

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

AMARILLAMIENTO DEL PINO HÍBRIDO (*Pinus elliotii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis*) POR *Lasiodiplodia* sp. Y SU RELACIÓN CON FACTORES EDÁFICOS EN VERACRUZ, MÉXICO

LAURA ROSNEY JIMÉNEZ GONZÁLEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

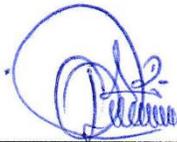
2020

La presente tesis titulada: **Amarillamiento del pino híbrido (*Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis*) por *Lasiodiplodia* sp. en Veracruz, México**, realizada por la alumna: **Laura Rosney Jiménez González**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. DIONICIO ALVARADO ROSALES

ASESOR



M.C VICTORIA AYALA ESCOBAR

ASESOR



DR. ARMANDO GÓMEZ GUERRERO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, septiembre de 2020

AMARILLAMIENTO DEL PINO HÍBRIDO (*Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis*) POR *Lasiodiplodia* sp. Y SU RELACIÓN CON FACTORES EDÁFICOS EN VERACRUZ, MÉXICO

**Laura Rosney Jiménez González, M. C.
Colegio de Postgraduados, 2020**

RESUMEN

El establecimiento de las plantaciones forestales comerciales en Veracruz puede verse influenciada negativamente por diversos factores, entre los que destacan, el clima, la calidad del suelo y las enfermedades. El objetivo de la presente investigación fue determinar la etiología del amarillamiento de árboles de pino híbrido y su relación con las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. En diciembre de 2018, en las plantaciones forestales comerciales del sur de Veracruz, se colectaron muestras de raíz y tallo de árboles con amarillamiento y muestras asintomáticas para el aislamiento de hongos fitopatógenos. En agosto 2019, se colectaron 85 muestras de suelo de 500g c/u a 30 cm de profundidad, para la determinación nutrimental del suelo, los cuales se realizaron en GISENALabs Texcoco, Edo. de México, bajo la metodología interna del Laboratorio y la NOM-021-RECNAT-2000. Del mismo modo, de árboles con amarillamiento, en seis lotes de aproximadamente una hectárea cada una, se colectaron 36 muestras de suelo de 200 g c/u, para el análisis de la diversidad fúngica, lo cual se realizó en el laboratorio de Patología Forestal del COLPOS al igual que el manejo de las muestras de tejido vegetal. Estas últimas se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) y se incubaron a 28 ± 2 °C. Para diversidad fúngica, se

utilizó medio PDA-TS (Papa – Dextrosa – Agar- Tergitol – Estreptomicina) de Steiner y Watson (1965). De los árboles muestreados, se aisló el hongo *Lasiodiplodia* sp. proveniente del tallo, generando una asociación hospedante-patógeno del 34.6%, de la cual, el 24.6% se aislaron de muestras con amarillamiento, mientras que el 10% restante se aisló de árboles asintomáticos. Mediante análisis filogenético de la región ITS, los genes β -tubulina (β -*tub*) y factor de elongación 1-alfa (*TEF1- α*), se identificaron las especies *Lasiodiplodia theobromae*, *L. brasiliense* y *L. iraniensis*. Por su prevalencia y asociación constante con los síntomas bajo estudio, la cepa *L. theobromae* se seleccionó para la prueba de patogenicidad y cuatro días después de la inoculación se presentaron los síntomas típicos de amarillamiento y muerte de plántulas. Los resultados de las variables de suelo indican bajos niveles de materia orgánica, pH de ácidos a fuertemente ácido, con baja disponibilidad de N, P, K, analizados de acuerdo a la norma 021. Los hongos del suelo identificados fueron *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Fusarium*. De acuerdo al índice de Shannon-Weaver la diversidad fúngica es baja, lo cual se relaciona con niveles bajos de materia orgánica y poca disponibilidad de nutrimentos. De acuerdo a los resultados se concluye que *Lasiodiplodia theobromae* está estrechamente relacionado con la baja calidad del suelo misma que afecta el desarrollo de los árboles sometiéndolas a estrés constante, condición que originó el desarrollo del hongo.

Palabras claves: Identificación filogenética, *Lasiodiplodia theobromae*, calidad del suelo, PDA-TS, Índice de Shannon-Weaver.

YELLOWING OF THE HYBRID PINE (*Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis*) FOR *Lasiodiplodia* sp. AND ITS RELATIONSHIP WITH EDAPHIC FACTORS IN VERACRUZ, MEXICO

**Laura Rosney Jiménez González, M. C.
Colegio de Postgraduados, 2020**

ABSTRACT

The establishment of commercial forest plantations in Veracruz can be negatively influenced by several factors, including climate, soil quality and diseases. The main goal of this research was to determine the etiology of the yellowing of hybrid pine tree and their relationship with the physical, chemical and biological properties of the soil. In december 2018, root and stem samples of trees with yellowing and asymptomatic samples were collected in the commercial forest plantations in south of Veracruz, for the isolation of phytopathogenic fungi. In august 2019, 85 soil samples of 500 g each to were collected at a depth of 30 cm, for soil analysis, which were carried out at GISENALabs Texcoco, State of Mexico under the methodology of the Laboratory and the NOM-021-RECNAT-2000. Also, from yellowing trees, in six plots of approximately one hectare each, 36 soil samples of 200 g each were collected for fungal diversity analysis, carried out in the Forest Pathology laboratory of COLPOS as well as plant tissue samples processing. The latter were seeded in Petri dishes with potato-dextrose-agar (PDA) culture medium and incubated at 28 ± 2 °C. For fungal diversity analysis, PDA-TS medium (Potato - Dextrose - Agar - Tergitol - Streptomycin) by Steiner and Watson (1965) was used. Of the trees sampled, the fungus *Lasiodiplodia* sp. was isolated from the stem, generating a

host/pathogenic association of 34.6%, of which 24.6% were isolated from samples with yellowing, while the remaining 10% were isolated from asymptomatic trees. Through phylogenetic analysis of ITS region, β -tubulin (β -*tub*) and 1-alpha elongation factor (*TEF1- α*) genes, the species *Lasiodiplodia theobromae*, *L. brasiliense* and *L. iraniensis* were identified. Because of its prevalence and constant association with the symptoms under study, the *L. theobromae* strain was selected for the pathogenicity test and four days after inoculation the typical symptoms of yellowing and seedling death occurred. The results of the soil variables indicate low levels of organic matter, acidic and strongly acidic pH's, with low availability of N, P, K, analyzed according to standard 021. The soil fungi identified were *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* and *Fusarium*. According to the Shannon-Weaver index the fungal diversity is low which is related to low levels of organic matter and low nutrients availability. According to the results, it is concluded that *Lasiodiplodia theobromae* is closely related to the low quality of the soil itself, which affects the development of trees by predisposing them to constant stress, a condition that originates the development of the fungus.

Keywords: Phylogenetic identification, *Lasiodiplodia theobromae*, soil quality, PDA-TS, Shannon-Weaver Index.

AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento y apoyo otorgado para realizar mis estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados, especialmente al Posgrado de Fitopatología por darme la oportunidad de realizar mis estudios y hacerme crecer profesionalmente.

A mi consejero el Dr. Dionicio Alvarado Rosales por depositar su confianza en mí, su paciencia, por su humildad y su guía en la realización de este trabajo.

A mis asesores, Dr. Armando Gómez Guerrero y la M.C. Victoria Ayala Escobar, por su gran apoyo brindado durante el desarrollo de la presente investigación

A UUMBAL por abrirme las puertas de sus instalaciones, al Ing. José Suarez, Ing. Ángela Zárate, Garduza y un agradecimiento especial al M.C. Sergio Hernández Pablo, por su aportación, apoyo y guía en la realización de este trabajo.

Al Dr. Dionicio Fuentes Aragón por su enseñanza y aportación en el desarrollo de ésta investigación

A mis amigos y profesores, que hicieron de mi estancia en el Colegio un lugar entrañable.

Dedico esta tesis a:

Mis padres, **Mercedes** y **Gregorio**, por su amor incondicional, su apoyo, valores y principios que me han inculcado pero lo más importante el haberme alentado a volar para alcanzar mis metas sin importar las dificultades.

Mis hermanas **Arely** y **Beatriz** mujeres guerreras que siempre estuvieron ahí para apoyarme; a mi hermano **Celso** quien desde pequeño me apoyó moral y económicamente, deuda que jamás terminaré de pagar y que estaré agradecida por el resto de mi vida; a mi hermano **Rufino** quien me enseñó que para mejorar hay que vencer el miedo y salir del nido familiar sin que éste se olvide; y por último a mi hermano **Eloy** quien me guió con su ejemplo y paciencia. A todos ustedes los amo infinitamente, gracias por su apoyo incondicional.

Mis sobrinos, Carlitos, Heidi, Alex, Nelson, Gustavito e Isaías, para que este logro sirva como inspiración en perseguir sus sueños.

Mis amigos, Imelda, Rosario, Iris, Viridiana, Karina, Edith, Gelasino, Honelver, Moises y en especial a Coral Mendoza por los 6 años de convivencia, enseñanzas, apoyo y confianza, los cuales extrañaré y recordaré siempre.



CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
LISTA DE CUADROS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
OBJETIVOS	3
HIPÓTESIS	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Importancia y distribución de <i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> y <i>P. elliotii</i> var. <i>elliotii</i>	4
<i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>	4
<i>Pinus elliotii</i> var. <i>elliotii</i>	5
Pino híbrido (PEExPCH)	6
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	7
Importancia mundial y en México	7
Enfermedades y síntomas ocasionados	8
Factores que afectan su incidencia	9
Ciclo de vida	10
Clasificación taxonómica	11
Descripción morfológica	14
Propiedades físicas y químicas del suelo	15
Hongos del suelo	16
La nutrición mineral y su relación con las enfermedades de plantas	18
LITERATURA CITADA	20
CAPITULO 1. ETIOLOGÍA DEL AMARILLAMIENTO DEL PINO HÍBRIDO (<i>Pinus elliotii</i> var. <i>elliotii</i> x <i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>) EN VERACRUZ, MÉXICO	26
1.1 RESUMEN	26
1.2 ABSTRACT	28
1.3 INTRODUCCIÓN	29

1.4	MATERIALES Y MÉTODOS	31
1.4.1	Lotes de estudio	31
1.4.2	Colecta del material biológico.....	31
1.4.3	Aislamiento e identificación de <i>Lasiodiplodia</i> y <i>Pestalotiopsis</i> a partir de tejido vegetal.....	33
1.4.4	Caracterización morfológica	34
1.4.5	Identificación molecular	34
1.4.6	Pruebas de patogenicidad.....	36
1.4.7	Evaluación.....	37
1.5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
1.5.1	Síntomas en campo y hongos aislados.....	41
1.5.2	Identificación morfológica.....	42
1.5.3	Identificación molecular	44
1.5.4	Pruebas de patogenicidad.....	45
1.6	CONCLUSIÓN	49
1.7	LITERATURA CITADA.....	49
CAPITULO 2. CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DEL SUELO Y SU RELACIÓN CON LA DIVERSIDAD FÚNGICA DE PLANTACIONES DE PINO HIBRIDO		
		54
2.1	RESUMEN	54
2.2	ABSTRACT	56
2.3	INTRODUCCIÓN	58
2.4	MATERIALES Y MÉTODOS	60
2.4.1	Muestreo para análisis físico-químico	60
2.4.2	Colecta de muestras para análisis de diversidad fúngica.....	60
2.4.3	Determinación de diversidad fúngica	61
2.4.4	Caracterización morfológica de los aislados	62
2.5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	63
2.5.1	Propiedades físicas y químicas del suelo.....	63

2.5.2 Densidad de unidades formadoras de colonias de la diversidad fúngica en predios C1, C2, C3, C4 y P de la zona de estudio del sur Veracruz	67
2.6 CONCLUSIONES	74
2.7 LITERATURA CITADA.....	75
CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES	78

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Distribución y rango de hospedantes de <i>L. theobromae</i> en cultivos frutícolas y maderables.	12
Cuadro 2. Especies y cepas utilizadas para la reconstrucción filogenética, incluyendo hospedante, origen y número de accesión del GenBank. Las cepas reportadas en este estudio se muestran en negritas	38
Cuadro 3. Datos promedio de características químicas del suelo en los principales predios (C1-C4) de plantación de pino híbrido, en el sur de Veracruz, interpretados de acuerdo a la NOM-021-RECNAT-2000.	65
Cuadro 4. Coeficiente de correlación de variables físicas y químicas del suelo con respecto a hongos totales, los cuales se observa una correlación con la MO, Fe, P, Ca, Da, Ca/Mg y % de arcilla.	71

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ubicación de lotes de muestreo en las plantaciones de pino híbrido *Pinus elliotii* var. *elliotii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* (PEE x PCH) al sur de Veracruz..... 32
- Figura 2.** Selección de árboles muestreados, A) Árboles con amarillamiento generalizado y poco vigor, B) Árbol asintomático de color verde oscuro con desarrollo de brotes nuevos. 33
- Figura 3.** A) Síntomas en campo, árboles de pino híbrido con amarillamiento generalizado y poco vigor, positivo a *Lasiodiplodia* sp. B, C) Desarrollo radicular rodeando la base del tronco, efecto conocido como anillamiento radicular..... 42
- Figura 4.** A) Colonia de *L. theobromae* en PDA con crecimiento micelial de color gris, de 5 días de edad. B) Micelio gris oliváceo con desarrollo de picnidios, 10 días después de la siembra. C) Conidios inmaduros, hialinos, amerosporas. D) Célula conidiogénica, hialina, cilíndrica, holoblástica. E) Paráfisis hialinas y cilíndricas. F) Conidios maduros subovoides, didimosporas, con estrías longitudinales, color café oscuro. Barra de escala=10 µm. 43
- Figura 5.** Árbol filogenético reconstruido con inferencia Bayesiana usando un alineamiento concatenado de la región ITS, y los genes *tef1* y *tub2*. *Diplodia mutila* se utilizó como fuera de grupo. Las secuencias generadas en este estudio se indican con un círculo, y en color correspondiente a las especies. La barra indica sustituciones por sitio. 47
- Figura 6.** Resultado de pruebas de patogenicidad de *Lasiodiplodia theobromae* en plantas de pino híbrido (*P. elliotii* var. *elliotii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*). A) Planta testigo sin síntomas, inoculado con disco de PDA puro. B) Marchitez generalizada y muerte de planta inoculada con el hongo. C) Desprendimiento de corteza del área inoculada hacia la raíz. D, E) Sección transversal del tallo mostrando inicio y necrosis medular. F) Picnidio ostiolado de color café oscuro con conidios hialinos extraído

alrededor de la zona dañada. G) Conidios maduros didimosporas, con estrías longitudinales color gris oscuro. H) Reaislamiento del patógeno con crecimiento micelial grisáceo en PDA. Barra de escala=10 μm	48
Figura 7. Muestreo en zig-zag para la toma de muestras de suelo para análisis físico-químico. Los círculos amarillos representa el lugar donde se tomó cada submuestra.	61
Figura 8. Comportamiento de Ca, Mg y K con respecto al pH, en predio C1 y C2 se observa mayor distribución y concentración en pH ligeramente ácidos, mientras que en C3 y C4 se concentra en pH más ácidos.	66
Figura 9. Número de colonias totales y por género de hongos detectado en muestras de los diferentes lotes bajo estudio en el sur de Veracruz.	68
Figura 10. Índice de diversidad fúngica en cada lote muestreado en el sur de Veracruz, calculado mediante el índice de Shannon.	70
Figura 11. Correlación entre unidades formadoras de colonias (UFC) y el % MO (materia orgánica), mostrando una relación lineal positiva entre ambas variables.	72
Figura 12. Correlación entre unidades formadoras de colonias (UFC) y el % de arcilla, mostrando una relación lineal positiva entre ambas variables.	72
Figura 13. Análisis de correlación entre unidades formadoras de colonias (UFC) y el estado nutrimental del suelo, presentando una relación lineal negativa para fósforo, hierro, Ca/Mg y relación lineal positiva para calcio aunque ninguno estadísticamente significativa.	73

INTRODUCCIÓN GENERAL

Dentro de la riqueza forestal que posee México, el género *Pinus* constituye un recurso de primera importancia por la producción maderable y no maderable, al 2016 ha contribuido con un 77.8% de las plantaciones forestales comerciales (CONAFOR, 2012). Dentro de la producción no maderables se incluye la cosecha de resina o resinación, actividad realizada principalmente en los estados de Michoacán, Jalisco, México, Oaxaca y recientemente en Veracruz (CONAFOR, 2012). En este último, las especies resineras más utilizadas son *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, *Pinus elliottii* var. *elliottii* y el híbrido obtenido de la cruce de ambas especies, el cual, posee una gran importancia económica principalmente en América del Sur, África Occidental y Australia (Dieters and Brawner, 2007). El proceso de producción de estas especies es afectado por diversos factores destacando el clima, suelo y diversas enfermedades. Una de las enfermedades de mayor importancia reportadas es el manchado azul de la madera causado por *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maublanc, la cual, en etapas tempranas provoca la “muerte descendente” de los árboles, además de que su presencia se asocia a la semilla (Mohali, 1993; Rees, 1998; Cleary *et al.*, 2019).

Lasiodiplodia theobromae es un hongo endófito con una amplia gama de hospedantes, muy extendida en países tropicales y subtropicales (CABI, 2010). En México, este patógeno es el agente causal de numerosas enfermedades en un amplio rango de especies de plantas (Picoz-Muñoz *et al.*, 2014). Su presencia está ampliamente relacionada con árboles bajo estrés fisiológico (Chungu *et al.*, 2010).

En varios estudios se ha demostrado que la baja disponibilidad de nutrientes, condiciones desfavorable del sitio y menor adaptación del árbol son factores, que permiten la aparición de los síntomas de estrés en etapas tempranas, lo cual puede actuar como factor que predispone el desarrollo de enfermedades (Zech y Drechsel, 1992; Cristancho *et al.*, 2004; Lugo *et al.*, 2006). Por tal motivo, la presente investigación tuvo como objetivo determinar la etiología del amarillamiento de los árboles de pino híbrido y su relación con las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo en las principales zonas productoras del sur de Veracruz.

OBJETIVOS

General

Determinar la etiología del amarillamiento de árboles de pino híbrido y su relación con propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, en el sur de Veracruz.

Específicos

Identificar morfológica y molecularmente los hongos asociados al amarillamiento de árboles de pino híbrido.

Evaluar la patogenicidad de la cepa más prevalente asociada al amarillamiento, en plántulas de pino híbrido en condiciones de laboratorio y vivero.

Determinar las propiedades nutrimentales de las principales zonas de producción de pino híbrido, su relación con la diversidad fúngica del suelo y la enfermedad.

HIPÓTESIS

El amarillamiento del pino híbrido, es una enfermedad ocasionada por un complejo de hongos endófitos y su desarrollo está relacionado al estrés nutrimental provocado por la baja calidad física, química y biológica del suelo.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia y distribución de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* y *P. elliottii* var. *elliottii*

Pinus caribaea* var. *hondurensis

El Pino caribeño o amarillo (*Pinus caribaea* var. *hondurensis* (Séneclauze) W.H.G. Barret & Golfari) es el pino tropical con mayor distribución geográfica, encontrado en forma natural en Las Bahamas, Cuba, El Salvador, Belice, Guatemala, Honduras, Nicaragua y México (CABI, 2019). Fuera del rango de distribución nativo esta especie ha sido evaluada e introducida a mayor escala con fines comerciales o de investigación en otros países como Brasil, Colombia y Venezuela (INAB, 2017). En México la distribución es limitada. Se ha encontrado en pequeñas cantidades en Quintana Roo y Yucatán, actualmente se ha distribuido a Oaxaca, Chiapas y Veracruz con fines comerciales (Perry, 1991; CONABIO, 1962).

Los principales usos son como combustible, en construcción, maderable e industrial, este último se refiere a la producción de resina que provee de materia prima a industrias que producen jabones, desinfectantes, barnices, fármacos y pinturas; pulpa y fabricación de papel (INAB, 2017; CONABIO, 1962).

Requerimientos biofísicos

El pino caribeño se desarrolla en zonas con climas cálidos con un rango de temperatura media anual de 24 a 27.2 °C, libre de heladas, desde el nivel del mar hasta los 700 m de altitud. Se adapta a suelos franco o franco arenosos y en mayor o menor grado en arcillo-arenoso con gran cantidad de grava. En áreas con precipitación anual de 2000 a 3000 mm y con suelos que presentan el desarrollo de un horizonte de acumulación de arcillas,

como los alfisoles, logra un buen crecimiento. Aunque también crece en suelos poco profundos que se saturan de agua hasta por seis meses al año (Perry, 1991; Greaves *et al.*, 2015).

Existe pobre desarrollo de biomasa y estrés en suelos con altas concentraciones de salinidad y pH ácidos ocasionando amarillamiento e interrupción del crecimiento (Sun and Dickinson, 1993). En la región de origen se ha encontrado en suelos con baja fertilidad con pH de 4.3 a 6.5 (CONABIO, 1962) pero se adapta a diferentes niveles de acidez del suelo. En las Bahamas e islas Caicos los árboles crecen en suelos de ligeramente a moderadamente alcalinos (pH de 7.5 a 8.5), en Cuba y América Central crece en suelos de intensamente a ligeramente ácidos (pH de 4.5 a 6.5), por otro lado, árboles de origen centroamericano mueren en un pH arriba de 7.0 (Martínez, 2014).

Enfermedades del Pino caribeño

Se han reportado enfermedades que limitan el establecimiento del pino caribeño, entre éstas se encuentra el tizón de la banda roja por *Dotistroma septosporum*, tizón foliar por *Lophodermium* sp., roya o tumor por *Cronartium* sp. y muerte descendente o regresiva por *Lasiodiplodia theobromae*. Esta última se manifiesta de diversas maneras y con diferentes síntomas: muerte progresiva acompañado con amarillamiento generalizado o irregular, ramas secas y crecimiento deficiente en altura y diámetro (Greaves *et al.*, 2015; INAB, 2017).

Pinus elliottii* var. *elliottii

P. elliottii es nativo del Sureste de Estados Unidos de Norteamérica, Alabama, Florida, Georgia, Luisiana, Misisipi, Carolina del Sur y se ha introducido al norte de Tennessee,

Centro Norte de Georgia y Alabama. Es una de las especies maderables plantadas con mayor frecuencia. Su importancia radica en el rápido crecimiento y la producción de madera de gran valor. En Brasil y parte de Estados Unidos, es una especie importante en la producción de resina y trementina (Lohrey and Susan, 2004; CABI, 2019).

Se desarrolla en climas cálidos y húmedos en elevaciones a partir de 150 m, con temperaturas medias mensuales en verano de 18 a 22°C; muestra tolerancia a climas con temperaturas bajas. Precipitación media anual de 1270 mm. Aunque en suelos inundados pueden tener buen crecimiento, el establecimiento de plántulas o el crecimiento inicial de una plantación se puede dificultar por mal drenaje. Se adapta a pH alcalino a neutro, suelos arenosos a suelos rocosos y presenta tolerancia a las sequías (CABI, 2019; Carey, 1992).

Las enfermedades más importantes que afectan el desarrollo de esta especie son la roya fusiforme causada por el hongo *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme*, la pudrición de raíz causada por *Heterobasidion annosum* el cual se disemina mediante contacto entre raíz de árboles adyacentes y el cancro causado por *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* con graves daños en vivero (Russell and Honkala, 1990).

Pino híbrido (PEExpCH)

El híbrido de *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* posee una gran importancia económica principalmente en América del Sur (Venezuela y Argentina), África Occidental y Australia. Este material genético reúne las características entre las dos especies parentales con el fin de obtener mejores ventajas en la tasa de crecimiento, resistencia al viento, calidad de la madera, rectitud del tallo y altura. Las características

de mayor interés del material genético se derivan de una recombinación de características: mayor crecimiento, volumen y alto rendimiento de producción de resina por parte de *P. caribaea* var. *hondurensis*, combinado con firmeza del viento, adaptabilidad a sitios húmedos, alta densidad de madera y rectitud del tallo de *P. elliotii* var. *elliotii* (Dieters and Brawner, 2007; Rasmussen *et al.*, 2009; Cappa *et al.*, 2012).

El desarrollo y supervivencia de los esquejes está influenciado por la temperatura entre 15 a 30°C, mientras que el enraizamiento es mayor y en menor tiempo a 25 °C. A temperaturas mayores de 30°C el desarrollo radicular es lento y pobre (Rasmussen *et al.*, 2009; Cappa *et al.*, 2012).

De acuerdo a Fernández *et al.* (1999), al realizar labores de terreno tales como camellones y fertilización a base de fósforo se obtendrá un mejor desarrollo de raíz, mayor crecimiento en altura y diámetro del cuello, generando mayor densidad de sobrevivencia de la plantación, además, la fertilización con fósforo es especialmente importante en suelos ácidos. Los suelos con baja densidad aparente son más recomendados, ya que representan menor obstáculo para el crecimiento de la raíz, debido que una mayor masa por unidad de volumen de suelo es un indicador de la resistencia mecánica del suelo (Osman, 2013).

Lasiodiplodia theobromae

Importancia mundial y en México

Lasiodiplodia theobromae (Pat.) Griffon & Maubl., corresponde a la familia Botryosphaeriaceae que son un grupo cosmopolita de hongos patogénicos, endófitos y saprófitos principalmente de plantas leñosas. Es una especie endófito con

comportamiento patogénico en hospedantes bajo estrés fisiológico y causa pérdidas económicas en diferentes cultivos. Se encuentra muy extendida en países tropicales y subtropicales de Europa, Asia, África, Norteamérica (Canadá, México, Estados Unidos), América Central y El Caribe (Belice, Islas Vírgenes Británicas, Costa Rica, Cuba, República Dominicana, El Salvador, Granada, Guatemala, Haití, Honduras, Jamaica, Nicaragua, Panamá, Puerto Rico, San Vicente y Las Granadinas, Trinidad y Tobago). En Sudamérica (Argentina, Bolivia, Brasil, Perú, Chile, Colombia, Ecuador, Guyana, Paraguay, Perú, Surinam y Venezuela) y Oceanía (CABI, 2010).

Enfermedades y síntomas ocasionados

En especies forestales está demostrado que los hongos se encuentran asociados desde semilla, en Pino caribeño y Pino cortante (*P. elliotii*), predominando los Ascomycota dentro de los cuales se encuentra el género *Lasiodiplodia theobromae* (Cleary *et al.*, 2019; Fraedrich *et al.*, 1994).

La incidencia de este patógeno en semillas de pinos está asociado a diversos factores tales como la fecha de recolección de conos y el secado. Cuando la recolección de conos ocurre en fechas tempranas y sin secado al instante, la incidencia es mayor mientras que en fechas tardías y con secado ésta es menor (Fraedrich *et al.*, 1994).

El mayor impacto de la enfermedad se ha reportado en Venezuela causando degradación de las paredes celulares, disminuyendo la fuerza y dureza de la madera del pino caribeño, provocando la reducción de su valor hasta un 50% (Mohali, 1993; Cedeño *et al.*, 1996). Además, ocasiona muerte regresiva acompañada con amarillamiento

generalizado o irregular, ramas secas y crecimiento deficiente en altura y diámetro (Greaves *et al.*, 2015; INAB, 2017).

En México y otros países, este patógeno es el agente causal de numerosas enfermedades en un amplio rango de especies de plantas. Está asociado a la muerte descendente, cáncer, gomosis, tizones, pudrición de raíz y frutos como mango, uva, papaya, rambután, yaca, guayaba, aguacate, guanábana, chirimoya, zapote, cítricos, entre otros (Cuadro 1) (Picoz-Muñoz *et al.*, 2014). En especies forestales ataca a eucalipto (*Eucalyptus urophylla* y *E. grandis*) de 1 a 3 años de edad, provocando cáncer en tallo y muerte, casi siempre en forma descendente, marchitez y amarillamiento (Cibrián, 2016).

Los síntomas visibles asociados al tronco o ramas de algunos hospedantes es la presencia de exudados de color café oscuro a negro y a medida que aumenta la severidad ésta se esparce sobre el área dañada. En las ramas se observa una marchitez, amarillamiento y defoliación seguido de muerte de la punta hacia la base y en daños más severos provoca la muerte del árbol. Al realizar cortes longitudinales en las zonas con daños iniciales se observa una decoloración del sistema vascular a manera de líneas de color café rojizo a oscuro que corren de forma descendente; en áreas muertas es posible detectar picnidios en estroma en la superficie de la corteza (Hernández *et al.*, 2013).

Factores que afectan su incidencia

La intensidad del ataque de un patógeno está estrechamente relacionada a la interacción entre el hospedante, el patógeno, el ambiente y el manejo. *L. theobromae* es un hongo endófito, el cual puede colonizar el tejido vegetal sin que éste presente síntomas. Mullen

et al. (1991) señalan que aislaron *L. theobromae* de árboles de cornejo (*Cornus florida*) y las pruebas de patogenicidad posteriores en tallos de la misma especie, con y sin estrés por sequía, mostraron que *L. theobromae* podía aislarse de todas las plantas inoculadas, pero los canchros se desarrollaron solamente en plantas estresadas, lo que significa que el estrés es una condición importante y ésta puede ser originada por diferentes factores como deficiencia hídrica, la cual limita la supervivencia y crecimiento de los árboles por altas temperaturas y estrés por desarrollo anormal de raíz, denominado anillamiento radicular o “Girdling root”, que ocurre al emerger raíces en la base del tronco rodeando completamente la raíz principal hasta provocar una constricción, afectando el desarrollo normal de la raíz principal y secundaria. Como efecto, las plantas se debilitan, su anclaje es débil y tienen un crecimiento vegetativo reducido debido a la translocación restringida de nutrientes y agua, mostrando síntomas de deficiencia nutrimental y marchitez durante las altas temperaturas, lo cual influye en el aumento de la severidad de cualquier enfermedad, tal es el caso de *L. theobromae* que está influenciada principalmente por temperaturas de 26 a 32 °C, alta humedad relativa y niveles críticos de nutrición (Shaw, 1997; Tucuch *et al.*, 2005; Martiñón-Martínez *et al.*, 2010).

Ciclo de vida

La principal fuente de inóculo son los conidios que se forman dentro de cuerpos fructíferos o picnidios (estado asexual), los cuales se desarrollan en el exterior de los tejidos infectados o en los restos de madera muerta en el suelo. La liberación y dispersión del inóculo se da principalmente por la lluvia y en menor proporción por el viento (González *et al.*, 1999). Éstos penetran por las heridas ocasionadas por insectos o herramientas de trabajo y en lenticelas, desarrollando apresorios y haustorios, y son

capaces de permanecer de manera latente en el hospedante; también se pueden encontrar en frutas momificadas sobre el suelo y en desechos orgánicos debajo de los árboles, conforme los árboles pasan a un estado de estrés, el hongo se vuelve patogénico ocasionando la muerte de ramas y tallos (Ploetz, 2003).

En tubérculos de ñame se ha reportado la formación de clamidosporas y pueden liberarse en el suelo con la desintegración del tejido huésped, el cual es la fuente de inóculo del siguiente ciclo cuando las condiciones son favorables (Ogundana, 1983).

Clasificación taxonómica

Taxonómicamente el hongo que causa la enfermedad de la muerte regresiva se clasifica de la siguiente manera:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Dothideomycetes

Subclase: Dothideomycetidae

Orden: Botryosphaeriales

Familia: Botryosphaeriaceae

Género: *Lasiodiplodia*

Especie: *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl (1909) (Mycobank, 2019; Phillips *et al.*, 2013).

Cuadro 1. Distribución y rango de hospedantes de *L. theobromae* en cultivos frutícolas y maderables.

País	Hospedante	Enfermedad	Referencias
México	<i>Pouteria sapota</i>	Muerte descendente y Pudrición de frutos	Tovar-Pedraza <i>et al.</i> , 2012; Vazquez-López <i>et al.</i> , 2009
	<i>Vitis vinifera</i>	Cancro	Urbez-Torres <i>et al.</i> , 2008
	<i>Anacardium occidentale</i>	Necrosis de frutos	Canales, 2007
	<i>Anona</i> sp.	Muerte descendente y Pudrición de frutos	Hernández <i>et al.</i> , 2013
	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	Pudrición blanda	Medina <i>et al.</i> , 2018
	<i>Carica papaya</i>	Pudrición del pedúnculo y Pudrición del tallo	Rojo, 2013: Da Siva <i>et al.</i> , 2011
	<i>Carya illinoensis</i>	Pudrición del fruto	Alvidrez-Villarreal <i>et al.</i> , 2012
	<i>Citrus aurantium</i> L.	Muerte de plantas	Varela <i>et al.</i> , 2013
	<i>Citrus aurantifolia</i>	Muerte de ramas	
	<i>Citrus sinensis</i>	Pudrición de la base del pedúnculo	
	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	Manchado de Cáliz	
	<i>Mangifera indica</i>	Pudrición del pedúnculo	Sandoval-Sánchez <i>et al.</i> , 2013
	<i>Nephelium lappaceum</i> L.	Pudrición de frutos	Hernández, 2010
	<i>Persea americana</i>	Pudrición del pedúnculo	Ochoa-Ascencio <i>et al.</i> , 2007
<i>Pinus pseudostrobus</i>	Cáncer de tallo	Mohali <i>et al.</i> , 2005	
<i>Pinus</i> sp.	Cáncer de tallo	Slippers <i>et al.</i> , 2004	

	<i>Theobroma cacao</i>	Pudrición de la mazorca	Álvarez, 1976
	<i>Eucalyptus</i> sp.	Muerte descendente	Cibrián y Pérez, 2012
Brasil	<i>Psidium guajava</i>	Pudrición del tallo	Cardoso <i>et al.</i> , 2002
	<i>Anacardium occidentale</i>	Podredumbre negra del vástago	Cardoso <i>et al.</i> , 2009
		Gomosis	Muniz <i>et al.</i> , 2011
	<i>Jatropha curcas</i>	Podredumbre de raíz y collar	Pereira <i>et al.</i> , 2009
Texas	Cítricos	Lesiones del tronco	Davis <i>et al.</i> , 1987
Cuba		Muerte regresiva de ramas, presencia de goma y pudriciones en fruto	Peña <i>et al.</i> , 2016
Etiopía	Araucaria	Tizón de aguja y Cáncer de tallo	Darge, 2017
India	<i>Jatropha curcas</i>	Podredumbre de raíz y collar de la nuez	Latha <i>et al.</i> , 2009
Venezuela	<i>Pinus caribaea</i>	Manchado azul de la madera de pino	Cedeño <i>et al.</i> , 1996; Mohali, 1991
		Cancro y muerte	Urbez-Torres <i>et al.</i> , 2016
Uruguay	<i>Prunus persicae</i> , <i>Pyrus</i> sp. y <i>Malus</i> sp.		Sessa-Jusid <i>et al.</i> , 2015
Norte América	<i>Pinus elliotii</i> var. <i>elliotii</i>	Muerte de brotes	Rowan, 1982

Fuente: propio actualizado de Picos-Muñoz *et al.*, 2014.

Descripción morfológica

El género *Lasiodiplodia* presenta una característica principal que separa al género de otros cercanamente emparentados, la presencia de picnidios, paráfisis y estriaciones longitudinales en conidios maduros. El conidioma es estromático, simple o agregado, superficiales o inmerso en el tejido del hospedero y una vez maduro emerge de éste, es de color café oscuro, unilocular, de pared gruesa color marrón, con frecuencia setoso, de hasta 5 mm de ancho, ostiolo central, papilado. Paráfisis hialinas, cilíndricas, tabicadas, regularmente ramificadas con los extremos redondeado hasta 55 μm de largo y 3-4 μm de ancho (Alves, 2008; Phillips *et al.*, 2013).

Los conidióforos son hialinos, simples, a veces septados y ramificados, cilíndricos, que surgen de las capas internas de las células que recubren los lóculos. Las células conidiogénicas son hialinas, de pared gruesa, lisas, cilíndricas a sub-obpiriformes, holoblásticas, con una o dos anelaciones. Los conidios son subovoides a elipsoidales, con ápices ampliamente redondeados, que se estrechan para truncar la base, más ancha a la altura del tercio superior, de paredes gruesas, con contenido granular, en un principio hialino y aseptados (amerospora), tornándose café oscuro una vez maduros, con 1 septo (didimospora), presentan depósitos de melanina en la superficie interior de la pared dispuestos longitudinalmente dando una apariencia estriada con medidas de (19–) 21.5–31.5 (–32.5) x (12–) 13–17(–18.5) μm y una proporción de 1.9 Largo/Ancho (Pitt y Hocking, 2009; Phillips *et al.*, 2013). Las colonias en medio de cultivo son moderadamente densas, con micelio aéreo, inicialmente blancas tornándose gris-olivo a los 7 días y con el tiempo adquieren un color gris oscuro (Tovar-Pedraza *et al.*, 2012; Phillips *et al.*, 2013).

Propiedades físicas y químicas del suelo

Para el desarrollo óptimo de las plantas es necesaria la interacción entre las características físicas, químicas y biológicas del suelo.

Dentro de las propiedades físicas se encuentra la textura, estructura, temperatura, densidad aparente las cuales determinan los regímenes de humedad y aeración del suelo (Binkley y Fisher, 2020). A su vez, el régimen térmico puede estar asociado a las variables físicas y color de suelo. La porosidad del suelo determina, el intercambio de gases como el oxígeno, que tiene estrecha relación con el desarrollo de la raíz. La estructura determina la forma como se agregan las partículas individuales (arena, limo, arcilla) del suelo. El desarrollo de la estructura que depende en gran parte de la materia orgánica determina las relaciones de aireación, infiltración, humedad y temperatura del suelo (Castellanos, 2000).

La textura y la estructura influyen en la cantidad y disponibilidad de agua y en cierto grado en la fertilidad del suelo. En general, las clases texturales del suelo son: gruesa, media, fina, en función de la presencia de partículas finas del suelo (menores a 0.02 mm). En la primera se encuentra los suelos con más del 50% de arena con cierto porcentaje de arcilla, el cual agrupa arena, arena franco y franco arenoso; la característica principal de este grupo es la baja capacidad de retener agua y nutrimentos, por su alta proporción de poros grandes y baja capacidad de intercambio catiónico.

Los suelos de textura media son aquellas que poseen porosidad equilibrada, que contienen menos de 35 a 40% de arcilla y menos de 50% de arena; los cuales permiten buenas condiciones de aireación y drenaje; en este se agrupa los franco, franco limoso,

franco arcilloso, franco arcillo arenoso y franco arcillo limoso. Este grupo son considerados ideales para la producción agrícola por su amplia disponibilidad de agua y nutrimentos. En el último grupo textural se encuentran los suelos con más de 40% de arcilla y aquellos con más de 60% de limo; dentro de éste se agrupan la arcilla, arcilla limosa, arcilla arenosa y limo. Presentan alta capacidad de retención de agua y normalmente presentan alta fertilidad natural (Castellanos, 2000).

Dentro de las propiedades químicas está la capacidad de intercambio catiónico (CIC) y se define como el número de cargas negativas del suelo por cada unidad de masa del suelo; y se expresa en centimol carga por kg de suelo ($\text{Cmol}_c\text{kg}^{-1}$) (Osman, 2013); es un indicador indirecto de la capacidad amortiguadora de los suelos, estima los sitios de carga de las arcillas y materia orgánica, considerando las cargas permanentes y las dependientes de pH (Castellanos, 2000). Del mismo modo el pH es una variable importante para el suelo ya que se relaciona con la solubilidad de nutrientes de la solución del suelo. Es decir, la disponibilidad de los nutrimentos para las plantas y los microorganismos del suelo, los cuales mineralizan la materia orgánica. La máxima disponibilidad de la mayoría de los nutrimentos como el Nitrógeno, Fosforo, Calcio, Magnesio, Potasio, Azufre, Hierro, Manganeseo, Cobre, Zinc, Boro y Molibdeno se obtiene cuando el pH del suelo se encuentra cercano a la neutralidad entre 6.0 y 6.5 (Castellanos, 2000; Pérez *et al.*, 2017).

Hongos del suelo

La productividad y la salud de los sistemas agrícolas dependen en gran medida de los procesos funcionales llevados a cabo por las comunidades microbianas del suelo,

además son utilizadas como indicador de la fertilidad y sanidad de la misma. El manejo de los recursos vegetales incide sobre este componente afectando tanto su biodiversidad como la densidad de las poblaciones microbianas (Olalde *et al.*, 1998). Existen numerosos factores que afectan la estructura y el funcionamiento de las comunidades microbianas del suelo destacando el clima, propiedades físicas y químicas del suelo como el pH, materia orgánica, humedad, aireación, temperatura, concentración del ión hidrógeno, fertilizantes orgánicos e inorgánicos, compactación así como las especies vegetales (Alexander, 1987; Frey *et al.*, 2004; Fierer y Jackson, 2006)

Los hongos comprenden un grupo diverso de organismos que desempeñan roles fundamentales en el ecosistema; contribuyen a los procesos y la capacidad productiva del suelo, regulación del ciclo de nutrientes, degradadores de material vegetal y patógenos de diversas plantas (Hawksworth, 2001; Zeilinger *et al.*, 2015). La mayoría de las especies fúngicas se concentra en la rizósfera; en menor cantidad en suelos alejados de la zona y residuos vegetales en descomposición, el cual poseen carbono suficiente que permite el crecimiento continuo de hongos del suelo, los cuales juegan un papel en el ciclo mineral y pueden oxidar formas reducidas de N y S (Bridge and Spooner, 2001; Pacasa-Quisbert *et al.*, 2017).

Para el desarrollo de las comunidades fúngicas del suelo influye en gran medida la materia orgánica y éstas suelen tener mayor capacidad de adaptación a rangos de pH más amplios que otros microorganismos del suelo (Rousk *et al.*, 2009). Algunas prácticas de manejo como el encalado y fertilización conducen a una disminución de la diversidad de la misma ya que generalmente llega a inducir el aumento de la comunidad bacteriana,

generando cambios en las propiedades funcionales microbianas y por consiguiente un impacto en la función del suelo (Lovell, 1995).

Los géneros de hongos más frecuentes colonizadores de suelo que se han reportados son *Mucor*, *Rhizopus*, considerados como saprófitos; *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, con especies patógenas de importancia económica en frutales y marchitez vascular (Dirk *et al.*, 2019). La abundancia, las actividades fisiológicas y bioquímicas de la flora fúngica varían de acuerdo al tipo de hábitats y mayormente se encuentra en los horizontes superficiales del suelo donde existen las condiciones para su desarrollo como microclimas y disponibilidad de recursos nutricionales; sin embargo éstos se ven afectados cuando se eleva el nivel de compactación del suelo y la aplicación de productos químicos (Nielse, 2002; Pacasa *et al.*, 2017)

En los suelos forestales, las comunidades fúngicas son las más abundantes, especialmente en suelos con pH ácido, condición que limita el crecimiento de bacterias y actinomicetos. Los hongos son muy dependientes del sustrato y estacionalidad de lluvias (Enríquez-Velázquez *et al.*, 2017).

La nutrición mineral y su relación con las enfermedades de plantas

Para que se presente una enfermedad en una planta es necesaria la interacción específica de varios factores, las cuales intervienen en la susceptibilidad de la misma. Así mismo, el patógeno debe estar presente en condiciones específicas requeridas para que ésta se desarrolle, una de las cuales puede ser el ambiente químico del suelo donde se desarrolla el cultivo. Diversos estudios mencionan que los nutrientes minerales

pueden aumentar o disminuir la resistencia a plagas y enfermedades debido a su efecto en el patrón de crecimiento, en la morfología, anatomía y particularmente en la composición química de la planta. Está comprobado que si hay condiciones de exceso de humedad, algunos elementos como el N, que promueven el crecimiento favorecen la severidad de enfermedades ocasionados por hongos que actúan como parásitos obligados, caso contrario para parásitos facultativos. Sin embargo, las plantas enfermas desarrolladas con una nutrición balanceada pueden resistir más el efecto de los patógenos, lo cual se traduce en un mejor desarrollo y rendimiento de la propia planta (Velasco, 1999; Munévar, 2004).

En un estudio detallado sobre la nutrición en relación con la enfermedad, fue la realizada en palma de aceite, en donde los resultados muestran que carencias y desbalance de algunos nutrimentos actúan como factores de predisposición de la pudrición del cogollo causado por *Thielaviosis paradoxa*, también señalan que los desbalances entre N y K, Ca y B y entre los elementos Ca, Mg y K propician el desarrollo de la enfermedad (Cristancho *et al.*, 2004).

De igual forma para hongos endófitos, Motta *et al.* (2004), mencionan que pueden estar más relacionadas a deficiencias de los principales macronutrimentos, junto con condiciones de temperatura y humedad óptima.

Al igual que la nutrición, la textura del suelo también es importante considerar, debido a que gran parte de la concentración de los elementos minerales está muy relacionada a la capacidad que tiene éste en la retención de agua. Por ejemplo en investigaciones

realizadas por Lugo *et al.* (2006), se encontró una correlación entre suelos con textura gruesa y la muerte de árboles forestales, debido a que este grupo textural posee poca capacidad de retención de humedad y nutrimentos, llevando a la planta a estrés hídrico y nutricional permanente, creando condiciones de inestabilidad en las plantaciones que las hacen susceptibles a enfermedades.

LITERATURA CITADA

- Alexander, M. 1987. Introducción a la Microbiología del Suelo. AGT editor, S.A. México.
- Binkley, D. and Fisher, R. 2020. Ecology and management of forest soils (5th ed.). UK: Wiley-Blackwell
- Bridge, P. and Spooner, B. 2001. Soil fungi: diversity and detection. *Plant and soil*, 232:147-154. Doi.org/10.1023/A:1010346305799.
- Center for Agricultural Bioscience International. 2010. *Lasiodiplodia theobromae*. Distribution maps of plant diseases. CABI Wallingford UK. Disponible en: <https://www.cabi.org/isc/abstract/20103281413>
- Center for Agricultural Bioscience International. 2019. Caribbean pine, Forestry Compendium. Wallingford, Reino Unido: CAB International. <https://www.cabi.org/isc>.
- Cappa, E. P., Marco, M., Garth, N. D. and Last, I. S. 2012. Performance of *Pinus elliottii*, *Pinus caribaea*, their F1, F2 and backcross hybrids and *Pinus taeda* to 10 years in the Mesopotamia region, Argentina. *New Forests*, 44:197-218. Doi: 10.1007/s11056-012-9311-2
- Carey, J. H. 1992. *Pinus elliottii*. In: Fire Effects Information System (FEIS) U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fire Sciences Laboratory. Disponible en: <https://www.fs.fed.us/database/feis/plants/tree/pinell/all.html>
- Castellanos, J. Z. 2000. Manual de Interpretación de Análisis de Suelos y Aguas. 2a edición. Intagri.
- Cedeño, L., Mohali, S. and Palacios-Pru, E. 1996. Ultrastructure of *Lasiodiplodia theobromae* causal agent of *Caribbean pine* blue stain in Venezuela. *Interciencia*, 21:264-271. <https://www.researchgate.net/publication/286999119>

- Cibrian, T. D. 2016. Manual para la Identificación y Manejo de Plagas en Plantaciones Forestales Comerciales. CONAFOR. México.
- Cleary, M., Oskay, F., Dogmus, H. T., Lehtijärvi, A., Woodward, S. and Vettraiño, A. M. 2019. Cryptic risks to forest biosecurity associated with the global movement of commercial seed. *Forests* 10:459. Doi.org/10.3390/f10050459
- Cristancho, R. J. A., Castilla, C. C., Rojas, M. M. Munévar, F. y Silva, J. H. 2007. Relación entre la saturación de Al, Mg, K y la tasa de crecimiento de la pudrición de cogollo de la palma de aceite en la zona oriental Colombiana. *Palmas* 28(2):25-35. <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/1209>
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 1962. *Pinus caribaea*. CONABIO. http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/55-pinac2m.pdf
- Dieters, M. and Brawner, J. 2007. Productivity of *Pinus elliotii*, *P. caribaea* and their F1 and F2 hybrids to 15 years in Queensland, Australia. *Annals of Forest Science*, 64:691-698. DOI: 10.1051 / bosque: 2007049
- Dirk, E. J. D., Trevors, J. T., Soares, R. A. and Nannipieri, P. 2019. *Modern Soil Microbiology, Third Edition*. CRC Press. New York.
- Enríquez-Velázquez, O., Aguilar-Aguilar, R., Valencia-Cantero, E. y Velázquez-Becerra, C. 2017. Perfil fisicoquímico y microbiológico de tres distintos suelos forestales y su efecto en el crecimiento de *Pinus devoniana* Lindl. *Polibotánica*, 44:109-118. Doi.org/10.18387/polibotanica.44.8
- Fernández, R., Rodríguez, A. F., Lupi, A., Hernández, A. y Reis, H. 1999. Efectos de diferentes prácticas de preparación del terreno y fertilización sobre el crecimiento inicial de *Pinus* spp. en el NE Argentino. *Bosque* 20(1):47-55. DOI: 10.4206 / bosque.1999.v20n1-05
- Fierer, N. and Jackson, R. B. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103: 626–631. Doi.org/10.1073/pnas.0507535103
- Fraedrich, S. W., Miller, T. and Zarnoch, S. J. 1994. Factors affecting the incidence of black seed rot in slash pine. *Canadian Journal of Forest Research*, 24:1717-1725. DOI:10.1139 / x94-222
- Frey, S. D., Knorr, M., Parrent, J. L., Simpson, R. T. 2004. Chronic nitrogen enrichment affects the structure and function of the soil microbial community in temperate hardwood and pine forests. *Forest Ecology and Management*, 196:159–171. Doi.org/10.1016/j.foreco.2004.03.018

- González, E. Umaña, G. y Arauz, L. F. 1999. Combate de la pudrición peduncular del mango causado por *Botryodiplodia theobromae* Pat., mediante el mantenimiento de los pedicelos y el deslechado sobre laminas. *Agronomía Costarricense*, 23(1):31-35. https://www.mag.go.cr/rev_agr/v23n01_031.pdf
- Greaves, E. D., Marin, Y., Visaez, F. and Hernández E., J. V. 2015. Forestry plantations of *Pinus caribaea* in Venezuela as a solar energy collector. *Interciencia*, 40(7):457-464. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33940000004>
- Hawksworth, D. L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105:1422-1432. DOI: 10.1017/S0953756201004725
- Hernández, F. L. M., Gómez, J. R. y Andrés, A. J. 2013. Importancia, plagas insectiles y enfermedades fungosas del cultivo del guanábano. *Campo Experimental Santiago Ixcuintla*, INIFAP. Libro Técnico No. 1. Santiago Ixcuintla, Nayarit, México.
- Instituto Nacional de Bosques. 2017. Pino caribe (*Pinus caribaea* var. *hondurensis* (Sénécl.) W. H. Barrett & Golfari). Paquete Tecnológico Forestal. Guatemala. INAB. http://www.itto.int/files/itto_project_db_input/2802/Technical/PINO%20CARIBE.pdf
- Lohrey, E. and Susan, V. 2004. Study on slash pine (*Pinus elliottii*) plantation management in South Eastern USA. Disponible en https://www.srs.fs.usda.gov/pubs/misc/ag_654/volume_1/pinus/elliottii.htm
- Lovell, R. D., Jarvis, S.C., and Bargett, R. D. 1995. Soil microbial biomass and activity in long-term grassland: Effects of management change. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(7):969-975. Doi.org/10.1016/0038-0717(94)00241-R
- Martínez, H. H. A. 2014. Preselección de especies en la consultoría “Fomento de la reforestación comercial para la mejora y conservación de las reservas de carbono”. Moravia, Costa Rica, FONAFIFO (Fondo Nacional de Fomento Forestal). 39 p. http://reddcr.go.cr/sites/default/files/centro-de-documentacion/fomento_de_la_reforestacion_comercial_para_la_mejora_y_conservacion_de_las_reservas_de_carbono.pdf
- Martiñón-Martínez, R. J., Vargas-Hernández, J. J., López-Upton, J., Gómez-Guerrero, A. y Vaquera-Huerta, H. 2010. Respuesta de *Pinus pinceana* Gordon a estrés por sequía y altas temperaturas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33(3): 239-248. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v33n3/v33n3a8.pdf>
- Mohali, S. 1993. Estudio histológico de Madera de pino caribe con manchado azul causado por *Botryodiplodia theobromae*. *Fitopatología Venezolana*, 6:14-17. <https://www.researchgate.net/publication/256437953>

- Mullen, J. M., Gilliam, C. H., Hagan, A. K. and Morgan-Jones, G. 1991. Canker of dogwood caused by *Lasiodiplodia theobromae*, a disease influenced by drought stress or cultivar selection. *Plant disease*, 75(9):886-889. Doi: 10.1094/PD-75-0886
- Munévar, F. 2004. Relación entre la nutrición y las enfermedades de las plantas. Palmas. Vol. 25. Tomo II: 171:178. <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/nutrici%C3%B3nylasenfermedadesenplantas.pdf>
- Motta, V. D. F., Arias A., N. A., Munévar M., F., Aldana D., J. A., Rairán C., N., Córdoba, H., Esteban, L. J. y Calvache, H. 2004. Relación entre la nutrición del cultivo y la incidencia de la *Pestalotiopsis* de la palma de aceite en las zonas norte y central de Colombia. Palmas. Vol. 25. Tomo II. <http://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/1081/1081>
- Nielsen, M. N. and Winding, A. 2002. Microorganisms as Indicators of Soil Health. National Environmental Research Institute, Denmark. Technical Report No. 388. https://www.dmu.dk/1_viden/2_Publikationer/3_fagrappporter/rapporter/FR388.pdf
- Ogundana, S. K. 1983. Life Cycle of *Botryodiplodia theobromae*, a soft rot pathogen of yam. *Journal of Phytopathology*, 106:204-213. Doi.org/10.1111/j.1439-0434.1983.tb00045.x
- Olalde, P. V y Aguilera, G. L. I. 1998. Microorganismos y Biodiversidad. *Terra Latinoamericana*, 16(3):289-292. <https://www.redalyc.org/pdf/573/57316312.pdf>
- Osman, K. T. 2013. *Forest Soils Properties and Management*. New York: Springer Science & Business Media
- Pacasa-Quisbert, F., Loza-Murguía, M. G., Bonifacio-Flores, A., Vino-Nina, L. y Serrano-Canaviri, T. 2017. Comunidad de hongos filamentosos en suelos del Agroecosistema de K'iphak'iphani, Comunidad Choquenaira-Viacha. *Journal Selva Andina Research Soc.*, 8:2-25. DOI: 10.36610 / j.jsars.2017.080100002
- Pérez, R. A., Galvis, S. A., Bugarín, M. R., Hernández M., T. M., Vázquez P., M. A. y Rodríguez, G. A. 2017. Capacidad de intercambio catiónico: descripción del método de la tiourea de plata (AgTU+ n). *Rev. Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 8:171-177. DOI:10.29312/remexca.v8i1.80
- Perry, J. P. 1991. *The Pines of Mexico and Central America*. Portland, Oregon. Timber Press. <https://www.cabi.org/ISC/abstract/19910653262>
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z. and Crous, P. W. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76:51-167. Doi: 10.3114 / sim0021

- Picos-Muñoz, P. A., García-Estrada, R. S., León-Felix, J., Sañudo-Barajas, A. y Allende-Molar, R. 2015. *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: Taxonomía, hospedantes, diversidad y control. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 33: 54-74. https://www.smf.org.mx/rmf/Vol3312015/ArticulosDeRevision/1406_1_2015.pdf
- Pitt, J. and Hocking, A. 2009. *Fungi and Food Spoilage*. 3 ed. Springer & Business Media.
- Ploetz, R. C. 2003. *Diseases of Tropical Fruit Crops*. CABI Publishing. Wallingford, UK. Pp. 76-77.
- Rasmussen, A., Smith, T. E. and Hunt, M. A. 2009. Cellular stages of root formation, root system quality and survival of *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* cuttings in different temperature environments. *New Forests*, 38:285–294. DOI 10.1007/s11056-009-9147-6
- Rousk, J., Brookes, P. C. and Baath, E. 2009. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:1589-1596. Doi:10.1128/AEM.02775-08
- Russell, M. B. and Honkala H. B. 1990. *Silvics of North America: 1. Conifers; Agriculture Handbook 654*. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Washington, DC. (Vol. 2). Disponible en: <https://www.forestasyst.org/conifers/elliottii.htm>
- Shaw, K. 1997. Girdling roots. *Arnoldia*. Arnold Arboretum of Harvard University, 37: 242-247. <http://arnoldia.arboretum.harvard.edu/pdf/articles/1977-37-5-girdling-roots.pdf>
- Sun, D. and Dickinson, G. 1993. Responses to salt stress of 16 Eucalyptus species, *Grevillea robusta*, *Lophostemon confertus* and *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. *Forest Ecology and management*, 60: 1-14. Doi.org/10.1016/0378-1127(93)90019-J
- Tovar-Pedraza, J. M., Mora-Aguilera, J. A., Nava-Díaz, C., Téliz-Ortíz, D., Valdovinos-Ponce, G., Villegas-Monter, A. y Hernández-Morales, J. 2012. Identificación, patogenicidad e histopatología de *Lasiodiplodia theobromae* en injertos de zapote mamey en Guerrero, México. *Agrociencia*, 46:147-161. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v46n2/v46n2a5.pdf>
- Tucuch, C., F. M., Palacios, P. A., Ku, N. R. y Guzmán, E. C. 2005. Manejo del cultivo de mango en el estado de Campeche. *Campo Experimental Edzna, INIFAP. Folleto Técnico*. Campeche, Camp., México. <http://www.cesix.inifap.gob.mx/frutalestropicales/articulos/37.pdf>
- Velasco, V. V. A. 1999. Papel de la nutrición mineral en la tolerancia a las enfermedades de las plantas. *Terra Latinoamericana*, 3(17):193-200. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57317303>

- Wainwright, M. 1988. Metabolic diversity of fungi in relation to growth and mineral cycling in soil a review. *Transaction of the British mycological Society*, 90:159-170. Doi: 10.1016/s0007-1536(88)80084-6
- Zeilinger, S., Gupta, V. K., Dahms, T. E., Silva, R. N., Singh, H. B., Upadhyay, R. S., Gomes, E. V, Tsui, C. K. and Nayak, S. C. 2015. Friends or foes Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 40:182–207. Doi: 10.1093 / femsre / fuv045
- Zech, W. and Drechsel, P. 1992. Multiple mineral deficiencies in forest plantations in Liberia. *Forest Ecology and Management*, 48(2):121-143. Doi.org/10.1016/0378-1127(92)90126-T

CAPITULO 1. ETIOLOGÍA DEL AMARILLAMIENTO DEL PINO HÍBRIDO (*Pinus elliotii* var. *elliotii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*) EN VERACRUZ, MÉXICO

1.1 RESUMEN

El amarillamiento del pino híbrido (*Pinus elliotii* var. *elliotii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis*) es una condición anormal muy frecuente presente en las plantaciones productoras de resina en el sureste de México, generando una deficiencia en el desarrollo de los árboles en la plantación. El presente estudio, tuvo como objetivo determinar la etiología del amarillamiento de árboles de pino híbrido, mediante la caracterización morfológica y molecular incluyendo la verificación de la patogenicidad del agente causal. En diciembre de 2018, en las plantaciones forestales comerciales del sur de Veracruz, se colectaron muestras de raíz y tallo de árboles con amarillamiento y muestras asintomáticas. De los 52 árboles muestreados, en 18 de ellos, se logró aislar al hongo *Lasiodiplodia* sp. provenientes del tallo, generando una asociación hospedante-patógeno del 34.6%, de la cual, el 24.6% se aislaron de muestras con amarillamiento, mientras que el 10% restante se aisló de árboles asintomáticos. Se seleccionaron dos cepas representativas para la caracterización morfológica y cuatro cepas para la identificación molecular mediante el análisis filogenético de la región ITS, los genes β -tubulina (β -*tub*) y factor de elongación 1-alfa (*TEF1- α*). Se identificaron tres especies de *Lasiodiplodia*: *L. brasiliense*, *L. iraniensis* y *L. theobromae*. Por su prevalencia y asociación constante con los síntomas bajo estudio, la cepa *L. theobromae* se seleccionó para la prueba de patogenicidad. Los síntomas de amarillamiento, seguida con una deshidratación gradual iniciando en la

zona inoculada al ápice, desprendimiento de corteza, y necrosis de tejidos vasculares, se presentaron cinco días después de la inoculación (ddi) en condiciones de laboratorio, mientras que en condiciones de vivero se observaron a los 8 ddi.

Palabras claves: Identificación filogenética, *Lasiodiplodia* sp.

ETIOLOGY OF THE YELLOWING OF THE HYBRID PINE (*Pinus elliottii* var. *Elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*) IN VERACRUZ, MEXICO

1.2 ABSTRACT

Yellowing of hybrid pine (*Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis*), is a very frequent abnormal condition present in resin producing plantations in southeastern Mexico, generating a deficiency in the development of the trees in the plantation. This study aimed to determine the etiology of the yellowing of hybrid pine trees through morphological and molecular characterisation, including the verification of pathogenicity of the causal agent. In december 2018, at the commercial forest plantations in south of Veracruz, root and stem samples of trees with yellowing and asymptomatic were collected. Of the 52 trees sampled, in 18 of them, the fungus *Lasiodiplodia* sp. was isolated of the stem, generating a host/pathogenic association of 34.6%, of which 24.6% were isolated from yellowing samples, while the remaining 10% from asymptomatic trees. Two representative strains were selected for morphological characterization and four strains for molecular identification by phylogenetic analysis of the ITS region, the genes β -tubulin (β -*tub*) and 1-alpha elongation factor (*TEF1- α*). Three species of *Lasiodiplodia* were identified: *L. brasiliense*, *L. iraniensis* and *L. theobromae*. Because of its prevalence and constant association with the symptomatology under study, the *L. theobromae* strain was selected for the pathogenicity test. Symptoms of yellowing, followed by gradual dehydration starting in the inoculated area at the apex, bark shedding, and vascular tissue necrosis, occurred five days after inoculation (dai) under laboratory conditions, while in nursery conditions they were observed at 8 dai.

Keywords: Phylogenetic identification, *Lasiodiplodia* sp.

1.3 INTRODUCCIÓN

El pino híbrido obtenido de la cruce de *P. elliotii* var. *elliotii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* (PEExPCH) posee una gran importancia económica principalmente en América del Sur, África Occidental y Australia (Dieters and Brawner, 2007). Las características de mayor interés de éste material genético parece derivarse de una recombinación de atributos de las dos especies parentales: mayor crecimiento y alto rendimiento de producción de resina por parte de *P. caribaea* var. *hondurensis*, combinado con firmeza del viento, adaptabilidad a sitios húmedos, alta densidad de madera y rectitud del tallo de *P. elliotii* var. *elliotii* (Dieters and Brawner, 2007; Rasmussen *et al.*, 2009; Cappa *et al.*, 2012).

A nivel mundial se estima que se obtienen más de un millón de toneladas de resina que se utiliza para la producción de resina colofobia y trementina (CONAFOR, 2012). México aporta a la producción mundial aproximadamente 20,000 toneladas por año, siendo *Pinus caribaea* var. *hondurensis* y *Pinus elliotii* var. *elliotii* dos de las especies resineras cosechadas principalmente en Veracruz (CONAFOR, 2012). La importancia de éste producto a nivel nacional, radica en que aporta más del 50% del valor de la producción forestal no maderable (NOM-026-SEMARNAT-2005). Por su parte el pino caribeño o amarillo (*Pinus caribaea* var. *hondurensis* (Séneclauze) W.H.G. Barret & Golfari) es el pino tropical con mayor distribución geográfica, encontrado en forma natural en diferentes países incluyendo México (Robbins, 1983; INAB, 2017).

El proceso de producción del pino es susceptible a ser influenciado por diversos factores entre los que destacan los ambientales, plagas y enfermedades. Entre los ambientales,

incluye el clima y suelo que favorecen el desarrollo de diversas enfermedades destacando el manchado azul de la madera causado por *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maublanc. En etapas tempranas provoca la “muerte descendente” de los árboles, además de que su presencia se asocia desde la semilla (Mohali, 1993; Rees, 1988; Cleary *et al.*, 2019). El mayor impacto de la enfermedad se ha reportado en Venezuela causando degradación de las paredes celulares disminuyendo la dureza de la madera del pino caribeño y reduciendo su valor hasta un 50% (Mohali, 1993; Cedeño *et al.*, 1996).

Lasiodiplodia theobromae es una especie endófito con una amplia gama de hospedantes, muy extendida en países tropicales y subtropicales (CABI, 2010). En México, este patógeno es el agente causal de numerosas enfermedades en un amplio rango de especies de plantas. Está asociado a la muerte descendente, cáncer, gomosis, tizones, pudrición de raíz y frutos como mango, uva, papaya, rambután, yaca, zapote y cítricos (Picoz-Muñoz *et al.*, 2014). El proceso de infección a nivel anatómico que ocurre en ramas y tallos incluye ruptura de peridermis, colapso y necrosis de células corticales, floema, laticíferos, fibras externas del floema y cambium vascular impidiendo el flujo de fotoasimilados y como resultado muerte de ramas (Vásquez-López *et al.*, 2009; Tovar-Pedraza *et al.*, 2012). En especies forestales existen reportes en eucalipto (*E. grandis* y *E. cloeziana*) ocasionando cáncer en tallo y muerte asociada a *Neofusicoccum eucalyptorum* y *N. parvum*. La presencia de *L. theobromae* está relacionada con árboles de bajo estrés fisiológico (Chungu *et al.*, 2010). Debido a que se desconoce el agente causal del amarillamiento de los pinos en el sur de Veracruz, principal región de

producción de resina y por la importancia económica de PEE x PCH, el objetivo de este estudio fue determinar la etiología, mediante la caracterización morfológica, molecular así como la verificación de la patogenicidad del agente causal en pino híbrido.

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1 Lotes de estudio

El área de estudio se localiza en las plantaciones forestales comerciales de Uumbal localizado al sur de Veracruz. En diciembre de 2018, se seleccionaron 6 lotes de aproximadamente una hectárea cada una, distribuidas en las principales zonas de producción de pino híbrido (Figura 1) para muestreo de raíz y tallo de árboles con amarillamiento (Figura 2 A) y árboles asintomáticos (Figura 2 B), con el propósito de obtener aislamientos de hongos asociados. La selección de los lotes se realizó considerando aquellas zonas con historial de pérdidas por muerte y plantaciones de un año. Se muestrearon 52 árboles en total, los cuales presentaron los síntomas descritos. En el muestreo también se incluyeron 6 árboles asintomáticos con el fin de corroborar la presencia del patógeno.

1.4.2 Colecta del material biológico

La colecta del material vegetal se realizó a finales de diciembre de 2018 se tomaron de forma destructiva y estuvieron compuestas por cinco cortes en rodaja, dejando un espaciamiento de 30 a 40 cm por área de corte.

- 1 muestra o rodaja de la base del fuste
- 2 muestras en la parte media

- 2 muestras de la parte apical
- 100g de raíz distribuidos en cada cuadrante del árbol a 30 cm de profundidad.

Cada muestra se homogenizó, se colocaron en bolsas de polipapel, se etiquetaron y se mantuvieron en refrigeración a 6°C hasta su procesamiento en los Laboratorios de UUMBAL y Patología Forestal del Colegio de Postgraduados.

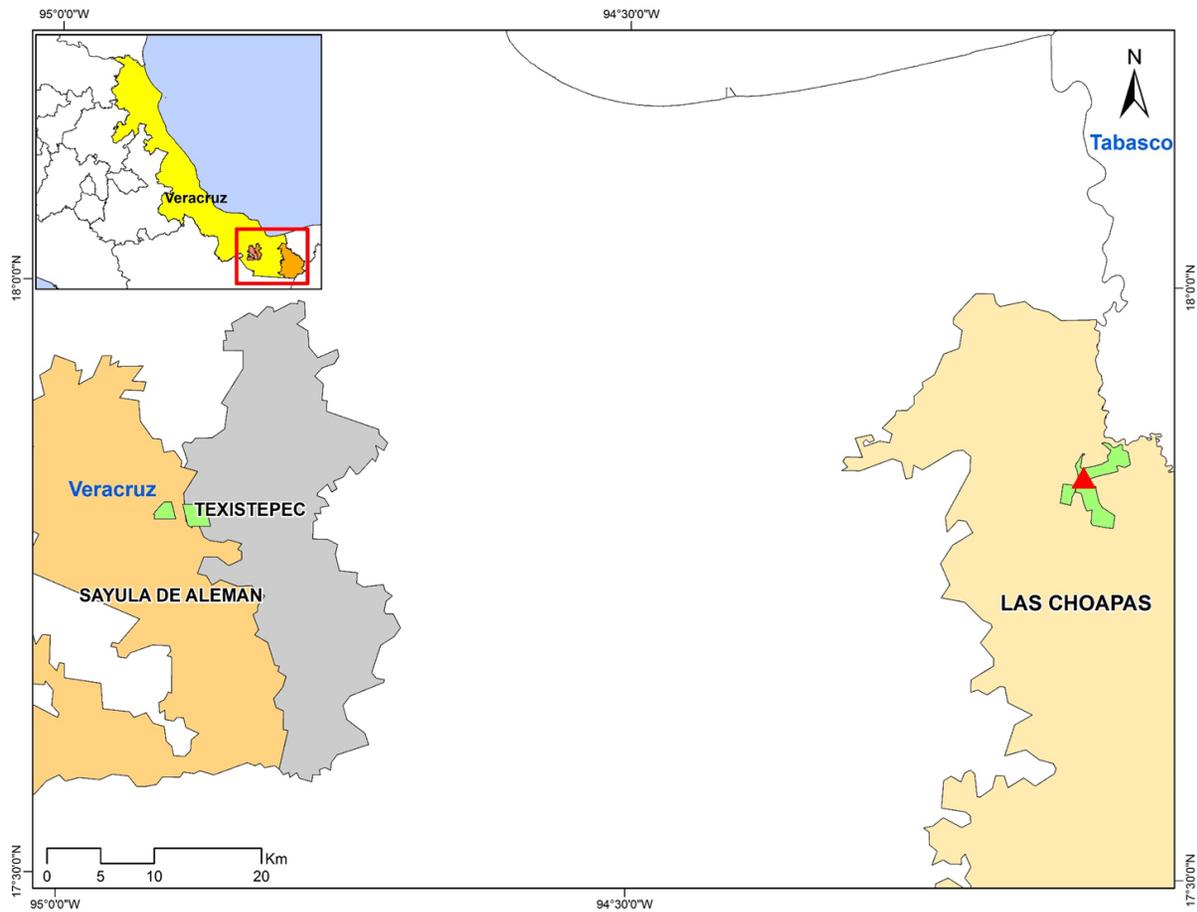


Figura 1. Ubicación de lotes de muestreo en las plantaciones de pino híbrido *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* (PEE x PCH) al sur de Veracruz.

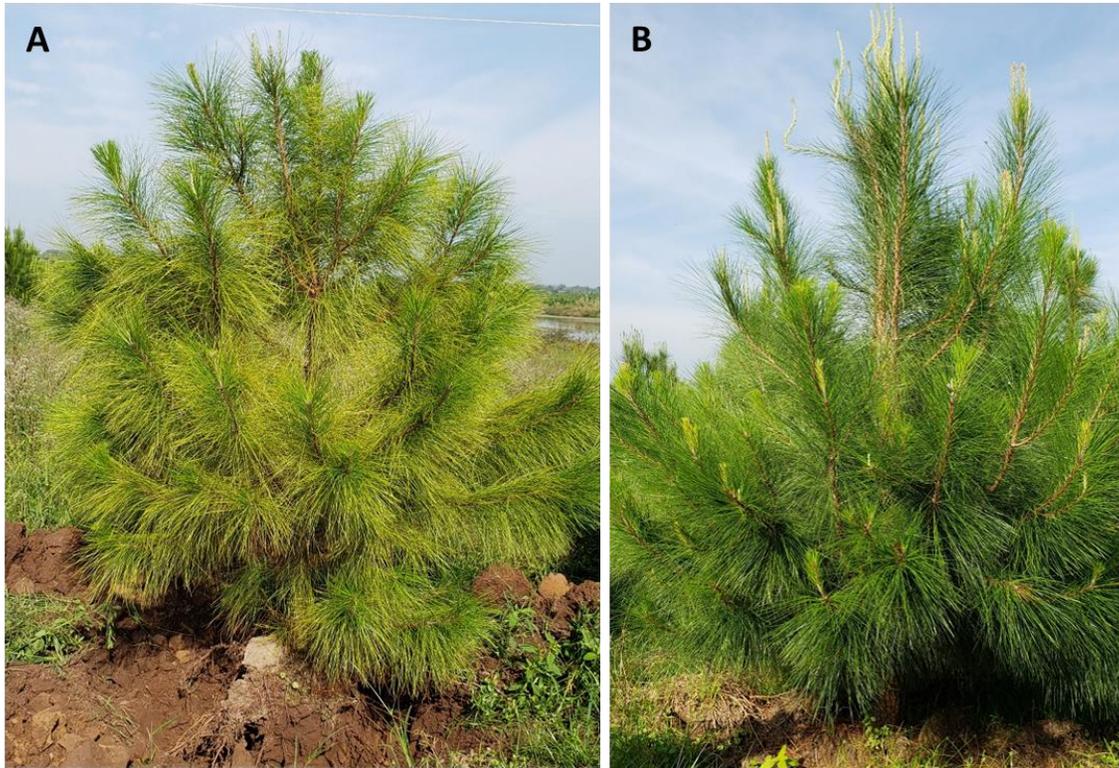


Figura 2. Selección de árboles muestreados, A) Árboles con amarillamiento generalizado y poco vigor, B) Árbol asintomático de color verde oscuro con desarrollo de brotes nuevos.

1.4.3 Aislamiento e identificación de *Lasiodiplodia* y *Pestalotiopsis* a partir de tejido vegetal

Las muestras de tejido, sintomático y asintomático, se fraccionaron en trozos de 4 a 5 mm, se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 3% por 5 minutos, se lavaron tres veces con agua destilada estéril por 1 minuto, y se secaron en papel filtro estéril. Posteriormente se colocaron cuatro trozos de tejido en cajas Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) y se incubaron bajo luz blanca a 28 ± 2 °C. Cada fracción de tejido se tomó como una repetición.

Una vez obtenido los aislamientos se procedió a observar e identificar en microscopio compuesto las características morfológicas del micelio y órganos reproductivos con aumentos de 40X y 60X, para ello se realizaron preparaciones con cinta adhesiva que consistió en extraer fragmentos de la colonia presionando suavemente el lado pegante de la cinta sobre el micelio aéreo del hongo y poner la cinta sobre porta objetos con una gota de ácido láctico. Las colonias con mayor prevalencia se transfirieron a nuevas cajas con PDA e incubaron en las mismas condiciones. Posteriormente, se purificaron mediante la técnica de cultivos monospóricos en agua agar, y finalmente colocándolos en PDA bajo las mismas condiciones de incubación para su caracterización morfológica y molecular.

1.4.4 Caracterización morfológica

Para la identificación se seleccionó dos cepas. A las colonias se les registraron las características de pigmentación y desarrollo de cuerpos fructíferos en PDA. Se realizaron cortes transversales de 10 picnidios mediante navaja Gillette®, se midieron largo y ancho de 100 conidios maduros, se registró su forma, septación, estriaciones y presencia de paráfisis. Las observaciones se realizaron en un microscopio compuesto marca Olympus modelo CX31-RBSFA. La identificación del género se realizó con las claves de Barnett & Hunter (1972) y para especie con las claves de Phillips *et al.*, (2013).

1.4.5 Identificación molecular

La extracción del ADN genómico se llevó a cabo empleando el método de CTAB (Doyle y Doyle, 1990), partiendo de cultivos monospóricos. La calidad y concentración del

mismo se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA®) y se diluyó a 50 ng μL^{-1} para la PCR. Se amplificó la región ITS del ADN ribosomal con los cebadores ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G -3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') usando los parámetros publicados por White *et al.* (1990), el gen factor de elongación (*TEF-1 α*) con los cebadores TEF1-688F (5'- CGG TCA CTT GAT CTA CAA GTG C-3') y TEF1-986R (5'-TAC TTG AAG GAA CCC TTA CC -3') (Alves *et al.*, 2008) y una parte de la región del gen β -tubulina con los cebadores β t2a (5'-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC -3') y β t2b (5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3') (Slippers, *et al.*, 2004). Las condiciones de PCR para ITS5 / ITS4 y β t2a / β t2b fueron de un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 2 min, seguido por 35 ciclos a 94 °C por 60 s, 58 °C por 60 s y 72 °C por 90 s, y una extensión final a 72 °C por 5 min. Para *TEF-1 α* las condiciones fueron 95 °C por 3 min, 35 ciclos a 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 60 s, y una extensión final a 72 °C por 5 min (White *et al.*, 1990; Urbez-Torres *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2013). Los productos de PCR se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, los fragmentos amplificados se purificaron con exoSAP-IT® siguiendo las especificaciones del fabricante, para su secuenciación se enviaron a Macrogen Inc., (Korea).

Para la reconstrucción filogenética se analizaron con el método de Máxima Verosimilitud (MV) e Inferencia Bayesiana (IB), utilizando los alineamientos concatenados de la región ITS, *TEF1* y β -*tub*. Las secuencias consenso se ensamblaron utilizando el software Geneious (Kearse *et al.*, 2012) y se alinearon usando MAFFT v.7. (Kato y Standley, 2013) incluyendo secuencias de referencia extipo descargadas de la base de datos de GenBank (Cuadro 1). El alineamiento concatenado se obtuvo con el software Mesquite

(Maddison y Maddison, 2018). Para MV, se usó la opción Máxima Verosimilitud más una prueba de Bootstrap rápido de 1000 generaciones y el modelo de sustitución nucleotídica GTR+G (General Time Reversible + distribución gama) en el software raxmlGUI 1.5b2 (Silvestro y Michalak, 2012). Para IB, se corrieron dos análisis paralelos de cuatro Cadenas de Markov Monte Carlo en el software MrBayes v.3.2.1 (Ronquist *et al.*, 2012), con 1, 500,000 de iteraciones (desviación estándar de la frecuencia de los 'splits' menor a 0.01) y muestreados cada 1000 iteraciones. Los primeros 25% de los datos se descartaron debido a la 'fase de calentamiento' y las probabilidades posteriores se calcularon con los datos remanentes. *Diplodia mutila* cepa CMW 7060 se utilizó como fuera de grupo. Los árboles obtenidos de ambos análisis se visualizaron en Figtree v.1.4.4 (Rambaut, 2010) y las secuencias generadas en este estudio se depositaron en la base de datos del GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

1.4.6 Pruebas de patogenicidad

En agosto de 2019 se realizaron inoculaciones para verificar la patogenicidad de *Lasiodiplodia theobromae* y *Pestalotiopsis* sp. Se inocularon plantas de la cruza de PEEXPCH (*Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis*) de 4.5 meses de edad. Los tratamientos utilizados fueron una cepa de *Lasiodiplodia* sp., y una de *Pestalotiopsis* sp., cultivadas en PDA a 27 ± 2 °C durante 18 días, tiempo después del cual se observó la presencia de picnidios con conidios maduros, el testigo consistió de PDA puro. La selección de la cepa para la prueba se realizó considerando la de mayor prevalencia. Se inocularon en 20 plantas cada una, 15 plantas se establecieron en ambiente controlado con 12 horas luz y 12 de oscuridad con un rango de temperatura de

29 a 31 °C; 5 plantas se colocaron en condiciones de vivero con un rango de temperatura de 25 a 43 °C. Previo a la inoculación, el tallo de las plantas se desinfectó superficialmente con agua destilada estéril y alcohol etílico al 70%, con un bisturí estéril de acero inoxidable se realizó una incisión en forma de U invertida de 5 mm de profundidad a una altura de 6 cm del nivel del sustrato. Con una aguja de disección, se cortaron discos de 4 mm de diámetro de PDA con micelio y un picnidio con conidios maduros de *L. theobromae*, del mismo tamaño se cortaron discos con conidios de *Pestalotiopsis* sp., los cortes se colocaron de forma individual en la herida quedando en contacto directo con el cambium expuesto. La herida se cubrió con la corteza extraída más una capa de algodón estéril humedecida con agua destilada estéril, después se cubrió con cinta parafilm para protegerla de la desecación y otros contaminantes. Las plantas se mantuvieron con riegos constantes para evitar muerte por sequía, incluyendo inyección de agua destilada estéril con jeringa de insulina en la zona de la herida.

1.4.7 Evaluación

Se realizaron observaciones diarias con el fin de monitorear el desarrollo del patógeno e inicio de los síntomas como marchitez, necrosis del tallo y desprendimiento de corteza. Al detectar los síntomas de la enfermedad, se procedió a hacer el reislamiento con el fin de comparar las características morfológicas con la cepa original.

Cuadro 2. Especies y cepas utilizadas para la reconstrucción filogenética, incluyendo hospedante, origen y número de acceso del GenBank. Las cepas reportadas en este estudio se muestran en negritas

Especie	Hospedante	País	Número de acceso GenBANK		
			ITS	TEF1- α	β - <i>tub</i>
<i>L. avicenniae</i>	<i>Avicennia marina</i>	Sudáfrica	KP860835	KP860680	KP860758
<i>L. brasiliense</i>	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	JX464063	JX464049	----
<i>L. brasiliense</i>	<i>Carica papaya</i>	Brasil	KC484797	KC481528	----
<i>L. brasiliense</i>	<i>Spondias purpurea</i>	Brasil	KT151808	KT151802	KT151805
<i>L. brasiliense</i>	<i>Andasonia</i> sp.	África	KU887094	KU886972	KU887466
<i>L. brasiliense</i>	Pino híbrido	México	MT103321	MT162469	MT212399
<i>L. bruguierae</i>	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	Sudáfrica	KP860832	KP860677	KP860756
<i>L. bruguierae</i>	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	Sudáfrica	KP860833	KP860678	----
<i>L. citricola</i>	<i>Citrus</i> sp.	Irán	GU945354	GU945340	----
<i>L. citricola</i>	<i>Citrus</i> sp.	Irán	GU945353	GU945339	----
<i>L. endophytica</i>	<i>Magnolia acuminata</i>	China	MK501838	MK584572	MK550606
<i>L. euphorbicola</i>	<i>Jatropha curcas</i>	Brasil	KF234543	KF226689	KF254926
<i>L. euphorbicola</i>	<i>Adansonia digitata</i>	Zimbabue	KU887187	KU887063	KU887494

<i>L. hormozganensis</i>	<i>Olea</i> sp.	Irán	GU945355	GU945343	----
<i>L. hormozganensis</i>	<i>Mangifera indica</i>	Irán	GU945356	GU945344	----
<i>L. hialina</i>	<i>Acacia confusa</i>	China	KX499879	KX499917	KX499992
<i>L. iraniensis</i>	<i>Andasonia</i> sp.	África	KU887123	KU887000	KU887501
<i>L. iraniensis</i>	<i>Mangifera indica</i>	Irán	GU945346	GU945334	----
<i>L. iraniensis</i>	<i>Juglans</i> sp.	Irán	GU945347	GU945335	----
<i>L. iraniensis</i>	Pino híbrido	México	MT103323	MT162471	MT212401
<i>L. jatrophiicola</i>	<i>Jatropha curcas</i>	Brasil	KF234544	KF226690	KF254927
<i>L. laosensis</i>	<i>Aquilaria crassna</i>	China	KY783471	KY848609	KY848552
<i>L. laosensis</i>	<i>Aquilaria crassna</i>	China	KY783450	KY848603	KY848536
<i>L. macrospora</i>	<i>Jatropha curcas</i>	Brasil	KF234557	KF226718	KF254941
<i>L. mahajangana</i>	<i>Terminalia catappa</i>	Madagascar	FJ900597	FJ900643	FJ900632
<i>L. mahajangana</i>	<i>Terminalia catappa</i>	Madagascar	FJ900595	FJ900641	FJ900630
<i>L. mediterranea</i>	<i>Quercus ilex</i>	Italia	KJ638312	KJ638331	----
<i>L. parva</i>	Suelo de Yuca	Colombia	EF622083	EF622063	----
<i>L. pseudoteobromae</i>	<i>Gmelina arborea</i>	Costa Rica	EF622077	EF622057	EU673111

<i>L. pseudoteobromae</i>	<i>Citrus aurantium</i>	Surinam	EF622081	EF622060	EU673112
<i>L. subglobosa</i>	<i>Jatropha curcas</i>	Brasil	KF234558	KF226721	KF254942
<i>L. subglobosa</i>	<i>Jatropha curcas</i>	Brasil	KF234560	KF226723	KF254944
<i>L. sterculiae</i>	<i>Sterculia oblonga</i>	Germania	KX464140	KX464634	KX464908
<i>L. thailandica</i>	<i>Mangifera. indica</i>	Tailandia	KJ193637	KJ193681	----
<i>L. thailandica</i>	<i>Phyllanthus acidus</i>	Tailandia	KM006433	KM006464	----
<i>L. theobromae</i>	Frutales	P. N. Guinea	AY640255	AY640258	EU673110
<i>L. theobromae</i>	<i>Leucospermum</i> sp.	USA	EF622074	EF622054	KU887531
<i>L. theobromae</i>	<i>Spondias purpurea</i>	Brasil	KT247466	KT247472	KT247475
<i>L. theobromae</i>	<i>A. occidentale</i>	Brasil	KT247469	KT247471	KT247477
<i>L. theobromae</i>	Pino híbrido	México	MT103322	MT162470	MT212400
<i>L. theobromae</i>	Pino híbrido	México	MT103324	MT162472	MT212402
<i>L. viticola</i>	<i>hybrid grape vignoles</i>	USA	HQ288227	HQ288269	HQ288306
<i>L. viticola</i>	<i>Vitis</i> sp.	USA	HQ288228	HQ288270	HQ288307
<i>D. mutila</i>	<i>Fraxinus excelsior</i>	Países bajos	AY236955	AY236904	AY236933

1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.5.1 Síntomas en campo y hongos aislados

En árboles de un año de edad se observaron síntomas de amarillamiento generalizado, porte bajo y anillamiento radicular. El anillado ocurre al emerger raíces en la base del tronco rodeándolo completamente hasta provocar una constricción, afectando el desarrollo normal de la raíz principal y secundaria (Figura 3 A, B, C) así como el crecimiento de los árboles, el transporte de agua y nutrientes en toda la planta, mostrando síntomas de deficiencia y estrés, por lo tanto, las deficiencias y estrés del hospedante son factores que favorecen la incidencia de *Lasiodiplodia* sp. (Shaw, 1997; Chungu *et al.*, 2010; Picos-Muñoz *et al.*, 2015).

De las 52 muestras colectadas, en 18 se aisló *Lasiodiplodia* sp., lo que correspondió al 34.5% del total de muestras, siendo C3, lote 3 y 7 con el mayor porcentaje de árboles positivos, de las mismas también se aisló *Pestalotiopsis* sp., en un 25 %. La presencia y las características morfológicas observadas de éste hongo coincidieron con las reportadas por Hu *et al.* (2007), quienes señalan que en varias especies de pinos lograron aislar más de diez especies endófitas de *Pestalotiopsis* sp.

Las cepas aisladas se obtuvieron de árboles sintomáticos y asintomáticos, lo cual coincide con lo reportado por Rubini *et al.* (2005), quienes aislaron a *L. theobromae* de ramas asintomáticos de cacao. Por su parte, Muniz *et al.* (2011), donde a través de microscopía electrónica de barrido observaron la existencia de hifas de *Lasiodiplodia theobromae* dentro de los vasos del xilema llegando a infectar el parénquima en árboles asintomáticos de nuez de la India (*Anacardium occidentale* L.), mientras que en árboles sintomáticos reportan una distribución extensa del hongo a lo largo del xilema

secundario, dentro de los vasos, infectando las células del parénquima, principalmente cerca de los canchros desarrollados durante el progreso de la enfermedad.

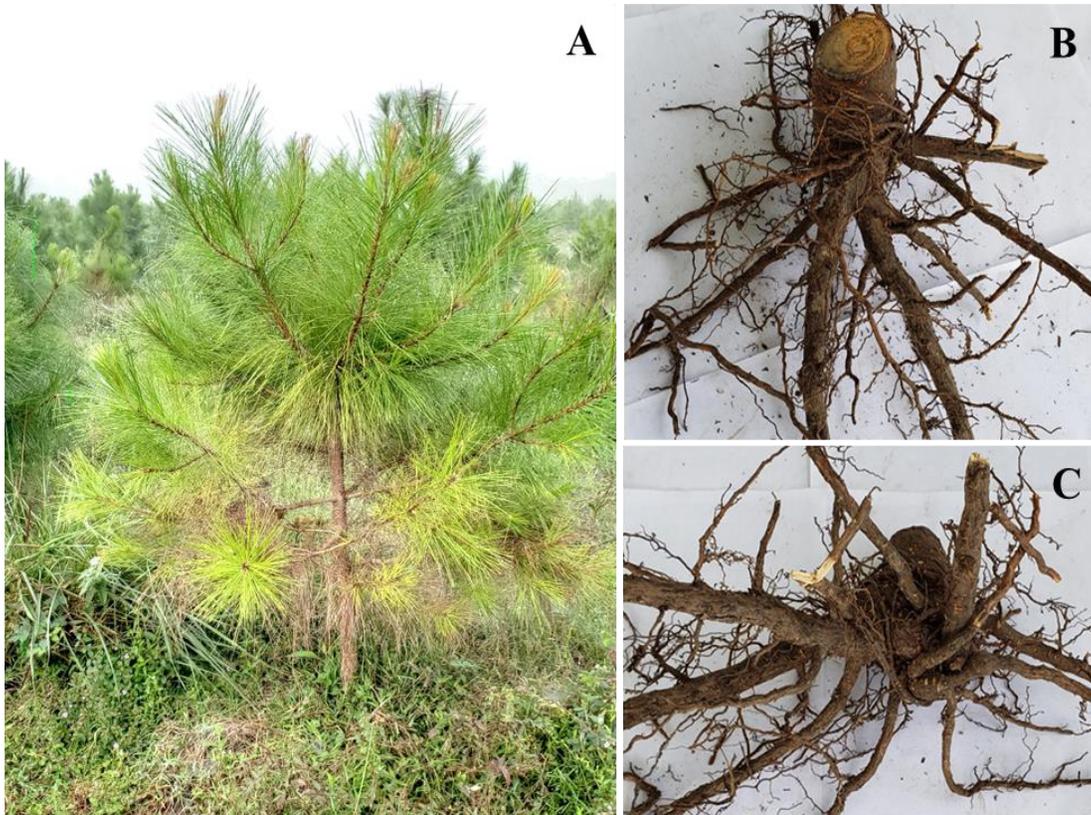


Figura 3. A) Síntomas en campo, árboles de pino híbrido con amarillamiento generalizado y poco vigor, positivo a *Lasiodiplodia* sp. B, C) Desarrollo radicular rodeando la base del tronco, efecto conocido como anillamiento radicular.

1.5.2 Identificación morfológica

Las colonias de *Lasiodiplodia* sp., en medio de cultivo PDA mostraron crecimiento micelial abundante en los primeros tres días. Inicialmente el micelio era sin pigmento, al tercer y cuarto día empezó a tornarse gris, llegando a ser gris oscuro y más denso en el centro de la caja petri. Conidiomas picnidiales se observaron después de 10 días. Desarrollo de varios picnidios en estroma, simples o compuestos, dispersos y frecuentemente agregados de color negro, obpiriformes, ostiolados (Figura 4 A, B).

Conidios inmaduros se formaron a los 15 y 18 días (Figura 3 C), los cuales fueron hialinos, elipsoidales a subovoides, amerosporas, con pared densa y contenido granular con presencia de células conidiogénicas y paráfisis hialinas (Figura 4 D, E). Los conidios maduros (23-25 días) fueron de color café oscuro, elipsoidales a ovoides, didimosporas, de 21.25-30 x 12-15 μm (\bar{x} =25.47 x 13.33) y estriaciones longitudinales irregulares (Figura 4 F). Las características morfológicas encontradas concordaron con la descripción taxonómica de *L. theobromae* (Alves *et al.*, 2008; Phillips *et al.*, 2013).

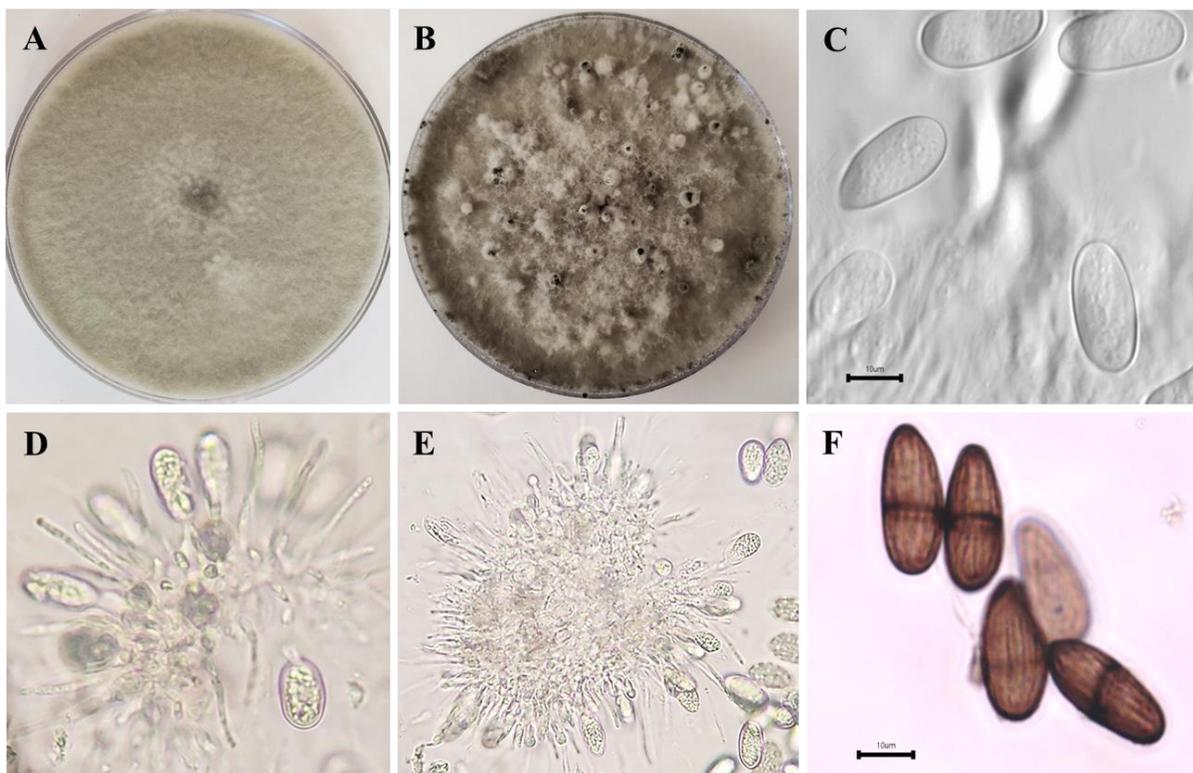


Figura 4. A) Colonia de *L. theobromae* en PDA con crecimiento micelial de color gris, de 5 días de edad. B) Micelio gris oliváceo con desarrollo de picnidios, 10 días después de la siembra. C) Conidios inmaduros, hialinos, amerosporas. D) Célula conidiogénica, hialina, cilíndrica, holoblástica. E) Paráfisis hialinas y cilíndricas. F) Conidios maduros subovoides, didimosporas, con estrías longitudinales, color café oscuro. Barra de escala=10 μm .

1.5.3 Identificación molecular

En esta investigación, se realizó la identificación molecular de las cepas estudiadas, usando un conjunto de datos concatenados de la región ITS, *TEF1- α* y *β -tub*, incluyendo cepas de referencia obtenidas del GenBank. El alineamiento final consistió de 44 taxones y 1216 caracteres incluyendo gaps, usando a *Diplodia mutila* como fuera de grupo. El análisis con IB de 1, 000,000 de iteraciones (desviación estándar de los 'splits' igual a 0.008938) generó 2002 árboles, de los cuales se descartaron el 25% en la fase de calentamiento (burnin phase), y las probabilidades posteriores se calcularon con los datos remanentes (1502 árboles). Ambos análisis IB y MV, generaron topologías similares. La cepa CP/VPC-1 se agrupó con el clado de *L. brasiliense* y las cepas CP/VPC-2 y CP/VPC-4 se agruparon con *L. theobromae*. Por último, la cepa CP/VPC-3 se agrupó con el clado de *L. iraniensis* (Figura 5), el cual está estrechamente relacionado con *L. jatrophicola*. De acuerdo con Correia *et al.* (2016) y Netto *et al.* (2017), *L. iranensis* está ampliamente relacionada filogenéticamente con *L. jatrophicola* aunque morfológicamente no son similares. Sin embargo Rodríguez-Galvez *et al.* (2017), mencionan que se consideran sinónimos debido a que la morfología es de menor importancia para discriminar especies y al no poder separarse basándose únicamente en secuencias de ITS y *TEF1- α* . Previamente, las tres especies encontradas se han reportado en limón persa (*Citrus latifolia* Tan.) en la zona citrícola de Martínez de la Torre Veracruz, por lo que se considera que no es específico para el pino híbrido (Bautista-Cruz *et al.*, 2019). En este trabajo *L. theobromae* fue la especie aislada con mayor frecuencia (50%) del total de las cepas analizadas; resultados similares se obtuvieron en trabajos realizados por Bautista-Cruz *et al.* (2019) en limón persa y en Brasil cuando se

investigaron frecuencias de las especies de *Lasiodiplodia* asociadas con la muerte de viñedos (Correia *et al.*, 2016), muerte regresiva, la pudrición del mango (Marques *et al.*, 2013) y la pudrición del tallo de la papaya (Netto *et al.*, 2014).

1.5.4 Pruebas de patogenicidad

El 53% de las plantas inoculadas con *L. theobromae* establecidas en condiciones de laboratorio mostraron síntomas de amarillamiento seguido de marchitez, desprendimiento de corteza y muerte 5 días después de la inoculación (Figura 6 B). Los síntomas manifestados en las plantas inoculadas fueron diferente a lo observado en las plantaciones, lo cual indica que la edad del hospedante, es un factor que predispone la agresividad y virulencia del hongo. El tiempo de aparición de los síntomas fue similar con lo reportado por Cedeño *et al.* (1996) y Mohali *et al.* (2002) al observar daños y signos del hongo en bloques de madera de *Pinus caribaea*, *Pinus oocarpa* y *Azadirachta indica* en 5 días posteriores a la inoculación. Alrededor del área inoculada se observó el desarrollo de pequeños picnidios globosos de color gris oscuro inmersos en el tejido, junto con una necrosis que se extendió a lo largo del tejido vascular (Figura 6 C, D, E), provocando el taponamiento de los haces vasculares, dando como resultado el amarillamiento y marchitamiento de las plántulas. Conidios inmaduros hialinos, amerosporas con pared densa, junto con conidios maduros café oscuro, elipsoidales, didimosporas y con estriaciones longitudinales se observaron dentro de los picnidios ostiolados (Figura 6 F, G). El patógeno se reisoló en PDA, donde desarrolló micelio gris oscuro y picnidios, coincidiendo con las características de la cepa original (Figura 6 H). La manifestación y el rápido avance de los síntomas se asoció a las heridas profundas

realizadas en la base del tallo de las plántulas y las condiciones de microambiente (>29 °C y 100% de humedad relativa) en que fueron establecidas, facilitando la penetración del patógeno al tejido vascular (Ploetz *et al.*, 1996; Pavlic *et al.*, 2004). Los síntomas iniciales coincidieron con los reportados en el material parental (*P. caribaea* var. *hondurensis*) por Greaves *et al.* (2015) e INAB (2017), los cuales consisten en muerte progresiva acompañada de un amarillamiento generalizado o irregular, ramas secas y disminución de crecimiento en altura y diámetro. Las plantas inoculadas con *Pestalotiopsis* sp., no mostraron síntomas durante el periodo de evaluación, lo que indica que se trata de una cepa endófito (Hu *et al.*, 2007). Así mismo, en las plantas testigo no se observaron síntomas de enfermedad, solamente una pequeña necrosis por efecto de la cicatrización de la herida donde se hizo la inoculación (Figura 6 A). Investigaciones sobre *Lasiodiplodia theobromae* y las pérdidas que puede ocasionar en coníferas son escasas, en Venezuela se ha reportado que este ocasiona el manchado azul de la madera en coníferas, principalmente en *P. caribaea* y *P. oocarpa*, pero también en especies latifoliadas como el árbol del neem (*Azadirachta indica*) causando una reducción en la calidad y un efecto negativo en la economía de la industria forestal (Mohali, 1993; Cedeño *et al.*, 1996; Mohali *et al.*, 2002). También existen evidencias de que el patógeno posee una asociación desde semilla en ambas especies del material parental, reportados en Nicaragua (*P. caribaea*), Sudáfrica y Florida (*P. elliotii*) (Rees, 1988; Fraedrich *et al.*, 1994; Cilliers *et al.*, 1995).

Las plantas expuestas al aire libre o condiciones de campo (25 a 43 °C) no mostraron síntomas a los 5 días después de la inoculación, esto posiblemente se debió a las altas temperaturas, ya que Ploetz (2003) y Tucuch *et al.* (2005), indican que la incidencia de

L. theobromae está influenciada principalmente por temperaturas de 26 a 32 °C, alta humedad relativa y niveles críticos de nutrición. La incidencia en campo durante el periodo de muestreo fueron bajas, posiblemente porque las condiciones requeridas en cuanto a temperatura limitó el rápido desarrollo de la enfermedad.

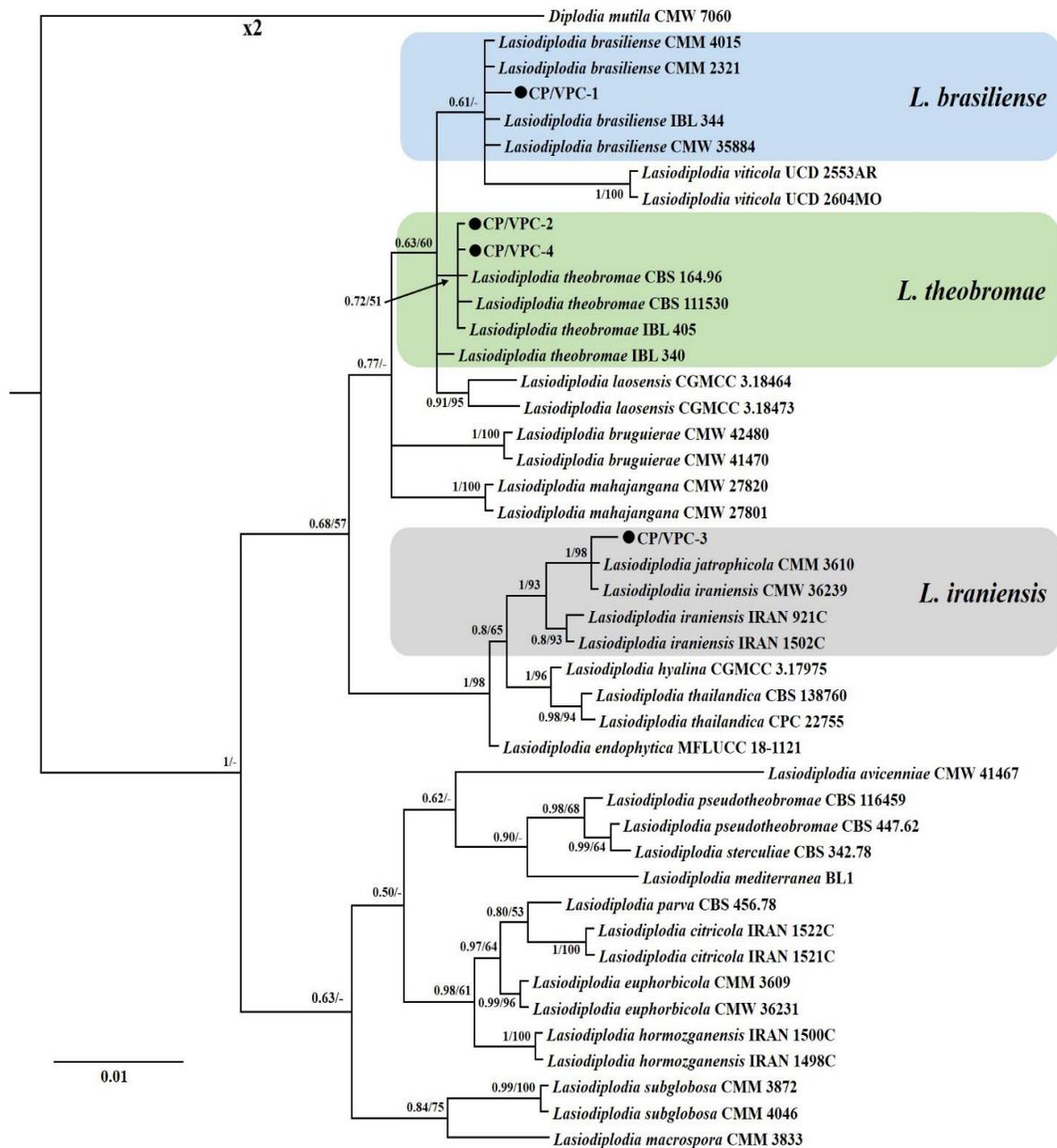


Figura 5. Árbol filogenético reconstruido con inferencia Bayesiana usando un alineamiento concatenado de la región ITS, y los genes *tef1* y *tub2*. *Diplodia mutila* se utilizó como fuera de grupo. Las

secuencias generadas en este estudio se indican con un círculo, y en color correspondiente a las especies. La barra indica sustituciones por sitio.

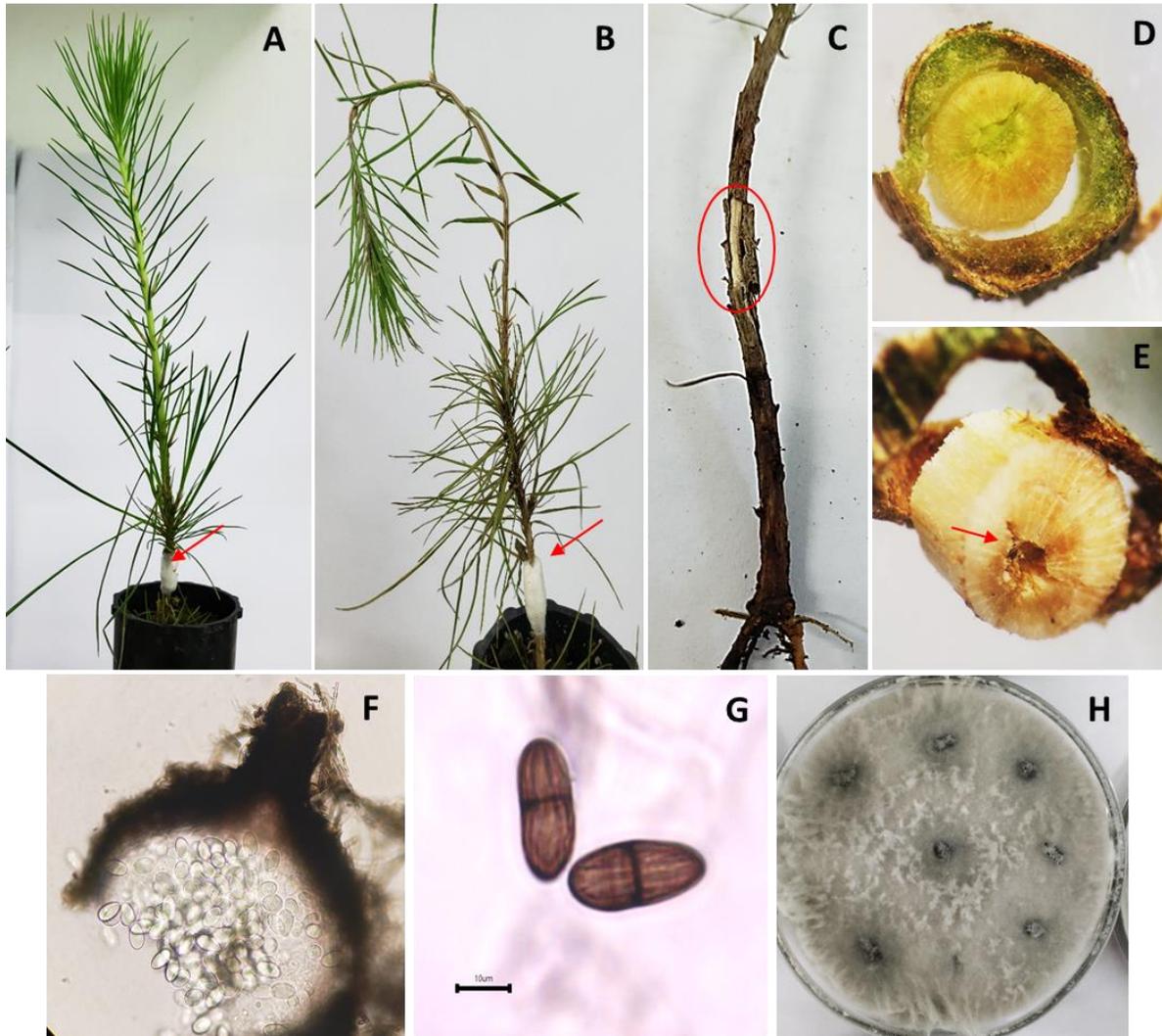


Figura 6. Resultado de pruebas de patogenicidad de *Lasiodiplodia theobromae* en plantas de pino híbrido (*P. elliotii* var. *elliotii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*). A) Planta testigo sin síntomas, inoculado con disco de PDA puro. B) Marchitez generalizada y muerte de planta inoculada con el hongo. C) Desprendimiento de corteza del área inoculada hacia la raíz. D, E) Sección transversal del tallo mostrando inicio y necrosis medular. F) Picnidio ostiolado de color café oscuro con conidios hialinos extraído alrededor de la zona dañada. G) Conidios maduros didimosporas, con estrías longitudinales color gris oscuro. H) Reaislamiento del patógeno con crecimiento micelial grisáceo en PDA. Barra de escala=10 μ m.

1.6 CONCLUSIÓN

El amarillamiento generalizado de los árboles de pino híbrido en plantaciones forestales en el sur de Veracruz, está asociado a *Lasiodiplodia theobromae*. Este hongo ocasiona necrosis medular, desprendimiento de corteza y posteriormente la muerte de las plantas a los 5 días ddi.

1.7 LITERATURA CITADA

- Agustí, M. 2003. Citricultura. 2a ed. Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Alves, A., Crous, P. W., Correia, A. and Phillips A., J. L. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. Fungal Diversity, 28:1-13. <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/28-1.pdf>
- Barnett, L. H. and Hunter, B. B. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Third Edition. Burgess Publishing Company. Minneapolis, Minnesota, USA.
- Bautista-Cruz, M. A., Almaguer-Vargas, G., Leyva-Mir, S. G., Colinas-León, M. T., Correia, K. C., Camacho-Tapia, M., Robles-Yerena, L., Michereff, S. J. and Tovar-Pedraza, J. M. 2019. Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with cankers and dieback symptoms of persian lime in Mexico. Plant Disease, 100:20-50. Doi.org/10.1094/PDIS-06-18-1036-RE
- Centre for Agricultural Bioscience International. 2010. *Lasiodiplodia theobromae*. Distribution maps of plant diseases. CABI Wallingford UK. <https://www.cabi.org/isc/abstract/20103281413>
- Cappa, E. P., Marco, M., Garth, N. D. and Last, I. S. 2012. Performance of *Pinus elliottii*, *Pinus caribaea*, their F1, F2 and backcross hybrids and *Pinus taeda* to 10 years in the Mesopotamia region, Argentina. New Forests, 44:197-218. Doi: 10.1007/s11056-012-9311-2
- Cedeño, L., Mohali, S. and Palacios-Pru, E. 1996. Ultrastructure of *Lasiodiplodia theobromae* causal agent of Caribbean pine blue stain in Venezuela. Interciencia 21:264-271. <https://www.researchgate.net/publication/286999119>
- Cilliers, A. J., Swart, W. J. and Wingfield, M. J. 1995. The occurrence of *Lasiodiplodia theobromae* on *Pinus elliottii* seeds in South Africa. Seed Science and Technology, 23:851-860. <https://www.researchgate.net/publication/235651137>

- Chungu, D., Muimba-Kankolongo, A., Wingfield, M. J. and Roux, J. 2010. Identification of fungal pathogens occurring in eucalypt and pine plantations in Zambia by comparing DNA sequences. *Forestry*, 83:507-515. DOI: 10.1093/forestry/cpq033
- Cleary, M., Oskay, F., Dogmus, H. T., Lehtijärvi, A., Woodward, S. and Vettraino, A. M. 2019. Cryptic Risks to Forest Biosecurity Associated with the Global Movement of Commercial Seed. *Forests* 10:459. Doi.org/10.3390/f10050459
- Comisión Nacional Forestal. 2012. La producción de resina en México. CONAFOR. 1a. ed. México.
- Correia, K. C., Silva, M. A., Morais, M. A., Armengol, J., Phillips A., J. L., Camara, M. P. S. and Michereff, S. J. 2016. Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. *Plant Pathology* 65(1):92-103. DOI: 10.1111/ppa.12388
- Dieters, M., and Brawner, J. 2007. Productivity of *Pinus elliottii*, *P. caribaea* and their F1 and F2 hybrids to 15 years in Queensland, Australia. *Annals of Forest Science*, 64:691-698. DOI:10.1051/forest:2007049
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Fraedrich, S. W., Miller, T. and Zarnoch, S. J. 1994. Factors affecting the incidence of black seed rot in slash pine. *Canadian Journal of Forest Research*, 24:1717-1725. DOI: 10.1139/x94-222
- Gómez-Jaimes, R., Nieto-Angel, D., Téliz-Ortiz, D., Mora-Aguilera, A., Martínez-Damián, M. T. y Vargas-Hernández, M. 2009. Evaluación de la calidad e incidencia de hongos en frutos refrigerados de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn. *Agrociencia* 43:37-48. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952009000100005&lng=es&tlng=es
- Hu, H. L., Jeewon, R., Zhou, D. Q., Zhou, T. X. and Hyde, K. D. 2007. Phylogenetic diversity of endophytic *Pestalotiopsis* species in *Pinus armandii* and *Ribes* spp.: evidence from rDNA and β -tubulin gene phylogenies. *Fungal Diversity*, 24:1-22. <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/24-1.pdf>
- Instituto Nacional de Bosques. 2017. Pino caribe (*Pinus caribaea* var. *hondurensis* (Sénécl.) W. H. Barrett & Golfari). Paquete Tecnológico Forestal. Guatemala. http://www.itto.int/files/itto_project_db_input/2802/Technical/PINO%20CARIBE.pdf
- Katoh, K. and Standley, D. M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 772-780. Doi.org/10.1093/molbev/mst010

- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meinjes, P. and Drummond, A. 2012. Geneious Basic: a integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28: 1647-1649. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts199
- Maddison, W. P. and Maddison, D. R. 2018. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis version 3.51. *Evolution*, 11(5). <http://mesquiteproject.org>
- Marques, M. W., Lima, N. B., de Moraes Jr., M. A., Barbosa, M. A. G., Souza, B. O., Michereff, S. J., Phillips, A. J. L., and Câmara, M. P. S. 2013. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity*, 61:181-93. DOI: 10.1007/s13225-013-0231-z
- Mohali, S., Encinas, O. y Mora, N. 2002. Manchado azul en madera de *Pinus oocarpa* y *Azadirachta indica* en Venezuela. *Fitopatología Venezolana*, 15:30-32. <https://www.researchgate.net/publication/255994168>
- Mohali, S. 1993. Estudio histológico de Madera de pino caribe con manchado azul causado por *Botryodiplodia theobromae*. *Fitopatología Venezolana*, 6:14-17. <https://www.researchgate.net/publication/256437953>
- Muniz, R. C., Freire, F., Pinto V., F. M., Cardoso, J. E., Cooke, P., Wood, D. and Florindo G., M. I. 2011. Colonization of cashew plants by *Lasiodiplodia theobromae*: Microscopical features. *Micron*, 42: 419-428. [Doi.org/10.1016/j.micron.2010.12.003](https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.12.003)
- Netto, B. M. S., Assuncao, I. P., Lima, A., G. S., Marques, M. W., Lima, W. G., Monteiro A., J. H., de Queiroz, B V., Michereff, S. J., Phillips, A. J. L. and Camara, M. P. S. 2014. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal Diversity*, 67:127-41. DOI: 10.1007 / s13225-014-0279-4
- Netto, B. M. S., Lima, W. G., Correia, K. C., da Silva, C. F. B., Thon, M., Martins, R. B., Miller, G., R. N., Michereff, S. J. and Camara, M. P. S. 2017. Analysis of phylogeny, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with gummosis of *Anacardium* in Brazil, with a new species of *Lasiodiplodia*. *Fungal Biology*, 121: 437-451. [Doi.org/10.1016/j.funbio.2016.07.006](https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.07.006)
- Norma Oficial Mexicana NOM-026-SEMARNAT-2005. Criterios y especificaciones técnicas para realizar el aprovechamiento comercial de resina de pino. México. 28 de Septiembre de 2006. <http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/3340/1/nom-026-semarnat-2005.pdf>
- Pavlic, D., Slippers, B., Coutinho, T. A., Gryzenhout, M. and Wingfield, M. J. 2004. *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new Botryosphaeria anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. *Studies in Mycology*, 50:313-322. <https://www.researchgate.net/publication/215514555>

- Phillips, A. J. L, Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z. and Crous, P. W. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76:51-167. Doi:10.3114/sim0021
- Picos-Muñoz, P. A., García-Estrada, R. S., León-Felix, J., Sañudo-Barajas, A. y Allende-Molar, R. 2015. *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: Taxonomía, hospedantes, diversidad y control. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 33: 54-74. https://www.smf.org.mx/rmf/Vol3312015/ArticulosDeRevision/1406_1_2015.pdf
- Ploetz, R. C. 2003. *Diseases of Tropical Fruit Crops*. CABI Publishing. Wallingford, UK. Pp: 76-77.
- Rambaut, A. 2010. FigTree v1.3.1. Institute of evolutionary biology, University of Edinburgh, Edinburgh. Disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rasmussen, A., Smith, T. E. and Hunt, M. A. 2009. Cellular stages of root formation, root system quality and survival of *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* cuttings in different temperature environments. *New Forests* 38:285-294. DOI 10.1007/s11056-009-9147-6
- Reckhaus, P. and Adamou, I. 1987. Hendersonula dieback of mango in Niger. *Plant Disease*, 71:1045. DOI: 10.1094 / PD-71-1045D
- Rees, A. A.1988. Infection of *Pinus caribaea* seed by *Lasiodiplodia theobromae*. *Transactions of the British Mycological Society*, 90:321-324. Doi.org/10.1016/S0007-1536(88)80105-0
- Robbins, A. M. J. 1983. *Pinus caribaea*, Morelet. Seed leaflets, 2. University of Copenhagen. https://curis.ku.dk/ws/files/40830820/Pinus_caribaea_2.pdf
- Rodríguez-Gálvez, E., Guerrero, P., Barradas, C., Crous, P. W. and Alves, A. 2017. Phylogeny and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of mango in Peru. *Fungal Biology*, 121:452-465. Doi.org/10.1016/j.funbio.2016.06.004
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A. and Huelsenbeck, J. P. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61: 539-542. DOI: 10.1093/sysbio/sys029
- Silvestro, D. and Michalak, I. 2012. RaxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity Evolutio*, 12: 335-337. DOI: 10.1007/s13127-011-0056-0
- Shaw, K. 1997. Girdling roots. *Arnoldia*. Arnold Arboretum of Harvard University 37: 242-247. <http://arnoldia.arboretum.harvard.edu/pdf/articles/1977-37-5-girdling-roots.pdf>

- Slippers, B., Crous, P. W., Denman, S., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D. and Wingfield, M. J. 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycology*, 96: 83-101. DOI:10.2307/3761991
- Tovar-Pedraza, J. M., Mora-Aguilera, J. A., Nava-Díaz, C., Téliz-Ortíz, D., Valdovinos-Ponce, G., Villegas-Monter, A. y Hernández-Morales. J. 2012. Identificación, patogenicidad e histopatología de *Lasiodiplodia theobromae* en injertos de zapote mamey en Guerrero, México. *Agrociencia*, 46:147-161. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v46n2/v46n2a5.pdf>
- Tucuch, C. F. M., Palacios, P. A., Ku N. R. y Guzmán, E., C. 2005. Manejo del cultivo de mango en el estado de Campeche. Campo Experimental Edzna, INIFAP. Folleto Técnico. Campeche, Camp., México. Pp. 33-34. <http://www.cesix.inifap.gob.mx/frutalestropicales/articulos/37.pdf>
- Urbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Guerrero, J. C., Guevara, J. and Gubler, W. D. 2008. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease*, 92:519-529. Doi.org/10.1094/PDIS-92-4-0519
- Vázquez-López, A., Mora-Aguilera, J. A., Cárdenas-Soriano, E. y Téliz-Ortiz, D. 2009. Etiología e histopatología de la muerte descendente de árboles de mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore y Stear) en el Estado de Guerrero, México. *Agrociencia*, 43:717-728. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v43n7/v43n7a6.pdf>
- Yan, J-Y., Xie, Y., Zhang, W., Wang, Y., Liu J-K., Hyde, K. D., Seem, R. C., Zhang, G-Z., Wang, Z-Y., Yao, S. W., Bai, X-J., Dissanayake, A. J., Peng, Y-L. and Li X-H. 2013. Species of *Botryosphaeriaceae* involved in grapevine dieback in China. *Fungal Diversity*, 61: 221-236. DOI 10.1007/s13225-013-0251-8

CAPITULO 2. CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DEL SUELO Y SU RELACIÓN CON LA DIVERSIDAD FÚNGICA DE PLANTACIONES DE PINO HIBRIDO

2.1 RESUMEN

La producción forestal al igual que otros cultivos puede verse influenciada por diversos factores, entre los que destaca, el clima, el suelo y las enfermedades. Este estudio tuvo como objetivo la caracterización fisicoquímica del suelo, su relación con la diversidad fúngica del suelo y el amarillamiento del pino híbrido. En agosto de 2019, en las plantaciones de pino híbrido de UUMBAL que se localiza al sur de Veracruz, se colectaron 85 muestras de suelo con 500g c/u a 30 cm de profundidad, para llevar a cabo análisis físicos y químicos del suelo, los cuales se realizaron en GISENAlabs Texcoco, Edo. de México. Así mismo, de árboles con amarillamiento, en seis lotes, se colectaron 36 muestras de suelo de 200 g c/u, para cuantificación e identificación de la diversidad fúngica, lo cual se realizó en el laboratorio de Patología Forestal del COLPOS. La determinación de las concentraciones de las variables físicas y químicas del suelo se realizó bajo la metodología interna del Laboratorio y la NOM-021-RECNAT-2000. Para el análisis de diversidad fúngica, se utilizó medio PDA-TS (Papa – Dextrosa – Agar-Tergitol – Estreptomina) de Steiner y Watson (1965) en el que realizó la siembra de 0.1 mL de solución de suelo/caja petri, en una concentración de 10^{-3} , las cajas se incubaron durante seis días bajo luz blanca a una temperatura de 28 a 30°C. Los hongos desarrollados se identificaron usando las claves de Barnett y Hunter. Los resultados de las variables de suelo indican bajos niveles de materia orgánica, pH's ácidos y fuertemente ácido, con baja disponibilidad de N, P, K, analizados de acuerdo a la NOM-

021-RECNAT-2000. Los hongos del suelo identificados fueron, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Fusarium*, sobresaliendo el primero en todos los rodales. De acuerdo al índice de Shannon-Weaver las zonas en estudio poseen una diversidad fúngica baja, lo cual está relacionado con niveles bajos de materia orgánica y poca disponibilidad de nutrimentos, por lo anterior, es probable que dichos afecten negativamente o predispongan a los árboles a ser atacadas por diversas enfermedades fúngicas.

Palabras clave: Producción forestal, Análisis físicos y químicos, PDA-TS, Índice de Shannon-Weaver.

SOIL PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND ITS RELATION TO FUNGAL DIVERSITY IN HYBRID PINE PLANTATIONS

2.2 ABSTRACT

Forest production, as well other crops, can be influenced by a number of factors, most notably climate, soil and disease. This study aimed to characterize the physicochemical, its relationship to the fungal diversity of the soil and the yellowing of the hybrid pine. In august 2019, in the hybrid pine plantations of UUMBAL located in south of Veracruz, 85 soil samples of 500 g each were collected at a depth of 30 cm, to carry out physical and chemical analyses of the soil, which were conducted in GISENALabs Texcoco, State of Mexico. Also, from yellowing trees, in six plots, 36 soil samples of 200 g each were collected for quantification and identification of fungal diversity, which was performed in the Forest Pathology Laboratory of COLPOS. The determination of the concentrations of the physical and chemical variables of the soil was carried out under the internal methodology of the Laboratory and the NOM-021-RECNAT-2000. For fungal diversity analysis, PDA-TS (Potato - Dextrose - Tergitol Agar - Streptomycin) medium by Steiner and Watson (1965) was used in which 0.1 mL of soil solution/petri dish was seeded, in a concentration of 10^{-3} , and the dishes were incubated for six days under white light at a temperature of 28-30°C. The developed fungi were identified using Barnett and Hunter's keys. The results of soil variables indicated low levels of organic matter, acidic and strongly acidic pH's, with low availability of N, P, K, analyzed according to NOM-021-RECNAT-2000. The soil fungi identified were *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* and *Fusarium*, excelling the first in all stands. According to the Shannon-Weaver index, the areas under study

have a low fungal diversity which is related to low levels of organic matter and low availability of nutrients, concluding that these factors negatively affect the development of the plantation generating high susceptibility to be attacked by various diseases.

Keywords: Forest production, physical and chemical analysis, PDA-TS, Shannon-Weaver Index.

2.3 INTRODUCCIÓN

El suelo es un sistema biológico dinámico, considerado el principal reservorio de una gran diversidad biológica, que participa en diferentes actividades contribuyendo a incrementar la capacidad productiva del suelo, y la calidad de la misma juega un papel importante en el desarrollo de las plantaciones. En plantaciones forestales o reforestaciones existen diversos elementos que pueden determinar el éxito del rendimiento o la sobrevivencia en campo, como la estructura, textura o perfil microbiológico del suelo. Éste último está compuesto por una diversidad de microorganismos que a su vez están directamente relacionados a diversos factores abióticos como la temperatura, humedad, pH, tipos de suelo, nutrición, materia orgánica entre otros (Nogueira y Andreote, 2016; Enríquez *et al.*, 2017). Bashan *et al.* (2015), mencionan que la ausencia de microorganismos afecta severamente el establecimiento, crecimiento y sobrevivencia de plántulas.

La pérdida o reducción de la diversidad compromete a la funcionalidad del suelo debido a que estos microorganismos regulan muchas de sus funciones como la descomposición de la materia orgánica, ciclo de nutrientes especialmente del carbono, nitrógeno, azufre y fósforo; control biológico de plagas, transformación de metales y minerales, además de contribuir a la formación y sedimentación de los suelos (Nielsen, 2002; Cardoso y Andreote, 2016).

El estudio de la diversidad de microorganismos del suelo ha aumentado y su importancia es debido a que explica la calidad del suelo así como el éxito de los cultivos agrícolas (Maeder *et al.*, 2002).

La actividad microbiana es mayor en la superficie del suelo debido a que el suministro del carbono proviene de las plantas. La densidad de los grupos de microorganismos se incrementa con relación a la disponibilidad de nutrientes, algunos por procesos de descomposición, otros por solubilización, como es el caso del fosfato inorgánico transformándolo a ortofosfato que es una forma asimilable para las plantas y otros por el flujo de la materia orgánica como la celulosa, lo cual depende en gran medida de la disponibilidad de C en los suelos (Cao *et al.*, 2008; Beltrán *et al.*, 2017).

Los hongos son los grupos más abundantes después de las bacterias y desempeñan funciones muy importantes en los ecosistemas que están relacionadas con el tipo de suelo, materia orgánica, clima, otros microorganismos y comunidades de plantas (Pacasa-Quisbert *et al.*, 2017). El microhábitat, que a su vez, depende de la vegetación dominante y las actividades antropogénicas principalmente el uso de fertilizantes químicos, se ha visto involucrado en la disminución de la diversidad de ésta comunidad, provocando la degradación de las propiedades físicas y químicas del suelo (Ros *et al.*, 2010).

Los hongos están asociados con cambios en el estado nutrimental y predominan en el protoplasma microbiano que se encuentra en el lecho de descomposición, principalmente en los estratos orgánicos de suelos boscosos o selváticos (Alexander 1987; Marschner *et al.*, 2004).

Con el fin de entender el papel de la calidad y la comunidad fúngica del suelo en el desarrollo de los pinos, el objetivo de este trabajo fue la caracterización fisicoquímica del

suelo y su relación con la diversidad fúngica y el amarillamiento del pino híbrido en Veracruz.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1 Muestreo para análisis físico-químico

En agosto de 2019 se colectaron 85 muestras de suelo en diferentes predios bajo estudio en plantaciones de UUMBAL en el sur de Veracruz.

La colecta se realizó bajo el diseño zig-zag (Figura 7), compuesto por 10 submuestras de 500 g cada una a una profundidad de 30 cm. Posteriormente se realizó la mezcla y se tomaron 500 g de muestra compuesta. Las muestras se enviaron al laboratorio Grupo Integral de Servicios Fitosanitarios ENA S.A. de C.V. (GISENALabs) en Texcoco, Edo. de México, para la determinación de pH, CE, DAP (Densidad aparente), CIC (Capacidad de Intercambio Catiónico), MO (Materia orgánica), CO (Carbono orgánico), N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu y Zn, bajo la metodología de la NOM-021-RECNAT-2000. Los resultados de los análisis obtenidos se interpretaron con la ayuda de la Norma y el Manual de interpretación de análisis de suelos y aguas de Castellanos, 2000.

2.4.2 Colecta de muestras para análisis de diversidad fúngica

La colecta de muestras para análisis de diversidad se realizó en dos épocas. En la época de sequía (mayo de 2019) y de lluvia (agosto 2019) se colectaron 84 muestras de 300 g cada una, lo cual se realizó en forma dirigida a 5 árboles con amarillamiento foliar más uno aparentemente sano; a una distancia de 15 cm de la raíz a 30 cm de profundidad, cada muestra se etiquetó para su traslado al laboratorio de UUMBAL y el Laboratorio de Patología Forestal del Colegio de Postgraduados.



Figura 7. Muestreo en zig-zag para la toma de muestras de suelo para análisis físico-químico. Los círculos amarillos representa el lugar donde se tomó cada submuestra.

2.4.3 Determinación de diversidad fúngica

Para la determinación de la diversidad de hongos presente en el suelo de los diferentes sitios, se utilizó la técnica de dilución de suelo PDA-TS (Papa–Dextrosa–Agar–Tergitol–Estreptomicina) de Steiner y Watson (1965). De cada muestra se pesaron 10 g de suelo y se colocaron dentro de un matraz Erlenmeyer con 90 mL de agua destilada estéril (un matraz por muestra); de esta suspensión (10^{-1}), se tomó 1 mL y se adicionó a un tubo de ensaye con 9 mL de agua destilada estéril (10^{-2}), la dilución se repitió hasta la 10^{-3} . De ésta suspensión se tomó 0.5 mL, de la cual se colocó 0.05 mL por caja Petri, se hicieron 10 repeticiones. Posteriormente, a cada caja se le adicionó medio PDA-TS tibio y se agitó ligeramente para obtener una dispersión homogénea.

Las cajas se mantuvieron a una temperatura de 28 a 30 °C bajo luz blanca. Se contaron las UFC 6 días después de siembra e incubación y se estimaron las poblaciones de cada

género por gramo de suelo seco (UFC g⁻¹ de suelo). Mediante el índice de diversidad proporcional de Shannon-Wiener-Wiener (H') se estimó la riqueza de especies el cual está representado por la siguiente fórmula:

$$H' = -\sum_{i=1}^n p_i \ln(p_i)$$

Dónde:

H=Índice de la diversidad de la especie

S= Número de especies

P_i= Proporción de la muestra que corresponde a la especie *i*

Ln= Logaritmo natural

2.4.4 Caracterización morfológica de los aislados

Mediante las claves de Barnett y Hunter (1972), se identificaron a nivel de género los hongos más frecuentes tomando en cuenta las características morfológicas como micelio, forma, color de la colonia y características de los conidios. Los hongos fueron cuantificados y purificados en medio PDA (Papa-dextrosa-agar). Se realizaron preparaciones de micelio sobre una gota de ácido láctico previamente colocado en un portaobjetos para su observación en el microscopio compuesto marca Olympus modelo CX31-RBSFA.

2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1 Propiedades físicas y químicas del suelo

De acuerdo a los resultados de los análisis de suelo de las principales zonas de plantaciones de pino híbrido presentan suelos de textura gruesa, bajo nivel de materia orgánica, con moderada acidez en el predio C1 y C2, en tanto que en predios de C3 y C4 son fuertemente ácidos. De acuerdo a la NOM-021-RECNAT-2000, estos resultados indican que son suelos con poca retención de humedad, pobres, con problemas de disponibilidad de nutrimentos, la cual disminuye con la acidez del suelo. Castellanos (2000), menciona que la máxima disponibilidad de la mayoría de los nutrimentos como nitrógeno, calcio, magnesio, fósforo, hierro, manganeso, boro cobre y zinc, se obtiene cuando el pH del suelo se encuentra entre 6.0 y 6.5; no obstante, los problemas mayores ocurren cuando el pH está por debajo de 5.5 ocasionando que algunos elementos alcancen niveles tóxicos o que existan pérdidas sustanciales de Ca, Mg y K, elementos esenciales, requeridas en grandes cantidades para las plantas. Sun y Dickinson (1993), mencionan que los pinos pueden desarrollarse en suelos de baja fertilidad, pero su crecimiento es lento y se encuentran bajo estrés nutricional cuando el suelo presenta altas concentraciones de salinidad. En suelos muy ácidos se reduce la solubilidad de algunos nutrimentos, provocando amarillamiento e interrupción del crecimiento generando mayor susceptibilidad de ser atacados por patógenos.

La materia orgánica juega un papel importante en la liberación y disponibilidad de algunos macro nutrientes como el N, P, S. Los compuestos orgánicos del suelo actúan como quelatantes para retener algunos micro nutrientes, que podrían lixiviarse; la MO influye sobre las propiedades físicas del suelo, por lo que al existir alto contenido de MO

la densidad aparente es menor mientras que la porosidad total aumenta, lo que favorece una alta actividad microbiana y un ambiente propicio para el desarrollo de raíces que con menor esfuerzo y gasto de energía exploran el suelo.

En el cuadro 3 se muestra algunas propiedades fisicoquímicas, donde de acuerdo a la NORMA021, el nitrógeno, fósforo y potasio presentan niveles medio en los predios C1 y C2, bajos en C3 y muy bajos en C4. Los niveles de calcio y magnesio son altos en C1 y C2, y niveles bajos en C3 y C4. De acuerdo a Martínez, (2014) estos resultados obtenidos pueden llegar a afectar el desarrollo del pino, debido a que crecen en diferentes condiciones de suelo pero presenta mejor desarrollo en suelos de baja densidad, bien drenados, de textura franco-arenosa o con textura franco arcilloso y pH entre 5.0 y 6.5. El calcio en la zona de intercambio es importantes para las plantas por estar involucrado con formación de la pared celular. Mientras que el N que se mineraliza de la MO es importante para aumentar la eficiencia fotosintética y crecimiento del árbol. La fertilidad del suelo reflejada en la disponibilidad de fósforo y potasio, están relacionados con moléculas de almacenamiento de energía y síntesis de aminoácidos, y con actividad estomática. La deficiencia de nutrientes influye en la formación de tejidos y en los procesos fenológicos como la floración, por lo tanto, una baja disponibilidad de nutrimentos limita la productividad de las plantaciones (Castellanos, 2000; Plassard y Dell, 2010).

Cuadro 3. Datos promedio de características químicas del suelo en los principales predios (C1-C4) de plantación de pino híbrido, en el sur de Veracruz, interpretados de acuerdo a la NOM-021-RECNAT-2000.

	pH	% MO	mg/kg		cmol/kg		
			N	P	Ca	Mg	K
C1	5.9 MA	2.35 M	26.36 M	12.2 A	17.86 A	3.13 A	0.73 M
C2	5.06 MA	3.14 M	35.24 M	8.76 M	10.58 A	2.82 M	0.41 M
C3	4.46 FA	1.96 B	28.24 M	4.26 B	1.48 B	0.49 MB	0.12 MB
C4	4.5 FA	3.32 M	14.46 B	1.54 B	0.47 B	0.19 MB	0.05 MB

MA: Moderadamente ácido; FA: fuertemente ácido; A: Alto; M: Medio; B: Bajo; MB: Muy bajo.

En la figura 8 se observa la relación entre el pH y los cationes intercambiables, Ca, Mg y K. Se observa que cuando el pH es bajo existen pocos cationes de Ca, Mg, y K en la zona de intercambio. Es decir, la fertilidad del suelo cambia drásticamente cuando los valores del pH son menores a 4.5.

La baja fertilidad podría ser un factor de estrés nutricional para el desarrollo óptimo de las plantación de pino híbrido, establecidas en las diferentes zonas de estudio, lo cual también fue reportado por Lugo *et al.* (2006), quienes mencionan que en suelos de textura arenosa, pH fuertemente ácido con bajo contenido de materia orgánica, nitrógeno, calcio y fósforo, provocan estrés nutricional que se pueden manifestar como amarillamiento y muerte de árboles. Por otra parte, Marquez *et al.* (2011), menciona que el estrés nutrimental en *Pinus caribaea* altera de manera importante la susceptibilidad de la especie al ataque de muchos patógenos entre ellas *L. theobromae*, patógeno endófito que se desarrolla en diversas hospedantes bajo condiciones de estrés.

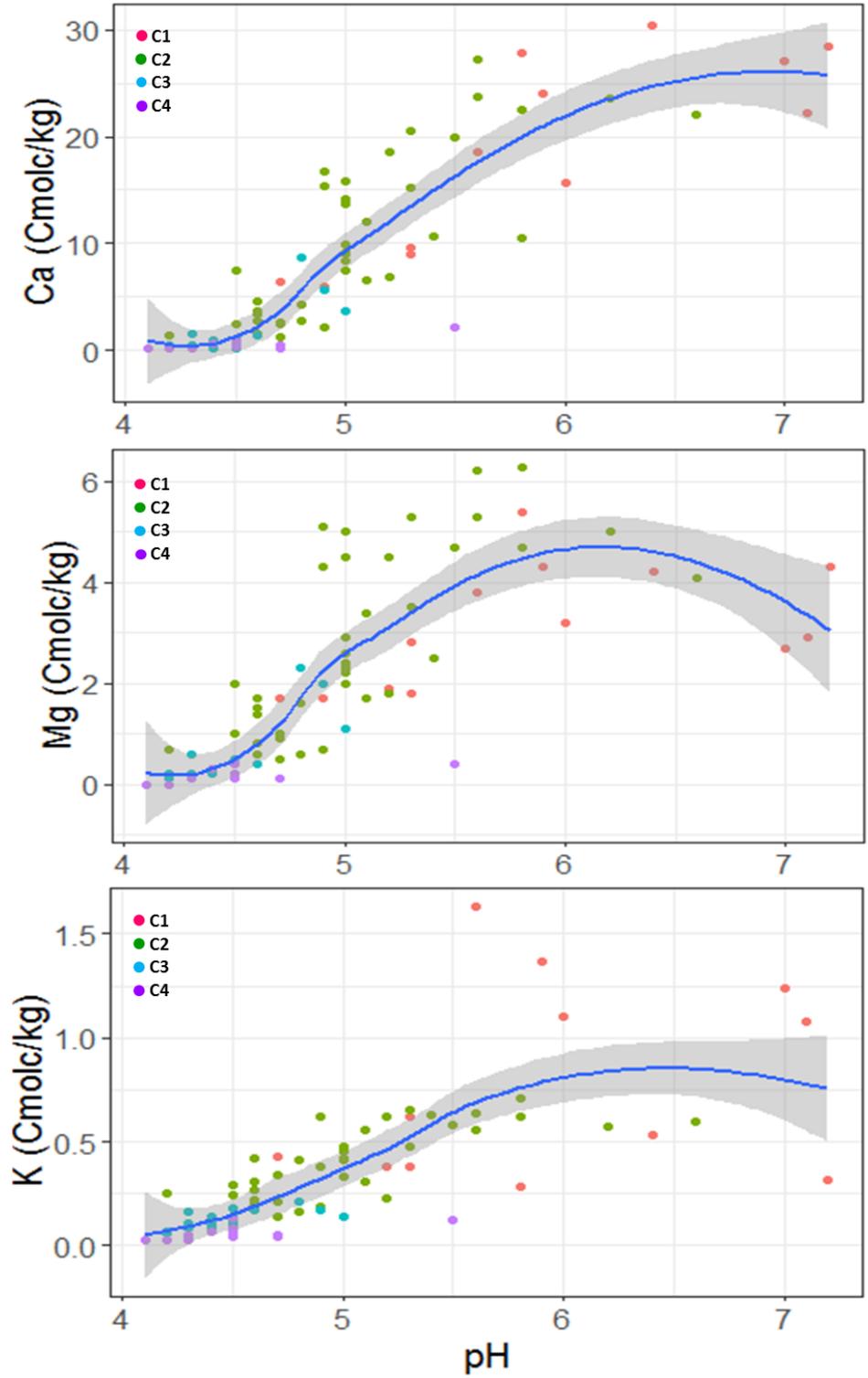


Figura 8. Comportamiento de Ca, Mg y K con respecto al pH, en predio C1 y C2 se observa mayor distribución y concentración en pH ligeramente ácidos, mientras que en C3 y C4 se concentra en pH más ácidos.

2.5.2 Densidad de unidades formadoras de colonias de la diversidad fúngica en predios C1, C2, C3, C4 y P de la zona de estudio del sur Veracruz

De las 84 muestras provenientes de 7 lotes (C2Lt4, C3Lt2, C3Lt3, C3Lt6, PLt20, C4Lt2B y C4Lt4B) del sur de Veracruz, colectados en mayo y agosto 2019, se registraron 2 géneros, *Aspergillus* y *Penicillium* en el primer muestreo, de los cuales el primero presentó mayor frecuencia en cuanto a unidades formadoras de colonia. En el segundo muestreo se encontraron 4 géneros de hongos, *Aspergillus* que fue el más frecuente, seguido de *Penicillium*, *Trichoderma* y *Fusarium*.

Por la predominancia de *Aspergillus* en ambas épocas y la escasa diferencia en el número de colonias, el análisis se realizó de forma conjunta sin separar los periodos de colecta. El lote C3Lt2 registró el mayor número de colonias con 1, 589,000. *Aspergillus* representó más del 70% respecto al total y en menor proporción se aisló *Fusarium* con el 0.6%. El lote con menor número de aislamientos fue C3Lt3 con 1, 313,000 colonias, sobresaliendo de igual manera *Aspergillus* y en menor proporción *Fusarium*, con 72% y 0.2% respectivamente (Figura 9).

En las zonas de estudio el comportamiento fue similar, el lote C4Lt2B presentó el mayor número de colonias/g de suelo con 2, 253,000. *Aspergillus* representó más del 90% del total y *Trichoderma* con 7.3%. El lote con menor cantidad de aislamientos fue PLt20 con 1, 227,000 colonias, sobresaliendo *Aspergillus* y en menor proporción *Fusarium* con 70% y 0.16%, respectivamente (Figura 9).

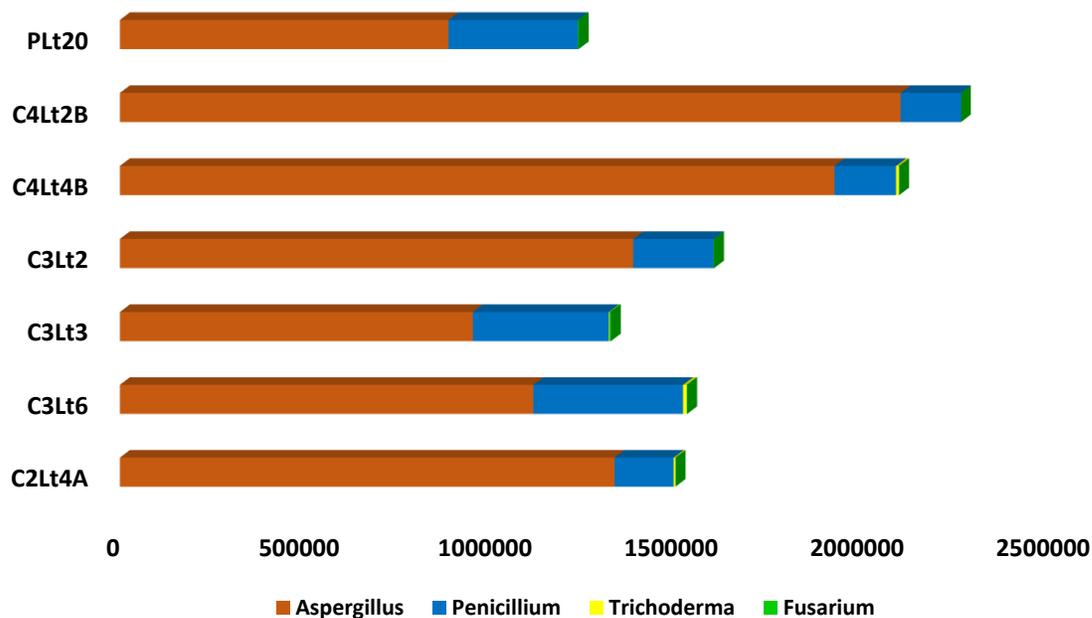


Figura 9. Número de colonias totales y por género de hongos detectado en muestras de los diferentes lotes bajo estudio en el sur de Veracruz.

Se realizó el cálculo de la diversidad de Shannon-Weaver (Shannon y Weaver, 1949) obteniendo valores de 0.5 a 1.6 (Figura 10). Por su parte Margalef (1972), menciona que este índice maneja rangos de interpretación que varía de 1 a 5, valores menores de 2 se catalogan como diversidad baja, de 2 a 3.5 media y superiores a 3.5 como diversidad alta. De acuerdo al criterio mencionado, los resultados del presente estudio sugieren que la diversidad es baja, lo cual se atribuye a la poca disponibilidad de nutrientes y bajo contenido en materia orgánica, así mismo, se calculó la interacción de las variables %MO y UFC's (Figura 11) el cual tuvo un coeficiente de correlación de Pearson de 0.50 (Cuadro 4), lo cual indica que ambas variables poseen una relación lineal positiva, pero debido a la poca cantidad de muestras ésta no fue estadísticamente significativa ($r^2=0.19$). La composición de la diversidad fúngica no sólo está estrechamente

relacionada con la materia orgánica también existen otros factores como los cambios en el estado nutrimental, calidad y cantidad de sustrato, comunidades de plantas, temperatura, humedad, disponibilidad de oxígenos, así como el pH del suelo (Nielsen y Winding, 2002; Marschner *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2008). Maeder *et al.* (2002) y Pacasa-Quisbert *et al.* (2017), mencionan que a pH's ligeramente alcalinos y suelos con mayor fertilidad existe mayor diversidad fúngica activa, llegando a mejorar las características físicas y químicas del suelo, originando una mejora en el desarrollo radicular y vigor de las plantas, incluyendo el incremento en la producción. Sin embargo, Lauber *et al.* (2008) y Rousk *et al.* (2010), mencionan que no existe una fuerte correlación entre pH y diversidad fúngica debido a que en sus estudios previos encontraron una estrecha correlación entre la distancia filogenética de la comunidad de hongos con las reservas nutrimentales del suelo y una relación débil con el pH, lo cual se corrobora en este estudio al no encontrar correlación entre UFC y pH (-0.09) pero sí con el % de Arcilla, el cual tuvo una correlación de Pearson de 0.85 y una $r^2=0.68$ (Figura 12), indicando que la diversidad fúngica presenta una estrecha relación con suelos de textura media y fina grupo textural caracterizados por su mayor capacidad de retención de humedad y nutrientes (Castellanos, 2000).

Con respecto a las variables nutrimentales se encontró una correlación entre UFC con el Ca (0.76), P (-0.60), Fe (-0.53) y Ca/Mg (-0.57) (Cuadro 4) aunque no fueron estadísticamente significativas, $r^2= 0.24$, $r^2=0.31$, $r^2=0.28$ y $r^2=0.33$ (Figura 13), estos resultados, aunque preliminares, reflejan la importancia que presenta éstas variables como indicadores de la salud del suelo además de ser un método para predecir los cambios que pueden llegar a sufrir estas relaciones al alterar las propiedades y usos del

suelo los cuales también se verán reflejados en el desarrollo de los cultivos (Lauber *et al.*, 2008; Pacasa-Quisbert *et al.*, 2017).

Con respecto a la predominancia del género *Aspergillus* seguido de *Penicillium*, se le atribuye a su capacidad de adaptación a diferentes condiciones de suelo por lo que son denominados colonizadores permanentes que juegan un papel importante en el desdoblamiento de diferentes sustratos, principalmente celulosa y hemicelulosa, liberación de nutrientes minerales, además, influyen en las propiedades fisicoquímicas del suelo (Nielse and Winding, 2002; Nihorimbere *et al.*, 2011). Su comportamiento como saprófito le permite permanecer en el suelo, en comparación con las otras especies de hongos que solo crecen y se desarrollan en épocas de alta humedad y que no son capaces de obtener su energía y nutrientes de los desechos o tejido muerto de las plantas (Agrios, 2011; Moreira *et al.*, 2012).

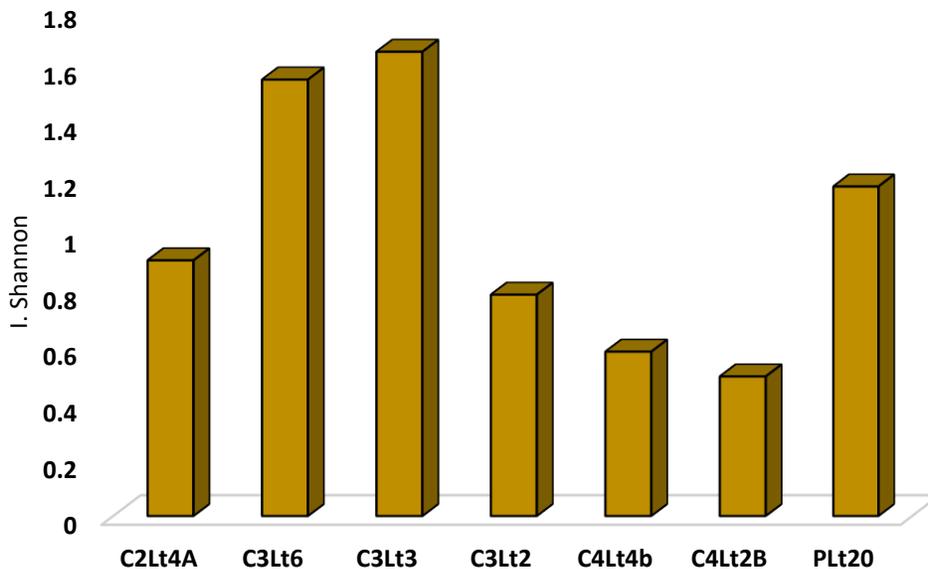


Figura 10. Índice de diversidad fúngica en cada lote muestreado en el sur de Veracruz, calculado mediante el índice de Shannon.

Cuadro 4. Coeficiente de correlación de variables físicas y químicas del suelo con respecto a hongos totales, los cuales se observa una correlación con la MO, Fe, P, Ca, Da, Ca/Mg y % de arcilla.

	pH	MO	Na	K	Ca	Mg	Al	Fe	P	Ca	Zn	Da	Ca/Mg	Arcilla	H. totales
pH	1														
MO	-0.18	1													
Na	0.90	-0.16	1												
K	0.99	-0.19	0.92	1											
Ca	0.99	-0.13	0.94	0.99	1										
Mg	1.00	-0.14	0.93	0.99	1.00	1									
N	0.85	0.36	0.80	0.83	0.87	0.87									
Al	-0.68	0.32	-0.34	-0.64	-0.60	-0.63	1								
Fe	-0.37	0.17	0.05	-0.33	-0.27	-0.30	0.90	1							
P	-0.07	0.31	0.34	0.01	0.06	0.02	0.75	0.89	1						
Ca	0.52	0.45	0.23	0.42	0.46	0.49	-0.61	-0.57	-0.42	1					
Zn	0.98	-0.17	0.96	0.99	1.00	0.99	-0.54	-0.20	0.12	0.39	1				
Da	0.79	-0.49	0.87	0.86	0.83	0.81	-0.37	-0.06	0.22	-0.10	0.86	1			
Ca/Mg	0.01	0.35	0.40	0.09	0.13	0.09	0.66	0.80	0.98	-0.38	0.19	0.29	1		
Arcilla	0.37	0.44	0.05	0.26	0.30	0.33	-0.58	-0.59	-0.52	0.98	0.22	-0.27	-0.50	1	
H. totales	-0.09	0.50	-0.39	-0.20	-0.17	-0.14	-0.37	-0.53	-0.60	0.76	-0.26	-0.65	-0.57	0.85	1

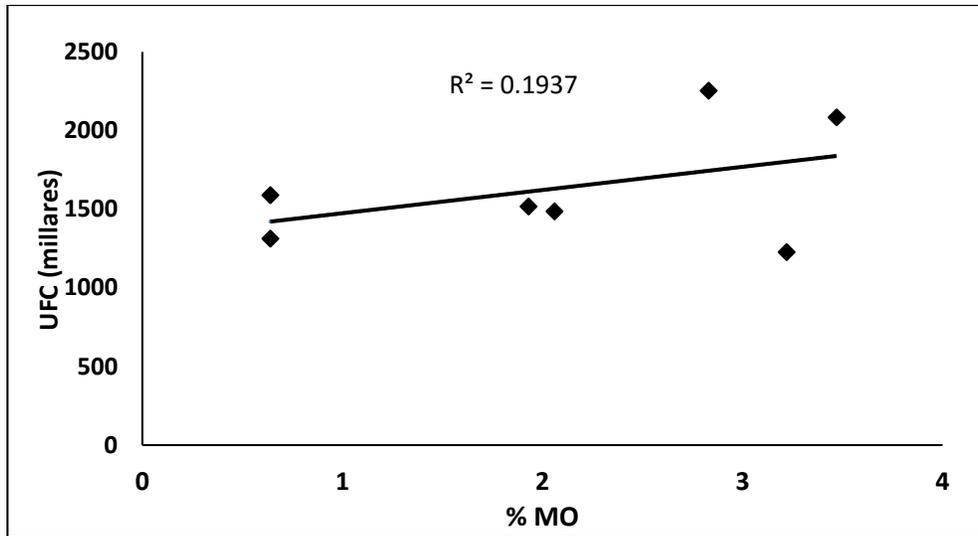


Figura 11. Correlación entre unidades formadoras de colonias (UFC) y el % MO (materia orgánica), mostrando una relación lineal positiva entre ambas variables.

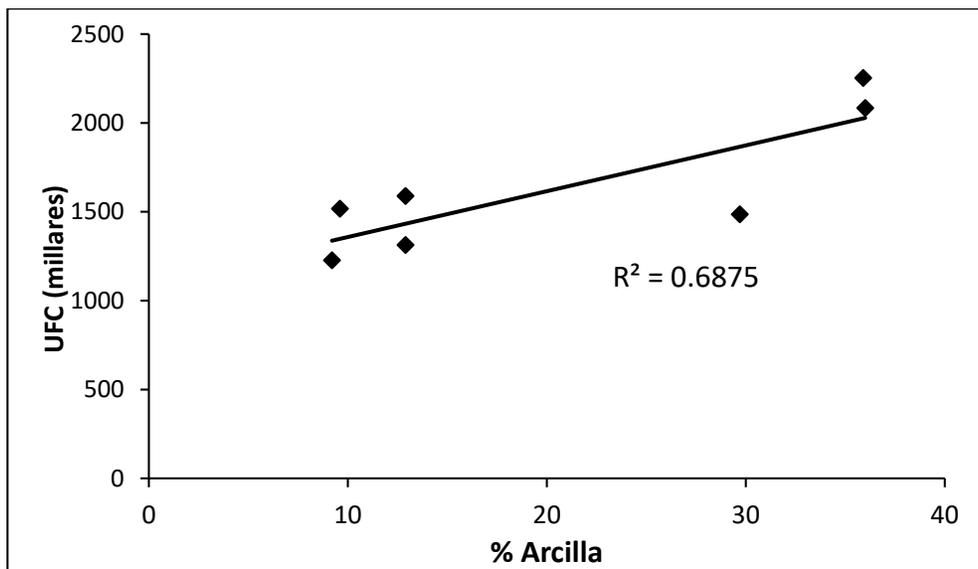


Figura 12. Correlación entre unidades formadoras de colonias (UFC) y el % de arcilla, mostrando una relación lineal positiva entre ambas variables.

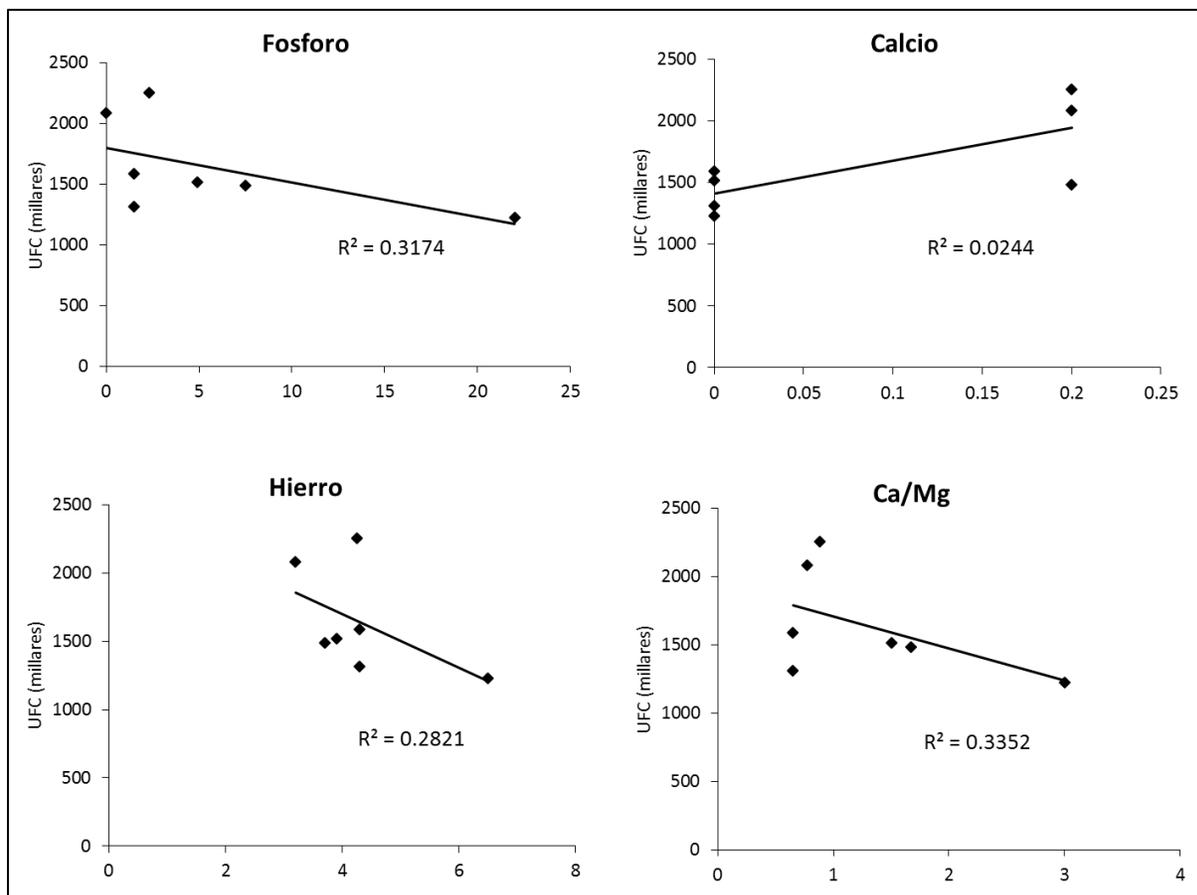


Figura 13. Análisis de correlación entre unidades formadoras de colonias (UFC) y el estado nutrimental del suelo, presentando una relación lineal negativa para fosforo, hierro, Ca/Mg y relación lineal positiva para calcio aunque ninguno estadísticamente significativa.

En general, la presencia de hongos totales aumentó con los indicadores de fertilidad del suelo. Por ejemplo, hubo mayores hongos totales cuando contenido de MO fue mayor, lo que se explica por la presencia de compuestos orgánicos, los cuales al descomponerse liberan otros nutrientes como el P, Ca y S que son requeridos por los microorganismos del suelo (Binkley y Fisher, 2020). También hay un aumento de hongos en la medida que hay más arcilla, esto se debe a que los componentes finos del suelo crean un entorno físico más apropiado para el crecimiento de los hongos, permitiéndoles

protección física y agua disponible ya que el agua se retiene con mayor fuerza en los poros pequeños del suelo (Gómez-Guerrero y Doane, 2018).

La disminución de las poblaciones de hongos con la reducción de Fe, se debe a una relación indirecta con el pH, es decir cuánto más Fe hubo en la solución del suelo, también hubo más acidez, lo que probablemente estuvo también asociado a la presencia y toxicidad del aluminio. Es destacable que cuando aumentan la relación Ca/Mg disminuyeron los hongos totales. Esto se debe a que cuanto más alta es la relación Ca/Mg, más deficiente es el Mg (Osman, 2013), en otras palabras, los resultados indican que las poblaciones de hongo aumentaron con el nivel de fertilidad del suelo.

2.6 CONCLUSIONES

Los análisis físicos y químicos del suelo de las principales zonas destinadas a la producción de pino híbrido en Veracruz, presentaron una baja concentración de MO, con pH ácido a fuertemente ácidos, afectando la disponibilidad de los nutrimentos, principalmente N, P, K, Ca y la diversidad biológica, los cuales estuvieron en niveles bajos $H' = 0.5$ a 1.6, sometiendo a los árboles a problemas de estrés fisiológico, pobre desarrollo radicular, poco vigor y alta susceptibilidad al ataque de la enfermedad del amarillamiento.

La diversidad fúngica tuvo una correlación positiva con la variable MO, % de arcilla y variables nutrimentales indicando que éstas variables tienen fuerte influencia sobre la calidad biológica del suelo.

Debido a la baja calidad del suelo, éstos tendrán un efecto negativo en el desarrollo de cualquier cultivo, los cuales pueden influir en el acceso y desarrollo de diversas enfermedades fungosas.

2.7 LITERATURA CITADA

- Alexander, M. 1987. Introducción a la Microbiología del Suelo. AGT editor, S.A. México.
- Agrios, N. G. 2011. Plant Pathology. 5th. Ed. Academic Press.
- Bashan, Y., Puente, E., Salazar, B., De-Bashan, L., Bacilio, M., Hernández, J., Leyva, L., Romero, B., Villalpando, R. y Bethlenfalvay, G. 2015. Reforestación de tierras erosionadas en el desierto: el papel de las bacterias promotoras de crecimiento en plantas y la materia orgánica. Suelos Ecuatoriales, 35(1):70-77. <https://www.researchgate.net/publication/242245023>
- Binkley, D. and Fisher, R. 2020. Ecology and management of forest soils. 5th Ed. UK: Wiley-Blackwell
- Beltrán, P., M. E., Rocha, G., Z. E., Bernal, F., A. A. y Pita M., L. A. 2017. Microorganismos funcionales en suelos con y sin revegetalización en el municipio de Villa de Leyva, Boyacá. Colombia Forestal, 20(2):158-170. <http://www.scielo.org.co/pdf/cofo/v20n2/v20n2a05.pdf>
- Cao, C., Jiang, D., Teng, X., Jiang, Y., Liang, W. and Cui, Z. 2008. Soil chemical and microbiological properties along a chronosequence of *Caragana microphylla* Lam. plantations in the Horqin sandy land of Northeast China. Applied Soil Ecology, 40:78-85. Doi.org/10.1016/j.apsoil.2008.03.008
- Cardoso, E. J. B. N. y Andreote, F. D. 2016. Microbiología do Solo. 2da Edição. Piracicaba, Sao Paulo. https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Bini/publication/311788702_Metabolismo_Microbiano/links/585a809908ae64cb3d4ac507/Metabolismo-Microbiano.pdf
- Castellanos, J. Z. 2000. Manual de Interpretación de Análisis de Suelos y Aguas. 2a edición. Intagri.
- Lauber, C. L., Strickland, M. S., Bradford, M. A. and Fierer, N. 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. Soil Biology Biochemistry, 40(9): 2407-2415. Doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.05.021

- Gómez-Guerrero, A., & Doane, T. 2018. The Response of Forest Ecosystems to Climate Change. In W. R. Horwath & K. Yakov (Eds.), *Climate change impacts on soil processes and ecosystem properties*. Elsevier, Vol. 35, pp. 185-206. Doi: 10.1016 / b978-0-444-63865-6.00007-7
- Maeder, P., Fließbach, A., Dubois, D., Gunst, L., Fried, P. and Niggli, U. 2002. Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science*, 296:1694-1697. DOI: 10.1126/science.1071148
- Martínez, H., H.A. 2014. Preselección de especies en la consultoría “Fomento de la reforestación comercial para la mejora y conservación de las reservas de carbono”. Moravia, Costa Rica, FONAFIFO (Fondo Nacional de Fomento Forestal). http://reddcr.go.cr/sites/default/files/centro-de-documentacion/fomento_de_la_reforestacion_comercial_para_la_mejora_y_conservacion_de_las_reservas_de_carbono.pdf
- Margalef, R. 1972. Homage to E. Hutchison, or why is there an upper limit to diversity. *Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Sciences*, 44: 211-235.
- Márquez, C. O., Franco, W., Hernández, R. y Visaez, F. Factores edáficos y nutricionales en relación con la muerte súbita en plantaciones de *Pinus caribaea* en Monagas, Venezuela. 2:15-18. <https://www.researchgate.net/publication/341434865>
- Marschner, P., Crowley, D. and Yang, C. H. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and soil*, 261(1): 199-208. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.458.560&rep=rep1&type=pdf>
- Nihorimbere, V., Ongena M., Smargiassi, M. and Thonart, P. 2011. Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 15(2): 327. <https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/113786/1/2011%20Nihorimbere%20Base.pdf>
- Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelo. Estudios, muestreo y análisis. México. 31 de diciembre de 2002. <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/mex50674.pdf>
- Moreira, F. M. S., Huising E. J. y Bignell, D. E. 2012. *Manual de Biología de suelos tropicales*. 1ra ed. Instituto Nacional de Ecología. México.
- Lugo, S., L., Mora C., Suarez, C. and Montarulio M. 2006. Relación entre la mortalidad y los suelos en las plantaciones de pino caribe del Oriente de Venezuela. *Revista Forestal Latinoamericana*, 39:57-83. <https://www.researchgate.net/publication/299390251>

- Pacasa-Quisbert, F., Loza-Murguía, M. G., Bonifacio-Flores, A., Vino-Nina, L. y Serrano-Canaviri, T. 2017. Comunidad de hongos filamentosos en suelos del Agroecosistema de K'iphak'iphani, Comunidad Choquenaira-Viacha. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 8:2-25. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2072-92942017000100002&lng=es&tlng=es
- Ros, M., Rodríguez, I., García, C., and Hernández, T. 2010. Microbial communities involved in the bioremediation of an aged recalcitrant hydrocarbon polluted soil by using organic amendments. *Bioresource Technology*, 101: 6916-6923. [Doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.126](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.126)
- Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P. C., Lauber, C. L., Lozupone, C., Caporaso, J. G., Knight, R. and Fierer, N. 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME Journal*, 4(10):1340-1351. [Doi: 10.1038/ismej.2010.58](https://doi.org/10.1038/ismej.2010.58)
- Plassard, C. and Dell, B. 2010. Phosphorus nutrition of mycorrhizal trees. *Tree Physiology*, 30(9): 1129-1139. [DOI: 10.1093/treephys/tpq063](https://doi.org/10.1093/treephys/tpq063)
- Steiner, G. W. y Watson, R. D. 1965. Use of surfactants in the soil dilution and plate count method. *Phytopathology*, 55:728-730.
- Sun, D. and Dickinson, G. 1993. Responses to salt stress of 16 Eucalyptus species, *Grevillea robusta*, *Lophostemon confertus* and *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. *Forest Ecology and management*, 60: 1-14. [Doi.org/10.1016/0378-1127\(93\)90019-J](https://doi.org/10.1016/0378-1127(93)90019-J)

CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES

Se demostró que el hongo endófito *Lasiodiplodia theobromae* en asociación con la baja calidad del suelo causan el amarillamiento generalizado de los árboles de pino híbrido.

Se encontró que el pino híbrido se encuentra desarrollándose bajo estrés fisiológico constante, debido al tipo de suelo que posee baja capacidad de retención de nutrientes, pH ácido, bajo contenido de materia orgánica y diversidad fungica limitada, los cuales son condiciones que favorecen la incidencia de *Lasiodiplodia theobroma*.

La presente investigación representa un precedente a posibles investigaciones más detalladas, que involucren variables de temperatura, humedad, manejo del suelo y el material genético de los árboles de pino.

- Se recomienda evaluar la sanidad de la semilla mediante pruebas en laboratorio para detección de hongos endófitos.
- Desinfestación de semillas mediante hipoclorito de sodio.
- De acuerdo a nuestro estudio del suelo se recomienda que antes o posterior al trasplante de los árboles, se debe realizar muestreos de suelo con el fin de analizar las propiedades físicas, químicas y biológicas el cual permitirá la toma de decisiones para evitar problemas futuros.
- Debido a la baja calidad del suelo se propone el aporte de MO con el fin de mejorar las características de éste y así aumentar la diversidad biológica los cuales juegan un papel importante en la liberación de los nutrientes.