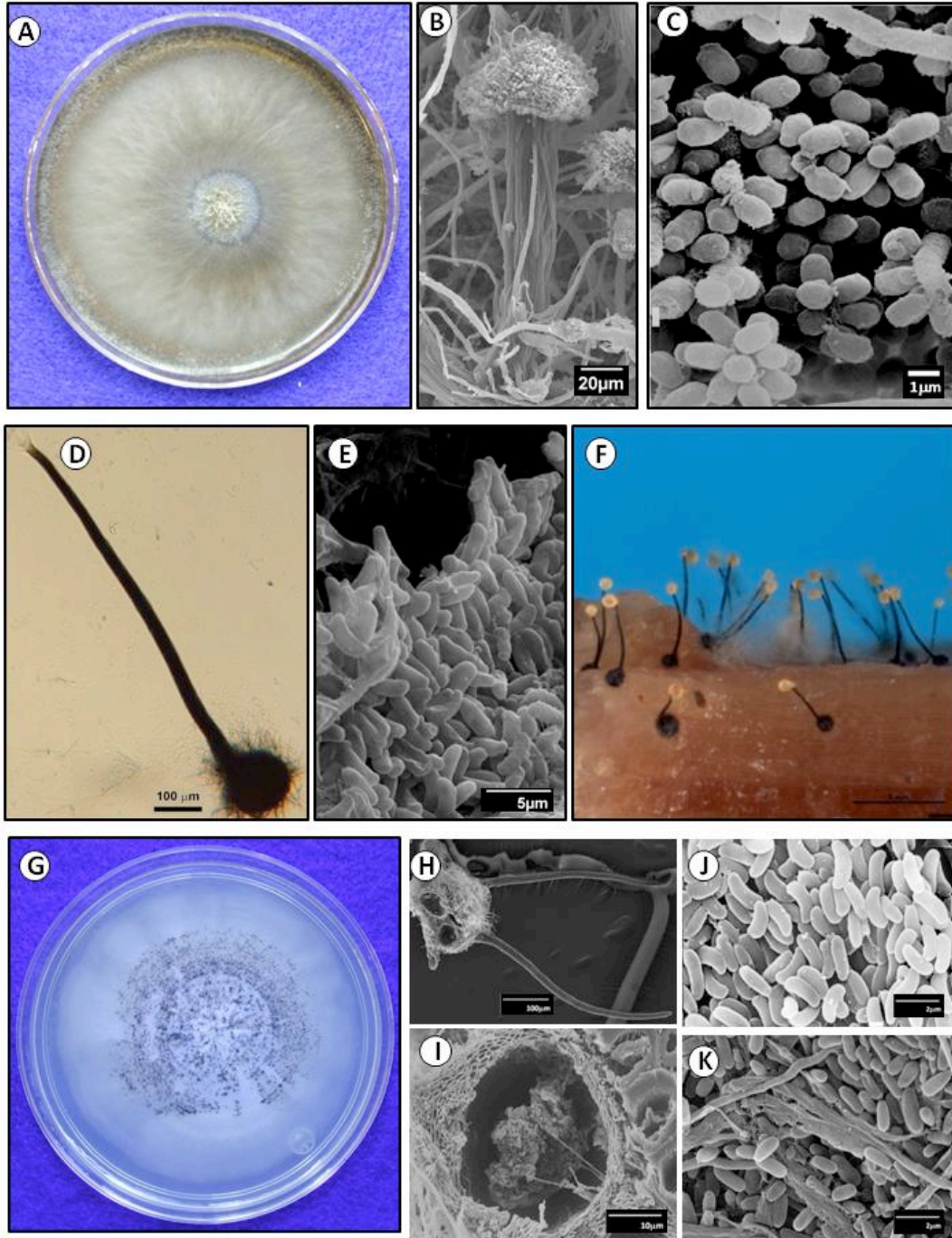


Figura 2. Características culturales y microscópicas (microscopía de luz y microscopía de barrido) de *Ophiostoma olivacepinii* y *O. nigrocarpum* sp. A) Aislamiento café claro, café oscuro en cultivos jóvenes a grisáceo en EMA al 2% a los 15 días de *Ophiostoma olivacepinii*. B) Sinema. C) Conidios elipsoides a ovoides. D) Peritecios con hifas ostiolares. E) Ascosporas reniformes. F) Peritecios de *O. nigrocarpum* en bloques de madera de *Pinus hartwegii*. G) Aislamiento blanco cremoso con peritecios de *O. nigrocarpum*. H, I) Corte de la base del peritecio J) Ascosporas reniformes. K) Conidios elipsoides a cilíndricos.



*Ophiostoma nigrocarpum* (Davids) de Hoog presentó un crecimiento radial en medio de cultivo EMA al 2% y alcanzó un diámetro de 30 mm a los 15 días. La coloración de la colonia fue blanca a gris oscuro dependiendo de la edad del cultivo (Figura 2G). Los conidios, unicelulares, ovoides, elipsoides a cilíndricos de  $(2.0)3.5(7.0) \times (1.0-)1.2(-2.0)$  contenidos en micelio blanco similar al del género *Sporothrix* (Figura 2K). Los peritecios crecen superficiales o ligeramente inmersos en el medio de cultivo, desarrollándose a los 10 a 15 días. Su base es globosa, oscura, de  $(188-)107.818(-84.6)$   $\mu\text{m}$  de diámetro. El cuello del peritecio es café oscuro a negro de 180 a 210  $\mu\text{m}$  de largo y  $(18-)22(-36)$   $\mu\text{m}$  de ancho de la base. El ápice del cuello más claro, de  $(15-)13(-21)$  de ancho e hifas ostiolares aseptadas de color café claro de  $(1.5-)3.2(-3.8)$   $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 2H, I). Las ascas son de tipo evanescente. Ascosporas hialinas, unicelulares, de forma lunada de  $(2.90-)3.50(-4.90) \times (1.0-)1.6(-2.0)$   $\mu\text{m}$  (Figura 2J). La masa de ascosporas está contenida en un mucilago blanco cremoso en el ápice del cuello del peritecio, las características corresponden a la descripción morfológica en las descripciones de Upadhyay (1981); Aghayeva *et al.* (2004).

Las colonias de *Ophiostoma angusticollis* (E.F. Wright & H.D. Griffin) mostraron un crecimiento radial de 26 mm de diámetro a los 15 días, a una temperatura de  $26 \pm 1$  °C, en medio de cultivo EMA al 2%; una coloración blanco cremosa y al reverso de la caja de Petri es blanco (Figura 3A). Los peritecios crecen superficiales o ligeramente inmersos en el medio de cultivo a los 15 o 20 días (Figura 3A, B). Su base es globosa, oscura, de  $(84.60-)96.30(-115.20)$   $\mu\text{m}$  de diámetro. El cuello del peritecio es café oscuro a negro de 225 a 507  $\mu\text{m}$  de largo y  $(12.00-)15.60(-21.30)$   $\mu\text{m}$  de ancho de la base. El ápice del cuello romo, más claro, de  $(1.85-)3.24(-6.30)$   $\mu\text{m}$  de ancho e hifas ostiolares ausentes (Figura 3C). Las ascas son de tipo evanescente. Ascosporas hialinas, unicelulares, de forma reniforme de  $(2.00-)3.50(-4.70) \times (1.0-)1.6(-2.0)$   $\mu\text{m}$

(Figura 3D, E). La masa de ascosporas está contenida en un mucilago blanco cremoso en el ápice del cuello del peritecio. Estas características morfológicas correspondieron a la descripción de Olchowecki y Reid (1974); Upadhyay (1981) y Aghayeva *et al.* (2004). El micelio de *O. angusticollis* en medio de cultivo presento un tipo de célula conidiogénica de apariencia denticulada similar a su anamorfo *Sporothrix* y con conidios hialinos, unicelulares, ovoides, de (2.0)3.5(7.0)x(1.0-)1.2(-2.0), con desarrollo simpodial (Upadhyay, 1981). Morfológicamente *Ophiostoma angusticollis* y *O. sejunctum* son muy similares. Sin embargo, la especie *O. angusticollis* presenta a *Sporothrix* como anamorfo y *O. sejunctum* tiene a *Hyalorhinocladiella* (Villarreal *et al.*, 2005). Además, la primer especie contiene la masa de ascosporas en un mucilago a diferencia de *O. sejunctum* que no las contiene (Olchowecki y Reid, 1974). Se ha aislado *O. angusticollis* y otros *Ceratocystis sensu lato* en la cámara pupal de un cerambicido asociado con el nematodo de la madera del pino (*Bursaphelenchus xylophilus*) en *Pinus resinosa* y *P. banksiana* (Wingfield, 1987).

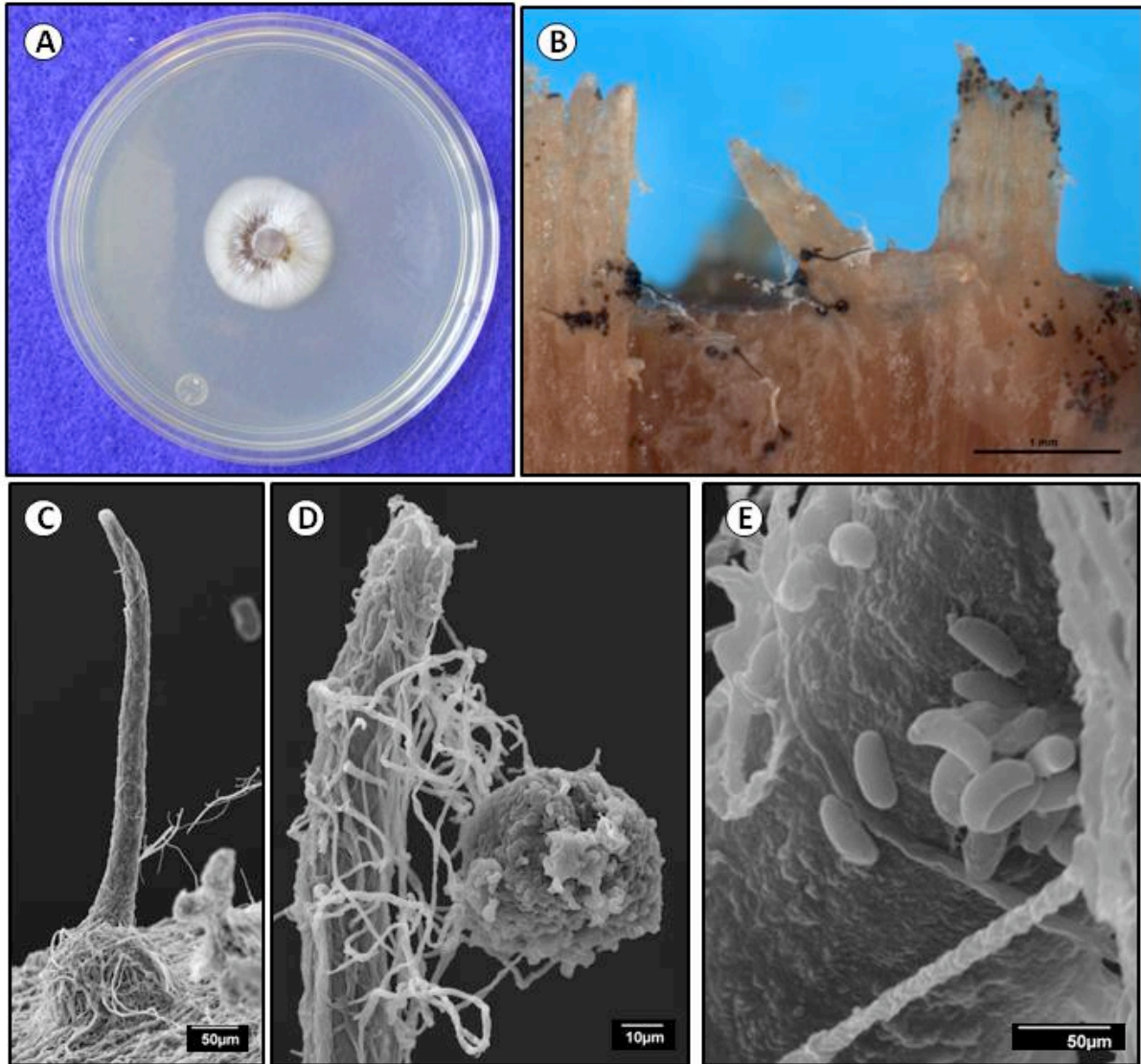


Figura 3. Características culturales y microscópicas (microscopia de luz y microscopia de barrido) de *Ophiostoma angusticollis*. A) Aislamiento blanco cremoso en cultivos en EMA al 2% a los 15 días. B) Peritecios de *O. angusticollis* en bloques de madera de *Pinus hartwegii*. C) Peritecios sin hifas ostiolares. D) Masas de ascosporas contenidas en una matriz gelatinosa. E) Ascosporas reniformes.

## Caracterización cultural

### Inducción de peritecios

Las estructuras sexuales aparecieron a los 30 días y de manera abundante a los 45 días sobre la superficie de los trocitos de madera de *Pinus*, impregnados con extracto de malta. Los aislamientos que produjeron peritecios fueron *O. angusticollis*, *O. nigrocarpum* con acumulación de masas de ascosporas en ápice del cuello de color (Figura 2F y 3B). Los aislamientos de *Leptographium guttulatum*, *Pesotum* sp. y *O. olivaceapinii* solo hubo crecimiento micelial de manera abundante sobre la madera. Jacobs *et al.* (2001ab) reportan la ausencia la fase sexual de *Leptographium guttulatum* en medio de cultivo artificial.

### Ambiente de crecimiento

El tipo de aislamiento y luz fueron altamente significativos para el crecimiento de los aislamientos en medio de cultivo EMA al 2% bajo condiciones de temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  (Cuadro 1). En los aislamientos de *Ophiostoma olivaceapinii* (ZOQ5, ZOQ15) y *Pesotum* sp. (ZOQ6) presentaron la mayor velocidad de crecimiento pero con diferencias mínimas (Cuadro 2) con un crecimiento promedio de 2.9, 2.5 y 2.4 mm por día respectivamente durante 20 días de evaluación. *Pesotum* (ZOQ6) presentó micelio café claro a café oliváceo y abundantes sinemas color café oscuro con masas de conidios de color gris a los 5 días en el centro de la caja de Petri y en la periferia micelio hialino a los 20 días. Adicionalmente, el resto de los aislamientos se observó que después de 20 días hubo abundantes sinemas y micelio aéreo en el medio de cultivo, presentando su máximo crecimiento a los 12 días en luz natural de laboratorio. *Ophiostoma olivaceapinii* presentó coloración café oscuro en el medio de cultivo, micelio de color blanco en el centro, micelio hialino raso y formación de sinemas en la periferia de la caja de petri sin llegar

a formar peritecios en los tres ambientes de crecimiento. Upadhyay (1981) reporta un crecimiento de *O. olivaceapinii* a una temperatura de 22 °C con 65 mm de diámetro a los 12 días y Villarreal *et al.* (2005) menciona un crecimiento óptimo a 24°C.

Cuadro 1. Análisis de varianza de la respuesta del aislamiento al efecto de la luz en el crecimiento de aislamientos de hongos ophiostomatoides aislados de galerías del insecto descortezador *Dendroctonus adjunctus* colectados en el municipio de Zoquiapan, México.

Factor de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P>F
Aislamiento (A)	2	35564.5600	32782.0867	465.61	<.0001
LUZ (L)	9	65564.1733	3951.6178	56.13	<.0001
A*L	18	40789.1600	2266.0644	32.19	<.0001
Error	120	8448.8000	70.4067		
Total	149	150366.6933			

Después de estos aislamientos, le siguió *O. angusticollis* (ZOQ16) con un máximo crecimiento a los 20 días en luz natural de laboratorio, luz blanca y sin crecimiento en luz negra (Cuadro 2). En medio de cultivo hubo la formación de micelio blanco cremoso compacto y la aparición de peritecios café oscuro, inmaduros y agrupados de 2 a 4. Los aislamientos de *O. nigrocarpum* (ZOQ12), *Leptographium guttulatum* (ZOQ2 y ZOQ8) presentaron un crecimiento promedio de 25 a 29 mm durante los 20 días comparado con *O. olivaceapinii* (ZOQ17) y *O. angusticollis* (ZOQ9) que presentaron los crecimientos menores de 11 mm en las tres ambientes de crecimiento (Cuadro 2). *O. nigrocarpum* presentó abundante micelio blanco con conidios a los 10 días y peritecios ligeramente inmersos entre los 15 y 18 días, con un máximo crecimiento a los 20. En luz negra no hubo crecimiento. Aghayeva *et al* (2004) reportan un crecimiento de *O. nigrocarpum* de 44.65 mm a 25 °C a los 10 días. Sin embargo, Upadhyay (1981) reporta un crecimiento de 35 mm a 22 °C a los 12 días en medio artificial. *Leptographium guttulatum* tuvo

un crecimiento máximo mayor de 7.5 mm a los 10 días en luz natural en comparación en luz blanca y luz negra donde no hubo crecimiento. Jacobs y Wingfield (2001) y Jacobs *et al.*, (2001) reportan que la temperatura óptima de crecimiento de *L. guttulatum* es de 25°C con un diámetro de 39 mm en 9 días.

Cuadro 2. Comparación de medias de la respuesta del aislamiento al efecto de la luz de los aislamientos de hongos ophiostomatoides aislados de galerías del insecto descortezador *Dendroctonus adjunctus* colectados en el municipio de Zoquiapan, México.

Factor	Nivel	Diámetro (mm) <sup>†</sup>	Factor	Nivel	Diámetro (mm) <sup>†</sup>
Luz	Luz natural	53.34 <sup>a</sup>	Aislamiento	ZOQ5	57.60 <sup>a</sup>
	Luz negra	37.66 <sup>b</sup>		ZOQ6	50.07 <sup>a</sup>
	Luz blanca	3.28 <sup>c</sup>		ZOQ15	48.47 <sup>a</sup>
		ZOQ16		34.73 <sup>b</sup>	
		ZOQ12		29.67 <sup>bc</sup>	
		ZOQ2		25.93 <sup>bc</sup>	
		ZOQ8		25.00 <sup>bc</sup>	
		ZOQ13		21.53 <sup>c</sup>	
		ZOQ17		10.67 <sup>d</sup>	
		ZOQ9	10.60 <sup>d</sup>		

<sup>†</sup>Medias con la misma letra son iguales (Tukey 5%)

### Caracterización molecular

El producto de PCR de las regiones internas ITS1 e ITS2 de los genes ribosomales (rADN) fue de 700 pb con los oligonucleótidos ITS1-F e ITS4 del ADN obtenido del micelio crecido en medio líquido de extracto de malta al 2%. Las secuencias de nucleótidos de cada uno de los aislamientos se alinearon y compararon con las secuencias reportadas en el banco de genes (NCBI), las secuencias se alinearon con el valor más alto de identidad de 98 a 100% (Cuadro 3). Las secuencias de *Leptographium guttulatum* (ZOQ2 y ZOQ8) se alinearon en primer lugar con

secuencias de la misma especie con número de acceso AY649783 con un índice de similaridad de 98% para ambas especies. Para secuencias de *Ophiostoma olivaceapinii* (ZOQ5, ZOQ15 y ZOQ17), se alinearon en primer lugar con una secuencia con número de acceso AJ538336 de la misma especie y un índice de similaridad de 98%. En el caso del género *Pesotum* (ZOQ6), se alineó con una secuencia con un número de acceso AY649781 e índice de similaridad de 98% que corresponde al género *Ophiostoma*. Los aislamientos ZOQ9, ZOQ13 y ZOQ16 identificados por características morfológicas como *Ophiostoma angusticollis*, solamente se alinearon con la misma especie ZOQ9 y ZOQ16, con número de acceso AY924333 con un índice de similaridad de 99 a 100% y el aislamiento ZOQ13 se alineó con el género *Sporothrix*, con número de acceso AY546722 con un índice de similaridad de 99%, este género es reportado como el estado asexual de la especie (Upadhyay, 1981). De igual forma el aislamiento ZOQ12 identificado como *O. nigrocarpum* se alineó con el género *Sporothrix* con un 99% de similaridad. *Ophiostoma nigrocarpum* es similar al complejo de *O. stenoceras* por características morfológicas; sin embargo, se pueden separar por comparación de secuencias de ADN (Aghayeva *et al.*, 2004 y Zhou *et al.*, 2004). En este grupo, *O. albinum*, *O. ponderosae* son sinónimos de *O. stenoceras* (Wilhelm *et al.*, 2003). Además, *Ophiostoma abietinum* descrito por Mamolejo y Butin (1993) en *Abies vejari* atacado por *Pseudohylesinus* sp. en México, es considerado como una forma intermedia entre *O. stenoceras* y *O. nigrocarpum* en base a la morfología del peritecio (De Beer *et al.*, 2003).

Cuadro 3. Caracterización molecular por alineamiento de las secuencias reportadas en el banco de genes con las secuencias intergénicas (ITS) de los genes ADNr de los hongos aislados de *Pinus hartwegii*.

Aislamiento	Identificación morfológica	Número <sup>†</sup> (NCBI)	Número de nucleótidos (pb)	Especie alineada (NCBI)	IS <sup>b</sup>	Valor de alineamiento
ZOQ2	<i>Leptographium guttulatum</i>	EU109663	695	<i>L. guttulatum</i>	98	1094
ZOQ5	<i>O. olivaceapinii</i>	EU109664	637	<i>O. olivaceapinii</i>	98	1140
ZOQ6	<i>Pesotum</i> sp.	EU109665	613	<i>Ophiostoma</i> sp	98	1040
ZOQ8	<i>L. guttulatum</i>	EU109666	696	<i>L. guttulatum</i>	98	1099
ZOQ9	<i>O. angusticollis</i>	EU109672	503	<i>O. angusticollis</i>	100	865
ZOQ12	<i>O. nigrocarpum</i>	EU109667	474	<i>Sporothrix</i> sp	99	857
ZOQ13	<i>O.angusticollis</i>	EU109668	474	<i>Sporothrix</i> sp	99	859
ZOQ15	<i>O. olivaceapinii</i>	EU109670	526	<i>O. olivaceapinii</i>	98	928
ZOQ16	<i>O. angusticollis</i>	EU109671	652	<i>O. angusticollis</i>	99	1042
ZOQ17	<i>O. olivaceapinii</i>	EU109669	625	<i>O. olivaceapinii</i>	98	1110

<sup>†</sup>NCBI (National Center for Biotechnology Information). <sup>b</sup>Índice de similaridad.

### Pruebas de patogenicidad

*Leptographium guttulatum* (ZOQ2 y ZOQ8) causó la muerte de árboles de 0 a 20 % respectivamente a los 330 días después de la inoculación (ddi). Los cortes transversales de la zona de inoculación exhibieron un manchado café oscuro en la corteza, floema, cambium y xilema, con la formación de micelio de color café oscuro abundante y formación de estructuras reproductivas (asexual), a los ocho días en cámara húmeda (Figura 4). De este género, se reportan como patógenos a las tres variedades de *Leptographium wagneri* causando la pudrición negra de la raíz en los E.U. en hospedantes específicos y *L. calophylli* y otras especies de *Leptographium* que no son considerados causantes primarios de enfermedad, pueden llegar a causar la muerte en plantas inoculadas artificialmente como *L. procerum*, *L. serpens* y *L. terebrantis* (Wingfield *et al.*, 1988; Jacobs y Wingfield, 2001). *L. terebrantis* causa lesiones en el floema e induce flujo de



resina del xilema en plántulas y árboles adultos (Eckhardt *et al.*, 2004), y llega a matar árboles de dos años de edad de *Pinus ponderosa* (Owen *et al.*, 1987).

*Ophiostoma olivaceapinii* (ZOQ5, ZOQ15 y ZOQ17) causó un 20 a 60% de muerte con la formación de estructuras reproductivas a los 12 días (correspondientes a *Pesotum*), sobre la superficie de la peridermis y un manchado café claro en el xilema (Figura 4).

*Ophiostoma nigrocarpum* (ZOQ12) causó un 40% de muerte y una manchado café oscuro evidente en el xilema y abundante micelio de color blanco grisáceo (Figura 4). El aislamiento de *Pesotum* (ZOQ6) ocasionó un 40% de muerte de plantas y *Ophiostoma angusticollis* (ZOQ9, ZOQ13 y ZOQ16) causó un 10, 20 y 60% respectivamente sin presencia de una manchado en los tejidos de corteza, floema y xilema (Figura 4). Díaz *et al.* (2008) reportan que *Ophiostoma quercus* no causó lesión en la zona de inoculación, *O. galeiformis* generó una lesión de 0.6 mm, mientras que *O. huntii* causó una lesión promedio de 6.5 mm en *Pinus radiata* de 18 meses de edad. Además, considera que *Ophiostoma quercus* y *O. galeiformis* no son patogénicos en comparación a *O. huntii* y podría ser considerado un patógeno débil como el caso de *Ophiostoma ips* que causa lesiones de 34 a 44 mm de longitud en *P. radiata* en Sudáfrica (Parmeter *et al.*, 1989; Zhou *et al.*, 2002) y *O. minus* en *Pinus elliottii* var *elliottii* de 25 a 30 años de edad que causó lesiones de 120 mm de longitud a las 6 semanas después de la inoculación (Popp *et al.*, 1995). Estos autores, en un segundo estudio inocularon a *O. minus*, *L. terebrantis* y *O. nigrocarpum* en árboles de 15 a 18 años de edad y reportan que *O. minus* y *L. terebrantis* causan lesiones de 10 a 12 cm de longitud a los 12 meses, sin embargo, *O. nigrocarpum* causó lesiones de 5 cm de longitud (Popp *et al.*, 1995) y una penetración del micelio de 1.43 cm en *Pinus ponderosa* (Parmeter *et al.*, 1989).

El análisis estadístico de máxima verosimilitud indicó que la variable CEPA no es significativa, este resultado es confirmando con la razón de momios, que fue de 0.990, esto debido a que el número de repeticiones por tratamiento fueron muy pocos.

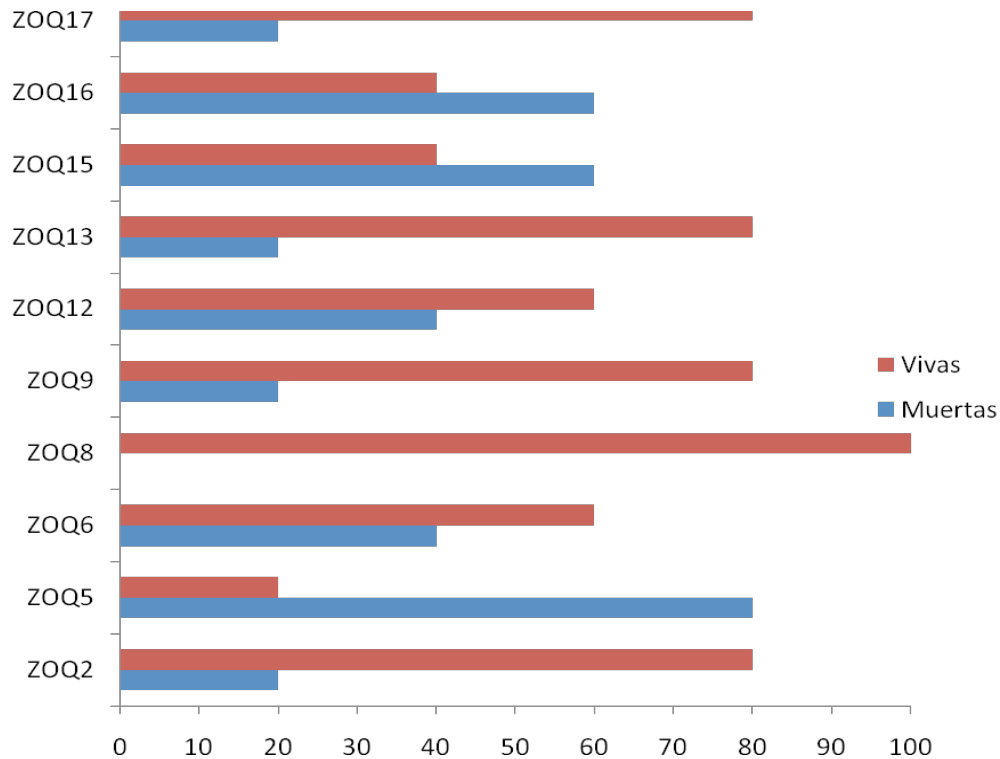


Figura 4. Porcentaje de plantas vivas y muertas inoculadas con cuatro especies de *Ophiostoma* y el género *Pesotum* sp. en *Pinus hartwegii* de tres años de edad.

#### Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

De los aislamientos cuyos productos de amplificación se sometieron a digestión con la enzima *Hind*III, se obtuvieron fragmentos de 750 pb para *Leptographium guttulatum*, *Ophiostoma olivaceapinii* generó dos fragmentos, uno de 680 y otro de 1500 pb, *Pesotum* un fragmento de 680 pb, *O. nigrocarpum* fragmentos de 700 y 1500 pb y *O. angusticollis* fragmentos de 750 y 1500 pb (Figura 5). Schroeder *et al.*, 2001, utilizaron 29 enzimas de

restricción para diferenciar aislamientos de *Ophiostoma piliferum* de otras especies de *Ophiostoma* provenientes de diversas regiones del mundo y encontraron que únicamente la enzima *Hind*III genera un patrón de restricción diferente en la región conservada del gen 26s ARNr comparado con las otras especies de *Ophiostoma*. Además, el marcador molecular se puede utilizar para diferenciar especies de *O. piceaperdum*, *O. floccosum* y *O. ips*.

En *Kpn*I generó un sólo fragmento en los cinco aislamientos. En *Leptographium guttulatum*, *Ophiostoma olivaceapinii* y *Pesotum* el fragmento fue de 700 pb, *O. nigrocarpum* de 800 pb y *O. angusticollis* un fragmento de 750 pb (Figura 6).

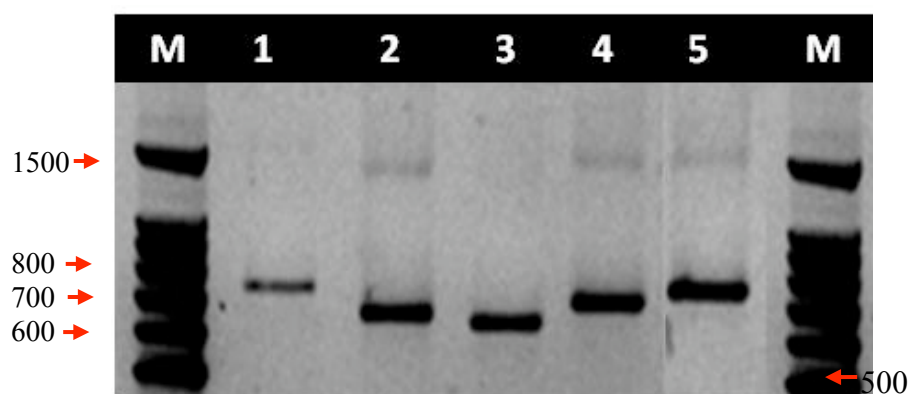


Figura 5. Digestión del ADN con la enzima *Hind*III amplificado con el par de primers ITS1-F e ITS4 de cinco hongos ophiostomatoides en un gel de agarosa al 2%. 1: *Leptographium guttulatum*, 2: *Ophiostoma olivaceapinii*, 3: *Pesotum* sp., 4: *O. nigrocarpum* y 5: *O. angusticollis*. M: marcador molecular de 100 pb (Promega).

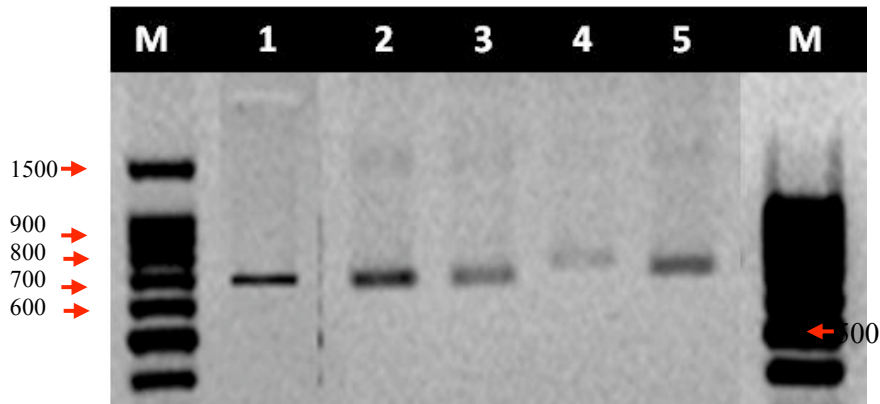


Figura 6. Digestión del ADN con la enzima *KpnI* amplificado con el par de primers ITS1-F e ITS4 de cinco hongos ophiostomatoideos en un gel de agarosa al 2%. 1: *Leptographium guttulatum*, 2: *Ophiostoma olivaceapinii*, 3: *Pesotum* sp., 4: *O. nigrocarpum* y 5: *O. angusticollis*. M: marcador molecular de 100 pb (Promega)

## CONCLUSIONES

Se identificaron los hongos *Leptographium guttulatum*, *O. angusticollis*, *O. olivaceapinii*, *Ophiostoma nigrocarpum* y *Pesotum* sp. asociados a galerías del insecto descortezador *Dendroctonus adjunctus* en el pino de las alturas. La identificación morfológica se corroboró molecularmente y sus secuencias fueron registradas en el banco de genes del NCBI. Las cuatro especies y la no identificada del género *Pesotum* se pueden considerar como patógenos débiles. Estadísticamente se comprobó, con el análisis de máxima verosimilitud y la razón de momios que existe una mayor probabilidad de que no se muera la planta por la presencia del hongo. Las enzimas *HindIII* y *KpnI* se detectaron poca variación para la separación de las especies *Ophiostoma* y el género *Pesotum*. Por lo tanto, es necesario utilizar otras técnicas moleculares que nos ayuden a diferenciar las especies.

## LITERATURA CITADA

- Aghayeva, D.N., Z.W. De Beer, T. Kirisitis, 2004. Two new *Ophiostoma* species with *Sporothrix* anamorphs from Austria and Azerbaijan. *Mycologia* 96:866-828.
- Barnett, H.L., B.B. Hunter, 2006. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth edition. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota. USA. 218 p.
- Barras, S.J., T. Perry, 1971. Gland cells and fungi associated with prothoracic mycangium of *Dendroctonus adjunctus* (Coleoptera: Scolytidae). *Annals Entomological Society of America* 64:123-126.
- Cibrián T. D., D. A. Rosales, S.E.G. Díaz, 2007. Enfermedades forestales en México/Forest diseases in Mexico. Universidad Autónoma Chapingo; CONAFOR-SEMARNAT, México; Forest Service USDA, EUA; NRCAN Forest Service, Canadá y Comisión Forestal de América del Norte, COFAN, FAO. Chapingo, México. 587 p.
- Croisé, L., F. Lieutier, H. Cochard, E. Dreyer, 2001. Effect of drought stress and high density stem inoculations with *Leptographium wingfieldii* on hydraulic properties of young Scots pine trees. *Tree Physiology* 21:427-436.
- De Beer, Z.W., T.C. Harrington, H.F. Vismer, B.D. Wingfield, M.J. Wingfield, 2003. Phylogeny of the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia* 95:434-441.
- Díaz, C., R. Ahumada, G. Cuevas, M. Beeche, 2008. Estudio de Patogenicidad de *Ophiostoma galeiformis* (Bakshi) Mathiesen-Käärik, *Ophiostoma huntii* (Robinso-jeffrey) de Hoog & Scheffer, y *Ophiostoma quercus* (Georgevitch) Nannfeldt (Ophiostomatales: Ophiostomataceae), sobre plantas de *Pinus radiata* D. Don en Chile. División Protección Fitosanitaria. Ministerio de Agricultura de Chile (SAG). Santiago, Chile. 6 p.

- Eckhardt, L.G., J.P. Jones, K.D. Klepzig, 2004. Pathogenicity of *Leptographium* species associated with loblolly pine decline. *Plant Disease* 88:1174-1178.
- Harrington, T.C., 1988. *Leptographium* species, their distributions, hosts and insect vectors. *In:* Harrington, T.C., F.W. Cobb (eds.), *Leptographium* root diseases on conifers. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minn. pp. 1-39.
- Hausner, G., J. Reid, G.R. Klassen, 1993. Grouping of isolates and species of *Ceratocystis sensu lato* on the basis of molecular and morphological characters. *In:* Wingfield, M.J., K.A. Seifert, J.F. Webber (eds.), *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, ecology and pathogenicity. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota. pp 93-104.
- Jacobs, K., M.J. Wingfield, 2001a. *Leptographium* species. Tree pathogens, insect associates, and agents of blue-stain. The American phytopathological society. St. Paul, Minnesota. 207 p.
- Jacobs, K., M.J. Wingfield, C. Coetsee, T. Kirisitis, 2001. *Leptographium guttulatum* sp. nov., a new species from spruce and pine in Europe. *Mycologia* 93:380-388.
- Kile, G.A, 1993. Plant diseases caused by species of *Ceratocystis sensu stricto* and *Chalara*. *In:* Wingfield, M.J., K.A. Seifert, J.F. Webber (eds.), *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, ecology and pathogenicity. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota. pp 173-184.
- Malloch, D., Blackwell, M, 1993. Dispersal biology of the ophiostomatoid fungi. *In:* Wingfield, M.J., K.A. Seifert, J.F. Webber (eds.), *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, ecology and pathogenicity. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota. pp 173-184.

- Marmolejo, J.G., H. Butin, 1993. Las especies de *Ophiostoma* y *Ceratocystiopsis* (Ascomycetes, Microascales) conocidas de Nuevo León, México. Reporte científico especial No. 13. Facultad de ciencias forestales. Linares, Nuevo León, México. pp. 155-170.
- Marmolejo, J.G., 1991. El manchado azul de la Madera en Nuevo León. Reporte científico No. 27. Facultad de ciencias forestales. Linares, Nuevo León, México 59 p.
- Mouton, M., M.J. Wingfield, P.S. Van-Wyk, 1993. Conidium development in the synnematous anamorphs of *Ophiostoma*. Mycotaxon XLVI:371-379.
- Olchowecki, A., J. Reid, 1974. Taxonomy of the genus *Ceratocystis* in Manitoba. Canadian Journal Botánica 54:1675-1711.
- Owen, D.R., K.Q. Lindahl, D.L. Wood, J.R. Parmeter, 1987. Pathogenicity of fungi isolated from *Dendroctonus valens*, *D. brevicomis*, and *D. ponderosae* to Ponderosa Pine Seedlings. Phytopathology 77:631-636.
- Paine, T.D., K.F. Raffa, T.C. Harrington, 1997. Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. Annual Review Entomology 42:179-206.
- Parmeter, J.R., G.W. Staughter, Mo-Mei Chen, D.L. Wood, H.A. Stubbs, 1989. Phytopathology 79:768-722.
- Popp, M.P., D.J. Johnson, M.S. Lesney, 1995. Characterization of the induced response of slash pine to inoculation with bark beetle vectored fungi. Tree Physiology 15:619-623.
- Sambrook, J., D.W. Russell, 2001. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Third edition. 1:1.32-1.34. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Six, D., T.D. Paine, 1996. *Leptographium pyrinum* is a mycangial fungus of *Dendroctonus adjunctus*. Mycologia 88:739-744.

- Schroeder, S., S.H. Kim, W.T. Cheung, K. Sterfing, 2001. Phylogenetic relationship of *Ophiostoma piliferum* to other sapstain fungi based on the nuclear rRNA gene. FEMS Microbiology Letter 195:163-167.
- Seifert, K.A., 1993. Sapstain of commercial lumber by species of *Ophiostoma* and *Ceratocystis*. In: M.J. Wingfield, K.A. Seifert, J.F. Webber (eds.), *Ceratocystis* and *Ophiostoma*. Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota. pp 141-151.
- Upadhyay, H.P., 1993. Classification of the ophiostomatoid fungi. In: Wingfield, M.J., K.A. Seifert, J.F. Webber (eds.), *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, ecology and pathogenicity. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota. pp 7-13.
- Upadhyay, H.P., 1981. A monograph of *Ceratocystis* and *Ceratocystiopsis*. University of Georgia Press. Athens. Georgia. 176 p.
- Villarreal, M., V. Rubio, M.T. De Troya, F. Arenal, 2005. A new *Ophiostoma* species isolated from *Pinus pinaster* in the Iberian Peninsula 92:259-268.
- Wilhelm, De B.Z., T.C. Harrington, H.F. Visser, 2003. Phylogeny of the *Ophiostoma stenoceras*–*Sporothrix schenckii* complex. Mycologia 95: 434-441.
- Wingfield, B.D., W.S. Grant, J.F. Wolfaardt, M.J. Wingfield, 1994. Ribosomal RNA sequence phylogeny is not congruent with ascospore morphology among species in *Ceratocystis sensu stricto*. Molecular Biology and Evolution. 11:376-383.
- Wingfield, M.J., 1987. Fungi Associated with the Pine Wood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, and Cerambycid Beetles. Mycologia 79: 325-328.



- Wingfield, M.J., 1993. *Leptographium* species as anamorphs of *Ophiostoma*: progress in establishing acceptable generic and species concepts. *In*: Wingfield, M.J., K.A. Seifert, J.F. Webber (eds.), *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, ecology and pathogenicity. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota. pp 43-51.
- Wingfield, M.J., P.S. Knox-Davies, 1980. Root disease, associated with *Verrucicladiella alacris*, of pines in South Africa. *Plant Disease* 64:569-571.
- Wingfield, M.J., P.S. Vanwik, W.F.O. Marasas, 1988. *Ceratocystis protea* sp. Nov., with a new anamorph genus. *Mycologia* 80:23-30.
- Zhou, X.D., W.Z. De Beer, B.D. Wingfield, M.J. Wingfield, 2001. Ophiostomatoid fungi associated with three pine-infesting bark beetles in South Africa. *Sydowia* 53:290-300.
- Zhou, X.D., Z.W. De Beer, D.C. Tovar, B.D. Wingfield, M.J. Wingfield, 2004. Characterisation of *Ophiostoma* species associated with pine bark beetles from Mexico, including *O. pulvinisporum* sp. nov. *Mycological Research* 108:690-698.
- Zhou, X., W. De Beer, B.D. Wingfield, M.J. Wingfield, 2002. Infection sequence and pathogenicity of *Ophiostoma ips*, *Leptographium serpens* and *L. lundbergii* to pines in South Africa. *Fungal Diversity* 10: 229-240

CAPITULO III. HISTOPATOLOGÍA DEL PINO DE LAS ALTURAS (*Pinus hartwegii* Lindl.) INOCULADO CON TRES HONGOS OPHIOSTOMATOIDES

OMAR ALEJANDRO PÉREZ VERA, Dr.  
COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2009

RESUMEN

El principal objetivo de este estudio fue identificar las alteraciones histológicas en el pino de las alturas (*Pinus hartwegii*) causadas por tres especies de hongos ophiostomatoides por medio de microscopia de luz. En *Pinus hartwegii* hubo acumulación de resina en la zona de inoculación a los 10 días y el follaje se torno amarillo a café rojizo a los 60 días. En las inoculaciones con *Leptographium guttulatum* y *Ophiostoma olivaceapinii* se observó que inducen la metabolización de polifenoles depositándose en las paredes de las células de la corteza, el floema, cambium vascular y médula se necrosaron. *O. ips* causó necrosis más severa en corteza, floema, cambium vascular y médula. En xilema, las hifas de los tres hongos penetran en las traqueidas y avanza longitudinalmente por las puntuaciones aereoladas y se distribuyen radialmente por células parenquimatosas y radios

Palabras clave: manchado azul, galerías, insecto, cambios estructurales.

CHAPTER III. HISTOPATHOLOGY OF HARTWEG PINE (*Pinus hartwegii* Lindl.)  
INNOCULATED WITH THREE OPHIOSTOMATIOD FUNGI

OMAR ALEJANDRO PEREZ VERA, Dr.  
COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2009

ABSTRACT

The goal of this study was to identify the histological alterations in hartweg pine (*Pinus hartwegii*) caused by tree species of ophiostomatiod fungi by light microscopy. There was an accumulation of resin in the inoculated zone within 10 days, and foliage of inoculated seedlings turned yellow and reddish-brown at 60 days. With inoculation of *Leptographium guttulatum* and *Ophiostoma olivaceapinii*, there was a deposition of polyphenols on the cell walls of the innerbark (phloem), and the innerbark, vascular cambium, and pith became necrotic. Compared to *L. guttulatum* and *O. olivaceapini*, *O. ips* caused a more severe necrosis of the innerbark, cambium, and pith. In the xylem of inoculated seedlings, the hyphae of the three different fungi penetrated into the tracheids and moved through the bordered pits and radially through the parenchyma cells in the rays.

**Keywords:** blue-stain, galleries, insect, structural changes.

## INTRODUCCIÓN

El género *Ophiostoma* H. & P. Sydow causa el manchado azul de la madera y produce pérdidas económicas importantes en bosques de coníferas (Gibbs, 1993). El hongo se dispersa por insectos descortezadores (Coleóptera: Curculionidea, Scolytidae) que dañan floema y cambium vascular de coníferas (Farrell *et al.*, 2001), *Dendroctonus adjunctus* es el principal descortezador plaga de coníferas en México y transporta esporas de *Ophiostoma* spp., en los micangios, la hembra de *D. adjunctus* dispersa las esporas por las galerías sinuosas que produce en el fuste del árbol y contribuye de manera importante a la muerte del árbol en menos de un año por el bloqueo del transporte de sustancias por los sistemas de conducción (Cibrián, 1995). Se ha reportado cerca de 15, 000 ha atacadas por diferentes especies de descortezadores, de estas tres, 902.82 ha por *D. adjunctus* atacando a 16 especies de pino, entre estos el pino de las alturas *Pinus hartwegii* (CONAFOR, 2007; Cibrián, 1995).

En México se han reportado 17 hongos ophiostomatoides pertenecientes a los órdenes Ophiostomatales y Microascales en coníferas y latifoliadas (Marmolejo y Butin, 1993; Zhou *et al.*, 2004; Cibrián *et al.*, 2007). Se han realizado pruebas de patogenicidad con *O. ips* en *P. radiata* y *P. elliotii* (Zhou *et al.*, 2001), *O. minus* en *Pinus elliotii* (Popp *et al.*, 1995). En *Pinus ponderosa* con *Geratocystis minor*, *C. clavigera* y *Leptographium terebrantis* (Harrington y Cobb, 1983; Paine, 1984; Owen *et al.*, 1987). Harrington (1993) reporta a *Leptographium wagneri* como uno de los que causan la enfermedad de la mancha negra de la raíz en coníferas y *L. calophylli* causante de una marchitez en *Calophyllum inophyllum*, ambos considerados como patógenos. Algunas especies no se ha definido su patogenicidad como *Leptographium serpens*, *L. terebrantis*, *L. lundbergii*, *L. procerum* en *Pinus* sp, pero pueden llegar a causar lesiones en el floema y matar los árboles con inoculaciones artificiales (Eckhardt *et al.*, 2004; Wingfield *et al.*,

1988). Únicamente se han observado cambios histológicos inducidos por *Ophiostoma ulmi* en *Ulmus americana*, *Prunus pensylvanica* y *Populus balsamifera* (Rioux y Quелlette, 1989, 1991). Para el caso de México la información de las enfermedades forestales es escasa y los daños causados por este grupo de hongos manchadores es nula. El objetivo principal de este estudio fue identificar las alteraciones histológicas en el pino de la altura *Pinus hartwegii* causadas por tres especies de hongos ophiostomatoideos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta, aislamientos e identificación de los hongos

42 muestras de corteza de *Pinus hartwegii* y 35 insectos de *Dendroctonus adjunctus* fueron obtenidos de la Estación Forestal Experimental Zoquiapan (EFEZ) de la Universidad Autónoma Chapingo, en Zoquiapan, Estado de México. Geográficamente el lugar se encuentra al Noroeste del Iztaccíhuatl en la parte Sureste 19°12'30'' y 19° 20'00'' de latitud N y los meridianos 98°42'30'' y 98°30'00'' de longitud W; 3, 000 msnm; clima templado subhúmedo, temperatura media anual de 11.1 °C y una precipitación pluvial de 200 mm (Blanco *et al.*, 1981). Cada una de las muestras de corteza se observaron bajo un estereomicroscopio (Lieder MZ-760X). Masas de conidias y ascosporas acumuladas en los conidióforos y ápices de los peritecios fueron colectados con una aguja de disección estéril y cultivados en extracto-malta-agar al 2% (EMA) adicionado con 0.1 g de cicloheximida y 0.02 g de sulfato de estreptomicina. Los 35 insectos fueron colectados de galerías de los árboles y colocados directamente en EMA al 2% adicionado con antibióticos. Todas las cajas de Petri con medio de cultivo se incubaron a 25±1 °C a luz natural durante 15 días. Cada aislamiento se purificó en EMA al 2%. La identificación se hizo mediante morfología y características moleculares amplificando la región intergénica (ITS)

de los genes ribosomales ADNr mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Cada uno de los aislamientos se preservó en tubos inclinados de EMA al 2% y se cubrieron con aceite mineral estéril conservándose en el laboratorio de Patología Forestal del instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco.

### Material vegetal e inóculo

El material vegetal consistió de 42 árboles de *Pinus hartwegii* de 3 años de edad y de una altura promedio de 30 cm, crecidos en bolsas de polietileno de 8 x 20 cm, obtenidos de la EFEZ y trasladados a invernaderos de la División de Ciencias Forestales (DICIFO) de la Universidad Autónoma Chapingo y mantenidos durante 30 días y a una temperatura de  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$  como un periodo de acondicionamiento previo a la inoculación.

Se obtuvieron veinte aislamientos puros para inocular: 10 *Ophiostoma ips* (ZOQ1, ZOQ3, ZOQ4, ZOQ7, ZOQ10, ZOQ11, ZOQ14, ZOQ18, ZOQ19 y ZOQ20), dos de *Leptographium guttulatum* (ZOQ2 y ZOQ8), tres *Ophiostoma olivaceapinii* (ZOQ5, ZOQ15, ZOQ17), tres *Ophiostoma angusticollis* (ZOQ9, ZOQ13, ZOQ16), uno de *Ophiostoma nigrocarpum* (ZOQ12) y uno *Pesotum* sp. (ZOQ6). Los aislamientos ZOQ18, ZOQ19 y ZOQ20 provienen del cuerpo del insecto *Dendroctonus adjunctus* y el resto de galerías de *Pinus hartwegii*.

### Inoculación de plantas

En total se inocularon cuarenta árboles (20 tratamientos) y 2 testigos sin inoculación. Dos árboles fueron inoculados para cada aislamiento. La zona de inoculación se ubicó a los 5 cm de altura de la base del tallo de *Pinus hartwegii*, el área de 1 cm de longitud se desinfectó con alcohol al 70% y se lavo con agua destilada 3 veces. Posteriormente con ayuda de un bisturí se

hizo una herida de 0.5 cm<sup>2</sup> levantando la corteza y se depositó un disco de medio de cultivo con el crecimiento del hongo. El disco se cubrió con la corteza, y ésta quedó sellada con algodón humedecido estéril, gasa estéril y Parafilm. La humedad del algodón se mantuvo por inyecciones cada cinco días con agua estéril dentro de las zonas selladas. Estas zonas se descubrieron cada tercer día para observar las reacciones del hospedante. Todos los árboles se mantuvieron en condiciones de alta humedad relativa cubriéndolas con bolsas de polietileno durante 24 h, la humedad del suelo se mantuvo con riegos cada 6 días durante dos meses y las condiciones de temperatura antes mencionada.

#### Preparación de las muestras para microscopia de luz

Con el fin de conocer los daños ocasionados por los hongos inoculados en los árboles se tomó de cada árbol tres secciones de tallo de 5 mm de longitud aproximadamente en parte alta, media y baja de la zona de inoculación a los 60 días. Las muestras se fijaron en una solución Craf III durante 48 h. Todas las muestras se lavaron tres veces con agua corriente durante 5 minutos, se deshidrataron gradualmente en soluciones de alcohol de 50, 70, 96, 100% y etanol absoluto-xileno (1:1) tres cambios de xileno y 2 cambios de Paraplast (Sigma Chemical Co.) por tres horas en cada solución en un cambiador automático de tejidos Tissue-Tek® (Sakura Fingtechnical Co., mod. 4640-B). De cada muestra se obtuvieron tres bloques de parafina. Se hicieron cortes en serie de 10 µm de grosor, tanto longitudinales como transversales en un micrótopo de rotación (American Optical Company, mod. Spencer 820), los cortes se pegaron a portaobjetos, colocándolos previamente en un baño de flotación con agua a una temperatura de 60 °C más grenetina (Johansen, 1940).

## Tinción

Para teñir los cortes, se utilizó la tinción diferencial safranina verde rápido (Johansen, 1940), para lo cual se eliminó primero el paraplast mediante 3 cambios de xileno y se hidrataron en una serie gradual de alcohol etílico 100, 96, 70 y 50%. Posteriormente se tiñó con safranina al 1% en alcohol etílico al 50%, se lavaron en una serie ascendente de alcohol etílico al 50, 70 y 96%, después se aplicó 2 a 3 gotas de verde rápido al 1% en alcohol etílico al 96%, por 45 seg se decantó el sobrenadante y se lavó con alcohol etílico al 96 y 100% y 3 cambios de xileno. Finalmente se montaron con resina sintética entre porta y cubreobjetos para su observación y se tomó fotomicrografías de las preparaciones en un microscopio de luz Romano III (Carl Zeiss®) con una cámara digital Paxcam 3.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Anatomía del tallo sano de *Pinus hartwegii*

En plantas testigo no inoculadas, se observó la peridermis conformada por una capa de células lignificadas externa y debajo de esta de dos a cuatro capas de células con polifenoles castaños densos y capas de células largas con polifenoles granulosos rojizos con paredes lignificadas. La corteza estuvo compuesta por células parenquimatosas conteniendo polifenoles guindas granulosos o rojizos, amarillos granulosos y densos. Además, presentó canales resiníferos constituidos por células epiteliales con paredes delgadas y células de la vaina con paredes relativamente gruesas, ambas células sin lignificar. Estas células de la vaina llenas con polifenoles rojizos, a veces hasta las células epiteliales los contienen. Algunas células de parénquima con escasos granos de almidón (Fig. 1A). El floema axial se presenta células del parénquima con polifenoles amarillos granulosos y las células del parénquima radial con



abundantes gránulos de almidón (Fig. 1B). Limitando el floema del xilema está el cambium a veces éste se observo con sus células pequeñas y alineadas uniformemente (Fig. 1B). El xilema constituido por traqueidas con punteaduras aeroladas en sección radial, radios uniseriados, canales resiníferos verticales y horizontales con la capa de células parenquimatosas epiteliales y las células de la vaina y, por lo regular cercanos a los radios. Ningún tipo de células del xilema contiene polifenoles (Fig. 1B y C). La médula posee sus células con polifenoles del mismo color y apariencia que los de la corteza (Fig. C). Las características coincidieron parcialmente con la descripción de Fahn (1974) y Esau (1977), la diferencia puede ser por la edad del árbol.

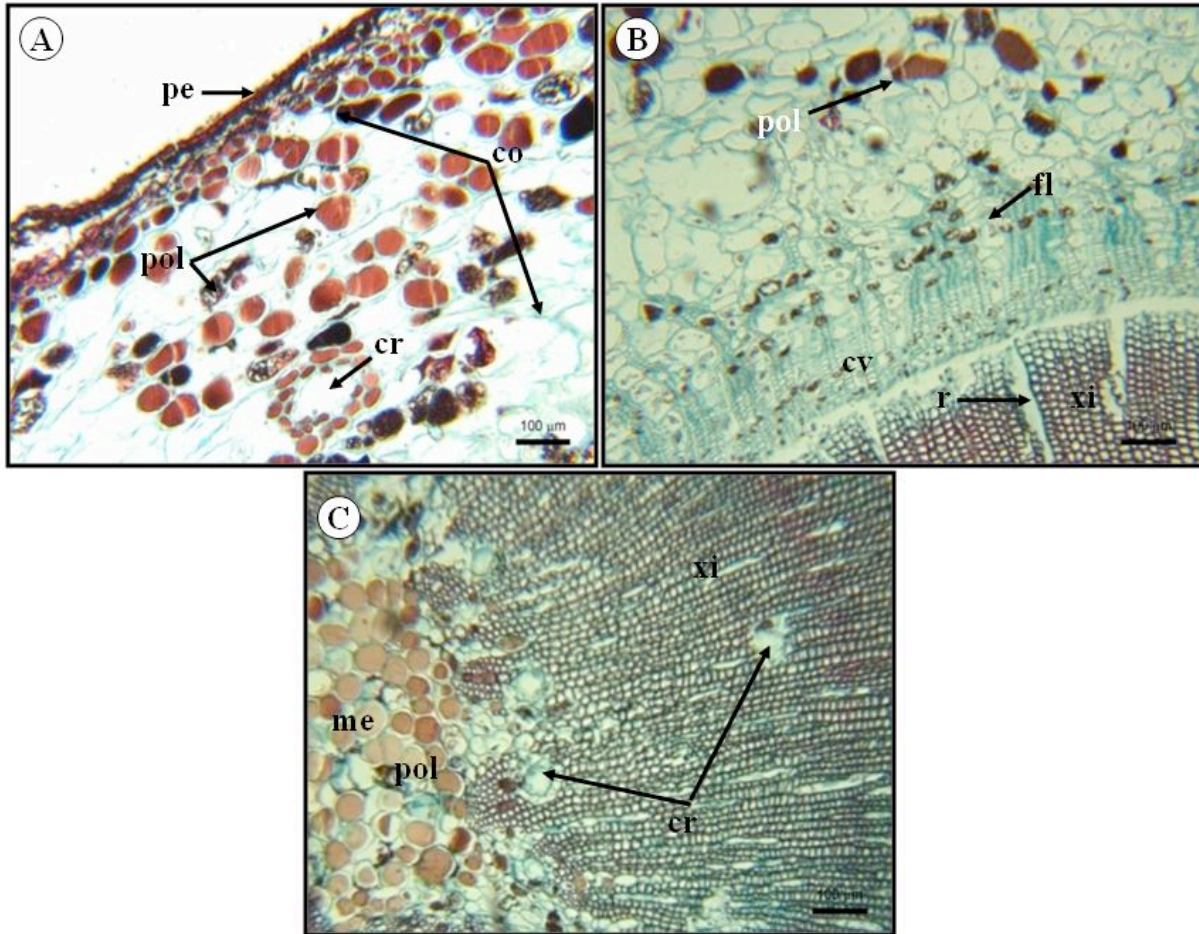


Figura 1. Fotomicrografías al microscopio de luz de cortes transversales de tallo sano de pino (*Pinus hartwegii*). A) Observe la peridermis (pe), corteza (co) y canales resiníferos (cr) conteniendo polifenoles (pol). B) Floema (fl) y cambium vascular (cv) con polifenoles, xilema (xi), rayos (r). C) Xilema (xi) con canales resiníferos, radios y médula (me) con polifenoles.

#### Anatomía del tallo inoculado de *P. hartwegii*

De los 20 aislamientos inoculados, solo tres fueron los que presentaron síntomas a nivel de follaje y causaron alteraciones estructurales en *Pinus hartwegii*, estos fueron: *Ophiostoma ips* (ZOQ19), *Leptographium guttulatum* (ZOQ2) y *Ophiostoma olivaceapinii* (ZOQ5). Los 17 aislamientos restantes no causaron ningún síntoma externo a nivel de follaje y únicamente la formación de un pequeño callo alrededor de la zona de inoculación. La primera reacción fue la acumulación de resina en la zona de inoculación a los 10 ddi en *Pinus hartwegii*, lo que coincidió

con Zhou *et al.* (2002) quienes reportan en la zona de inoculación la presencia de resina en *Pinus radiata* y *P. elliotii* al ser inoculados con *Ophiostoma ips*, *Leptographium lundbergii* y *L. serpens*. De forma similar se observó en *P. taeda* inoculado con *Ophiostoma minus* (Tisdale *et al.*, 2003). La formación de callo alrededor de la zona de inoculación en *Pinus hartwegii* se presenta como una primera medida de defensa al daño por los hongos inoculados (Klepzig y Walkinshaw, 2003). Además, hubo clorosis del follaje en la zona cercana de inoculación y tornándose el follaje amarillo, café cremoso a rojiza a los 15 ddi. Los síntomas más severos los causó *Ophiostoma ips* seguido por *Leptographium guttulatum* y *Ophiostoma olivaceapinii*; a los treinta días, el follaje fue de color amarillento y a los 60 días la mayor parte del follaje en la rama inoculada se torno café cremoso a rojizo (Figs. 2A, B y C), esto coincide con Lee *et al.* (2006) quienes observaron clorosis en *Pinus contorta* var. *latifolia* a los 9 meses de haber sido inoculado con *L. longiclavatum* y *O. clavigerum*. En el caso de *Pinus sylvestris* de 25 años de edad, el follaje se torno verde amarillento a amarillo a los tres meses después de la inoculación (Fernández *et al.*, 2004). Cibrián (1995) menciona que el cambio de coloración del follaje es resultado del ataque del insecto descortezador asociado con hongos manchadores que colonizan su hospedante. Dichas aseveración se corroboran en este estudio. Además puede influir la técnica de inoculación, cantidad de inóculo y el estado fisiológico del árbol para que el árbol sea fácilmente colonizado (Klepzig *et al.*, 2005).

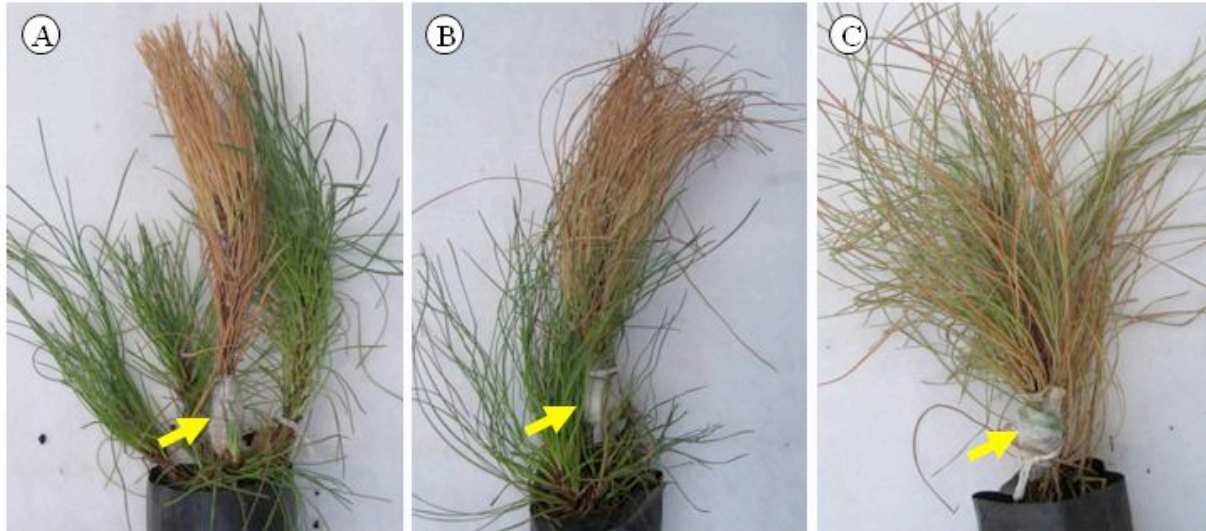


Figura 2. Plantas inoculadas de *Pinus hartwegii* mostrando los síntomas que indujeron los hongos ophiostomatoides aislados de galerías y del cuerpo del insecto descortezador *Dendroctonus adjunctus* a los 60 ddi (zona de inoculación como lo indica la flecha). A) *Leptographium guttulatum*. B) *Ophiostoma olivaceapinii*. C) *Ophiostoma ips*.

El manchado oscuro del floema y xilema en *Pinus hartwegii* que se observa macroscópicamente es causada por la melanina del hongo (polímero 1,8 dihidroxi-naphthaleno) o el ácido 2,3-dihidroxibenzoico y ceratenolone combinado con hierro (Seifert, 1993; Cibrián *et al.*, 2007). Sin embargo, se puede inferir que también es por la metabolización de los polifenoles que normalmente contienen las células que conforman estos tejidos. En la zona de inoculación las ramas de *Pinus hartwegii* presentaron lesiones necróticas de 0.8 a 10 mm de longitud, esto dependiendo del aislamiento y en el interior del xilema una coloración café claro a café oscuro. De acuerdo con Zhou *et al.* (2002), mencionan a *Leptographium lundbergii*, *L. serpens* y *Ophiostoma ips* causan lesiones de 29.3, 27.8 y 33.3 mm respectivamente en *Pinus caribaea*, *P. elliotii* y *P. radiata* de dos años de edad en Sudáfrica sin presentar síntomas a nivel de follaje. Las lesiones necróticas alrededor de la zona de inoculación son el resultado de flujo de resina y la

acumulación de compuestos fenólicos para prevenir el avance del hongo hacia el interior de los tejidos (Solheim, 1993)

En la zona de inoculación (parte alta) con *Ophiostoma olivaceapinii*, las células de la peridermis que contenían polifenoles en su citoplasma, éstos se metabolizaron e impregnaron las paredes (Figura 3A). Los polifenoles de las células de la corteza de igual manera se metabolizaron e impregnaron las paredes, ya no se observaron polifenoles granulosos ni densos, posteriormente las células se colapsaron, perdieron su forma y sus paredes sufrieron rompimientos, algunas se hipertrofiaron. El floema y cambium fueron los más dañados se observaron completamente colapsado sus componentes celulares y en ocasiones necrosados (Figura 3A y B). El xilema aparentemente no sufre daños excepto los radios y canales resiníferos donde hubo colapso de células por presencia de hifas del hongo (Figura 3B). Las paredes de las células de la médula se observaron rotas e invadidas por el hongo (Figura 3C). Esto coincide con Forde (1995) quien reporta a la especie *Ophiostoma piliferum* creciendo en células parenquimatosas, ricas en azúcares, triglicéridos y ácidos grasos. En la parte media y baja de inoculación se observó también impregnación de polifenoles y colapso o desorganización celular. En las tres partes de la zona inoculada debido a la fragilidad de las paredes del floema y del cambium, estos dos tejidos en ocasiones se observa como si estuvieran macerados o con grandes cavidades por la desintegración de las células. En cortes tangenciales, no se observó la forma de penetración y avance de *Ophiostoma olivaceapinii* en el xilema. Sin embargo, los hongos ophiostomatoides invaden las traqueidas a través de las puntuaciones y canales resiníferos distribuyéndose longitudinalmente y radialmente por células parenquimatosas de la corteza, floema, cambium y radios del xilema (Seifert, 1993; Gibbs, 1993).

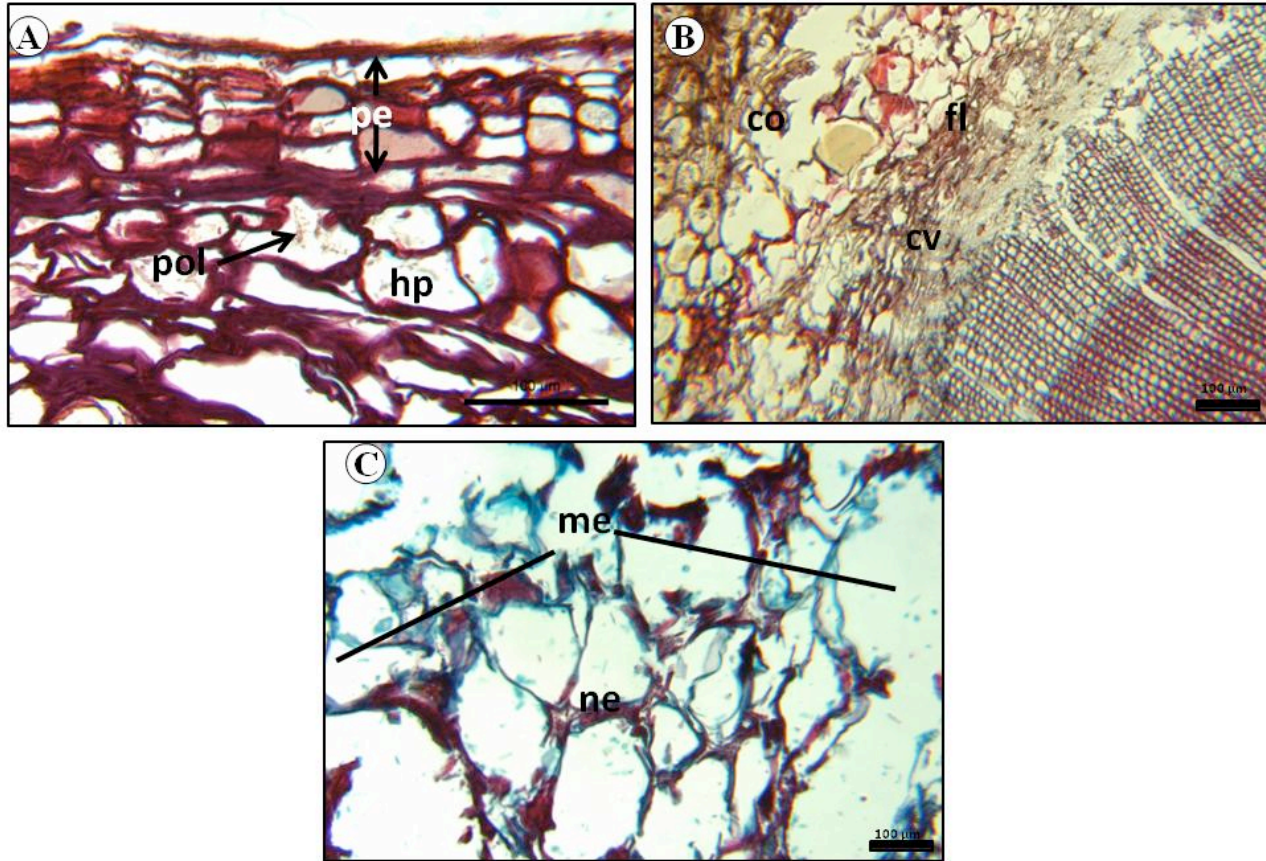


Figura 3. Fotomicrografías de las alteraciones de los tejidos del tallo del pino de las alturas (*Pinus hartwegii*) inoculado (parte alta) con *Ophiostoma olivaceapinii* a los 60 días. A) Colapso de células e hipertrofia (hp) y degradación de polifenoles de color rojo en la corteza y la peridermis (pe). B) Colapso en floema (fl) y cambium vascular (cv). C) Necrosis en médula (me) con presencia de micelio entre las células y no se observan polifenoles.

En los cortes de la parte alta del tallo de *Pinus hartwegii* con *Leptographium guttulatum* se observó que los daños ocasionados en corteza, floema y cambium vascular fueron los mismos que *Ophiostoma olivaceapinii* (Figura 4A y B) excepto los canales resiníferos, éstos sufren necrosis en las células epiteliales, las células de la vaina están totalmente invadidas por hifas café oscuro del hongo (Figura 4B). En el xilema se nota que la infección se mueve radialmente a través de los radios unicelulares, y alcanza los canales resiníferos presentando necrosis (Figura 4B y C). El hongo se observó que penetra por las puntuaciones y avanza longitudinalmente por

traqueidas, principalmente las cercanas a los radios, esto concuerda con Harrington y Cobb (1983) quienes reportan el avance de *Leptographium* en traqueidas y radios. En la parte media parece que el daño sólo fue en la zona de inoculación y no abarcó toda la circunferencia del tallo, y se observó impregnación de polifenoles y colapso o desorganización. En la parte baja los daños fueron similares que en la parte alta y únicamente la medula estuvo más desintegrada (necrosada) y con hifas del hongo (Figura 4C). En un corte transversal del tallo inoculado se observó macroscópicamente una coloración café oscuro en la corteza, floema y xilema, lo que coincide con Jacobs y Wingfield (2001) y Jacobs *et al.* (2001) quienes reportan a *L. guttulatum* causando un machado de la madera de *Picea abies* y *Pinus sylvestris*. En este estudio, se observó alteraciones en los tejidos de *Pinus hartwegii* de tres años de edad causado por *L. guttulatum*, aunque estos hongos no alteran las propiedades mecánicas en la madera, pero pueden influir en la pérdida de peso al consumir carbohidratos, ácidos grasos y triglicéridos (Cibrián *et al.*, 2007). Se reporta *L. wagneri* con sus tres variedades como patógenos verdaderos por causar la pudrición negra de la raíces de *Pinus* en los Estados Unidos de América (Jacobs y Wingfield, 2001).

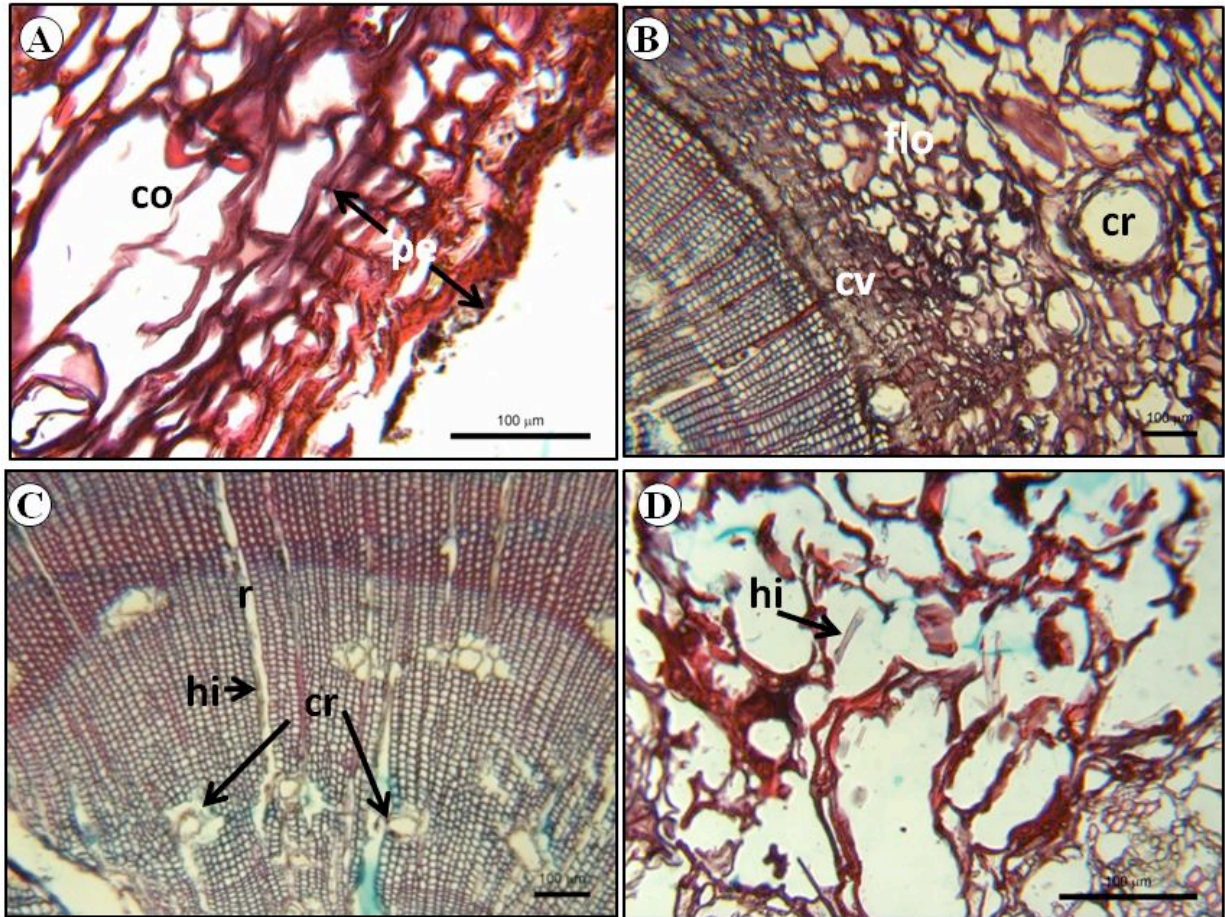


Figura 4. Fotomicrografías de las alteraciones de los tejidos del tallo del pino de las alturas (*Pinus hartwegii*) inoculado con *Leptographium guttulatum* a los 60 días. A) Necrosis e hipertrofia de células de la corteza (co). B) Colapso celular en floema (flo), cambium vascular (cv) y los canales resiníferos (cr) de la corteza invadidos con hifas del hongo (hi). C) Radios (r) y canales resiníferos (cr) del xilema invadidos por hifas del hongo. D) Necrosis en médula (me) e hifas del hongo (hi).

Las alteraciones causadas por *Ophiostoma ips*, obtenido del cuerpo del insecto se observó en la zona alta, media y baja de la corteza, floema y cambium; todos bastante colapsados y necrosados sin embargo aún se pudo ver el hongo (Figura 5A, B). El xilema poco lignificado, radios y canales resiníferos con necrosis y con el hongo (Figura 5C). Ligera presencia de polifenoles en radios y células del parénquima que rodean a los canales



resiníferos. La medula necrosada y las paredes de las células rojizas con micelio del hongo (Figura 5D). En Sudáfrica se reporta a *O. ips* en *Pinus caribaea*, *P. elliottii*, *P. radiata* de dos años de edad causando lesiones de 30 mm sin presentar síntomas externos a nivel de follaje (Zhou *et al.*, 2002), la mayoría de las especies de *Ophiostoma* causan un manchado de la madera recién cortada (Seifert, 1993). Las especies reportadas de este género que causan enfermedad es *O. ulmi* (Buisson) Nannf. y *O. novo-ulmi* Brasier con dos subespecies, *O. novo-ulmi* subsp. Americana y *O. novo-ulmi* subsp. *novo ulmi* en *Ulmus americana* causando la enfermedad del olmo holandés (Brasier and Kirk 2001). Los cambios histológicos observados en *Ulmus americana* fue la formación de estructuras alveolares, tilides, geles y zonas de barreras, algunas células exhiben autoflorescencia amarilla alrededor de los vasos del xilema que impide el avance del hongo (Et-Touil, *et al.*, 2005). En *Prunus pensylvanica* hay formación de burbujas en los miembros del vaso del xilema a los tres días después de la inoculación y la formación de geles después de cinco días (Rioux y Quелlette, 1989; 1991). En *Populus balsamífera* hay formación de tilides a los ocho días después de la inoculación y acumulación de compuestos fenólicos en las células del parénquima (Rioux y Quелlette, 1991). En el caso de *Ophiostoma ips* se considera un patógeno débil como *O. minus*, *Leptographium terebrantis* y *L. wingfieldii* que pueden llegar a causar alguna lesión sobre el floema o pueden llegar a matar el árbol cuando son inoculadas en masa (Zhou *et al.*, 2002; Wingfield, 1986).

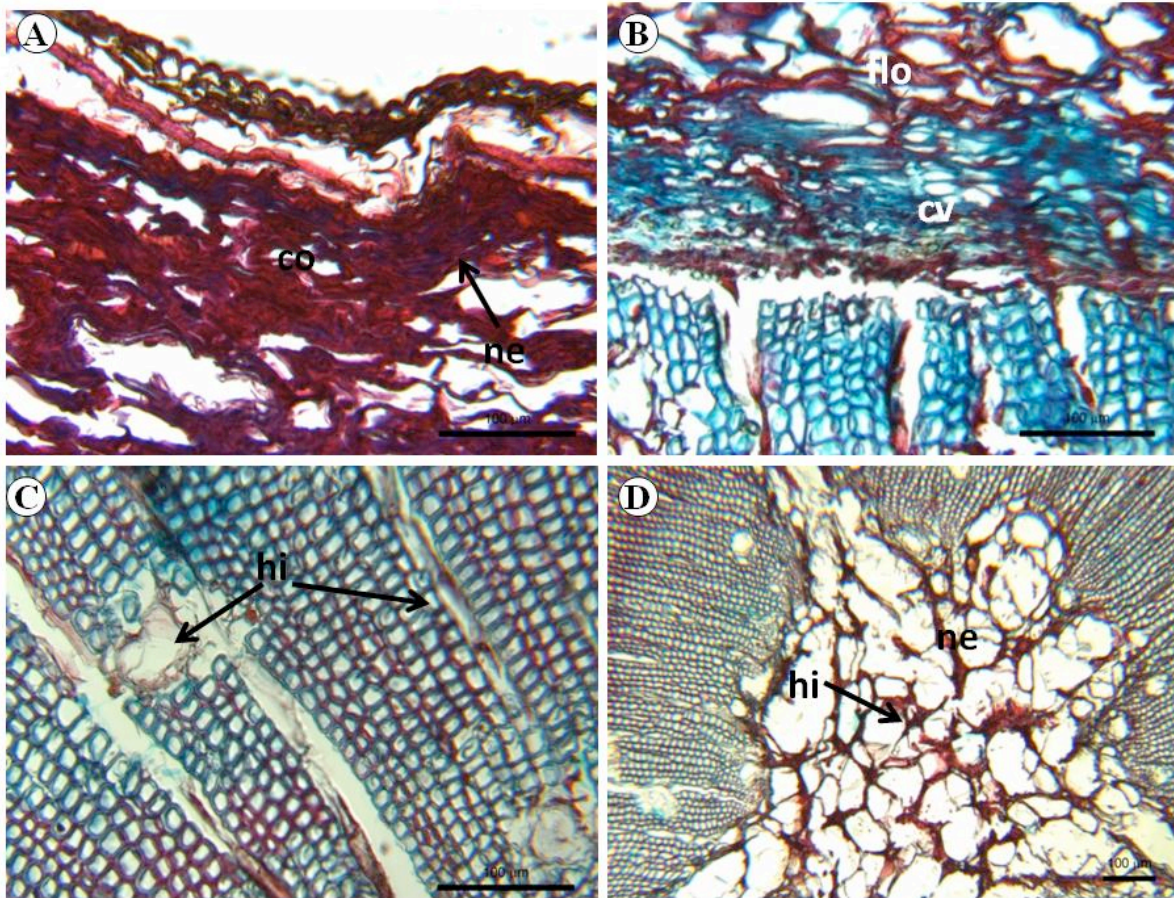


Figura 5. Fotomicrografías de las alteraciones de los tejidos del tallo del pino de las alturas (*Pinus hartwegii*) inoculado con *Ophiostoma ips* a los 60 días. A) Peridermis (pe), corteza (co) necrosada. B) Necrosis en floema (fl) y cambium vascular (cv). C) Radios del xilema (rx) y canales resiníferos (cr) invadidos por hifas del hongo (hi). D) Necrosis en medula (me) con hifas del hongo.

En este estudio no se observó el inicio de las primeras alteraciones causadas por hongos en los diferentes tejidos, debido a que los síntomas fueron evidentes a los 60 días ddi, generalmente se reporta muerte rápida de células y la acumulación de metabolitos secundarios en el sitio de daño que da como resultado una lesión necrótica (Nagy *et al.*, 2004). Los hongos manchadores al invadir células de sus hospedantes inducen acumulación de compuestos secundarios, tal es el caso de *Pinus sylvestris* donde hay la presencia

estilbenos (Pinosylvin y pinosylvin monomethylether) y un flavonoide (pinocembrin) al ser inocuados con *Leptographium wingfieldii*, *Ophiostoma brunneo-ciliatum* y *O. ips* (Croisé y Lieutier, 1993; Croisé *et al.*, 1998). Las alteraciones en *Pinus hartwegii* fueron colapso y necrosis como resultado del avance de la infección en corteza, floema, cambium, radios y canales resiníferos hasta la medula, estos resultados concuerdan con Nagy *et al.* (2000, 2004), Franceschi *et al.* (1998, 2000) y Krokene *et al.* (1999) quienes además observaron cambios morfológicos e incremento de fenoles en células parenquimatosas en *Picea abies* en repuesta al daño que causa *Ceratocystis polonica*. Además, hay la reducción de la humedad interna, hidrólisis de almidón, poca adhesión de la corteza, resinosis, traumatismo de los canales resiníferos y la producción de nuevo cambium y peridermis en *Pinus contorta* y *Abies grandis* (Reid *et al.* 1967; Nagy *et al.*, 2005).

La acumulación de hifas de los hongos se observó alrededor de los canales resiníferos y radios, ambas constituidas por células parenquimatosas (Forde, 1995). El avance longitudinal de los tres hongos fue por traqueidas como lo hace *Ophiostoma piliferum* Gibb (1993) y penetrando a través de sus puntuaciones (Seifert, 1993). Otros autores como Harrington y Cobb (1983) y Rane y Tattar (1987) reportan hifas del hongo *Verticicladiella abietina* en traqueidas y *Verticicladiella procera*, *V. wagneri*, *Verticicladiella* spp y *Leptographium terebrantis* en traqueidas y radios del xilema en *Pinus ponderosa*. Hubert (1953) observó hifas largas café oscuro con anastomosis en xilema, invasión de células del radio y canales resiníferos en *Pinus monticola* Doug inocuados con *Leptographium*. Estos estudios sugieren que todos los hongos ophiostomatoides son similares en su crecimiento a través de las células del hospedante. Además en las células parenquimatosas y radios con fenoles son ricas en fenilalanina amonio liasa, ésta es una

enzima clave para la síntesis de compuestos fenólicos, estos compuestos llegan a inactivar las enzimas pectolíticas que ayudan a los hongos a penetrar las paredes celulares (Franceschi *et al.*, 1998).

La mayoría de las especies de *Ophiostoma* y sus anamorfos son patógenos débiles o saprofiticos, y se asocian con insectos descortezadores (Harrington, 1993). Sin embargo, en este estudio *Ophiostoma ips* fue la más patogénica en relación a *O. olivaceapinii* y *Leptographium guttulatum* en árboles de *Pinus hartwegii* de tres años de edad. Lieutier *et al.* (1989) lo considera como un ascomiceto débil por causar un manchado azul en la madera en coníferas, dentro de esta categoría esta *O. minus*, *O. montia*, *O. penicillatum* y *O. picea* (Seifert 1993). En este estudio *O. ips* causo necrosis en los tejidos de la corteza, floema, cambium y en el xilema creció en radios y canales resiníferos llegando a causar la muerte de la planta. Wingfield y Marasas (1980) reportan lesiones en el cambium y xilema en *Pinus pinaster* de 10 años de edad. En general, los tres hongos inoculados penetraron en las punteaduras de las traqueidas y se establecieron en células parenquimatosas de la corteza, floema, cambium, canales resiníferos y radios causando muerte celular en los diferentes tejidos, y a pesar de haber necrosis, el hongo vive, eso debido a que es un hongo con hábitos saprofiticos (Seifert, 1993; Gibbs, 1993).

## CONCLUSIONES

En *Pinus hartwegii* hubo acumulación de resina en la zona de inoculación con *Leptographium guttulatum*, *Ophiostoma ips* y *Ophiostoma olivaceapinii* a los 10 ddi y el follaje se torno amarillo a café rojizo a los 60 ddi. *Leptographium guttulatum* y *Ophiostoma olivaceapinii* inducen la metabolización de polifenoles depositándose en las paredes de las células de la corteza, floema, cambium y médula con desintegración de las células. Por su parte *O. ips* causó necrosis en corteza, floema, cambium y médula. En xilema, las hifas de los tres hongos penetran y avanza longitudinalmente por las puntuaciones de las traqueidas y se distribuyen radialmente por células parenquimatosas y radios. De los hongos estudiados *O. ips* fue el que tuvo mayor patogenicidad en *P. hartwegii* dado que se considera un patógeno débil.

## LITERATURA CITADA

- Blanco, Z.S., 1981. Ecología de la Estación Experimental Zoquiapan; descripción general, vegetación y fauna. Chapingo, México. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Bosques. 114 p.
- Brasier, C.M., and Kirk, S.A. 2001. Designation of the EAN and NAN races of *Ophiostoma novo-ulmi* as subspecies. Mycolgical Research 105:547–554.
- Cibrián T. D., D. A. Rosales, S.E.G. Díaz, 2007. Enfermedades forestales en México/Forest diseases in Mexico. Universidad Autónoma Chapingo; CONAFOR-SEMARNAT, México; Forest Service USDA, EUA; NRCAN Forest Service, Canadá y Comisión Forestal de América del Norte, COFAN, FAO. Chapingo, México. 587 p.
- Cibrián, T.D., J.T. Méndez. M, R.C. Bolaños, H.O. Yates III, J. F. Lara, 1995. Insectos Forestales de México. Universidad Autónoma Chapingo. SFFS-SARH, México; Forest Service USDA, E.U.A.; NRCA Forest Service, Canadá y Comisión Forestal de América del Norte, COFAN, FAO. Chapingo, México. 453 p.
- Cibrián, T.D., J.T.M. Montiel, R.C. Bolaños, H.O. Yates III, J.F. Flores, 1995. Insectos Forestales de México. Universidad Autónoma Chapingo. Estado de México. México. 453p.
- CONAFOR. 2007. <http://www.conafor.gob.mx/>
- Croisé, L., E. Dreyer, F. Lieutier, 1993. Effects of drought on the induced defense reaction of Scots pine to dark beetle-associated fungi. Ann Sci. For. 50:91-97.
- Croisé, L., E. Dreyer, F. Lieutier, 1998. Effects of drought stress and severe pruning on the reaction zone induced by single inoculations with a bark beetle associated fungus (*Ophiostoma ips*) in the phloem of young Scots pines. Canadian Journal Forestry Research 28:1814-1824.
- Eckhard, L.G., J.P. Jones, K.D. Klepzig, 2004. Pathogenicity of *Leptographium* species associated with Loblolly pine decline. Plant Disease 88:1174-1178.
- Esau, K., 1977. Anatomy of seed plants. Jonh Wiley and Sons. New York. 674 p.

- Et-Touil, A., D. Rioux, F.M. Mathieu, L. Bernier, 2005. External symptoms and histopathological changes following inoculation of elms putatively resistant to Dutch elm disease with genetically close strains of *Ophiostoma*. *Canadian Journal of Botany* 83:656-667.
- Fahn, A., 1974. *Anatomia vegetal*. H. Blume Ediciones. España. 643 p.
- Farrell B.D., A.S. Sequerira, B.C. O'Meara, B.B. Normark, J.H. Chung, B.H. Jordal, 2001. The evolution of agriculture in beetles (Curculionidae Scolytinae and Platypodinae). *Evolution* 55:2011-2027.
- Fernández, M.M.F., A.E. García, Lieutier, F. 2004. Effects of various densities of *Ophiostoma ips* inoculations on *Pinus sylvestris* in north-western Spain. *Forestry Pathology* 34:213-223.
- Forde, K. J., 1995. The effects of *Ophiostoma piliferum* on wood pulp: investigation of the impact of *Ophiostoma piliferum* on the strength properties of handsheets. Institute of Paper Science and Technology. Atlanta, Georgia, USA. 136 p.
- Franceschi, V.R., P. Krokene, P. Krekling, T.E. Christiansen, 1998. Specialized phloem parenchyma cells in Norway spruce (Pinaceae) bark are an important site of defense reactions. *American Journal of Botany* 87:601-615.
- Franceschi, V.R., Krokene, P. Krekling, T.E. Christiansen, 2000. Phloem parenchyma cells are involved in local and distant defense responses to fungal inoculation or bark-beetle attack in Norway spruce (Pinaceae). *American Journal of Botany* 87:314-326.
- Gibbs, J.N. 1993. The biology of ophiostomatoid fungi causing sapstain in trees and freshly cut logs. *In: Wingfield, M.J., K.A. Seifert, J.F. Webber (eds.), Ceratocystis and Ophiostoma. Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity.* The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. pp 153-160.
- Harrington, T.C. 1993. Diseases of conifers caused by species of *Ophiostoma* and *Leptographium*. *In: Wingfield, M.J., K.A. Seifert, J.F. Webber (eds.), Ceratocystis and Ophiostoma. Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity.* The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. pp 161-172.
- Harrington, T.C., F.W. Cobb, 1983. Pathogenicity of *Leptographium* and *Verticicladiella* spp. Isolated from roots of western North American conifers. *Phytopathology* 73:596-599.

- Hubert, E.E. 1953. Studies of *Leptographium* isolated from western white pine. *Phytopathology* 43:637-641.
- Jacobs, E., M.J. Wingfield, C. Coetsee, T. Kirisitis, 2001. *Leptographium guttulatum* sp. Nov., a new species from spruce and pine in Europe. *Mycologia* 93:380-388.
- Jacobs, K., M.J. Wingfield, 2001. *Leptographium* species. Tree pathogens, insect associates, and agents of blue-stain. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 207 p.
- Johansen, D.A., 1940. Plant Microtechnique, Mc. Graw-Hill Book Co., Inc., New York, N.Y. 523 p.
- Klepzig, K.D., H.C.H. Walkinshaw, 2003. Cellular Response of Loblolly Pine to Wound Inoculation with Bark Beetle-Associated Fungi and Chitosan. Resch. Pap. SRS-30. Asheville, NC: United States Department of Agriculture. Forest Service. Southern Research Station. 9 p.
- Krokene, P., E. Christiansen, H. Solheim, V.R. Franceschi, A.A. Berryman, 1999. Induced Resistance to Pathogenic Fungi in Norway Spruce. *Plant Physiology* 121:565-569.
- Lee, S., Kim, J.J., C. Breuil, 2006. Fungal diversity associated with the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* and infested lodgepole pines in British Columbia. *Fungal Diversity* 22:91-105.
- Lieutier, F., C. Cheniclet, J. Garcia, 1989. Comparison of the defense reactions of *Pinus pinaster* and *Pinus sylvestris* to attacks by two bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) and their associated fungi. *Environmental Entomology* 18:228-34.
- Marmolejo, J.G., H. Butin, 1993. Las especies de *Ophiostoma* y *Ceratocystiopsis* (Ascomycetes, Microascales) conocidas de Nuevo León, México. Reporte científico especial No. 13. Facultad de ciencias forestales. Linares, Nuevo León, México. pp. 155-170.
- Nagy, N.E., C.G. Fossdal, P. Krokene, T. Kreeling, A. Lönneborg, H. Solheim, 2004. Induced responses to pathogen infection in Norway spruce phloem: changes in polyphenolic parenchyma cells, chalcone synthase transcript levels and peroxidase activity. *Tree Physiology* 24:505-515.



- Nagy, N.E., V.R. Franceschi, H. Solheim, T. Krekling, E. Christiansen, 2000. Wound-induced traumatic resin duct development in stems of norway spruce (pinaceae): anatomy and cytochemical traits. *American Journal of Botany* 87:302-313. 2000.
- Nagy, N.E., V.R. Franceschi, H.K.H. Solheim, 2005. Callus cultures and bark from Norway spruce clones show similar cellular features and relative resistance to fungal pathogens. *Tree* 19:694-702.
- Owen, D.R., K.Q. Lindahl, D.L. Wood, J.R. Parmeter, 1987. Pathogenicity of fungi isolated from *Dendroctonus valens*, *D. brevicomis*, and *D. ponderosae* to Ponderosa Pine Seedlings. *Phytopathology* 77:631-636.
- Paine, T.D., 1984. Seasonal response of ponderosa pine to inoculation of the mycangial fungi the western pine beetle. *Canadian Journal of Botany* 62:551-555.
- Popp M.P., D.J. Johnson, M.S. Lesney, 1995. Characterization of the induced response of slash pine to inoculation with bark beetle vectored fungi. *Tree Physiology* 15:619-623.
- Rane, K., T. Tattar, 1987. Pathogenicity of blue-stain fungi associated with *Dendroctonus terebrans*. *Plant Disease* 71:879-883
- Reid, R.W., H.S. Whitney, J.A. Watson, 1967. Reactions of lodgepole pine to attack by *Dendroctonus ponderosae* Hopkins and blue stain fungi. *Canadian Journal of Botany*. 45: 1115-1126.
- Rioux, D., G.B. Ouellette, 1989. Light microscope observations of histological changes induced by *Ophiostoma ulmi* in various nonhost trees and shrubs. *Canadian Journal of Botany* 67:2335-2351.
- Rioux, D., G.B. Ouellette, 1991. Barrier zone formation in host and nonhost trees inoculated with *Ophiostoma ulmi*. I. Anatomy and histochemistry. *Canadian Journal of Botany* 69:2055-2073.
- Seifert, K.A., 1993. Sapstain of commercial lumber by species of *Ophiostoma* and *Ceratocystis*. In: Wingfield, M.J., K.A. Seifert, J.F. Webber (eds.), *Ceratocystis and Ophiostoma*. Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. pp. 141-150.

- Solheim, H., 1993. Ecological aspects of fungi associated with the spruce bark beetle *Ips typographus* in Norway. *In*: Wingfield, M.J., K.A. Seifert, J.F. Webber (eds.), *Ceratocystis* and *Ophiostoma*. Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. pp. 235-242.
- Tisdale, R.A., T.E. Nebeker, J.D. Hodges, 2003. The role of oleoresin flow in the induced response of loblolly pine to a southern pine beetle associated fungus. *Canadian Journal of Botany* 81:368-374.
- Wingfield, M.J., 1986. Pathogenicity of *Leptographium procerum* and *L. terebrantis* on *Pinus strobus* seedlings and established trees. Sonderdruck aus *European Journal of Forest Pathology* 5:299-308.
- Wingfield, M.J., O.F.W. Marasas, 1980. *Ceratocystis ips* associated with *Orthomicus erosus* (Coleoptera: Scolytidae) on *Pinus* spp. in the Cape Province of South Africa. *Phytophylactica* 12:65-69.
- Wingfield, M.J., P. Capretti, M. MacKenzie, 1988. *Leptographium* spp. As root pathogens on conifers. *In*: Harrington, T.C., F.W. Cobb (eds.), *Leptographium* root diseases on conifers. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. pp. 113-128.
- Zhou, X.D., De Beer, W., Wingfield, B.D., M.J. Wingfield, 2002. Infection sequence and pathogenicity of *Ophiostoma ips*, *Leptographium serpens* and *L. lundbergii* to pines in South Africa. *Fungal Diversity* 10:229-240.
- Zhou, X.D., W.Z. De Beer, B.D. Wingfield, M.J. Wingfield, 2001. Ophiostomatoid fungi associated with three pine-infesting bark beetles in South Africa. *Sydowia* 53:290-300.
- Zhou, X.D., Z.W. De Beer, D. Cibrián, B.D. Wingfield, M.J. Wingfield, 2004. Characterization of *Ophiostoma* species associated with pine bark beetles from Mexico, including *O. pulvinisporum* sp. nov. *Mycological Research* 108:690-698.

## CONCLUSIONES GENERALES

Con base en los resultados morfológicos y análisis molecular de los aislamientos obtenidos de galerías e insecto descortezador *Dendroctonus adjunctus* en *Pinus hartwegii*, se concluye que el hongo corresponde a *Ophiostoma ips* (teleomorfo) de galerías y el anamorfo (*Graphilbum* sp.) de galerías y del cuerpo del insecto, el cual se reporta por primera vez asociado a este insecto en *Pinus hartwegii* en México.

Se identificaron los hongos *Leptographium guttulatum*, *O. angusticollis*, *O. olivaceapinii*, *Ophiostoma nigrocarpum* y *Pesotum* sp. asociados a galerías del insecto descortezador *Dendroctonus adjunctus* en el pino de las alturas. La identificación morfológica se corroboró molecularmente y sus secuencias fueron registradas en el banco de genes del NCBI. Las cuatro especies y la no identificada del género *Pesotum* se pueden considerar como patógenos débiles. Estadísticamente se comprobó, con el análisis de máxima verosimilitud y la razón de momios que existe una mayor probabilidad de que no se muera la planta por la presencia del hongo. Las enzimas *Hind*III y *Kpn*I se detectaron poca variación para la separación de las especies *Ophiostoma* y el género *Pesotum*. Por lo tanto, es necesario utilizar otras técnicas moleculares que nos ayuden a diferenciar las especies.

En *Pinus hartwegii* hubo acumulación de resina en la zona de inoculación con *Leptographium guttulatum*, *Ophiostoma ips* y *Ophiostoma olivaceapinii* a los 10 ddi y el follaje se torno amarillo a café rojizo a los 60 ddi. *Leptographium guttulatum* y *Ophiostoma olivaceapinii* inducen la metabolización de polifenoles depositándose en las paredes de las células de la corteza, floema, cambium y médula con desintegración de las células. Por su parte *O. ips* causó necrosis en corteza, floema, cambium y médula. En xilema, las hifas de

los tres hongos penetran y avanza longitudinalmente por las puntuaciones de las traqueidas y se distribuyen radialmente por células parenquimatosas y radios. De los hongos estudiados *O. ips* fue el que tuvo mayor patogenicidad en *P. hartwegii* dado que se considera un patógeno débil.