



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**



*"La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra"*

**CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES FÚNGICAS EN PINUS SP EN SISTEMAS FORESTALES DE LA SIERRA NORTE DE PUEBLA, UNA ALTERNATIVA AL USO DE PLAGUICIDAS**

**TESIS**

Que para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES**

Presenta

**LUIS MARTÍN GUTIÉRREZ FLORES**

Directora de tesis:  
Dra. Lucia López Reyes



Octubre 2023



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**  
**INSTITUTO DE CIENCIAS**



**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

*“La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra”*

**CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES FÚNGICAS EN PINUS SP EN SISTEMAS FORESTALES DE LA SIERRA NORTE DE PUEBLA, UNA ALTERNATIVA AL USO DE PLAGUICIDAS**

TESIS

Que para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES**

Presenta

**LUIS MARTÍN GUTIÉRREZ FLORES**

Comité Tutorial:

Directora	Dra. Lucía López Reyes
Co-Directora Externa	Dra. Amparo Mauricio Gutiérrez
Tutor	Dr. Eduardo Torres Ramírez
Integrante Comité Tutorial	Dra. Elsa Iracena Castañeda Roldán †
Integrante Comité Tutorial	Dr. Enrique Hipólito Romero

Octubre 2023

## ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN .....	8
II.	ANTECEDENTES .....	9
II.1	Importancia de los bosques .....	9
II.1.1	Importancia ecológica del bosque .....	9
II.1.2	Importancia social del bosque .....	9
II.1.3	Importancia económica del bosque .....	10
II.2	El bosque de pino como sistema complejo .....	10
II.3	Escenario forestal en México y Puebla .....	12
II.4	Cadena productiva de los recursos forestales .....	13
II.5	Legislación nacional para el manejo forestal .....	15
II.5.1	Legislación para el uso de plaguicidas en México .....	16
II.6	Plaguicidas y sus efectos ambientales .....	16
II.6.1	Fungicidas en México .....	18
II.7	Control biológico de enfermedades en plantas .....	21
II.7.1	El control biológico de enfermedades en <i>Pinus</i> spp.....	22
II.8	Los mecanismos de control biológico .....	25
II.8.1	Competencia por espacio y/o nutrientes.....	25
II.8.2	Depredación .....	26
II.8.3	Parasitismo .....	26
II.8.4	Amensalismo.....	27
II.8.5	Inducción de la respuesta sistémica .....	28
II.9	Interacción planta-microorganismo en el biocontrol .....	29
II.10	Plaguicidas de formulación biológica .....	29
II.11	Bacterias Gram positivas como agentes de control biológico.....	30
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
IV.	JUSTIFICACIÓN.....	33
V.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	34
VI.	HIPÓTESIS .....	34
VII.	OBJETIVOS .....	34
VII.1	Objetivo General .....	34

<b>VII.2</b> Objetivos específicos.....	34
<b>VIII.</b> SITIO DE ESTUDIO .....	35
<b>VIII.1</b> Sierra Norte del Estado de Puebla .....	35
<b>VIII.2</b> Caracterización biofísica del sitio de estudio .....	35
<b>IX.</b> MATERIALES Y MÉTODOS .....	41
<b>IX.1</b> Aislamiento e identificación de bacterias Gram positivas con propiedades antifúngicas y caracterización de sus mecanismos de acción antagonicos.....	41
<b>IX.2</b> Aislamiento e identificación de hongos provenientes de acículas de <i>Pinus</i> spp. del Norte del Estado de Puebla .....	42
<b>IX.3</b> Pruebas de patogenicidad en acículas y plántulas de pino a nivel invernadero .....	43
<b>IX.4</b> Evaluación del antagonismo de bacterias Gram Positivas como agentes de control biológico de hongos bajo condiciones controladas .....	44
<b>IX.5</b> Caracterización del control biológico de hongos patógenos en la Sierra Norte de Puebla.....	45
<b>IX.6</b> Valoración de la importancia social del bosque de pino con respecto a los servicios ecosistémicos y económicos en el Norte del Estado de Puebla a partir de encuestas a actores clave.....	46
<b>X.</b> RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
<b>X.1</b> Muestreo.....	47
<b>X.2</b> Aislamiento y caracterización de bacterias Gram positivas .....	49
<b>X.3</b> Aislamiento y caracterización de hongos asociados a pino.....	64
<b>X.4</b> Patogenicidad y control biológico en condiciones de cámara húmeda .....	71
<b>X.5</b> Patogenicidad y control biológico bajo condiciones de invernadero .....	74
<b>X.6</b> Evaluación de control biológico bajo condiciones naturales.....	81
<b>X.7</b> Caracterización de la importancia social.....	85
<b>X.7.1</b> Mapeo de la cadena productiva .....	85
<b>X.7.2</b> Identificación de actores clave .....	88
<b>X.7.3</b> Diseño y aplicación del instrumento de valoración social .....	89
<b>XI.</b> CONCLUSIONES .....	97
<b>XII.</b> BIBLIOGRAFÍA.....	99
<b>XIII.</b> ANEXOS.....	126
<b>XIII.1</b> Encuesta de percepción social de los servicios ecosistémicos del bosque .....	126
<b>XIII.2</b> Protocolo para la aplicación de biofungicida en campo .....	130
<b>XIII.3</b> Procedimiento de validación del control biológico en campo .....	131
<b>XIII.4</b> Hoja de seguridad del fungicida químico .....	133

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Formulaciones químicas con actividad antifúngica distribuidas en México. ....	19
<b>Cuadro 2.</b> Formulaciones biológicas con actividad antifúngica distribuidas en México. ....	20
<b>Cuadro 3.</b> Ventajas y desventajas del biocontrol .....	22
<b>Cuadro 4.</b> Uso de agentes de control biológico en <i>Pinus</i> spp.....	23
<b>Cuadro 5.</b> Fungicidas químicos de uso agrícola y forestal en México .....	32
<b>Cuadro 6.</b> Muestras de suelo y acícula procedentes de la Sierra Norte de Puebla .....	49
<b>Cuadro 7.</b> Población de bacterias presentes en los suelos forestales .....	50
<b>Cuadro 8.</b> Identificación bioquímica de bacterias aisladas de suelo forestal de la Sierra Norte de Puebla .....	52
<b>Cuadro 9.</b> Producción de quitinasas y sideróforos de las bacterias aisladas de suelo forestal.....	54
<b>Cuadro 10.</b> Especies de bacilos Gram positivos aislados de suelo de la Sierra Norte de Puebla .....	60
<b>Cuadro 11.</b> Identidad de los hongos asociados a <i>Pinus</i> spp. de la Sierra Norte de Puebla.....	67
<b>Cuadro 12.</b> Ensayos de patogenicidad en cámara húmeda .....	71
<b>Cuadro 13.</b> Ensayos de control biológico en cámara húmeda.....	73
<b>Cuadro 14.</b> Parámetros de sanidad en plantas de <i>Pinus patula</i> bajo condiciones de campo .....	83
<b>Cuadro 15.</b> Actores clave identificados en la cadena productiva del pino de la Sierra Norte de Puebla .....	88

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Complejidad del bosque de pino .....	11
<b>Figura 2.</b> Diseminación de enfermedades en sistemas forestales .....	13
<b>Figura 3.</b> Interacciones involucradas en el control biológico .....	21
<b>Figura 4.</b> Sitio de estudio.....	36
<b>Figura 5.</b> Mapa climatológico del sitio de estudio.....	37
<b>Figura 6.</b> Mapa edafológico del sitio de estudio.....	38
<b>Figura 7.</b> Mapa de precipitación pluvial del sitio de estudio .....	39
<b>Figura 8.</b> Mapa de uso de suelo y vegetación del sitio de estudio .....	40
<b>Figura 9.</b> Escala de severidad de la enfermedad en <i>Pinus</i> spp. ....	45
<b>Figura 10.</b> Muestreo de acículas y suelo asociado a pino.....	47
<b>Figura 11.</b> Puntos de muestreo en la Sierra Norte de Puebla.....	48
<b>Figura 12.</b> Soluciones diluidas de suelo asociado a pino.....	50
<b>Figura 13.</b> Galerías API a) 50CHB y b) 20E inoculadas con una cepa bacteriana de suelo forestal .....	51
<b>Figura 14.</b> Bacterias sembradas en medio mínimo enriquecido con quitina .....	53
<b>Figura 15.</b> Producción de sideróforos de bacterias del género <i>Bacillus</i> .....	56
<b>Figura 16.</b> Control biológico en placa con <i>Bacillus</i> sp.....	56
<b>Figura 17.</b> Inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento micelial de <i>C. coatesiae</i> , <i>M. rubricosum</i> y <i>C. rosea</i> .....	57
<b>Figura 18.</b> Antagonismo en placa de <i>C. coatesiae</i> , <i>M. rubricosum</i> y <i>C. rosea</i> .....	58
<b>Figura 19.</b> Ensayo de compatibilidad de cepas antagonistas de hongos.....	59
<b>Figura 20.</b> Árbol filogenético de bacterias antagonistas de hongos aisladas de la rizosfera de <i>Pinus</i> spp. ....	62
<b>Figura 21.</b> Bacterias antagonistas de hongos en agar gelosa sangre.....	63
<b>Figura 22.</b> Aislamiento de hongos asociados a <i>Pinus</i> spp. en agar papa dextrosa.....	64
<b>Figura 23.</b> Hongos en común entre las especies <i>P. montezumae</i> , <i>P. patula</i> y <i>P. pseudostrobus</i> .....	65
<b>Figura 24.</b> Estructura reproductiva de <i>Aspergillus</i> sp. observada en microscopio óptico 40x .....	65
<b>Figura 25.</b> Gel de agarosa al 3% con productos de PCR de hongos aislados de pino. ....	66
<b>Figura 26.</b> Árbol filogenético de hongos asociados a la defoliación en <i>Pinus</i> spp.....	70
<b>Figura 27.</b> Producción de pinos en vivero en la localidad de Pueblo Nuevo.....	74
<b>Figura 28.</b> Plantas de <i>Pinus</i> spp. con diferentes tratamientos.....	75
<b>Figura 29.</b> Crecimiento de <i>C. rosea</i> en las acículas de <i>P. pseudostrobus</i> de invernadero.....	76
<b>Figura 30.</b> Incidencia de la enfermedad en <i>P. patula</i> .....	77
<b>Figura 31.</b> Índice de severidad de la enfermedad en <i>P. patula</i> .....	77
<b>Figura 32.</b> Incidencia de la enfermedad en <i>P. montezumae</i> .....	78
<b>Figura 33.</b> Índice de severidad de la enfermedad en <i>P. montezumae</i> .....	79
<b>Figura 34.</b> Incidencia de la enfermedad en <i>P. pseudostrobus</i> .....	80
<b>Figura 35.</b> Índice de severidad de la enfermedad en <i>P. pseudostrobus</i> .....	80
<b>Figura 36.</b> Aplicación de mezcla bacteriana a <i>P. patula</i> .....	82
<b>Figura 37.</b> Acículas de <i>P. patula</i> con diferentes tratamientos .....	83
<b>Figura 38.</b> Índice de severidad e incidencia de lesiones a árboles de <i>Pinus patula</i> tratados .....	84
<b>Figura 39.</b> Mapeo de la cadena productiva del pino de la Sierra Norte de Puebla .....	85
<b>Figura 40.</b> Sexo de los actores clave de la cadena productiva del pino de la Sierra Norte de Puebla .....	89
<b>Figura 41.</b> Tiempo dedicado a actividades relacionadas con el sector forestal de los actores clave .....	90
<b>Figura 42.</b> Uso de los recursos forestales en la Sierra Norte de Puebla.....	90
<b>Figura 43.</b> Importancia de la conservación del bosque de pino de la Sierra Norte de Puebla .....	91
<b>Figura 44.</b> Principales bienes y servicios obtenidos del bosque de pino en la Sierra Norte de Puebla.....	92
<b>Figura 45.</b> Disminución forestal en la Sierra Norte de Puebla y sus causas .....	93
<b>Figura 46.</b> Afectación del bosque por plagas y enfermedades y sus impactos observados .....	93
<b>Figura 47.</b> Problemática para el manejo del bosque de pino de la Sierra Norte de Puebla.....	94
<b>Figura 48.</b> El control biológico como alternativa al manejo de hongos en el bosque .....	95

## **Agradecimientos:**

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías, por la beca tesis que me otorgó para el curso del Doctorado en Ciencias Ambientales con el número de beca 742331.

A la Comisión Nacional Forestal del Estado de Puebla, por el apoyo brindado en la atención del problema ambiental de la defoliación de pinos en la Sierra Norte de Puebla.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado, por el apoyo al proyecto grupal “Biofungicida bacteriano para el control biológico de enfermedades fúngicas en *Pinus* sp. de la Sierra Norte de Puebla como una alternativa al uso de plaguicidas” con clave 100155588-VIEP2023 perteneciente al Programa Institucional de Fomento a la Investigación y a la Consolidación de Cuerpos Académicos.

A BiofertiBUAP, por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

A la Dra. Lucía López Reyes, a la Dra. Amparo Mauricio Gutiérrez y a el M.C. Moisés G. Carcaño Montiel por su soporte y enseñanzas en mi proceso de formación.

A mi familia, por el respaldo, motivación y apoyo incondicional para continuar con mi formación profesional.

## I. INTRODUCCIÓN

México es un país megadiverso que alberga el 12% de la diversidad mundial de especies de animales y plantas, con una mayor variabilidad genética (35%) en las áreas tropicales y boscosas [Jardel, 2006; Rzedowski, 2006; Llorente y Ocegueda, 2008]. Además, el 72% de su superficie se encuentra dedicada al aprovechamiento de los recursos forestales [Benitez y Bellot, 2007]. En México, la mayor producción forestal corresponde a las coníferas con el 88% del total nacional donde Durango, Chihuahua, Michoacán, Jalisco, Oaxaca y Puebla son las principales entidades involucradas [INECC, 2007]. La contribución directa del sector forestal en México es de 5 000 millones de dólares por año (0.81% del PIB nacional) y produce aproximadamente 100 000 empleos permanentes [CONABIO, 2006]. Además de ser valiosos económicamente, los bosques representan un recurso ambiental sustancial [Tapia y Reyes, 2008]; tienen una trascendencia y reconocimiento por su diversidad biológica, los servicios ambientales que ofrecen, la diversidad de productos que generan y, sus aportes a las estrategias de mitigación y adaptación al cambio climático [Campo *et al.*, 2016; SEMARNAT, 2016]. Sin embargo, los bosques se encuentran constantemente afectados por condiciones ambientales adversas como los incendios, la presencia de plagas y las enfermedades. La presencia de enfermedades es una de las principales causas de pérdida del patrimonio forestal por su alarmante expansión en los sistemas boscosos [Leautaud y López, 2017; CCMSS, 2016]. Los hongos son los agentes más comúnmente asociados a las enfermedades en los bosques del Estado de Puebla y se establecen en diferentes partes de las plantas alterando su salud. Estos organismos, son combatidos con la aplicación de sustancias químicas de fácil uso y acceso, aunque son de baja efectividad y tienen impactos negativos al medio por ser altamente tóxicos a la biodiversidad, conducir a problemas de contaminación ambiental y provocar resistencia en plagas, etc. [Crissman, 2002]. Uno de los retos que se enfrenta como sociedad es combatir la presencia de estos patógenos fúngicos para garantizar que las generaciones futuras cuenten con los recursos forestales y la diversidad biológica necesarios para su óptimo desarrollo. Ante esta situación, el uso de microorganismos antagonistas emerge como una alternativa prometedora que ayuda a reducir el uso de plaguicidas de síntesis química. Por ello, se propone la aplicación del control biológico a especies de pino afectadas por hongos fitopatógenos en el Norte del Estado de Puebla, como una alternativa al uso de fungicidas químicos con el consecuente beneficio ecológico, social y económico que brinda el bosque de la región.

## **II. ANTECEDENTES**

### **II.1 Importancia de los bosques**

Los bosques son bienes naturales de gran valor ambiental por su aportación a los ecosistemas y a la sociedad, por proveer insumos directos como la madera, servicios ecosistémicos por ser sumideros de emisiones de carbono, colaborar en la regulación de las condiciones climáticas y preservar la biodiversidad [FAO, 2011]. Asimismo, cerca de 1 000 millones de personas en el mundo dependen para su subsistencia de los bosques, ya sea como fuente directa o indirecta de ingresos [FAO, 2020]. Además, los bosques son considerados sistemas ambientalmente invaluableles por tener contribuciones decisivas en los sectores económico, ecológico y social.

#### **II.1.1 Importancia ecológica del bosque**

Desde el punto de vista ecológico, los bosques son la fuente de alimento y el hábitat de más de tres cuartas partes de la biodiversidad terrestre mundial. También, favorecen la protección de los suelos al controlar la erosión, colaboran en la generación de oxígeno y actúan como sumidero de contaminantes [FAO, 2018]. Los servicios ecosistémicos que proporcionan los sistemas boscosos colaboran a la producción en los sectores: agrícola, ganadero, forestal y pesquero al influir en la regulación del agua y el clima, proteger e intervenir en el ciclo de los nutrientes del suelo, fomentar el control biológico de plagas y la polinización [Reed *et al.*, 2017]. Además, cerca del 75% del agua dulce disponible en el planeta proviene de cuencas hidrográficas asociadas a los bosques [MEA, 2005].

#### **II.1.2 Importancia social del bosque**

Todas las personas dependemos de los bosques al beneficiarnos de sus funciones por intervenir en los ciclos del carbono, el agua y los nutrientes [FAO, 2018]. Sin embargo, las poblaciones aledañas a los sistemas boscosos dependen directamente de los bienes y servicios forestales para vivir, pues de ellos obtienen recursos alimentarios, materias primas, protección, fuentes de dendroenergía, algunos medicamentos e ingresos por su aprovechamiento [Balvanera, 2012]. También, los sistemas boscosos ofrecen contribuciones a la sociedad al fortalecer los medios de vida, conservar la diversidad biológica y colaborar al combate del cambio climático. Además, la seguridad

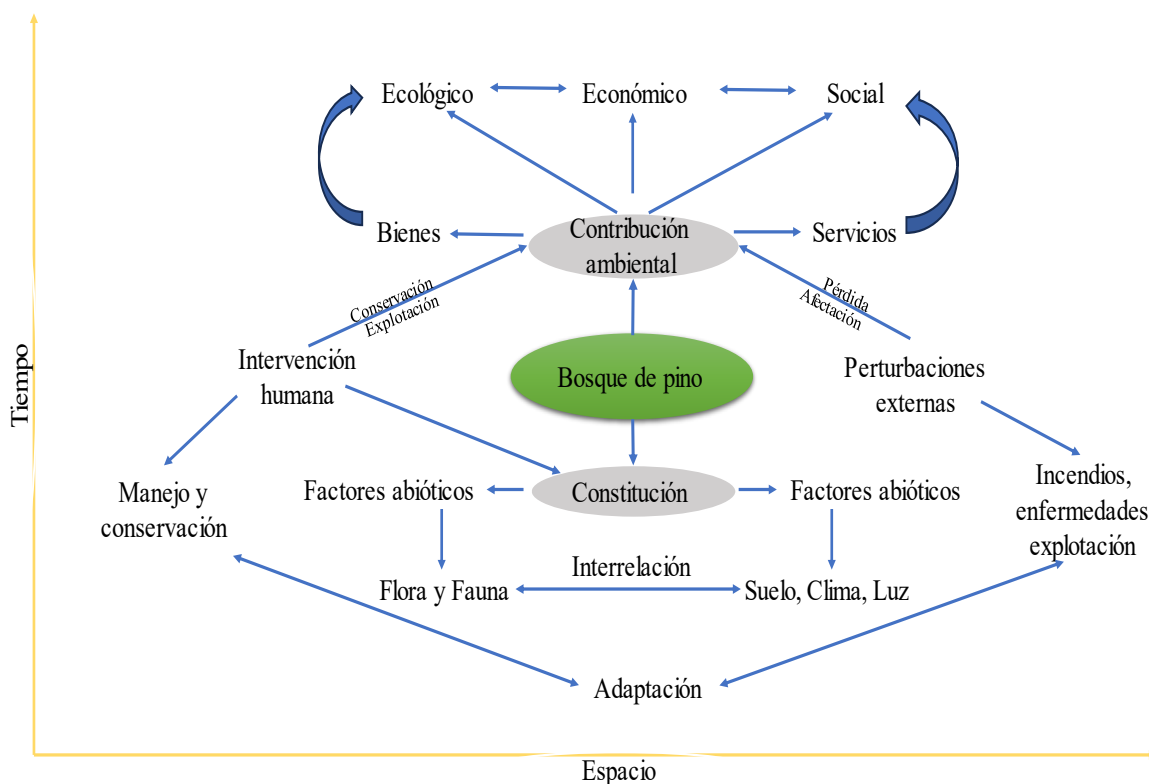
alimentaria, la conservación y el manejo sostenible de los bosques son objetivos complementarios e interdependientes [FAO, 2020]. Asimismo, proporcionan espacios recreativos y turísticos, además de tener un valor escénico, cultural y espiritual para algunas comunidades [Verschuuren y Brown, 2018]. Desafortunadamente, los servicios intangibles de los bosques y su biodiversidad son infravalorados debido a que regularmente se privilegian a los beneficios económicos obtenidos de su explotación [Ruiz *et al.*, 2007].

### **II.1.3** Importancia económica del bosque

Los bosques representan una fuente de ingresos al ser esenciales para la obtención de energía y materia prima. Del mismo modo, contribuyen a la agricultura sostenible al favorecer en la estabilización de los suelos, regular el clima y los flujos de agua. [Zamora, 2016]. También, el turismo y la recreación presente en los bosques son importantes para la economía de las comunidades ubicadas en sitios forestales [Hegetschweiler *et al.*, 2017]. Los insumos maderables y no maderables obtenidos de los bosques suministran aproximadamente el 20% de los ingresos obtenidos en las zonas forestales de países en desarrollo [Angelsen *et al.*, 2014]. Además, cerca de 45 millones de personas a nivel mundial obtienen empleo del sector forestal formal, con ingresos laborales superiores a los 580 000 millones de dólares al año [FAO, 2018]. Asimismo, a nivel mundial, se obtienen beneficios económicos de productos forestales no maderables cercanos a los 8 000 millones de dólares [FAO, 2020].

### **II.2** El bosque de pino como sistema complejo

Un sistema complejo es “una representación de un recorte de la realidad compleja, conceptualizado como una totalidad organizada en la cual los elementos no son separables y por lo tanto no pueden ser estudiados aisladamente” [García, 2006]. A partir de esta definición, se puede observar al bosque de pino como un conjunto de elementos bióticos y abióticos que están interrelacionados y que son interdependientes, con propósitos dentro del sistema ecológico e importantes para la conservación de su equilibrio y diversidad (Figura 1). Ante todo, los sistemas complejos son sistemas de componentes que interactúan y originan fenómenos emergentes [Green y Sadedin 2005].



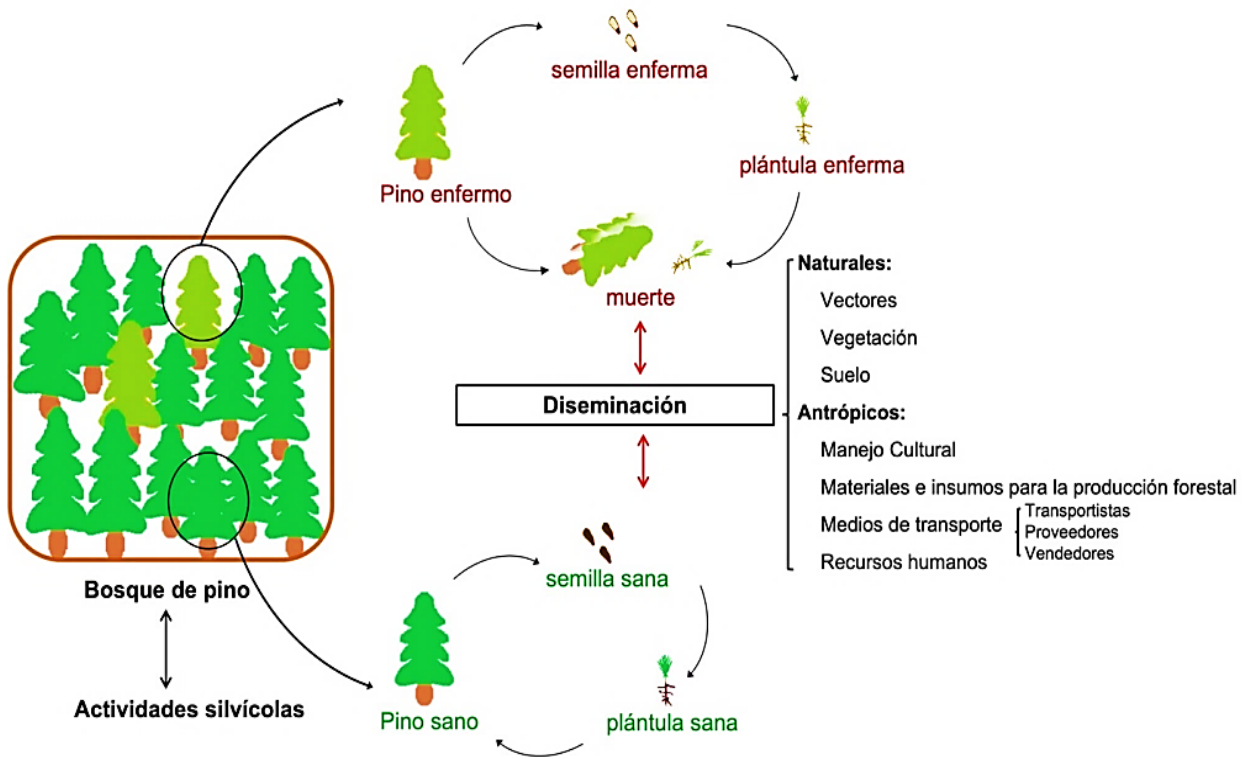
**Figura 1.** Complejidad del bosque de pino

Cada característica, disposición o arreglo observado en este ecosistema es producto de las interacciones y las interdependencias de las partes que lo conforman. Además, la dinámica de esta diversidad de elementos se encuentra sujeta a la intervención del hombre, como un ser orientado a satisfacer sus necesidades a partir del capital natural del ecosistema. Por lo que, la humanidad no es ajena al bosque y hay que comprender que también formamos parte del bosque y el bosque parte de nosotros y nuestra cultura. También, la diversidad y heterogeneidad ecosistémica del bosque de pino le brinda estabilidad y adaptabilidad [Gunderson y Holling 2002]; sin embargo, los elementos que lo conforman pueden ser perturbados por condiciones externas que lleven a su desequilibrio. Un ejemplo de ello son las enfermedades de las plantas, que son perturbaciones externas que regularmente requieren de la intervención humana afrontar su control. Si bien, este ecosistema presenta resiliencia a presiones por su capacidad de autorregulación, el desequilibrio ecológico ocasionado por múltiples factores que afectan conjuntamente al bosque, provocan debilidad en el sistema y con ello su degradación. Del mismo modo, las afectaciones causadas por la presencia de enfermedades en el bosque ocasionan la disminución en el aprovisionamiento de múltiples

contribuciones de gran importancia a nivel ecológico, económico y social. Por ejemplo: ecológicamente, causan el deterioro del hábitat de una amplia diversidad; económicamente, afectan la obtención de materia prima y merman los empleos; y, socialmente, afectan a un socioecosistema importante para la cultura. Por ello, es importante analizar a los bosques como sistemas complejos y destacar el hecho de que las estrategias de gestión forestal necesitan un enfoque holístico.

### II.3 Escenario forestal en México y Puebla

En el sector forestal mexicano habitan aproximadamente 11 millones de personas, quienes satisfacen sus necesidades a partir del capital natural forestal. Sin embargo, debido al uso intensivo y no sustentable de los recursos, existe una disminución de la biomasa forestal del país ocasionada por explotaciones indiscriminadas; así como por condiciones desfavorables como los incendios, la agricultura intensiva, el sobrepastoreo, la contaminación atmosférica y la presencia de patógenos [Ken *et al.*, 2020]. La degradación y pérdida de la superficie arbolada de estos ecosistemas genera problemas ambientales en los sectores ecológico, económico y social. El estado de Puebla se ubica en el vigésimo lugar a nivel nacional con mayor superficie forestal (1.7 millones de hectáreas), con el 45% de su superficie cubierta por áreas arboladas, el 18% representada por vegetación de zonas áridas y el 37% son superficies perturbadas [SEMARNAT, 2001]. En los sistemas boscosos de Puebla dominan 11 especies arbóreas de cinco géneros y la familia con mayor representación es Pinácea con un total de seis especies; de las cuales *Pinus montezumae* es la que presenta los valores mayores de densidad, área basal y área de copa, seguido por *Abies religiosa* y *Pinus hartwegii* [López *et al.*, 2017]. Sin embargo, estas especies arbóreas están afectadas por plagas y enfermedades, las cuales son las principales causantes de la pérdida de biomasa en los bosques de pino. Las enfermedades en los bosques de pino son alteraciones a la salud de las plantas debidas a la interacción de un patógeno con un árbol susceptible en un ambiente favorable. Además, afectan principalmente a zonas donde existe un fuerte impacto antropogénico y los factores de tipo ambiental les provocan estrés [SEMARNAT, 2016]. También, las enfermedades se pueden transmitir entre árboles forestales de especies diferentes en cualquier etapa su ciclo de vida, a través de medios naturales como la acción del viento y, vectores antrópicos principalmente relacionados a malas prácticas en los procesos de aprovechamiento y reforestación [Gutiérrez-Flores *et al.*, 2022] (Figura 2).



**Figura 2.** Diseminación de enfermedades en sistemas forestales [Gutiérrez-Flores *et al.*, 2022]

#### II.4 Cadena productiva de los recursos forestales

Una cadena productiva es un conjunto secuencial y articulado de actores que se encuentran interrelacionados e involucrados en las etapas de producción, transformación y comercialización para la generación de un bien o servicio [Antúnez y Ferrer, 2016]. Además, en la formulación de estas cadenas se toman en cuenta los insumos necesarios para la producción desde el sector primario hasta su destino y aprovechamiento final, así como los servicios ofrecidos a lo largo de la cadena [Lazzarini *et al.* 2001]. Cada uno de los actores involucrados tiene un rol y una responsabilidad específicos para la elaboración del bien o servicio, así como una diferente facultad sobre la cadena, acceso a la información, riesgos y ganancias acordes a sus compromisos [Gottret y Cordoba, 2006]. El conjunto de actores identificados se encuentra sometido a la influencia del entorno, representado por varios elementos como las condiciones ambientales o políticas [Cancino y Rodríguez, 2009]. En una cadena productiva equitativa, los actores involucrados generan relaciones justas, controlan los recursos, aprovechan las oportunidades, tienen poder de decisión y

reciben beneficios acordes a su inversión y trabajo realizado [Apaza y Moreno, 2008]. Los actores clave de una cadena productiva son analizados como un conjunto de individuos que están diferenciados por su nivel de bienestar, género y por las habilidades que desenvuelven para lograr sus medios de vida [Ruralter, 2004]. Dentro de las ventajas observadas por la elaboración de cadenas productivas tenemos principalmente el manejo completo de la información en un esquema, lo que brinda facilidad para encontrar puntos críticos estratégicos que limitan el desarrollo de la cadena y que permite la identificación de actores clave que inciden en su funcionamiento [Cillóniz *et al.*, 2003]. Además, realizar un análisis de cadena productiva tiene otras utilidades, destacando entre ellas: entender el funcionamiento productivo, los actores involucrados, sus roles e interrelaciones. También se pueden identificar áreas de oportunidad para la mejora del sistema de producción. Así como construir o fortalecer las relaciones encontradas en la cadena de producción para fomentar la creación de cadenas de valor y, posicionar los bienes y servicios en el mercado con mayor precisión [Lundy *et al.*, 2004]. La creación de cadenas productivas de bienes obtenidos a partir de los ecosistemas puede aportar al desarrollo de mercados basados en productos que favorecen la generación de ingresos en zonas de alta biodiversidad. Para lograrlo, se requiere una visión multidisciplinaria de sostenibilidad que debe estar incluida dentro de proyectos de conservación de la biodiversidad [Heinrichs *et al.*, 2016]. La cadena productiva forestal es observada como un conjunto de eslabones necesarios para la obtención de bienes como la madera y de servicios del ecosistema [Schimpf *et al.*, 2019]. En una cadena productiva forestal podemos encontrar en primer lugar como beneficiarios a los dueños de los bosques. Sin embargo, también se ven beneficiados los habitantes de las áreas forestales, profesionistas y técnicos que contribuyen a su manejo, y la sociedad en general que encuentra en los bosques una fuente de empleo, ingresos, insumos y servicios ecosistémicos [Hernández, 2017]. Existen antecedentes de la formulación de este tipo de cadenas productivas en México, por ejemplo: el análisis estratégico de la cadena productiva forestal en la región de la Reserva de la Biosfera de la Mariposa Monarca [Rodríguez *et al.*, 2018]. Además, la creación de cadenas productivas para el aprovechamiento de recursos forestales es fomentada por el gobierno de México para la explotación sostenible de los recursos naturales mediante acciones de integración y consolidación de las cadenas productivas forestales, para colaborar en la reducción de la pobreza y marginación en zonas forestales, promover la planeación, organización, producción y aprovechamiento forestal, así como incrementar el nivel de competencia de las cadenas productivas [SEMARNAT, 2020].

## II.5 Legislación nacional para el manejo forestal

Dentro de la legislación aplicable al sector forestal se encuentra en primera instancia La Ley General de Desarrollo Forestal Sustentable. Este decreto tiene como objetivo regular la conservación, protección, restauración, producción, ordenación, el cultivo, manejo y explotación de los sistemas forestales nacionales; así como distribuir las competencias que, en materia forestal a los distintos niveles de gobierno, con el fin de propiciar el desarrollo forestal sustentable [DOF, 2020]. Permite la explotación legal y sustentable de los bosques en beneficio de la sociedad y contribuye al acatamiento de la “Deforestación Cero” a la que México se comprometió llegar en el año 2030 con el acuerdo de los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Organización de las Naciones Unidas. Por otro lado, las zonas forestales afectadas por plagas y enfermedades tienen legislación directamente aplicable al control biológico que permite combatir y mitigar los daños, como lo es el Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-70-FITO-1995, que establece los requisitos y especificaciones fitosanitarios para la importación, introducción, movilización y liberación de agentes de control biológico. Este proyecto de norma tiene como fin último evitar la dispersión de organismos perjudiciales y promover el uso de organismos benéficos a la naturaleza y sociedad [DOF, 1996]. También es aplicable el Programa Nacional Forestal, el cual, a partir de sus estrategias y líneas de acción, contribuye al logro de los compromisos con el Convenio Sobre Diversidad Biológica, las Metas de Aichi (2011-2020) y los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2030. El Programa Nacional Forestal tiene como objetivo la promoción del manejo forestal comunitario para la gestión sostenible de los recursos forestales; así como la generación e impulso de cadenas productivas competitivas que colaboren en el desarrollo de las economías locales para mejorar la calidad de vida de las poblaciones que habitan en zonas forestales. Con ello se permite hacer un uso responsable de los recursos forestales, y al mismo tiempo, se protegen los ecosistemas de factores que deterioran la cobertura vegetal, para mantener el patrimonio natural a través de una gestión sostenible. También, tiene como objetivos la conservación y restauración de la capacidad de aprovisionamiento de servicios ecosistémicos de las zonas forestales, mediante un enfoque participativo y de inclusión de la sociedad que contribuya a garantizar un medio ambiente sano que consienta el desarrollo y bienestar de la población [PNF, 2020].

### **II.5.1** Legislación para el uso de plaguicidas en México

El uso, manejo y comercialización de plaguicidas químicos está regulado por diversos reglamentos (ambiental, sanitario, fitosanitario, zoonosanitario, laboral y de transporte); dentro de los cuales, la Ley General de Salud es la que tiene mayor injerencia [Ortíz *et al.*, 2014]. En el control de las actividades relacionadas con estos químicos también se ven involucradas diversas dependencias como: la Secretaría de Salud (SS), la Secretaría del Trabajo y Previsión Social (STPS) y la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Además, existe una reglamentación oficial para el uso de plaguicidas, en la que se incluyen las siguientes normas: NOM-232-SSA1-2009, NOM-032-FITO-1995, NOM-003-STPS-1999, NOM-052-FITO-1995. También, existe el Decreto por el que se reforman, adicionan y derogan diversas disposiciones del reglamento en materia de registros, autorizaciones de importación, exportación y certificados de exportación de plaguicidas, nutrientes vegetales y sustancias y materiales tóxicos o peligrosos [DOF, 2014]; y el Registro Sanitario de Plaguicidas y Nutrientes Vegetales [DOF, 2019]. Toda la legislación antes mencionada se orienta a brindar los lineamientos para el uso y manejo de las sustancias plaguicidas con el fin de minimizar los riesgos y efectos adversos que su uso y aplicación puedan provocar. El acatamiento de estos decretos es necesario para proteger y preservar el ambiente natural, la salud humana y aprovechar de forma sustentable los recursos. Desafortunadamente, los intereses económicos, gubernamentales e industriales, juegan en contra de la implementación de un marco regulatorio adecuado para la comercialización y uso de plaguicidas en México. Este conflicto de intereses promueve una desatención de las leyes y aunado a las pocas alternativas biológicas que existen, se propicia la desprotección del medio ambiente y la salud [Micheli, 2001]. Es por ello, que se observa como necesario un cambio de paradigma en la legislación de los plaguicidas orientado hacia la sostenibilidad; así como colaborar en el impulso de alternativas ecológicas para el control de plagas con menor impacto, y con ello, construir un sistema de aprovechamiento y conservación.

### **II.6** Plaguicidas y sus efectos ambientales

Los plaguicidas son los contaminantes de origen antrópico más aplicados en los ambientes naturales. Se definen como “una sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o

controlar plagas” [Ramírez, 2001]. Estos compuestos de origen químico representan un peligro para el ambiente por su alta toxicidad y algunos están restringidos por acuerdos internacionales como el Convenio de Róterdam, el Protocolo de Montreal y el Convenio de Estocolmo sobre los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP); el cual incluye 12 productos químicos, dentro de los que se encuentran ocho plaguicidas [PAN UK, 2009]. El uso de los plaguicidas es muy diverso y la agricultura es la actividad en la que más se emplean, ya que consume cerca del 85% de la producción a nivel mundial [Del Puerto *et al.*, 2014]. La contaminación ambiental por plaguicidas se da fundamentalmente por filtraciones en su almacenamiento, residuos descargados y dispuestos en el suelo, derrames accidentales y su uso excesivo. Los plaguicidas se dispersan en el ambiente por diversas rutas, definidas por factores como el clima, las condiciones geomorfológicas, hidrogeológicas y meteorológicas de las zonas donde son vertidos [RAPAL, 2007]. Algunas sustancias químicas que forman parte de estos compuestos son resistentes a la degradación y, en consecuencia, persisten por largos períodos de tiempo en las aguas subterráneas y superficiales [FAO, 2017]. Los fungicidas son plaguicidas químicos que se fumigan o espolvorean sobre el suelo, las semillas, hojas o frutas para controlar la propagación de hongos y mohos. La mayoría de estas formulaciones se constituyen por: bencenos, tiocarbamatos, tioftalimidas y compuestos organometálicos; que son tóxicos persistentes y tienen efectos nocivos a la salud [Gielser *et al.*, 2008]. Estos plaguicidas pueden llegar al humano de forma directa a través del agua y el aire, e indirectamente por medio de la cadena biológica de los alimentos. Tienen efectos agudos y crónicos en la salud según el grado de exposición, considerándose crónico si superan los niveles considerados seguros [UE, 2006]. Los plaguicidas se pueden clasificar según su naturaleza, como de origen químico y biológico, además de que tienen medios de acción de amplio espectro y son comúnmente persistentes y de impacto negativo en el ambiente [Serra *et al.*, 2020]. Desafortunadamente se carece de la información suficiente sobre la identificación, el uso adecuado y los efectos nocivos de los plaguicidas químicos en árboles de pino. Por ejemplo, se desconocen los modos de acción fisiológico, bioquímico y molecular de las formulaciones sintéticas, los mecanismos necesarios para evitar el desarrollo de resistencia en los patógenos relacionados a las enfermedades, los efectos de los químicos sobre los microorganismos del suelo, las dosis de necesarias y, los métodos y condiciones de aplicación de los plaguicidas [Adusei-Fosu y Rolando, 2018]. Por otra parte, los plaguicidas biológicos son formulaciones desarrolladas a partir de organismos vivos y sus productos, que han demostrado ser eficaces para combatir organismos

nocivos [Heydari y Pessarakli, 2010; Liu *et al.*, 2021]. Entre ellos se encuentran, por ejemplo, algunas especies antagónicas como *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus simplex* y *Erwinia billingiae* que actúan contra hongos patógenos como *Fusarium* spp. [Iturritxa *et al.*, 2017].

### II.6.1 Fungicidas en México

En México, se utilizan fungicidas que se han prohibido en otros países debido a su peligrosidad [Ortíz *et al.*, 2014]. Algunas formulaciones contienen ingredientes activos dañinos como: benomyl, captan, carbendazim, clorotalonil, folpet, mancozeb, quinoxifen y tiofanato de metilo, que permiten el control de hongos patógenos [DEAQ, 2018]. Estos compuestos se clasifican como altamente peligrosos al no cumplir con los criterios establecidos por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) para su uso y comercialización [FAO y OMS, 2019]. Además, la aplicación de los fungicidas puede favorecer el desarrollo de mutaciones genéticas, alteraciones hormonales y modificaciones endocrinas [RAPAM, 2017; Bravo *et al.*, 2020]. En el Cuadro 1, se muestra un listado de los ingredientes activos contenidos en los fungicidas comercializados en la República Mexicana de acuerdo con el Diccionario de Especialidades Agroquímicas [DEAQ, 2018] y el Registro Sanitario de Plaguicidas y Nutrientes Vegetales [COFEPRIS, 2019]. Así como se observa el efecto y los métodos de acción que tienen sobre los hongos patógenos y la toxicidad que pueden exhibir. Los plaguicidas se encuentran en diversas presentaciones comerciales de uso principalmente agrícola y algunas de recomendación forestal. También existen formulaciones biológicas y botánicas con actividad antifúngica que son distribuidas en México para el control de enfermedades fúngicas. En el cuadro 2 se observan tres soluciones biológicas, de las cuales un par son formulaciones generadas a partir de bacterias del género *Bacillus* que tienen la capacidad de biocontrolar patógenos por competencia, por la producción de antibióticos, enzimas y de otras sustancias como los sideróforos [Tejera *et al.*, 2012]; y, una solución a base de conidios del hongo *Trichoderma harzianum*, especie fúngica que inhibe a los patógenos a partir de diversos mecanismos antagónicos como la antibiosis, parasitismo y competencia; así como dos formulaciones de origen vegetal que contribuyen a la prevención de la presencia de hongos fitopatógenos [Ezziyyani *et al.*, 2004b].

**Cuadro 1.** Formulaciones químicas con actividad antifúngica distribuidas en México.

<b>Ingrediente: concentración</b> <sup>(Toxicidad)</sup>	<b>Efecto</b>	<b>Mecanismo de acción</b>
Aluminio tris: 80% <sup>(a,b)</sup>	Preventivo y de control	Bloquea la esporulación y estimula las defensas de la planta
Azoxiestrobina: 60%, Ciproconazol: 24% <sup>(a,b,c)</sup>	Control	Bloquea el proceso respiratorio y la síntesis de ergosterol
Azoxystrobin: 18%, Difenconazol: 11% <sup>(a, c)</sup>	Preventivo y de control	Sistémica
Azoxystrobin: 23% <sup>(a, c)</sup>	Preventivo y de control	Sistémica, preventiva y curativa
Azufre elemental: 52%-93% <sup>(a, b, c)</sup>	Preventivo y de control	Afecta la cadena respiratoria fúngica y proporciona nutrientes
Azufre elemental: 47% <sup>(a, b, c)</sup>	Preventivo y de control	Sistémica
Benomyl: 50% <sup>(a, b, c) *</sup>	Preventivo y de control	Sistémica
Bicarbonato de potasio <sup>(a, b, c)</sup>	Control	Regula la presión osmótica y destruye las paredes celulares
Captán: 50% <sup>(a, b, c) *</sup>	Preventivo	Previene, atenúa y controla enfermedades del follaje
Carbendazim: 43%-50% <sup>(c) *</sup>	Control (antracnosis)	Sistémica y curativa
Cimoxanil: 8%, Clorotalonil: 72% <sup>(c)</sup>	Control	Sinérgica por contacto
Ciproconazol: 10% <sup>(c)</sup>	Control	Sistémica y protectora
Clorotalonil: 52%-54% <sup>(c) *</sup>	Preventivo y de control	De contacto
Clorotalonil: 40%, Dimetomorf: 8% <sup>(a, b, c) *</sup>	Preventivo	Antiesporulante
Cuaternario de amonio: 12% <sup>(a, b, c)</sup>	Desinfectante/sanitizante	Desinfección y limpieza
Cymoxanil: 60% <sup>(a)</sup>	Preventivo y de control	Sistémica y translocación acropétala
Difenconazol: 25% <sup>(a)</sup>	Preventivo y de control	Sistémica preventiva, curativa y traslaminar
Difenconazol: 4%, Clorotalonil: 40% <sup>(c)</sup>	Control	Sistémica y de contacto
Oxitetracloruro de cobre 72% <sup>(a, b)</sup>	Preventivo y de control	Sistémica y de contacto
Famoxadona: 23%, Cymoxanil: 30% <sup>(a, c)</sup>	Preventivo	Sistémica, acropétala y de contacto
Famoxadona: 6%, Mancozeb: 63% <sup>(b, c)</sup>	Preventivo	Distintos modos de acción metabólicos
Fenbuconazol: 24% <sup>(a, b, c)</sup>	Preventivo y de control	Sistémica que inhibe la síntesis de los esteroides en los hongos
Fenhexamida: 50% <sup>(a, b, c)</sup>	Correctivo	Inhibe el tubo germinativo del hongo <i>Botrytis</i>
Folpet: 80% <sup>(b, c) *</sup>	Preventivo y de control	Protector de acción por contacto
Fosetil-Al: 80% <sup>(a, b, c)</sup>	Preventivo y de control	Refuerza las defensas de la planta y es antiesporulante
Fosfito de calcio: 25% <sup>(a, b, c)</sup>	Preventivo y de control	Controla la pudrición de la raíz y disfunción causada por <i>Phytophthora</i>
Fosfito de cobre: 40% <sup>(a, c)</sup>	Preventivo y de control	Estimula las defensas de la planta y actúa como fertilizante
Fosfito de magnesio: 75% <sup>(a, b, c)</sup>	Preventivo	Aporta magnesio
Fosfito de zinc: 40% <sup>(a, b, c)</sup>	Preventivo y de control	Aporta zinc, componente estructural
Fosfito potásico: 70% <sup>(a, b, c)</sup>	Preventivo y de control	Estimula las defensas de la planta y aporta potasio
Fosfonato de potasio: 75% <sup>(a, b, c)</sup>	Preventivo	Estimula las defensas de la planta

### Cuadro 1. Continuación

Isopyrazam: 13% <sup>(a)</sup>	Preventivo	Inhibe el complejo II de la respiración del hongo
Mancozeb 30%-80% <sup>(a, b, c) *</sup>	Preventivo	De contacto y protectora
Mancozeb: 50% <sup>(a, b, c) *</sup>	Preventivo	Preventiva debida a la mezcla de fungicidas
Mancozeb: 64%, Cymoxanil: 8% <sup>(b, c) *</sup>	Preventivo y de control	Actúa sobre el metabolismo de hongos pleosporales
Metalaxil: 9%, Clorotalonil: 72% <sup>(a, c)</sup>	Control	Sistémica y de contacto
Metil tiofanato: 50% <sup>(a, b, c)</sup>	Preventivo y de control	Impide el crecimiento micelial y la germinación de conidias
Myclobutanil: 20%-40% <sup>(a)</sup>	Control	Impide la biosíntesis de los ergosteroles de los hongos
Myclobutanil: 4%, Quinoxifen: 4% <sup>(a, b, c)</sup>	Control	Preventiva/translaminar y curativa/sistémica
Oleato cúprico: 22% <sup>(b)</sup>	Preventivo	De contacto foliar
Oxatiapiprolin: 10% <sup>(a, b, c)</sup>	Preventivo	Sistémica, acropétalo para el control de Oomycetos
Penthiopyrad: 20% <sup>(a, b, c)</sup>	Preventivo	Inhibe el proceso de respiración fúngica
Picoxystrobin: 18%, Ciproconazol: 7% <sup>(a, b, c)</sup>	Control	Inhibe la síntesis de ATP
Propiconazol: 26% <sup>(a)</sup>	Preventivo y de control	Actúa dentro de la planta inhibiendo el desarrollo del micelio
Quinoxifen: 23% <sup>(a, b, c) *</sup>	Preventivo y de control	Se fija en las ceras de la cutícula controlando la enfermedad
Quintozeno 37%-75% <sup>(a, b, c)</sup>	Control	De contacto para patógenos que atacan las semillas, raíces y tallos
Sulfato de cobre pentahidratado: 21% <sup>(a, b, c)</sup>	Preventivo	Sistémica
Tebuconazol: 23%-26% <sup>(a, b, c)</sup>	Preventivo y de control	Solución de amplio espectro y sistémico
Tebuconazol: 22%, Azoxystrobin: 11% <sup>(a)</sup>	Preventivo y de control	Sistémica y de contacto
Tiofanato de metilo: 42%-70% <sup>(c) *</sup>	Preventivo y de control	Sistémica y de contacto

a: Nocivo en caso de ingestión, b: Nocivo al contacto con la piel, c: Nocivo si se inhala. \*: Sustancia prohibida en otro país. Elaboración propia con información del Diccionario de Especialidades Agroquímicas (DEAQ) [2018] y del Registro Sanitario de Plaguicidas y Nutrientes Vegetales (COFEPRIS) [2019].

### Cuadro 2. Formulaciones biológicas con actividad antifúngica distribuidas en México.

Ingrediente activo: concentración (Toxicidad)	Efecto	Mecanismo de acción
<i>Bacillus</i> spp.: 10 <sup>8</sup> UFC <sup>(a, b, c)</sup>	Preventivo	Inhibe el crecimiento de patógenos de la raíz
<i>Bacillus subtilis</i> <sup>(a, b, c)</sup>	Control (pudrición radical)	Antagónico a <i>Fusarium oxysporum</i>
Extracto de gobernadora <sup>(d)</sup>	Control	Produce polifenoles que quelatan el calcio de la pared celular
Sales potásicas de ácidos grasos vegetales <sup>(d)</sup>	Preventivo	De contacto como complemento a fungicidas de amplio espectro
<i>Trichoderma harzianum</i> : 3%-10% <sup>(a, b, c)</sup>	Control	Desplaza patógenos por parasitismo, antibiosis y competencia

a: Nocivo en caso de ingestión, b: Nocivo al contacto con la piel, c: Nocivo si se inhala, d: Compuestos de origen vegetal sin toxicidad aparente. Elaboración propia con información del Diccionario de Especialidades Agroquímicas (DEAQ) [2018] y del Registro Sanitario de Plaguicidas y Nutrientes Vegetales (COFEPRIS) [2019].

## II.7 Control biológico de enfermedades en plantas

El control biológico es una estrategia que permite el manejo de plagas y enfermedades en plantas a través de la actividad de organismos vivos llamados antagonistas [Serrano y Galindo, 2007]. Esta técnica involucra diversas interacciones entre el ambiente, hospedero, huésped y el antagonista o biocontrolador, que disminuye la densidad poblacional y/o la actividad del patógeno (Figura 3). El antagonismo es toda acción ejercida por organismos que resulta en la disminución de la población de otro organismo y, en fitopatógenos reduce la expresión de la enfermedad. Los antagonistas de patógenos que se utilizan en el control biológico pueden ser de diversos tipos, entre los que encontramos a hongos, bacterias, nematodos, protozoos, virus, viroides y plantas. Los organismos antagonistas pueden presentar cinco mecanismos de acción frente a un patógeno: competencia, antibiosis, explotación, resistencia inducida en el huésped y lisis, bien de forma individual o asociada [Hernández *et al.*, 2007].

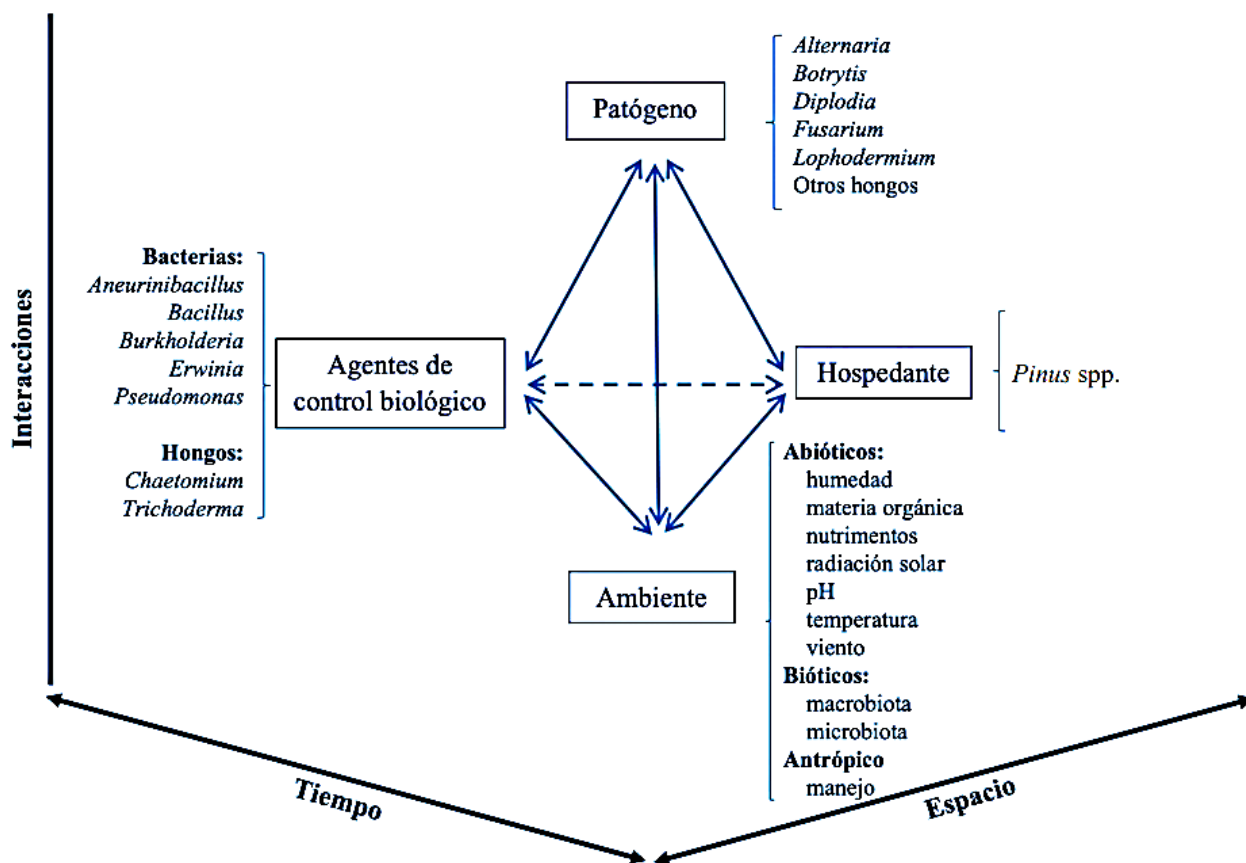


Figura 3. Interacciones involucradas en el control biológico [Gutiérrez-Flores *et al.*, 2022]

El control biológico o biocontrol se enfoca en la reducción de la densidad poblacional de un patógeno o de sus actividades inductoras de enfermedad, por la acción de uno o más organismos antagonistas [Baker y Cook, 1974]. El interés por el uso de esta técnica ha incrementado en las últimas décadas por las múltiples ventajas que tiene sobre los métodos químicos (Cuadro 3) y la preocupación de que el uso indiscriminado de productos químicos ha ocasionado el surgimiento de plagas resistentes y graves efectos de contaminación al ambiente [Gepp *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2019]. Ahora existe un mayor compromiso y conciencia social por la conservación del medio ambiente, lo que ha promovido el desarrollo de prácticas sostenibles como el biocontrol, no sólo enfocadas al beneficio económico, sino también al ecológico y social.

**Cuadro 3.** Ventajas y desventajas del biocontrol

<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
Mayor especificidad	Ignorancia sobre el método
Baja resistencia de las plagas al control	Falta de apoyo económico
Sustituye parcial o totalmente a los plaguicidas	Falta de personal especializado
Relación coste/beneficio	Antagonistas susceptibles a plaguicidas
Evita plagas secundarias	No provee una supresión inmediata
Escasas intoxicaciones	

[Summy y French, 1988]

### II.7.1 El control biológico de enfermedades en *Pinus* spp.

El biocontrol se ha utilizado ampliamente en el sector agrícola como una alternativa al combate químico de enfermedades en los cultivos. Sin embargo, hay una aplicación escasa de esta técnica para el manejo de árboles forestales. A pesar de ello, se ha observado que el control biológico ha tenido éxito en el manejo de enfermedades fúngicas en *Pinus* spp. bajo condiciones de invernadero y en ambientes naturales [Iturrutxa *et al.*, 2017]. Un ejemplo de ello es el biocontrol con bacterias como *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus simplex* y *Erwinia billingiae*, aisladas de la rizosfera de *Pinus radiata*, con actividad antagonica contra el hongo *Fusarium circinatum* [Iturrutxa *et al.*, 2017]. Este hongo patógeno también afecta a otras especies de pino como: *Pinus muricata*, *Pinus tadea*, *Pinus elliotii* y *Pseudotsuga menziesii* [Gordon *et al.*, 2006]. Asimismo, se ha demostrado

la capacidad biocontroladora de cepas de los géneros *Bacillus* y *Burkholderia*; las cuales representan una buena alternativa para el control de las enfermedades ocasionadas por *Fusarium circinatum* en *Pinus taeda* [Soria *et al.*, 2012]; así como *Aneurinibacillus migulanus* para controlar al hongo *Dothistroma septosporum* en *Pinus contorta* [Alenezi *et al.*, 2016]. Además, otras investigaciones han confirmado que cepas aisladas de bosque del género *Trichoderma* pueden controlar patógenos fúngicos del género *Armillaria*, al disminuir la podredumbre de la raíz de árboles de sistemas forestales [Chen *et al.*, 2019] y *Fusarium circinatum* en diferentes especies de pino [Martínez-Álvarez *et al.*, 2015]. Igualmente, se ha encontrado que *Trichoderma* spp. pueden producir enzimas, sideróforos y ácido indol-3-acético, como mecanismo de biocontrol de hongos y de promoción de crecimiento, como lo hacen bacterias promotoras del crecimiento vegetal [Infante *et al.*, 2009]. Asimismo, el control biológico en plantas de vivero se puede realizar al aplicar aislados de tres géneros microbianos: *Bacillus*, *Pseudomonas*, y *Trichoderma* [Reglinski y Dick, 2005]. Por ejemplo, el uso de hongos del género *Trichoderma* spp. tiene una alta efectividad para controlar la población de *Botrytis cinérea* en *Pinus sylvestris* bajo condiciones de invernadero [Capieau *et al.*, 2004]. En el cuadro 4, se muestran algunos ejemplos de agentes de control biológico usados contra hongos que afectan a diferentes especies de *Pinus* bajo condiciones de laboratorio, invernadero y campo.

**Cuadro 4.** Uso de agentes de control biológico en *Pinus* spp.

Agente de Biocontrol	Patógeno	Planta	Aplicación	Referencia
Hongos				
a. <i>Trichoderma</i>				
<i>T. harzianum</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	<i>P. greggii</i>	Invernadero	García-Díaz <i>et al.</i> , 2019
<i>T. koningiopsis</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>P. massoniana</i>	<i>In vitro</i> Invernadero	Yu y Luo, 2020
<i>T. harzianum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>P. sylvestris</i>	<i>In vitro</i>	Capieau <i>et al.</i> , 2004
<i>T. polysporum</i>			Vivero	

**Cuadro 4.** Continuación

b. <i>Otro</i>				
		<i>P. nigra</i>	<i>In vitro</i>	
		<i>P. pinaster</i>	Campo	
<i>Chaetomium, Alternaria</i>	<i>F. circinatum</i>	<i>P. pinea</i>		Martínez-Álvarez <i>et al.</i> , 2016
		<i>P. radiata</i>		
		<i>P. sylvestris</i>		
<b>Bacterias</b>				
a. <i>Aneurinibacillus</i>				
<i>A. migulanus</i>	<i>Dothistroma septosporum</i>	<i>P. contorta</i>	<i>In vitro</i>	Alenezi <i>et al.</i> , 2015
b. <i>Bacillus</i>				
<i>B. pumilus</i>	<i>Sphaeropsis sapinea</i>	<i>P. massoniana</i>	<i>In vitro</i> Invernadero	Dai <i>et al.</i> , 2021
<i>B. simplex</i>	<i>Heterobasidion annosum</i>	<i>P. radiata</i>	<i>In vitro</i> Invernadero	Mesanza <i>et al.</i> , 2016
	<i>Armillaria mellea</i>			
	<i>F. circinatum</i>	<i>P. radiata</i>	<i>In vitro</i> Invernadero	Iturrutxa <i>et al.</i> , 2017
<i>B. subtilis</i>	<i>Fusarium sambucinum</i>	<i>P. elliottii</i>	<i>In vitro</i> Invernadero	Maciel <i>et al.</i> , 2014
	<i>F. circinatum</i>	<i>P. taeda</i>	<i>In vitro</i>	Soria <i>et al.</i> , 2012

Gutiérrez-Flores *et al.*, 2022

## II.8 Los mecanismos de control biológico

Las plantas se relacionan con diversos organismos y establecen distintas interacciones durante su ciclo de vida, como, por ejemplo: mutualismo, proto cooperación, comensalismo, neutralismo, competencia, amensalismo, parasitismo y depredación [Cano, 2011]. El control biológico es considerado como el resultado positivo a la salud de una planta generado por alguna interacción de este tipo o la combinación de estas a diferentes escalas, y puede involucrar más de un individuo controlador de la población patógena [Van Driesche *et al.*, 2007]. El biocontrol se puede generar cuando organismos no patógenos compiten con los patógenos por nutrientes y/o espacio en y alrededor de una planta huésped; otra forma de observarlo son las actividades de varios hiperparásitos, agentes que parasitan a los patógenos de las plantas para desarrollarse [Van Lenteren *et al.*, 2018]. También la infección y el parasitismo del huésped por patógenos avirulentos pueden conducir al biocontrol de patógenos a través de la estimulación de los sistemas de defensa del huésped. Por último, puede controlarse un patógeno a través de su depredación por un organismo depredador para consumo y sustento [Gallego-Roperó y Armbrrecht, 2005].

### II.8.1 Competencia por espacio y/o nutrientes

La competencia es una interacción biológica entre dos organismos en la cual la población de uno es reducida a consecuencia de la presencia de otro debido a la demanda simultánea de los mismos recursos. Por lo que existe una limitación de la cantidad de recursos usados por ambos organismos, que pueden ser agua, alimento o espacio [Droby *et al.*, 2009]. Este tipo de interacción es común entre bacterias y hongos debido a su relación superficie/volumen. El incremento de las células de los organismos antagonistas lleva al consumo y agotamiento de los nutrientes disponibles y/o a la ocupación del espacio disponible para los organismos patógenos y, por lo tanto, reduce su población [Sharma *et al.*, 2009]. Este mecanismo de competencia se ha usado con éxito como método de control biológico para patógenos fúngicos. Algunos hongos fitopatógenos se han controlado a partir de tratamientos con bacterias, como *Candida oleophila*, bacteria que ha demostrado tener la capacidad de controlar la germinación de conidios de *Penillium expansum* y de *Botrytis* spp. [Guerrero *et al.*, 2011].

### II.8.2 Depredación

La depredación es una interacción biológica que consiste en que un individuo consume a otro de especie distinta para sobrevivir, conocidos como depredador y presa respectivamente [Bear y Rintoul, 2014]. Regularmente, en la depredación existe una relación de control poblacional, lo que ayuda a mantener un ecosistema balanceado. En esta interacción se proporciona energía para la subsistencia y desarrollo del organismo depredador, por consumir al organismo presa [Begon *et al.*, 1999]. La depredación influye en los organismos a dos niveles ecológicos: a nivel del individuo, la presa tiene una disminución en la forma física y afecta principalmente la reproducción de la especie; y, a nivel comunidad, reduce el número de individuos en la población de presas [Reece *et al.*, 2011; Douglas y Jean, 2016]. Por ejemplo, este mecanismo de control biológico se ha empleado en el sector agrícola con *Rodalia cardinalis*, que es un coleóptero que puede controlar la *Icerya purchasi*, una plaga que afecta a los cítricos mediante su consumo [Verdú y Pina, 2002]. También se ha reportado que algunos coccinélidos benéficos como *Cycloneda sanguinea* e *Hippodamia convergens* controlan por depredación poblaciones de áfidos en diferentes cultivos [Milán, 2010].

### II.8.3 Parasitismo

El parasitismo es otro tipo de interacción biológica entre dos organismos, en donde uno cumple el rol de huésped y el otro de hospedador [Rodríguez *et al.*, 2014]. La especie que lleva a cabo el proceso se denomina parásito o huésped y se desarrolla sobre o dentro de un individuo hospedero, alimentándose de sus fluidos corporales, órganos y le ocasionan la muerte. En la naturaleza hay dos tipos de parásitos, los endoparásitos, que son los que habitan dentro del huésped y, los que viven en la parte externa, llamados ectoparásitos [Sánchez, 2000]. El parasitismo es un medio por el cual una especie parásita sobrevive a costa de otras especies, al satisfacer sus necesidades básicas en perjuicio del organismo hospedante [Martínez, 2014]. Regularmente, en el parasitismo, el hospedador percibe un daño por la acción del organismo parásito en alguna etapa de su ciclo de vida. Este tipo de interacción parasita se puede llevar a cabo en cualquiera de las distintas etapas que componen la vida de un organismo [Valverde *et al.*, 2005]. Una vez que la especie parásita tiene ventaja en la relación, se establece mediante selección natural y puede ser un proceso irreversible que ocasiona transformaciones fisiológicas y morfológicas de la especie [Sánchez,

2000]. Es por ello por lo que, los parásitos toman su nombre en función de la etapa de vida del hospedero, por ejemplo: *Trichogrammatidae* ataca a huevos, por dicha razón se les llama parásitos de huevos [Van Driesche *et al.*, 2007], *Diaeretiella* son parasitoides de ninfas, parasitoides de larvas como *Cotesia flavepis* y parasitoides de pupas de diferentes especies de *Spalangia* spp. [Carballo, 2002].

#### **II.8.4 Amensalismo**

El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que llevan a cabo las células de los organismos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples (anabolismo), o para degradar las complejas y obtener las simples (catabolismo), con el objetivo de proveer energía para los procesos vitales y para la síntesis de materia orgánica [Kornberg, 2020]. Las plantas, además del metabolismo primario, tienen un metabolismo secundario que les ayuda a la producción y acumulación de compuestos de naturaleza química [Ávalos y Pérez, 2009]. Los metabolitos secundarios son compuestos producidos por bacterias, hongos o plantas que no están directamente involucrados en el ciclo de vida de un organismo. Su ausencia no produce la muerte inmediata, sino más bien un deterioro de su habilidad de supervivencia. Algunos metabolitos secundarios son usados por el hombre como medicamentos, saborizantes y pigmentos [Hinke, 2006]. Para las plantas, los productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales, otros tienen una función protectora frente a depredadores y actúan como repelentes. También, el amensalismo es una forma de control biológico al intervenir en los mecanismos de defensa frente a diferentes patógenos como pesticidas naturales [Sosa *et al.*, 2004]. Además de las plantas, diversos microorganismos secretan metabolitos secundarios que interfieren con el crecimiento y/o actividades de un patógeno. Un ejemplo de biocontrol por amensalismo es la producción de antibióticos, los cuales son toxinas microbianas que pueden envenenar o matar otros microorganismos. Algunos organismos producen y secretan uno o más compuestos antibióticos que colaboran en el control poblacional de algún patógeno y la enfermedad que causa [Pal, 2006]. La capacidad de producir múltiples antibióticos posiblemente ayuda a suprimir diversos competidores microbianos, algunos de los cuales pueden ser patógenos de plantas, colaborando así en el control biológico. También la producción de enzimas líticas, capaces de hidrolizar diversos compuestos poliméricos, como quitina, proteínas, celulosa, hemicelulosa y

ADN, se encuentran relacionados al biocontrol de patógenos [Vargas-Hoyos, 2015]. Por ejemplo, *Bacillus velezensis*, es una bacteria endofítica que posee varios rasgos de biocontrol, como la producción de fuertes metabolitos antifúngicos (iturinas y fenicinas), colabora en la promoción del crecimiento vegetal y puede inducir la respuesta sistémica [Kang *et al.*, 2019].

### II.8.5 Inducción de la respuesta sistémica

Las plantas pueden desarrollar diversos mecanismos de defensa debido al ataque de fitopatógenos. Una vez reconocido el organismo patógeno, se activa el mecanismo de respuesta que incluyen la expresión de genes de defensa, conocido como Resistencia Sistémica Inducida (RSI). Esta respuesta es el perfeccionamiento de la capacidad de defensa de la planta contra patógenos y plagas adquiridas después de un estímulo [Samaniego *et al.*, 2017]. La resistencia vegetal inducida es una de las estrategias no químicas prometedoras para el manejo efectivo de las enfermedades. La resistencia mediada por la planta huésped se rige por los genes de respuesta de defensa que codifican para la producción de diversas proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) [Prasannath, 2017]. Esta respuesta puede ser beneficiada por la interacción con microorganismos benéficos, como las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). Por ejemplo, algunas rizobacterias como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, se han utilizado para estimular la resistencia sistémica inducida (RSI) de las plantas en el sector agrícola [Choi *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2015]. También, se ha demostrado que algunas PGPR del género *Bacillus* logran inducir los mecanismos de defensa de las plantas contra enfermedades producidas por virus [Samaniego *et al.*, 2017]. Lo que evidencia que el uso de estas bacterias como alternativa biológica para el control de patógenos en plantas puede contribuir al desarrollo de una agricultura sostenible y conservación de los ecosistemas. Asimismo, existen antecedentes de que las rizobacterias inducen resistencia en las plantas contra enfermedades fúngicas, bacterianas y virales [Moreno *et al.*, 2018]. Además, hay hongos que colaboran en la inducción sistémica de las plantas, como lo es *Acremonium*, el cual induce un proceso de muerte celular en respuesta a una proteína elicitora que produce. La acción de esta proteína activa la inmunidad y confiere resistencia contra la antracnosis [Hael-Conrad *et al.*, 2018]. A pesar de ello, la respuesta sistémica puede limitarse por el estrés en la planta, como la deficiencia de agua, lo que induce a la alteración de las señales para la limitación del patógeno [Arango-Velez *et al.*, 2015]. También, se ha demostrado

que se puede inducir la respuesta sistémica en árboles de coníferas mediante la lignificación, como resultado de la inoculación de patógenos como el hongo *Sphaeropsis sapinea* y *Diplodia scrobiculata* en *Pinus nigra* [Bonello y Blodgett, 2004; Blodgett *et al.*, 2007]. De esta manera, la respuesta sistémica involucra una serie de compuestos de señalización que regulan la producción de productos químicos, los cuales, se encuentran fuertemente conectados con ácido salicílico, etileno, ácido jasmónico y ácido abscísico [Vinod y Sabah, 2018].

## **II.9 Interacción planta-microorganismo en el biocontrol**

Existen diversas interacciones entre microorganismos en los ecosistemas, tales como sinérgicas, antagónicas y de competencia, reguladas por factores bióticos y abióticos [Francely, 2016]. Las relaciones que se llevan a cabo entre los microorganismos inciden en la interacción planta-microorganismos-ambiente. Los microorganismos descritos como agentes de control biológico (BCA) y/o promotores del crecimiento vegetal (PGPM), dependen de estos factores para expresar sus efectos benéficos [Marschner y Timonen, 2005]. También, factores de tipo abiótico, como las condiciones climáticas y las características fisicoquímicas del suelo, intervienen de forma directa en el tipo de interacción de los organismos y la expresión de sus acciones favorecedoras hacia las plantas [Siddiqui y Akhtar, 2008]. Es complejo predecir los efectos que tienen las interacciones entre las plantas y los microorganismos benéficos. Por lo que el resultado de la inoculación de microorganismos depende de las compatibilidades funcionales en la fisiología y en la bioquímica de la interacción [Vázquez *et al.*, 2000].

## **II.10 Plaguicidas de formulación biológica**

Los plaguicidas de formulación biológica o bioplaguicidas son productos biológicos que tienen como ingrediente activo un agente antagonista de un organismo patógeno; sus formulaciones presentan baja o nula toxicidad, se degradan con facilidad y tienen un potencial bajo o nulo para producir un impacto negativo en el medio ambiente [USEPA, 2017]. Existen aproximadamente 50 productos biológicos formulados en el mercado internacional que provienen en general de USA e Israel [Nárdiz y De Cal, 2006]. Dentro de las formulaciones bioplaguicidas podemos encontrar a los biofungicidas, que son compuestos destinados al control y/o erradicación de hongos patógenos.

La mayoría de estos productos contienen en su formulación hongos y/o bacterias [Melgarejo, 2006]. Existen pocos productos comerciales de este tipo y la mayoría usan hongos de los géneros *Trichoderma*, *Glioladium*, actinobacterias como *Streptomyces* y bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*. También, los formulados por hongos de *Trichoderma* se consideran de alta efectividad ya que antagonizan un amplio espectro de fitopatógenos al producir enzimas líticas que tienen la capacidad de degradar la pared celular de los agentes fúngicos [Infante *et al.*, 2009]. Se ha observado que los biofungicidas actúan mediante diversos mecanismos para combatir al patógeno, como: la competencia por espacio y nutrientes, el parasitismo, la producción de enzimas líticas, la producción de metabolitos secundarios y la inducción de la respuesta sistémica de la planta. Los biofungicidas que son eficaces, generalmente presentan varios mecanismos antagonistas que actúan de manera conjunta para controlar al patógeno [Martínez *et al.*, 2013]. Algunos fungicidas biológicos, se han utilizado como método alternativo para reducir el daño causado por hongos fitopatógenos, generando poca o ninguna contaminación ambiental y sin provocar resistencia en los hongos a manejar [Guédez *et al.*, 2008; Heydari y Pessarakli, 2010].

## **II.11 Bacterias Gram positivas como agentes de control biológico**

Existe la evidencia del uso de bacterias grampositivas como controladoras de patógenos por su capacidad fungicida, insecticida, nematocida o promotora de crecimiento vegetal. Además, este tipo de microorganismos poseen una alta resistencia y adaptación al ambiente físico [Orberá *et al.*, 2009]. Estas bacterias tienen una pared celular gruesa constituida por peptidoglicano, pero no cuentan con una membrana celular externa, se logran diferenciar por tinción de Gram al pintarse de color azul y pueden tener forma de cocos o bacilos [López-Jácome *et al.*, 2014; Bush, 2019]. Algunas de estas bacterias pueden formar parte de la biota autóctona en el cuerpo, como la piel y el estómago [Cantón y Ruiz-Garbajosa, 2013]. Además, las bacterias del género *Bacillus* se encuentran incluidas en esta clasificación. El género *Bacillus* tiene una distribución cosmopolita por su facilidad de adaptación y supervivencia, debido principalmente a su capacidad para formar endosporas y se considera al suelo como su principal reservorio [Calvo y Zuñiga, 2010; Corrales *et al.*, 2016]. Las especies de *Bacillus* pertenecen al Reino Bacteria; Filo Firmicutes; Clase Bacilli; Orden Bacillales y Familia Bacillaceae [Maughan y Van der Auwera *et al.*, 2011]. Dentro de sus principales características se encuentran su crecimiento aerobio o anaerobio facultativo, tienen

morfología bacilar, con movimiento flagelar, y un tamaño que va de los 0.5 a los 10  $\mu\text{m}$ , su crecimiento óptimo ocurre a pH neutro y en un intervalo de temperatura amplio. Algunas bacterias de este género están asociadas a la promoción del crecimiento vegetal y control de patógenos en plantas, por lo que son aplicados en el sector agrícola [Tejera *et al.*, 2011]. En este género se encuentran diversas bacterias promotoras del crecimiento vegetal y organismos antagonistas de fitopatógenos como los hongos. También, *Bacillus* es el género más explotado para la producción de bioplaguicidas debido a su gran versatilidad [Ongena y Jacques, 2008]. Los principales mecanismos de acción de este tipo de bacterias son: la excreción de antibióticos, toxinas, sideróforos, enzimas líticas e inducen la resistencia sistémica, por lo cual tienen una capacidad para ser utilizados como agentes de control biológico de plagas y enfermedades en plantas [Rojas *et al.*, 2017 y Tejera *et al.*, 2011].

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La región norte del Estado de Puebla está afectada por plagas y enfermedades que son investigadas para su control o eliminación. Existen más de 6 000 hectáreas de bosque perjudicadas por su presencia en 14 municipios del estado, entre los que destacan: Zacatlán, Tetela de Ocampo, Aquixtla, Zautla, Xochiapulco y Zacapoaxtla [CONAFOR, 2015]. La principal problemática encontrada es la defoliación asociada a la presencia de hongos, lo que ocasiona la muerte de los árboles y con ello la pérdida de miles de hectáreas de bosque. La disminución de la biomasa del bosque de pino de la región ha llevado a la reducción de los beneficios materiales y económicos que se generan por su explotación, lo que afecta el aprovisionamiento de servicios ecosistémicos como la generación de agua y aire limpios. Además, los organismos fúngicos que afectan a los pinos en el norte de Puebla se han combatido con poco éxito mediante la aplicación de fungicidas de amplio espectro, como lo son: azoxystrobin, clorotalonil, fosetil-Al, fosfito de calcio, fosfito de cobre, fosfito potásico, mancozeb, metalaxil, y propiconazol (Cuadro 5). El uso de estos compuestos químicos representa un riesgo al ecosistema y a la sociedad debido a su alta toxicidad, al afectar la biodiversidad y la salud humana, y causar enfermedades que pueden llegar a ser fatales [Fait *et al.*, 2004]. Además, el clorotalonil, es el fungicida químico más empleado en el norte del Estado de Puebla para el manejo de enfermedades fúngicas forestales y figura en la lista de sustancias extremadamente peligrosas para la salud (Special Health Hazard Substance List) ya que es un compuesto carcinógeno [NJDEP, 2005].

**Cuadro 5.** Fungicidas químicos de uso agrícola y forestal en México [Gutiérrez-Flores *et al.*, 2021]

<b>Ingrediente: concentración</b> (Toxicidad)	<b>Efecto</b>	<b>Actividad</b>
Azoxystrobin: 23% (a, c)	Preventivo y de control	Sistémica, preventiva y curativa
Clorotalonil: 52%-54% (c) *	Preventivo y de control	De contacto
Fosetil-Al: 80% (a, b, c)	Preventivo y de control	Refuerza las defensas de la planta y es antiesporulante
Fosfito de calcio: 25% (a, b, c)	Preventivo y de control	Controla la pudrición de la raíz y disfunción causada por <i>Phytium</i>
Fosfito de cobre: 40% (a, c)	Preventivo y de control	Estimula las defensas de la planta y actúa como fertilizante
Fosfito potásico: 70% (a, b, c)	Preventivo y de control	Estimula las defensas de la planta y aporta potasio
Mancozeb 30%-80% (a, b, c) *	Preventivo	De contacto y protectora
Metalaxil: 9%, Clorotalonil: 72% (a, c)	Control	Sistémica y de contacto
Propiconazol: 26% (a)	Preventivo y de control	Inhibe el desarrollo del micelio

a: Nocivo en caso de ingestión, b: Nocivo al contacto con la piel, c: Nocivo si se inhala, d: Compuestos de origen vegetal sin toxicidad aparente. \*: Sustancia prohibida en otro país. Elaboración propia con información del Diccionario de Especialidades Agroquímicas (DEAQ) [2018] y del Registro Sanitario de Plaguicidas y Nutrientes Vegetales (COFEPRIS) [2019].

#### IV. JUSTIFICACIÓN

Los ecosistemas boscosos en la Sierra Norte de Puebla contribuyen a la sociedad y a la biodiversidad al aportar bienes y servicios, por lo que su manejo y conservación es trascendental. No obstante, existen hongos fitopatógenos que afectan a la biomasa forestal. La presencia de estos agentes ha llevado a la necesidad de aplicar fungicidas químicos en los árboles de pino como estrategia emergente, pero poco eficiente. El ingreso de estas sustancias químicas al ambiente representa un alto riesgo para los sistemas biológicos por su toxicidad y persistencia [Van der Werf, 1996]. Las sustancias químicas que componen los plaguicidas se bioacumulan en la biota, lo que provoca graves trastornos fisiológicos [Cid *et al.*, 2007; Kalyoncu *et al.*, 2009]. Por lo tanto, la búsqueda de alternativas al uso de compuestos químicos para el control de las enfermedades forestales es una necesidad, enfocada al mantenimiento y conservación de los beneficios naturales que aportan estos sistemas sin provocar efectos negativos al ecosistema. Además, la pérdida de biomasa forestal asociada a agentes fúngicos es un problema complejo que requiere un enfoque multidisciplinario y un proceso de investigación experimental para elaborar estrategias para su control. Asimismo, se ha demostrado que el uso de bacterias antagónicas es una opción para biocontrolar agentes fúngicos en plantas de pino de sistemas boscosos [Gutierrez-Flores, 2018]. Por esta razón, el control biológico de hongos mediante el uso de bacterias es observado como una alternativa al combate químico que puede colaborar a la recuperación de zonas forestales en la Sierra Norte del Estado de Puebla. En consecuencia, en la presente investigación se evaluó el biocontrol de hongos patógenos presentes en *Pinus patula*, *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* mediante el uso de bacterias de origen forestal en la Sierra Norte del Estado de Puebla. La aplicación de la técnica de control biológico de las enfermedades fúngicas puede mejorar la salud y biomasa del bosque, lo que beneficia desde el punto de vista ecológico, económico y social.

## **V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Es una alternativa al uso de plaguicidas el control biológico de enfermedades fúngicas en *Pinus* spp. en la Sierra Norte de Puebla?

## **VI. HIPÓTESIS**

La aplicación de una formulación microbiana propia del sector forestal favorece la sanidad de los árboles de pino afectados por patógenos fúngicos presentes en la Sierra Norte del Estado de Puebla, lo que representa una alternativa para el manejo y conservación del bosque de pino.

## **VII. OBJETIVOS**

### **VII.1** Objetivo General

Evaluar el control biológico de hongos asociados a la defoliación de *Pinus* spp. mediante el uso de bacterias de origen forestal, como una alternativa al uso de plaguicidas.

### **VII.2** Objetivos específicos

1. Generar una colección de bacterias Gram Positivas endémicas del sitio de estudio con propiedades antifúngicas.
2. Determinar la presencia de hongos patógenos en *Pinus* spp. de la Sierra Norte de Puebla.
3. Comparar la patogenicidad de los hongos aislados de *Pinus* spp. en condiciones *in vitro* e *in vivo*.
4. Analizar el antagonismo de las bacterias aisladas contra los hongos patógenos de *Pinus* spp. en condiciones controladas.
5. Validar el control biológico de hongos patógenos en *Pinus* spp. *in situ*.
6. Caracterizar la importancia social del control biológico en el bosque de pino de la Sierra Norte del Estado de Puebla.

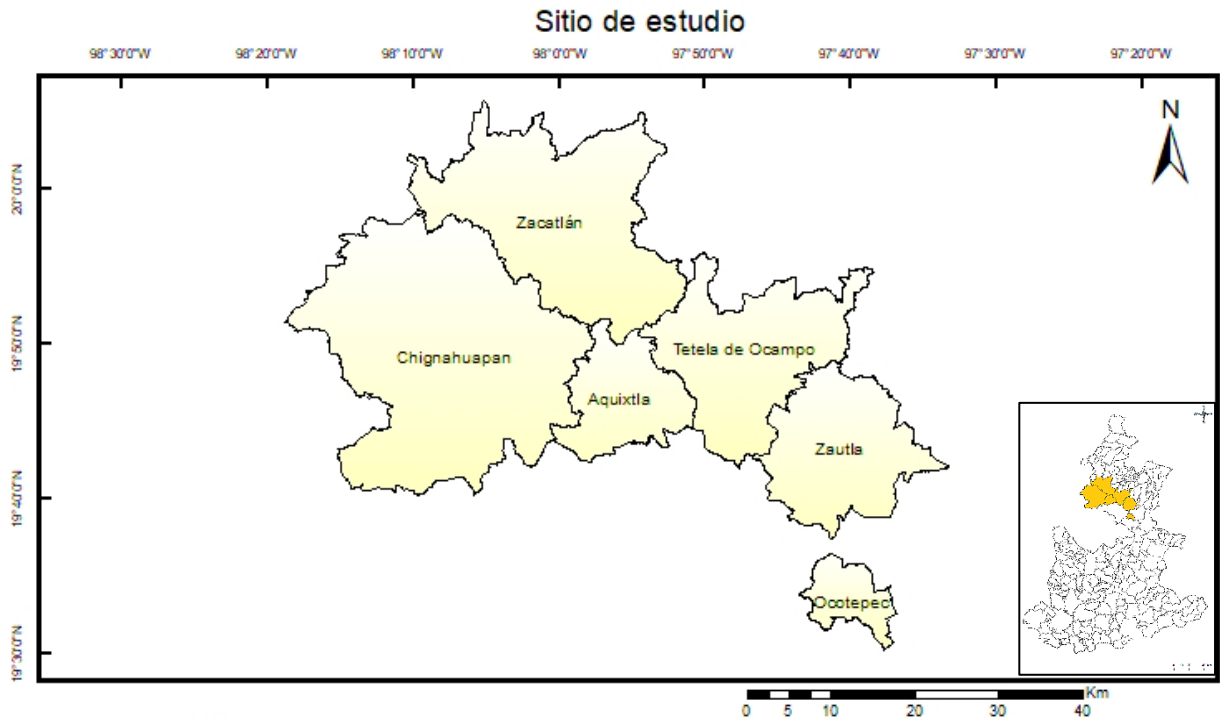
## **VIII. SITIO DE ESTUDIO**

### **VIII.1 Sierra Norte del Estado de Puebla**

La Sierra Norte de Puebla es una cordillera montañosa con una extensión territorial aproximada de 5903 kilómetros cuadrados que constituye el extremo sur de la Sierra Madre Oriental en México. Esta cordillera, se encuentra limitada al oriente con la llanura costera del Golfo, y al poniente y sur con el eje Neovolcánico. Tiene una orografía bastante accidentada, que se caracteriza por sus elevaciones y profundas depresiones, con una altitud que varía de 1 000 a 3 000 msnm. En temporada de lluvias las precipitaciones alcanzan los 2 500 milímetros anuales y en algunas zonas puede llegar a 4 000. Se pueden identificar dos climas dominantes, el clima templado húmedo con lluvias todo el año y el clima semicálido subhúmedo con lluvias todo el año. Además, la flora de la sierra se compone principalmente de árboles de distintas especies de pinos, oyameles y cedros. Debido a los recursos forestales e hidrológicos presentes en la Sierra Norte de Puebla es considerada como una de las regiones naturales más importantes del estado. Asimismo, es la segunda región más habitada debido a las condiciones naturales y socioculturales [INAFED, 2010].

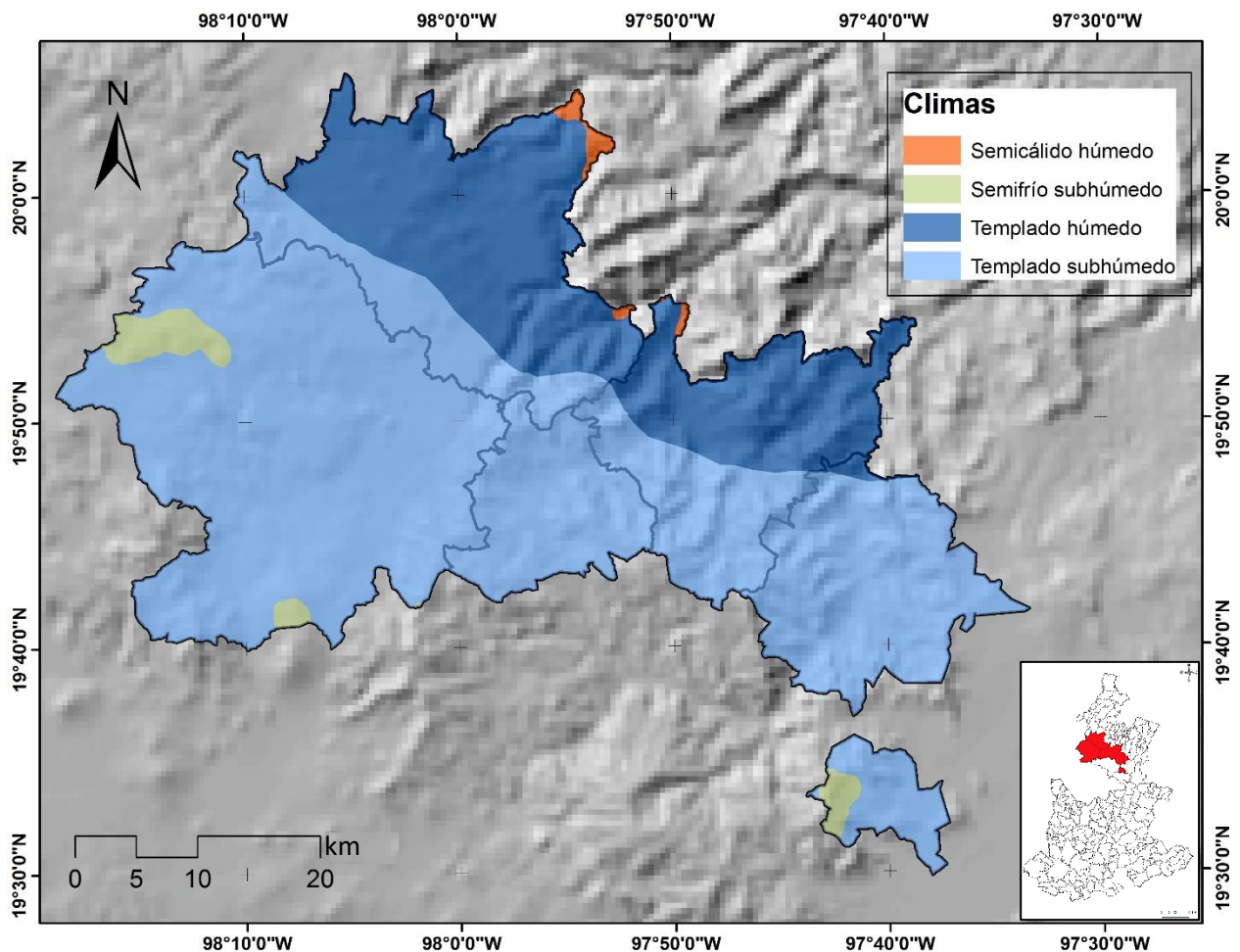
### **VIII.2 Caracterización biofísica del sitio de estudio**

El sitio de estudio de la presente investigación se conformó por seis municipios: Aquixtla, Chignahuapan, Ocoatepec, Tetela de Ocampo, Zacatlán y Zautla (Figura 4). Estos municipios ocupan una superficie de 2019 km<sup>2</sup>, lo que representa aproximadamente el 6% del territorio estatal. Además, son parte de la Sierra Norte del Estado de Puebla, la región con mayor aprovechamiento forestal de la entidad [CONAFOR, 2011]. La altitud de estas entidades municipales varía de entre 1 500 msnm (Ocoatepec) y 2 900 msnm (Aquixtla); diferencia que se debe a que forman parte de una cadena montañosa que constituye el extremo sur de la Sierra Madre Oriental de México.



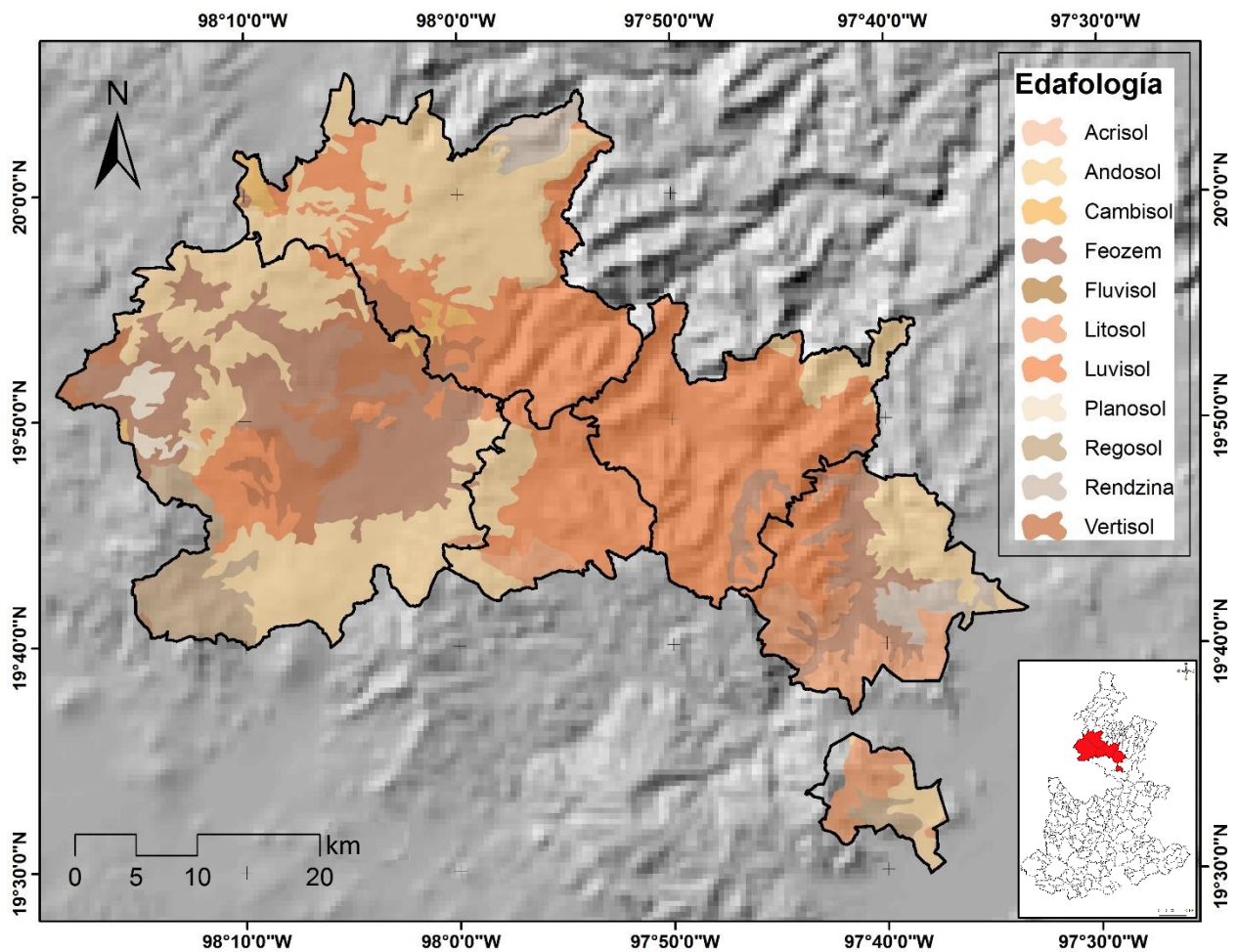
**Figura 4.** Sitio de estudio

En el sitio de estudio se identifican cuatro tipos de clima: semicálido húmedo, semifrío subhúmedo, templado húmedo y templado subhúmedo, con temperatura media anual que va de 12°C a 18°C durante el año (Figura 5). Por la ubicación y elevación de la sierra, predominan los climas templado húmedo y templado subhúmedo con lluvias en verano, encontrando bajas temperaturas desde octubre hasta febrero. El clima templado húmedo presenta extensos veranos, con mucho calor y abundante precipitación, además de inviernos breves y moderados. Y, en el clima templado subhúmedo se presenta temperaturas entre 10° y 18 °C y de 18° a 22 °C, no obstante, en algunas regiones puede disminuir a menos de 5°C [INEGI, 2010].



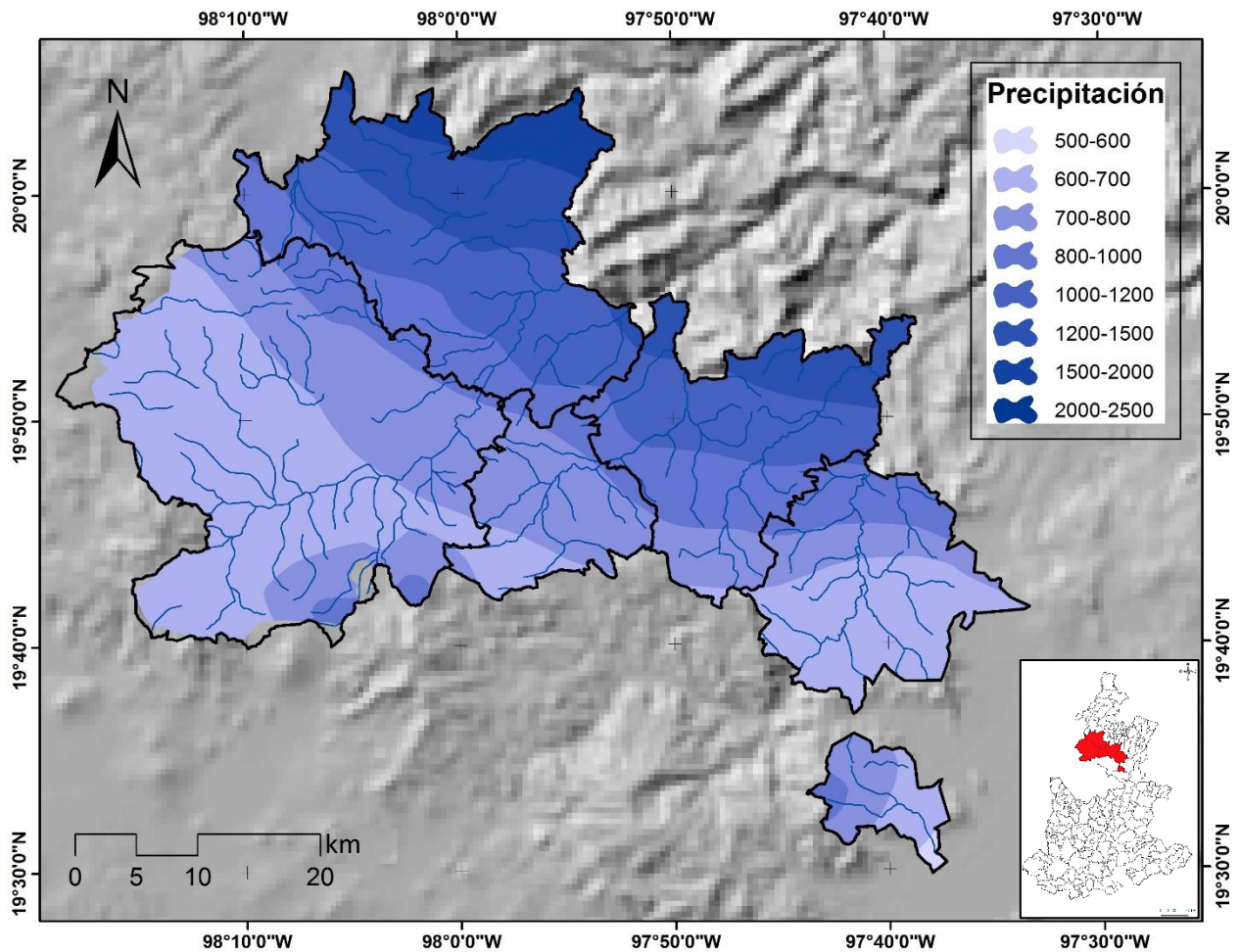
**Figura 5.** Mapa climatológico del sitio de estudio

En la zona de estudio, se cuenta con la presencia de luvisoles, andosoles y feozem en la mayor parte de la superficie (Figura 6). Los luvisoles son el tipo de suelo que se desarrolla más ampliamente en la Sierra Norte de Puebla, resultado del incremento en los niveles de precipitación. Se caracterizan por encontrarse en superficies accidentadas y tener bajo contenido de nutrientes, por lo que su uso es limitado para las actividades agrícolas. Los andosoles son suelos desarrollados a partir de materiales volcánicos de uso forestal principalmente. Y, los feozem son suelos que se caracterizan por tener un horizonte superficial oscuro y son ricos en materia orgánica, encontrándolos sobre todo en regiones templadas subhúmedas [Gardi *et al.*, 2014].



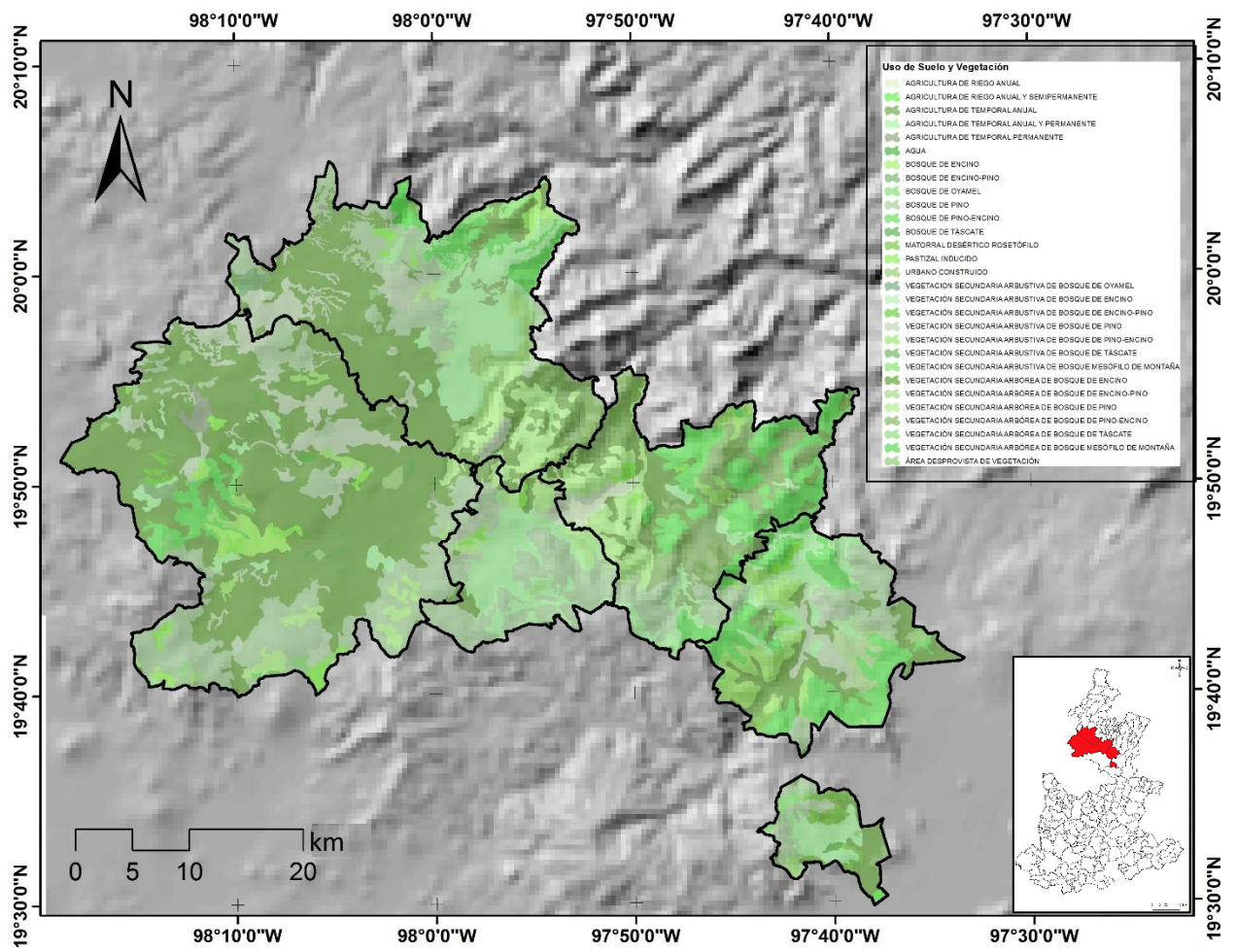
**Figura 6.** Mapa edafológico del sitio de estudio

Los hongos necesitan condiciones climáticas favorables para realizar con éxito su ciclo infectivo [Navas-Cortés y Landa, 2019]. Los municipios que conforman el sitio de estudio tienen una precipitación pluvial abundante, con precipitaciones que van de 500 hasta 2 500 mm de lluvia por año, lo cual, favorece el desarrollo de los fitopatógenos fúngicos y representa un potencial riesgo para las plantas (Figura 7). La Sierra Norte de Puebla pertenece casi en su totalidad a la Región Hidrológica RH27 Tuxpan-Nautla y tiene como principal afluente la cuenca del Río Tecolutla. La abundancia de lluvias en esta región se relaciona directamente con los dos tipos de climas dominantes, pues en el clima templado subhúmedo la precipitación anual va de 500 a 1 200 mm y en el clima templado húmedo la precipitación va de 1 200 a 2 500 mm [INEGI, 2010].



**Figura 7.** Mapa de precipitación pluvial del sitio de estudio

La distribución de la vegetación natural y de la producción agrícola, así como de los asentamientos humanos responde a condiciones orográficas, como las múltiples pendientes y la presencia de cuencas y valles que permiten el establecimiento de la población, su mantenimiento y desarrollo. El principal uso de suelo en la región es de carácter agrícola, aunque también presenta una vocación forestal (Figura 8). La Sierra Norte de Puebla es la región con el mayor aprovechamiento maderable mediante el Manejo Forestal Comunitario en el estado de Puebla, debido a que la mayor parte de sus recursos forestales son de uso doméstico [CONAFOR, 2018]. Además, la vegetación dominante es bosque de pino, seguida de bosque de encino, bosque de encino-pino y, cubre aproximadamente el 50% de la superficie en estudio.



**Figura 8.** Mapa de uso de suelo y vegetación del sitio de estudio

## IX. MATERIALES Y MÉTODOS

### IX.1 Aislamiento e identificación de bacterias Gram positivas con propiedades antifúngicas y caracterización de sus mecanismos de acción antagónicos

Se aislaron bacterias Gram positivas con actividad antifúngica a partir de suelos provenientes de la zona de estudio y se incluyeron a la colección del Laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas-ICUAP. Se realizaron diluciones seriadas de cada muestra de suelo desde -1 hasta -5 para incubarse a 30°C durante 24 horas y posteriormente contar de bacterias mesofílicas aerobias por cada dilución en agar nutritivo. También, cada muestra de suelo se sometió a una pasteurización a 80°C por un lapso de 30 minutos para el aislamiento de organismos esporulados, los productos de la pasteurización se sembraron en agar nutritivo y se incubaron por 24 horas [Oberá *et al.*, 2005]. Consecutivamente, se resembraron las bacterias en agar nutritivo hasta la obtención de cultivos axénicos. A las bacterias aisladas se les caracterizó bioquímicamente empleando APIs 50CHB y 20E de biomérieux. Además, se realizaron ensayos para determinar sus características biocontroladoras del crecimiento fúngico. Se evaluó la producción de la enzima quitinasa a cada bacteria Gram positiva obtenida de la pasteurización, mediante su siembra en un medio mínimo enriquecido con quitina [Okumoto 2001] y se determinó la eficiencia de producción de la enzima a partir de la relación de tamaño diámetro del halo de degradación (DH) y de la colonia bacteriana (DB), con la fórmula  $EP = \left( \frac{DH-DB}{DB} \right) \times 100$  [Campuzano *et al.*, 2017; Parra-Cota *et al.*, 2017]. También, se evaluó la producción de sideróforos a las bacterias aisladas a partir de su inoculación con un replicador en una caja Petri con el medio de cultivo CAS (Cromo Azurol S). Las cajas fueron incubadas por 5 días para posteriormente evaluar la producción de sideróforos (EP) mediante los diámetros del halo de degradación (DH) y diámetro de la colonia bacteriana (DB) con la fórmula  $EP = \left( \frac{DH-DB}{DB} \right) \times 100$ . Además, las bacterias más eficientes en las pruebas de producción de quitinasas y sideróforos se ensayaron como biocontroladoras *in vitro* de tres hongos encontrados en común entre las especies de pino que son el objeto de estudio. Posteriormente, se seleccionaron las seis cepas bacterianas con mayor efectividad biocontroladora *in vitro* del desarrollo de los hongos para realizar pruebas de compatibilidad al sembrarlas y observar la posible producción de sustancias que inhiban su crecimiento entre sí. También, se realizó una prueba de hemólisis en agar gelosa sangre a las

bacterias seleccionadas para evaluar la producción de enzimas hemolisinas como un factor de virulencia. Las bacterias que tuvieron una mayor capacidad para el control de crecimiento fúngico bajo condiciones *in vitro* se seleccionaron para su identificación a partir del gen 16S ARNr. Se les extrajo el ADN de acuerdo con las instrucciones del Kit de extracción de ADN genómico (Wizard de Promega) y, se amplificó el gen 16S ARNr con los iniciadores fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'). El ciclo de reacción se realizó en un termociclador (Techne®TC-3000G) con un volumen final de 50 µL (23.5 µL de agua estéril, 5 µL de cada iniciador, 12.5 µL de enzima GoTaq de Promega® y 4 µL de DNA genómico). Los productos amplificados (aproximadamente 1 500 pb) se observaron en gel de agarosa al 1.5% posterior a la electroforesis (80 V durante 120 min) con ayuda de un transiluminador (WiseUV® Wisd WUV-L50). Posteriormente, los productos de PCR se purificaron con el kit DNA Wizard® Genomic DNA Purification y se enviaron a secuenciar por el método de Sanger. Las secuencias obtenidas se analizaron y compararon en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (The Basic Local Alignment Search Tool: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## **IX.2** Aislamiento e identificación de hongos provenientes de acículas de *Pinus* spp. del Norte del Estado de Puebla

Se evaluó la presencia de agentes fúngicos en acículas de *P. patula*, *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* procedentes del sitio de estudio. Las muestras de hoja de pino obtenidas se sembraron en Agar Dextrosa Papa (PDA) y los organismos fúngicos surgidos a partir las lesiones de las hojas se resembraron en PDA hasta obtener cultivos puros. Además, los hongos mayormente presentes en las muestras de pino se identificaron fenotípicamente por la técnica de microcultivo, mediante la observación de sus estructuras reproductivas en microscopio óptico y, genéticamente por comparación de secuencias con ayuda de la técnica de la reacción en cadena polimerasa (PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction), según la metodología propuesta por Álvarez *et al.*, 2013. Para la identificación genética, los hongos se cultivaron en caldo de papa y dextrosa y se incubaron a 30°C durante 5 días. La masa micelial se cosechó por filtración y se realizó la extracción de ADN por lisis celular de acuerdo con el manual Wizard Genomic DNA Purification Kit de Promega. Posteriormente, el ADN extraído se usó para la amplificación de las regiones

intergénicas ITS1 e ITS2. Se emplearon los oligonucleótidos ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), para la amplificación de los espacios transcritos internos situados entre los genes ribosomales (rARN) 18S-5.8S y 5.8S-28S (White *et al.*, 1990) por la técnica de la reacción en cadena polimerasa y se sintetizaron por Integrated DNA Technologies (IDT). La reacción se llevó a cabo dentro de un termociclador (Techne®TC-3000G), en un volumen final de 50 µL, los cuales contendrán 17 µL de agua estéril, 2 µL de cada oligonucleótido (ITS1 e ITS4), 25 µL de enzima GoTaq de Promega® (PCR Colorless Master) y 4 µL de DNA genómico. El producto amplificado por PCR (aproximadamente 600 pb) se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 3% a 80 V durante 50 min. El gel se tiñó durante 30 minutos con GelRed® Nucleic Acid Gel Stain y con ayuda de un transiluminador (WiseUV® Wisd WUV-L50) se observaron las bandas obtenidas. Los productos de PCR se purificaron con DNA Wizard® Genomic DNA Purification Kit y se enviaron a secuenciar por Servicios Genómicos Langebio del Centro de Investigación y Servicios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) en Irapuato, Guanajuato, México. Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Chromas Lite® y posteriormente se compararon para su alineamiento con la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (The Basic Local Alignment Search Tool: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### **IX.3 Pruebas de patogenicidad en acículas y plántulas de pino a nivel invernadero**

En charolas de plástico transparente desinfectadas con medidas de 20 cm x 25 cm se colocaron grupos de acículas de *P. patula*, *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* sobre papel absorbente estéril, las acículas se infectaron con tres hongos observados como compartidos entre las especies de pino y se mantuvieron en condiciones de humedad para favorecer el desarrollo de los organismos fúngicos durante siete días. En este periodo de incubación se monitoreó el desarrollo fúngico y, al final de los tratamientos se evaluó el porcentaje de severidad de la enfermedad debido a su presencia. También, se infectaron plántulas de pino bajo condiciones de invernadero con los hongos encontrados en común. Se observaron y compararon las lesiones que provocan bajo condiciones controladas; así como también se evaluaron los parámetros de incidencia y severidad

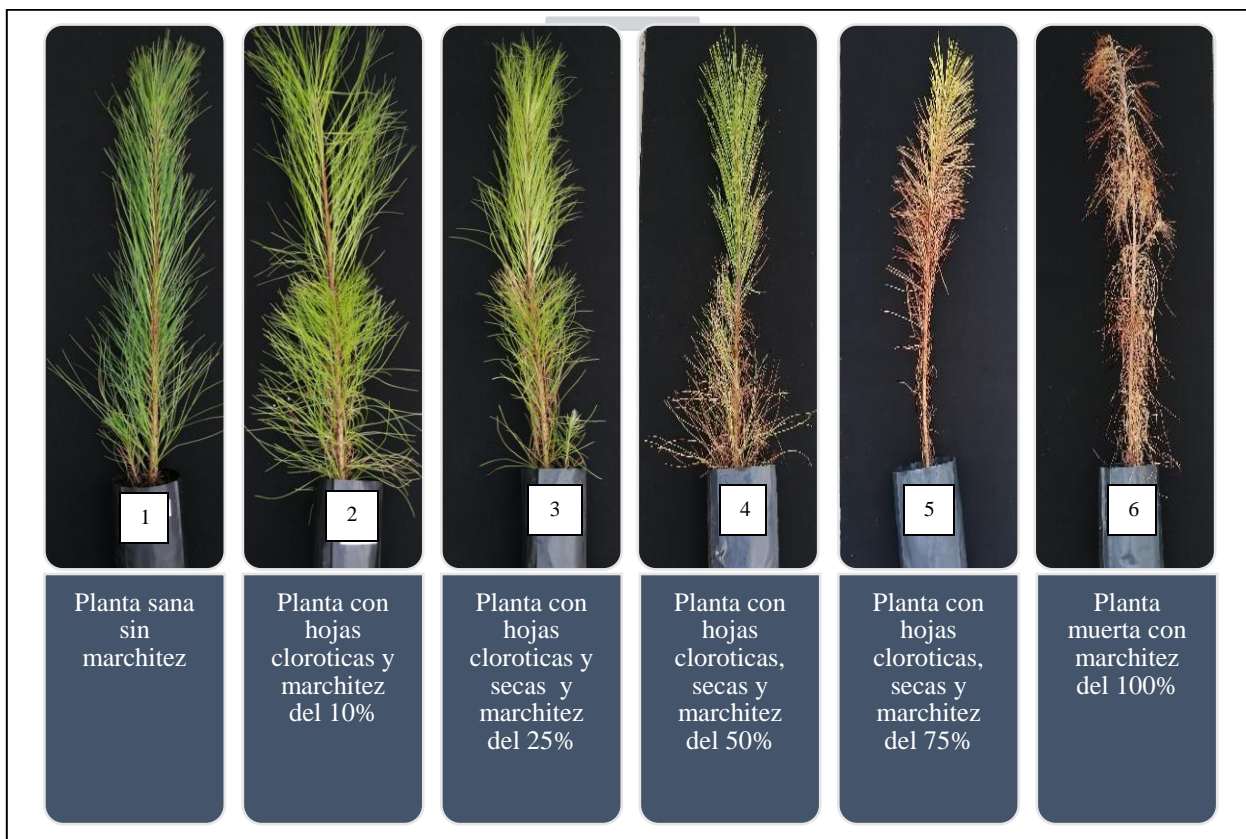
ocasionados por la presencia de los hongos y con ello valorar la patogenicidad de los hongos sobre las tres especies de pino [Cañedo y Ames, 2004].

#### **IX.4** Evaluación del antagonismo de bacterias Gram Positivas como agentes de control biológico de hongos bajo condiciones controladas

Se realizaron pruebas de control biológico en acículas en condiciones de humedad y en pinos pequeños de invernadero de las especies: *P. patula*, *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* [Carranza *et al.*, 2015]. Las acículas y plantas de pino se infectaron con tres hongos encontrados en común en la zona forestal y se trataron a partir de la inoculación con las bacterias seleccionadas y caracterizadas con mayor capacidad antagonica en los ensayos *in vitro*. Los ensayos de cámara húmeda tuvieron una duración de siete días, para posteriormente evaluar el parámetro de severidad provocada por la presencia de los hongos como el porcentaje de área necrosada de acícula. Para evaluar la capacidad de biocontrol de los hongos en plantas de pino, al final de los tratamientos se valoraron los parámetros de incidencia y severidad de la enfermedad. La incidencia de la enfermedad se evaluó a partir de la sumatoria del número de lesiones presentes en cada acícula de pino (1). Para evaluar el índice de severidad de la enfermedad (IS), se utilizó la escala de severidad elaborada en esta investigación (Figura 9) y la aplicación de la fórmula propuesta por Chiang & Bock, 2021 (2).

$$\text{Incidencia de lesiones} = \sum \text{lesiones en cada acícula} \quad (1)$$

$$\text{Índice de severidad} = \frac{\Sigma (\text{frecuencia de clase} \times \text{puntaje de clase de calificación})}{(\text{número total de observaciones}) \times (\text{índice máximo de enfermedad})} \times 100 \quad (2)$$



**Figura 9.** Escala de severidad de la enfermedad en *Pinus* spp.

#### IX.5 Caracterización del control biológico de hongos patógenos en la Sierra Norte de Puebla

Se realizaron tres tratamientos a pinos con síntomas de enfermedad, ubicados en un predio forestal en la localidad de Villa Cuauhtémoc del municipio de Chignahuapan. El primero consistió en la mezcla de las tres bacterias que resultaron más eficientes en los ensayos realizados *in vitro* e *in vivo* (*P. simplex*, *B. thuringiensis* y *B. simplex*) a proporciones iguales. El segundo fue la aplicación de un tratamiento químico a base del fungicida comercial clorotalonil y el tercero un control sin aplicación. Este ensayo permitió evaluar la capacidad bacteriana como método de biocontrol en las condiciones propias del bosque de pino y comparar su efectividad respecto a un químico de amplio espectro [Gutiérrez-Flores, 2018]. Posterior a siete meses de la aplicación de los tratamientos, se evaluaron los parámetros de incidencia de lesiones y el índice de severidad de la enfermedad, con la finalidad de valorar si la mezcla bacteriana seleccionada, representa una alternativa al combate de hongos fitopatógenos tradicional (compuestos químicos).

## **IX.6** Valoración de la importancia social del bosque de pino con respecto a los servicios ecosistémicos y económicos en el Norte del Estado de Puebla a partir de encuestas a actores clave

El sitio de estudio cuenta con una amplia área superficial y dispersión poblacional, para acotar a la población de interés y con ello, facilitar la obtención de la información, se formuló la cadena productiva del pino de la Sierra Norte de Puebla. La esquematización nos permitió la búsqueda de actores clave, que se refiere a personas con una injerencia relevante en la cadena productiva de los pinos en la Sierra Norte de Puebla. Esta cadena productiva se estableció a través de la revisión de la literatura y su relación con las actividades involucradas en la producción de pino en el norte del estado de Puebla. Fueron identificadas las etapas, actividades, recursos humanos, insumos, productos, usos y beneficios que se implican en la producción de pino de la región [Deras, 2003]. Para mapear la cadena productiva se consideró la producción de pino en seis municipios del norte del Estado: Aquixtla, Chignahuapan, Ocoatepec, Tetela de Ocampo, Zacatlán y Zautla. Con la construcción de este sistema y la ubicación de los individuos con mayor importancia en los eslabones de producción; se seleccionó a los propietarios de los predios forestales de la región, personal que labora en los viveros forestales y personal de Comisión Nacional Forestal (CONAFOR), como la población a aplicar la encuesta de percepción social del valor que tienen los servicios obtenidos a partir de los recursos forestales. Además, la cadena productiva ayudó a comprender la dinámica de aprovechamiento desarrollada en el área de estudio y la importancia de los recursos forestales en la economía regional [Codato, 2015]. La encuesta fue aplicada a 25 actores clave mediante el uso de Google forms con la liga: [https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSdsVcwhZKrdTzb5RXNV\\_DwFYfCfeJ8Svrusl1M\\_HxIPajek4w/viewform?vc=0&c=0&w=1&flr=0](https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSdsVcwhZKrdTzb5RXNV_DwFYfCfeJ8Svrusl1M_HxIPajek4w/viewform?vc=0&c=0&w=1&flr=0) y, de manera presencial al realizar visitas a los viveros de producción forestal y predios ubicados en la Sierra Norte de Puebla. Esta herramienta consistió en 31 cuestionamientos enfocados a la recopilación de datos generales de los actores clave, así como a la valoración directa, indirecta e intrínseca del bosque de pino y la aceptación del uso del control biológico como alternativa a los plaguicidas en el sitio de estudio. Finalmente, los resultados obtenidos de la aplicación de esta encuesta se analizaron para comprender la importancia y el valor social que tiene el bosque de pino de la Sierra Norte de Puebla, a través de la opinión de los actores clave [Alvarado y García, 2008].

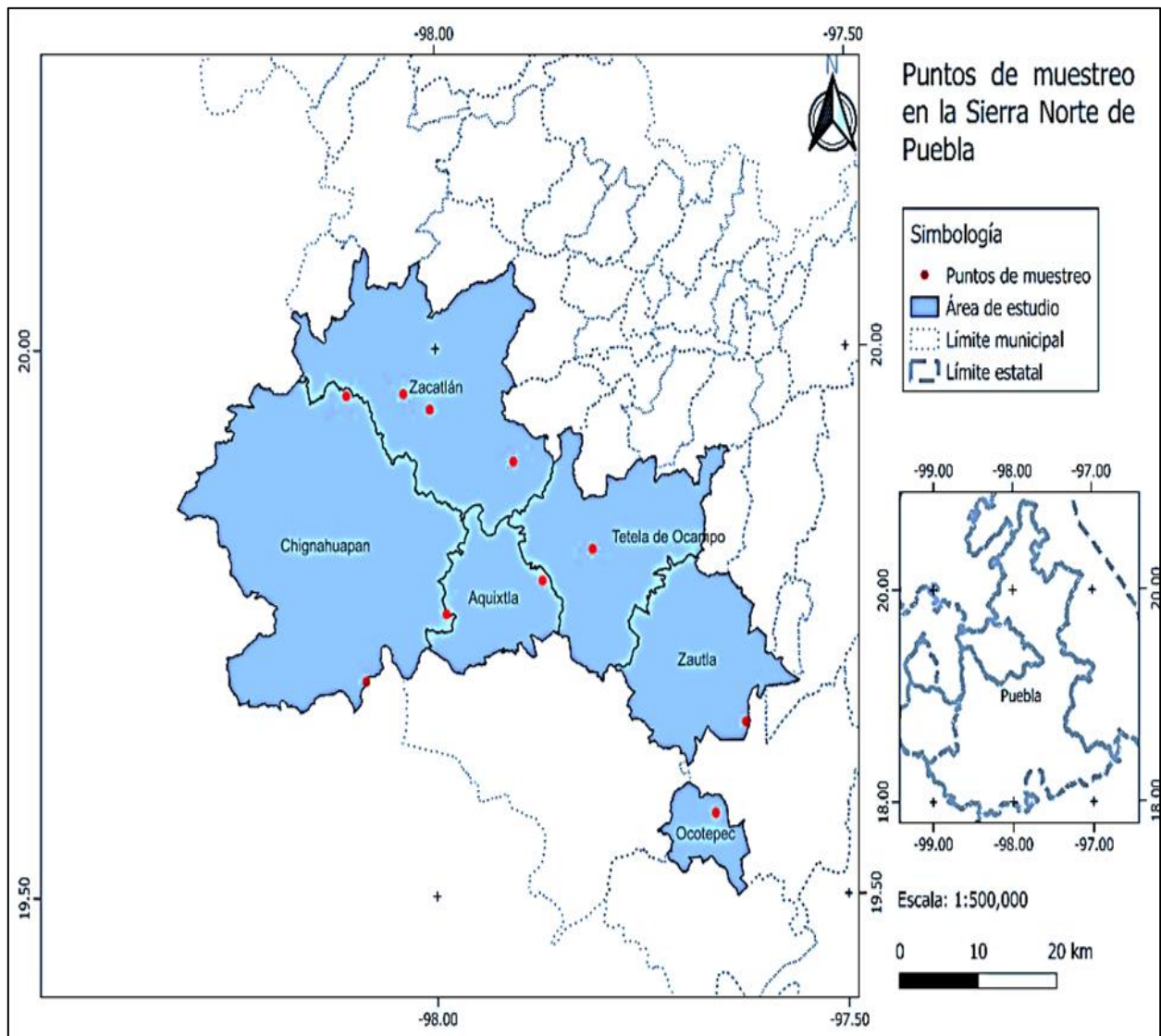
## X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### X.1 Muestreo

Se realizó el muestreo de acículas y suelos en los municipios de Aquixtla, Chignahuapan, Ocoatepec, Tetela de Ocampo, Zacatlán y Zautla, ubicados en la Sierra Norte del estado de Puebla (Figura 10).



**Figura 10.** Muestreo de acículas y suelo asociado a pino



**Figura 11.** Puntos de muestreo en la Sierra Norte de Puebla

Se colectaron 10 muestras de acícula y suelo de seis municipios localizados en la Sierra Norte de Puebla (Aquixtla, Chignahuapan, Ocoatepec, Tetela de Ocampo, Zacatlán y Zautla). A cada muestra se le asignó una clave para tener un manejo adecuado y su identificación posterior, así como también se tomó su georreferencia para la ubicación del problema (Figura 11 y Cuadro 6). Posteriormente, las muestras de acícula y suelo se utilizaron para el aislamiento de organismos fúngicos asociados a la defoliación y bacterias con capacidad biocontroladora.

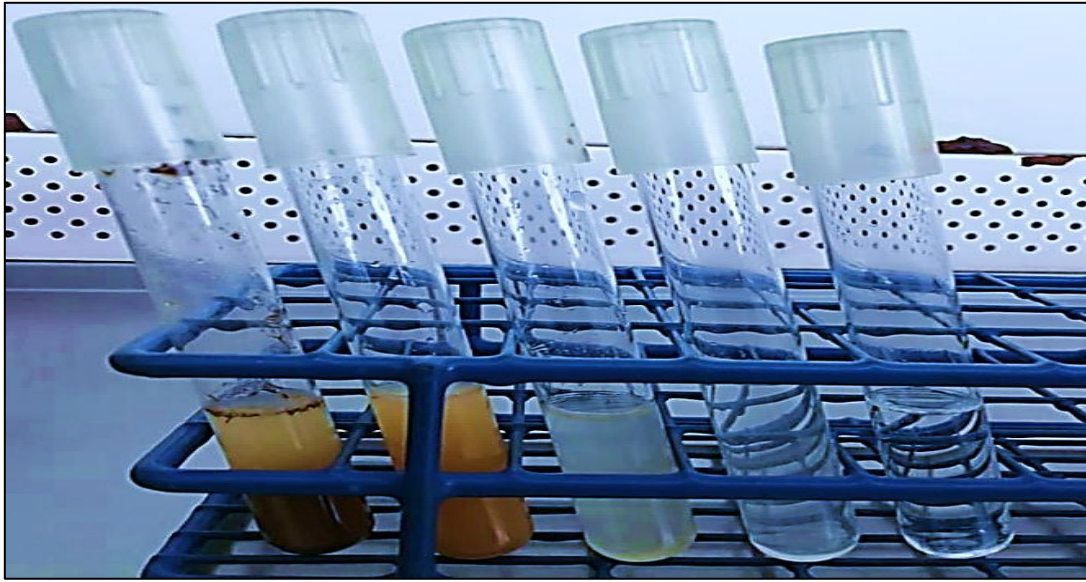
**Cuadro 6.** Muestras de suelo y acícula procedentes de la Sierra Norte de Puebla

No.	Clave	Sustrato	Localidad	Coordenada N	Coordenada W
1	M <sub>1</sub> CgS	Suelo	Chignahuapan	19°41'35.088''	98°4'58.134''
2	M <sub>2</sub> CcS	Suelo	Chichicaxtla	19°45'27.204''	97°59'14.838''
3	M <sub>3</sub> HS	Suelo	Huauchinango	19°57'32.55''	98°2'20.682''
4	M <sub>4</sub> PS	Suelo	Pueblo Nuevo	19°57'26.352''	98°6'30.636''
5	M <sub>5</sub> ES	Suelo	Eloxochitlán	19°56'39.846''	98°0'24.846''
6	M <sub>6</sub> ZaSA	Suelo y acícula	Zacatlán	19°53'47.18''	97°54'19.07''
7	M <sub>7</sub> AA	Acícula	Aquixtla	19°47'15.84''	97°52'13.50''
8	M <sub>8</sub> TSA	Suelo y acícula	Tetela de Ocampo	19°48'58.24''	97°48'33.11''
9	M <sub>9</sub> ZuA	Acícula	Zautla	19°39'26.21''	97°37'24.52''
10	M <sub>10</sub> OA	Acícula	Ocotepc	19°34'27.80''	97°39'39.82''

M<sub>x</sub>= número de muestra, S= suelo, A= acícula, Cg= Chignahuapan, Cc= Chichicaxtla, H= Huauchinango, P= Pueblo Nuevo, E= Eloxochitlán, Za= Zacatlán, A= Aquixtla, T= Tetela de Ocampo, Zu= Zautla, O= Ocotepc.

## X.2 Aislamiento y caracterización de bacterias Gram positivas

El análisis microbiológico realizado a las muestras de suelo forestal a partir del conteo de bacterias en placa con medio de cultivo permitió determinar el número de microorganismos presentes en cada muestra en relación con las colonias que forman (UFC) (Cuadro 6). Además, se obtuvieron bacterias Gram positivas del suelo de la Sierra Norte de Puebla mediante un proceso de pasteurización y se sembraron en agar nutritivo para que cada colonia formada proviniera de un solo microorganismo [Sánchez *et al.*, 2017] (Figura 12).



**Figura 12.** Soluciones diluidas de suelo asociado a pino

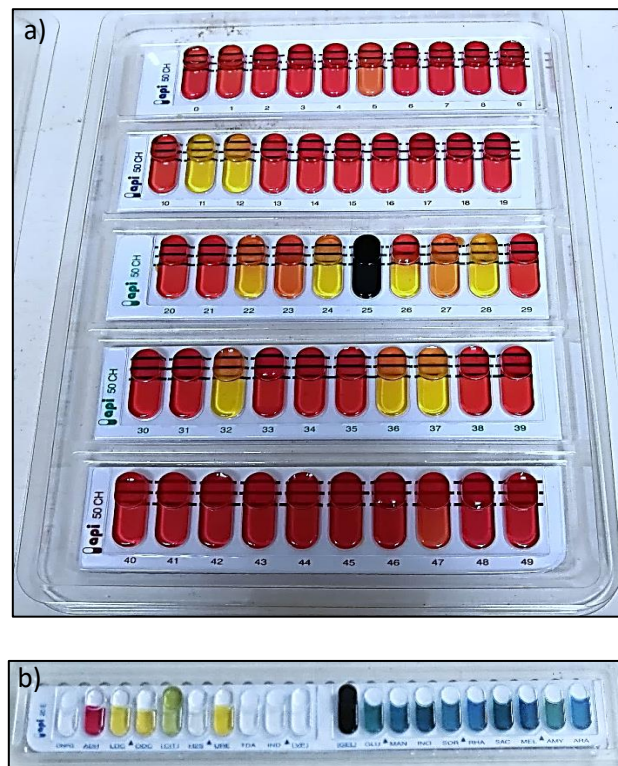
En el Cuadro 7, se observa el número de bacterias presentes en cada muestra; así como del conteo de UFC.g<sup>-1</sup> suelo posterior a la pasteurización y el número de bacterias que presentó la capacidad de solubilizar quitina y producir sideróforos. Se observó que la muestra M4MPS perteneciente a la localidad de Pueblo Nuevo, presentó el mayor contenido de bacterias por gramo de suelo con 243x10<sup>5</sup> UFC.g<sup>-1</sup>, seguida de la muestra M5MES de la localidad Eloxochitlán con 55x10<sup>5</sup> UFC.g<sup>-1</sup>, la cual también ostenta la mayor cantidad de UFC.g<sup>-1</sup> de bacterias esporuladas con 23x10<sup>3</sup>.

**Cuadro 7.** Población de bacterias presentes en los suelos forestales

Clave	Localidad	Bacterias				
		Totales (10 <sup>5</sup> )*	Esporuladas (10 <sup>3</sup> )*	Aisladas (10 <sup>3</sup> )*	Quitinolíticas (10 <sup>3</sup> )*	Productoras sideróforos (10 <sup>3</sup> )*
M1MCgS	Chignahuapan	21	12	2	1	2
M2MCcS	Chichicaxtla	43	20	3	2	3
M3MHS	Huachinango	32	16	3	3	3
M4MPS	Pueblo Nuevo	243	13	3	2	3
M5MES	Eloxochitlán	55	23	3	2	3
M6MZSA	Zacatlán	30	15	4	3	4
M8MTSA	Tetela de Ocampo	27	11	9	7	9

\*UFC.g<sup>-1</sup> suelo.

Las bacterias esporuladas obtenidas de la pasteurización se depuraron por repetitividad y se seleccionaron 27 cepas para caracterizar su capacidad de control de crecimiento fúngico. A las bacterias seleccionadas de cada muestra se les evaluó la capacidad de producir la enzima quitinasa y se observó que el suelo procedente de Tetela de Ocampo presentó la mayor población bacteriana capaz de degradar quitina con  $7 \times 10^3$  UFC.g<sup>-1</sup>. También se les valoró la capacidad de producir sideróforos y se encontró que todas las cepas son capaces de limitar el contenido de hierro en placa Petri. Se ha demostrado que bacterias aisladas de la rizosfera tienen la capacidad de controlar el crecimiento de hongos fitopatógenos mediante la limitación de hierro rizosférico [Xue *et al.*, 2015]. También, algunas bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Burkholderia* pueden controlar patógenos por otros mecanismos como la competencia por espacio o nutrientes, inducción de la respuesta sistémica, producción de metabolitos secundarios como enzimas que degradan la pared celular de los hongos y la producción de sideróforos [Ezziymani *et al.*, 2004a; Bhattacharyya y Jha, 2012; Márquez *et al.*, 2020].



**Figura 13.** Galerías API a) 50CHB y b) 20E inoculadas con una cepa bacteriana de suelo forestal

Los 27 aislados bacterianos seleccionados se identificaron como *Bacillus* Gram positivos mediante la técnica de tinción de Gram. Además, se caracterizaron bioquímicamente a partir del comparativo de los resultados obtenidos en los sistemas miniaturizados API 50 CHB y API 20 E con la base de datos de Biomerieux (Figura 13). Los kits miniaturizados, como los API 50CHB y API 20 E ayudan a determinar la fisiología de las bacterias de manera fácil y rápida, además de que tienen una elevada precisión [Sosa *et al.*, 2011]. La interpretación del perfil bioquímico de las 27 cepas mediante APIWEB™ de Biomerieux nos permitió observar que el 93% de las bacterias aisladas de la rizosfera de los pinos pertenecen al género *Bacillus* de las especies: *B. cereus* (14), *B. mycoides* (9), *B. firmus* (1), *Bacillus* no reactivo (1), *Brevibacillus* no reactivo (1) y *Geobacillus thermoglucosidasius* (1). Sin embargo, fue necesario complementar con biología molecular para confirmar las especies de las bacterias más eficientes para el biocontrol (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Identificación bioquímica de bacterias aisladas de suelo forestal de la Sierra Norte de Puebla

<b>Especie</b>	<b>Cepa</b>	<b>Calidad de identificación</b>	<b>Similitud (%)</b>
<i>Bacillus cereus</i>	M1CG1	Excelente identificación en el género	91.5
<i>Bacillus cereus</i>	M2CC1	Muy buena identificación en el género	80.0
<i>Bacillus cereus</i>	M3H1	Muy buena identificación en el género	95.5
<i>Bacillus cereus</i>	M3H3	Muy buena	99.6
<i>Bacillus cereus</i>	M4PN2	Muy buena	99.5
<i>Bacillus cereus</i>	M5EL1	Muy buena identificación en el género	52.0
<i>Bacillus cereus</i>	M5EL3	Muy buena identificación en el género	80.0
<i>Bacillus cereus</i>	M6MZ1	Muy buena identificación en el género	53.5
<i>Bacillus cereus</i>	M6MZ3	Buena	97.9
<i>Bacillus cereus</i>	M6MZ4	Muy buena identificación en el género	63.5
<i>Bacillus cereus</i>	M8T1	Muy buena identificación en el género	99.5
<i>Bacillus cereus</i>	M8T2	Excelente identificación en el género	91.5
<i>Bacillus cereus</i>	M8T4	Muy buena identificación en el género	58.7
<i>Bacillus cereus</i>	M8T5	Muy buena identificación en el género	81.7
<i>Bacillus firmus</i>	M4PN1	Dudoso	59.2
<i>Bacillus mycoides</i>	M3H2	Excelente identificación en el género	79.1
<i>Bacillus mycoides</i>	M4PN3	Muy buena identificación en el género	48.9
<i>Bacillus mycoides</i>	M5EL2	Muy buena identificación en el género	68.5
<i>Bacillus mycoides</i>	M6MZ2	Buena identificación en el género	82.9

**Cuadro 8.** Continuación

<i>Bacillus mycoides</i>	M8T3	Identificación aceptable en el género	67.9
<i>Bacillus mycoides</i>	M8T6	Buena identificación en el género	68.9
<i>Bacillus mycoides</i>	M8T7	Excelente identificación en el género	49.7
<i>Bacillus mycoides</i>	M8T8	Excelente identificación en el género	49.7
<i>Bacillus mycoides</i>	M8T9	Muy buena identificación en el género	68.5
<i>Bacillus</i> no reactivo	M2CC3	Dudoso	60.0
<i>Brevibacillus</i> no reactivo	M2CC2	Baja discriminación	80.4
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	M1CG2	Buena identificación	90.3

La identificación bioquímica se realizó comparando los perfiles metabólicos obtenidos en las pruebas rápidas de identificación API 50CHB y 20E de cada bacteria con lecturas en APIWEB™ biomérieux.

En el análisis de producción de enzimas quitinasas se observó que el 74% de las cepas seleccionadas degradan la quitina en medio mínimo enriquecido (Figura 14); incluidas las que tienen una forma de crecimiento rizoide, a las cuales se les clasificó cualitativamente como productoras (Cuadro 9).



**Figura 14.** Bacterias sembradas en medio mínimo enriquecido con quitina

La cepa de *Bacillus mycoides* (M3H1) obtenida de suelo forestal de Huauchinango, destacó con la mayor capacidad para degradar la quitina con un 64.44±9.18% de eficiencia productiva; seguida de las cepas de *Bacillus cereus* (M6MZ4), *Bacillus mycoides* (M3H3) y *Bacillus mycoides* (M8T9), endémicas de Zacatlán, Huauchinango y Tetela de Ocampo respectivamente. Diversas cepas del género *Bacillus* se han reportado como efectivas controladoras de patógenos fúngicos en plantas, al colaborar en la promoción de su crecimiento, inducir su respuesta sistémica, producir antimicrobianos (lipopéptidos, antibióticos y enzimas) y competir por factores de crecimiento (espacio y nutrientes) contra los fitopatógenos [Shaffi *et al.*, 2017]. Asimismo, se ha observado que quitinasas producidas por bacterias pueden hidrolizar la quitina contenida en la pared celular de los hongos, que representa hasta el 20% de su composición [Castro *et al.*, 2011]. Por esto, las cepas bacterianas con capacidad productora de quitinasas son una opción viable en el control biológico de fitopatógenos fúngicos y constituyen una alternativa para su control poblacional. Por ejemplo, se ha demostrado que las quitinasas producidas por *B. subtilis* son capaces de inhibir al hongo *Rhizoctonia solani*; así como también, se han caracterizado quitinasas de *B. thuringiensis* con potencial biocontrolador de *Penicillium glaucum* y *Sclerotinia fuckeliana* ya que pueden inhibir la germinación de sus esporas [Liu *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2011].

**Cuadro 9.** Producción de quitinasas y sideróforos de las bacterias aisladas de suelo forestal

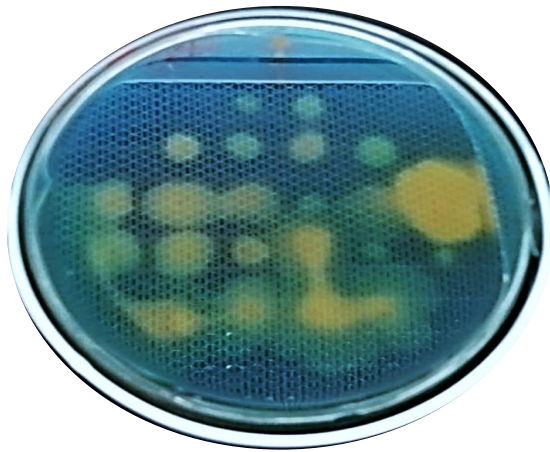
Especie (Identificación bioquímica)	Cepa	Eficiencia productiva de quitinasas (%)	Eficiencia productiva de sideróforos (%)
<i>Bacillus cereus</i>	M1CG1	11.90±1.71	10.90±1.17
<i>Bacillus cereus</i>	M2CC1	16.16±2.50	14.16±5.20
<i>Bacillus cereus</i>	M3H1	64.44±9.18	37.18±3.47
<i>Bacillus cereus</i>	M3H3	28.18±1.57	83.33±5.89
<i>Bacillus cereus</i>	M4PN2	17.26±6.76	31.75±2.24
<i>Bacillus cereus</i>	M5EL1	14.81±6.41	11.61±4.64
<i>Bacillus cereus</i>	M5EL3	00.00±0.00	57.41±6.93
<i>Bacillus cereus</i>	M6MZ1*	Produce	Produce
<i>Bacillus cereus</i>	M6MZ3	26.19±2.06	33.33±11.78
<i>Bacillus cereus</i>	M6MZ4	33.33±0.00	20.45±3.21
<i>Bacillus cereus</i>	M8T1*	Produce	Produce
<i>Bacillus cereus</i>	M8T2	00.00±0.00	07.27±1.95
<i>Bacillus cereus</i>	M8T4	06.14±0.45	16.98±2.34
<i>Bacillus cereus</i>	M8T5	11.57±0.80	13.88±1.96

**Cuadro 9.** Continuación

<i>Bacillus firmus</i>	M4PN1	00.00±0.00	41.66±6.80
<i>Bacillus mycoides</i>	M3H2	21.21±5.25	20.37±6.54
<i>Bacillus mycoides</i>	M4PN3*	Produce	Produce
<i>Bacillus mycoides</i>	M5EL2	14.02±3.54	12.04±0.65
<i>Bacillus mycoides</i>	M6MZ2	20.50±5.56	25.00±0.00
<i>Bacillus mycoides</i>	M8T3	13.03±6.05	31.75±2.44
<i>Bacillus mycoides</i>	M8T6	00.00±0.00	15.08±1.12
<i>Bacillus mycoides</i>	M8T7*	Produce	Produce
<i>Bacillus mycoides</i>	M8T8*	Produce	Produce
<i>Bacillus mycoides</i>	M8T9	26.06±6.82	20.37±6.54
<i>Bacillus</i> no reactivo	M2CC3	00.00±0.00	00.00±0.00
<i>Brevibacillus</i> no reactivo	M2CC2	32.19±2.40	24.07±4.28
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	M1CG2	00.00±0.00	00.00±0.00

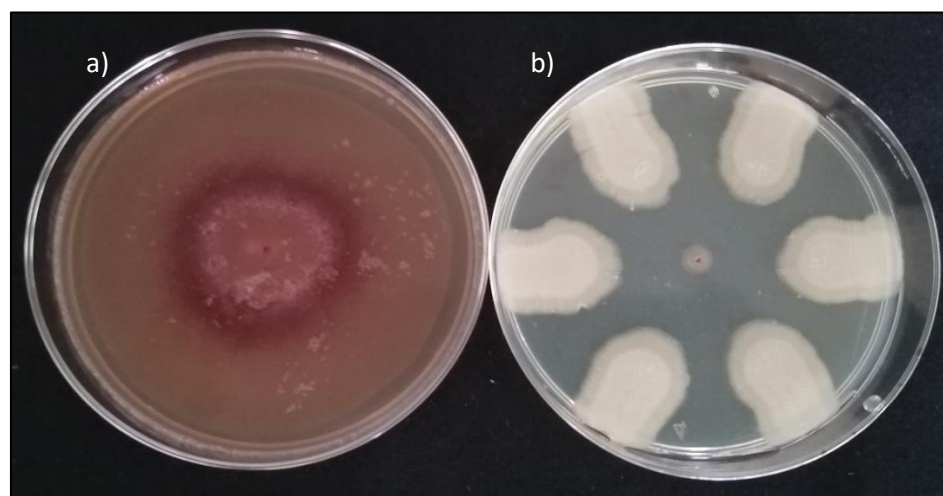
\*Cepa de crecimiento rizoide.

Los sideróforos son compuestos producidos por bacterias de gran interés debido al potencial que tienen para el control biológico al secuestrar el hierro y reducir su disponibilidad hacia los fitopatógenos; así como activar la resistencia sistémica y promover el crecimiento de las plantas [Aguado-Santacruz *et al.*, 2012]. Se encontró que todas las cepas ensayadas presentan la capacidad de captar hierro a partir de la producción de sideróforos (Figura 15). La bacteria que tiene la mayor capacidad para la producción de estos compuestos es *Bacillus mycoides* (M3H3), con una eficiencia superior al 83%. Seguida de las cepas *Bacillus simplex* (M5EL3) y *Bacillus firmus* (M4PN1), con eficiencias del 57.41±6.93% y 41.66±6.80% respectivamente; mientras que el resto de las cepas presentaron valores de entre 10 y 37 % (Cuadro 9). En otras investigaciones se ha demostrado que sideróforos producidos por bacterias como *Pseudomonas fluorescens* son capaces de inhibir el crecimiento de hongos patógenos de plantas como *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum gloesporioides* y *Phytophthora cinnamomi*, al limitar funciones celulares como la respiración [Orozco-Mosqueda *et al.*, 2010; Santoyo *et al.*, 2010]. También se ha asociado la producción de sideróforos como un mecanismo de control biológico de cepas de *Bacillus* que permite la limitación del hierro rizosférico, el cual es un nutriente fundamental para la vida de los organismos [Yu *et al.*, 2011].



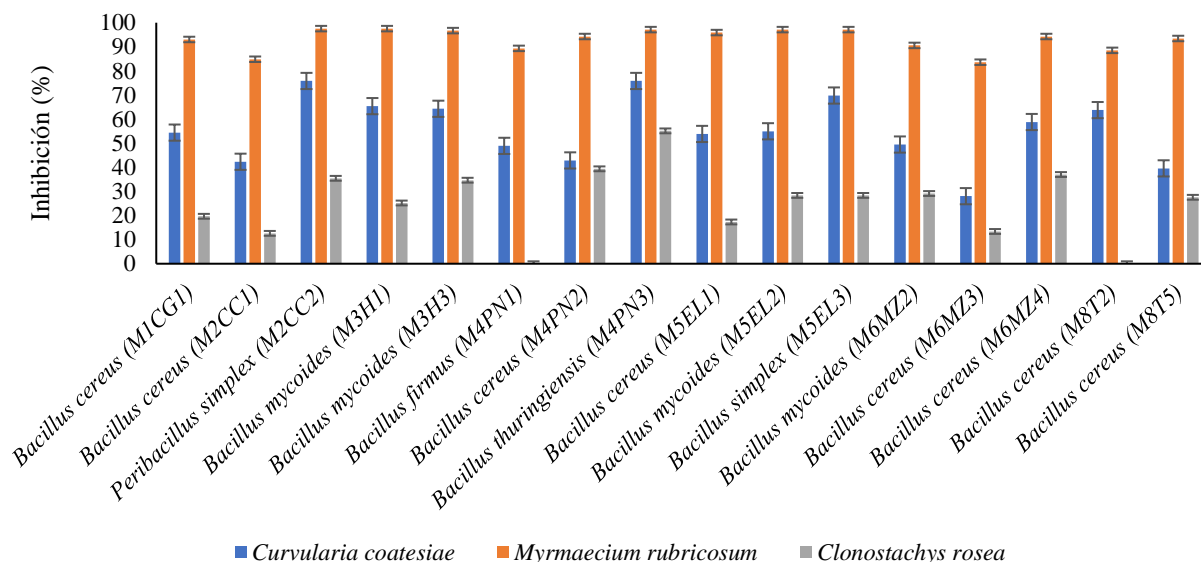
**Figura 15.** Producción de sideróforos de bacterias del género *Bacillus*

Con base en los resultados obtenidos en el análisis de producción de la enzima quitinasa y sideróforos de las cepas aisladas de suelo forestal, se seleccionaron las 16 bacterias más eficientes para ser probadas como controladoras del crecimiento fúngico en placa contra tres hongos observados como compartidos entre las especies *Pinus patula*, *Pinus montezumae* y *Pinus pseudostrobus*. Para ello, las bacterias fueron sembradas en placa Petri de forma radial y el hongo reto en el centro, como se observa en el apartado b) de la figura 16.



**Figura 16.** Control biológico en placa con *Bacillus* sp. a) Hongo *Myrmaecium rubricosum* y b) *Bacillus firmus* (M4PN1) contra hongo *Myrmaecium rubricosum*

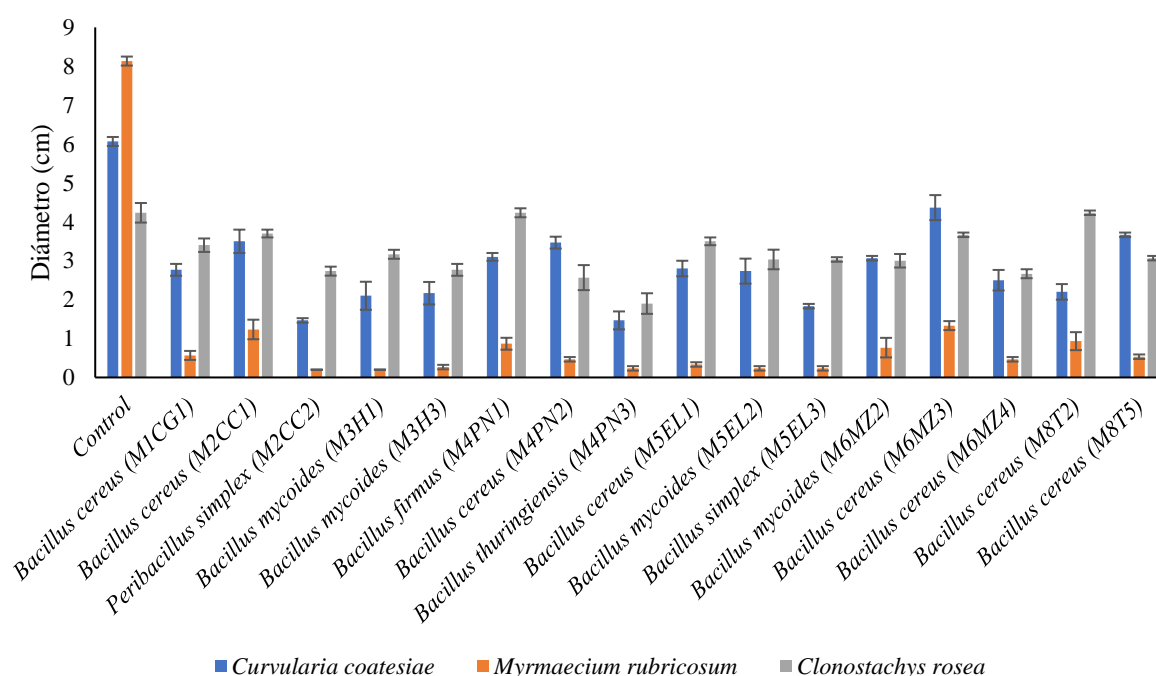
Se evaluó el control biológico de las bacterias seleccionadas a los 10 días posteriores a su siembra y se observó que todas las cepas limitaron el desarrollo de los hongos bajo condiciones de placa. Se encontró que las cepas ensayadas tienen buena capacidad para controlar el desarrollo del hongo *Myrmaecium rubricosum* al disminuir su crecimiento desde el 83.64% hasta el 97.53% respecto al control. Además, el desarrollo del hongo *Curvularia coatesiae* fue reducido del 28% al 76% y del hongo *Clonostachys rosea* hasta un 55% (Figura 17).



**Figura 17.** Inhibición in vitro del crecimiento micelial de *C. coatesiae*, *M. rubricosum* y *C. rosea*

También se encontró que las cepas *Peribacillus simplex* (M2CC2), *Bacillus thuringiensis* (M4PN3) y *Bacillus simplex* (M5EL3), limitaron en mayor medida el crecimiento del hongo *Curvularia coatesiae* bajo condiciones *in vitro*. Así como la cepa *Bacillus thuringiensis* (M4PN3) fue la mayor controladora del hongo *Clonostachys rosea*, seguida de las bacterias *Bacillus cereus* (M4PN2) y *Bacillus cereus* (M6MZ4) (Figura 18). Estos resultados evidencian la efectividad del control biológico de hongos fitopatógenos de pino en condiciones *in vitro* a partir del uso de bacterias de origen forestal del género *Bacillus*. Asimismo, otras cepas productoras de sideróforos como *Pseudomonas fluorescens*, se han reportado como biocontroladoras de patógenos fúngicos *in vitro*,

ya que disminuyen en valores superiores al 70% el desarrollo de patógenos como *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum gloesporioides* y *Phytophthora cinnamom* en cajas Petri con medio sólido [Orozco-Mosqueda *et al.*, 2010]. Además, algunas bacterias aisladas de la rizosfera de las plantas pertenecientes al género *Bacillus* se han descrito como productoras de sideróforos y enzimas líticas; con capacidad para inhibir el crecimiento en placa de los hongos *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* y *Alternaria alternata* en porcentajes superiores al 50% [Govin *et al.*, 2019].



**Figura 18.** Antagonismo en placa de *C. coatesiae*, *M. rubricosum* y *C. rosea*

Posteriormente, se realizaron pruebas de compatibilidad en placa entre las seis bacterias con mayor capacidad antagonica en los ensayos de laboratorio: *Peribacillus simplex* (M2CC2), *Bacillus thuringiensis* (M4PN3), *Bacillus mycooides* (M3H1 y M3H3), *Bacillus simplex* (M5EL3) y *Bacillus cereus* (M6MZ4) (Figura 19). Se observó que las seis cepas seleccionadas no producen metabolitos secundarios que puedan limitar su interacción. Por lo que, fueron utilizadas como un consorcio

bacteriano para el control biológico de hongos asociados a la defoliación de *Pinus* spp. bajo condiciones de cámara húmeda, invernadero y campo.



**Figura 19.** Ensayo de compatibilidad de cepas antagonistas de hongos

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos de producción de la enzima quitinasa, la producción de sideróforos y el control biológico en placa contra hongos patógenos, se seleccionaron las bacterias Gram positivas que presentaron la mayor capacidad antagonista para identificarles por el gen 16S ARNr como: *Peribacillus simplex* (M2CC2), *Bacillus thuringiensis* (M4PN3), *Bacillus mycoides* (M3H1 y M3H3), *Bacillus simplex* (M5EL3) y *Bacillus cereus* (M6MZ4) (Cuadro 10). Las cepas forestales se clasificaron molecularmente como correspondientes a los géneros *Bacillus* y *Peribacillus*. Se ha observado que bacterias de estos géneros tienen una alta resistencia a la temperatura y a productos químicos por su capacidad para formar endosporas; además de conferirles una vida útil de entre uno a tres años como producto biológico [Kumar *et al.*, 2012]. Diversas especies del género *Bacillus* han demostrado tener actividad antagonista contra microorganismos fitopatógenos de cultivos agrícolas como el maíz, arroz y frutales [Li *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014]. Los principales mecanismos por los cuales bacterias de este género tienen capacidad biocontroladora de patógenos son: la producción de antibióticos, sideróforos, enzimas líticas, toxinas y la inducción de la respuesta sistémica de la planta [Layton *et al.*, 2011, Samaniego-Gómez *et al.*, 2017]. También, *Bacillus subtilis* es una de

las bacterias más usadas como agente de control biológico, ya que ha demostrado su capacidad como biocontroladora *in vitro* e *in vivo* de hongos como *Fusarium sambucinum* en semillas y plántulas de *Pinus elliottii*, al reducir la acción nociva del patógeno. Asimismo, *Bacillus* spp. pueden colaborar como promotores del crecimiento vegetal en el incremento de la longitud de las plántulas, la masa verde y las variables de masa seca [Maciel *et al.*, 2014].

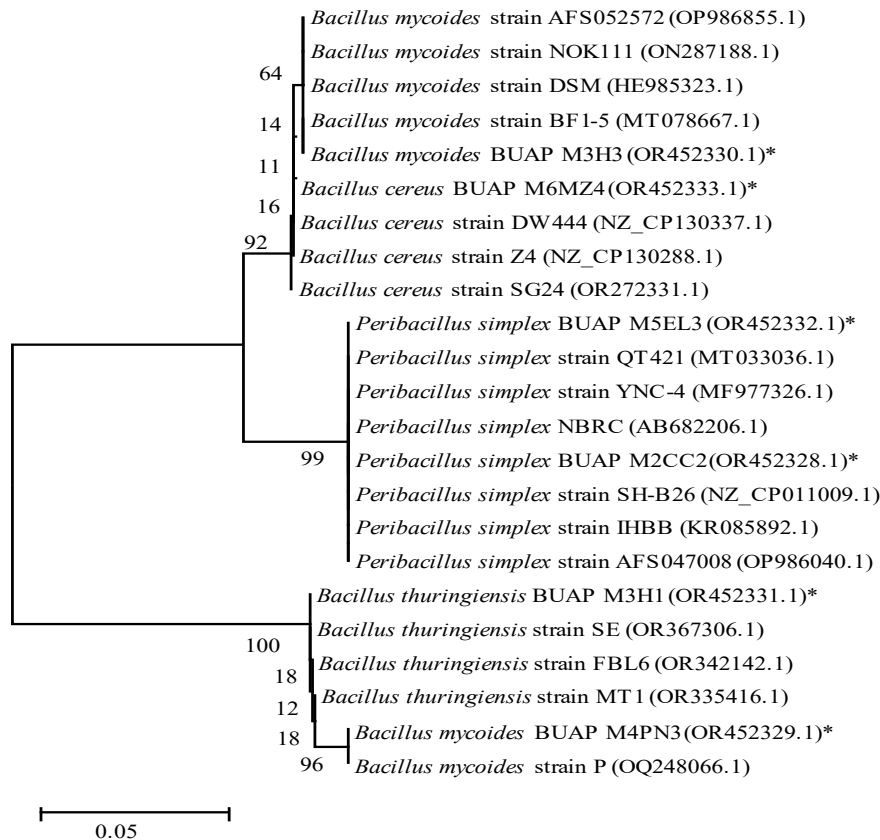
**Cuadro 10.** Especies de bacilos Gram positivos aislados de suelo de la Sierra Norte de Puebla

Clave	Identificación bioquímica (% de similitud)	Identificación genética (% de similitud)
M2CC2	<i>Brevibacillus</i> no reactivo (80.4)	<i>Peribacillus simplex</i> (99.85)
M3H1	<i>Bacillus cereus</i> (95.5)	<i>Bacillus mycooides</i> (100.00)
M3H3	<i>Bacillus cereus</i> (63.5)	<i>Bacillus mycooides</i> (100.00)
M4PN3	<i>Bacillus mycooides</i> (48.9)	<i>Bacillus thuringiensis</i> (100.00)
M5EL3	<i>Bacillus cereus</i> (80.0)	<i>Bacillus simplex</i> (99.88)
M6MZ4	<i>Bacillus cereus</i> (99.6)	<i>Bacillus cereus</i> (99.27)

La identificación bioquímica se realizó comparando los perfiles metabólicos obtenidos en los APIs 50CHB y 20E de las bacterias en la base de datos de biomereux. Para la identificación genética se compararon las secuencias de las cepas en el banco de genes de NCBI y se seleccionó la que presentó un mayor porcentaje de similitud.

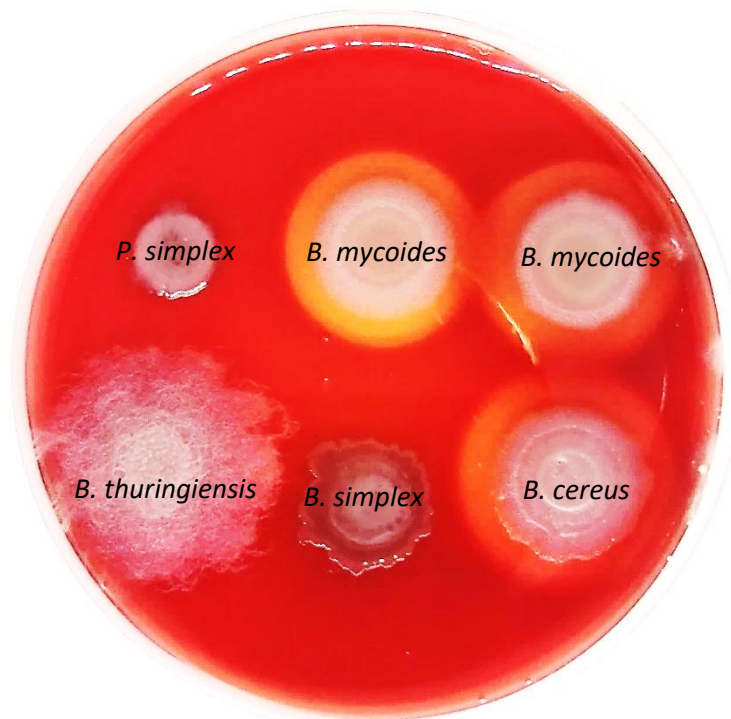
*B. cereus* (cepa M6MZ4) es una bacteria Gram positiva con forma de bastón, aeróbica o anaeróbica facultativa, móvil y formadora de esporas, con una distribución muy variada en el ambiente [Bottone, 2010]. Se describe como un patógeno humano volátil por relacionarse con la intoxicación alimentaria y ha sido asociada al control biológico en el sector agrícola por ser una bacteria quitinolítica con la capacidad de control de patógenos como los hongos del género *Botrytis* y *Cercospora arachidicola* [Huang *et al.*, 2005; Kokalis-Burelle *et al.*, 1992; Kotiranta *et al.*, 2000]. *B. thuringiensis* (M4PN3) es un bacilo Gram positivo cosmopolita que habita el suelo, es aerobio facultativo y esporulado [Portela-Dussán *et al.*, 2013]. Durante su fase de esporulación produce una inclusión parasporal, conformada por proteínas Cry y Cyt con actividad biológica que en la agricultura se emplea para el control de plagas [Adang *et al.*, 2014; Bravo *et al.*, 2011]. Es el

principal organismo a nivel mundial empleado para el control biológico de insectos plaga, impulsado en la actualidad por la creciente demanda de alimentos libres de pesticidas químicos y el uso de controladores amigables con el ambiente [Almeida *et al.*, 2016]. Esta especie bacteriana es productora de quitinasa, cualidad que le hace tener un potencial para el control biológico de hongos [Sánchez y Barboza, 2017]. *B. mycoides* (M3H1 y M3H3), es un bacilo Gram positivo en forma de bastón y formador de esporas. Se ha descrito como un agente no patógeno que coloniza la filósfera con la capacidad de inducir la resistencia sistémica, ya que fomenta la actividad de las enzimas: quitinasa,  $\beta$ -1,3-glucanasa y peroxidasa, relacionadas con la patogénesis [Bargabus *et al.*, 2002]. Esta bacteria ha demostrado su capacidad como controladora de *B. cinerea* en cultivos agrícolas debido a la secreción de compuestos inhibidores volátiles y no volátiles, así como puede colaborar en la activación de los sistemas de defensa del huésped [Guetsky *et al.*, 2007]. También ha demostrado ser un agente de biocontrol efectivo para hongos que provocan enfermedades en raíces como el frijol [Ghazal *et al.*, 2013]. También, se identificó genéticamente a la bacteria *Peribacillus simplex* (cepa M2CC2) como controladora del desarrollo fúngico. Las especies de *Peribacillus* estaban originalmente clasificadas en el género *Bacillus* y han sido recientemente reclasificadas. El género *Peribacillus* comprende 17 especies Gram-positivas aisladas de diversos nichos ecológicos como el suelo y las plantas; son aerobias o anaerobias facultativas y su crecimiento ocurre en el rango de temperatura entre 3 y 45°C [Patel y Gupta, 2020]. Se han encontrado algunas especies como *Peribacillus castrilensis*, relacionadas a la promoción del crecimiento vegetal y control biológico debido a su capacidad de producir compuestos inhibidores como lipopéptidos antifúngicos y lograr la limitación del desarrollo de patógenos como *D. solani* y *E. amylovora* [Rodríguez *et al.*, 2020]. Otra cepa identificada con capacidad biocontroladora fue *Bacillus simplex* (M5EL3); especie que se ha utilizado para controlar la pudrición de la raíz del comino negro (*Nigella sativa*) causada por *Fusarium camptoceras* (PHYF1) en condiciones de invernadero y de campo, reduciendo la afectación por el hongo hasta en un 60% [Al-Sman *et al.*, 2019]. También, se realizó un árbol filogenético de las especies identificadas genéticamente para observar si existen relaciones entre las especies identificadas con capacidad antagónica de hongos y las reportadas en el banco de genes de NCBI, para ello, se utilizó el método neighbor joining (NJ) y el modelo de evolución Jukes-Cantor con valores de bootstrap de 1000 réplicas con el programa Mega X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Figura 20).



**Figura 20.** Árbol filogenético de bacterias antagonistas de hongos, aisladas de la rizosfera de *Pinus* spp. basado en la distancia de Neighbor-joining (NJ). La barra de escala indica el número de sustituciones de base por sitio. Se muestran los valores de Bootstrap nodos, así como las especies de las bacterias y los números entre paréntesis indica los números de acceso de las secuencias de ADNr en GenBank. \* Bacterias antagonistas de hongos aisladas de suelo forestal.

Además, se realizó la evaluación de capacidad hemolítica de las seis bacterias seleccionadas como un factor que indica patogenicidad, sembrándolas en agar gelosa sangre (Figura 21). El agar sangre es un medio enriquecido para el aislamiento y crecimiento de microorganismos exigentes y para la combinación de reacciones hemolíticas. Se observó la producción de halos hemolíticos alrededor de las colonias bacterianas. Las bacterias que producen estas enzimas presentan un halo transparente alrededor de las colonias a consecuencia de la lisis de los hematíes [Murray *et al.*, 1999]. Existen diversas bacterias que pueden producir hemolisinas como *Streptococcus salivaris*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* [Navarro-Navarro *et al.*, 2011; Palavecino, 2004].

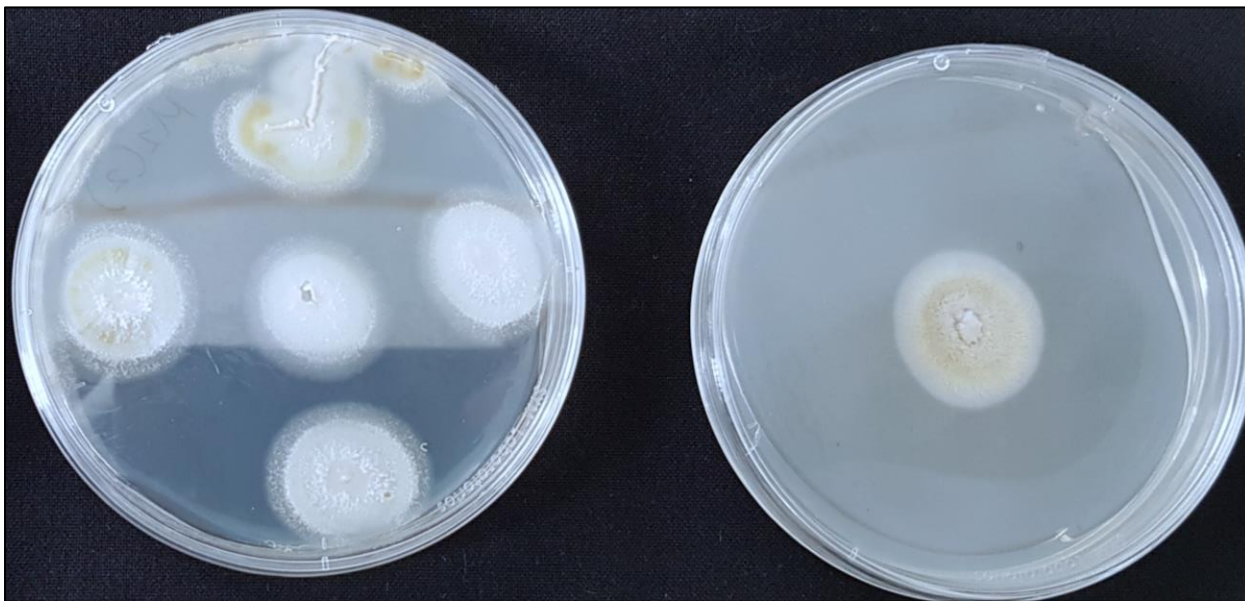


**Figura 21.** Bacterias antagonicas de hongos en agar gelosa sangre

Esta técnica permiti3 encontrar que tres cepas antagonistas identificadas como *B. cereus* y *B. mycooides* (2) producen hem3lisis. La especie *B. cereus* es gen3ticamente diversa, se encuentra en distintos nichos en el ambiente y puede contaminar los alimentos afectando a la salud de humanos [S3nchez *et al.*, 2016]. Por su parte, *B. mycooides* es una especie omnipresente en el suelo y la rizosfera, con actividad ben3fica para el desarrollo de las plantas y el biocontrol de pat3genos, productora de esporas y capaz de crecer hemol3ticamente en placas de agar sangre [Kurniawan y Chuang, 2021]. Adem3s, *B. mycooides*, si bien no se considera una especie pat3gena del humano, se ha reportado como causante de infecci3n en el torrente sangu3neo [Heidt *et al.*; 2019]. A partir de los resultados encontrados en esta evaluaci3n, se excluyeron a las cepas identificadas como *B. cereus* y *B. mycooides* de los ensayos de validaci3n *in situ*, por su posible capacidad pat3gena humana.

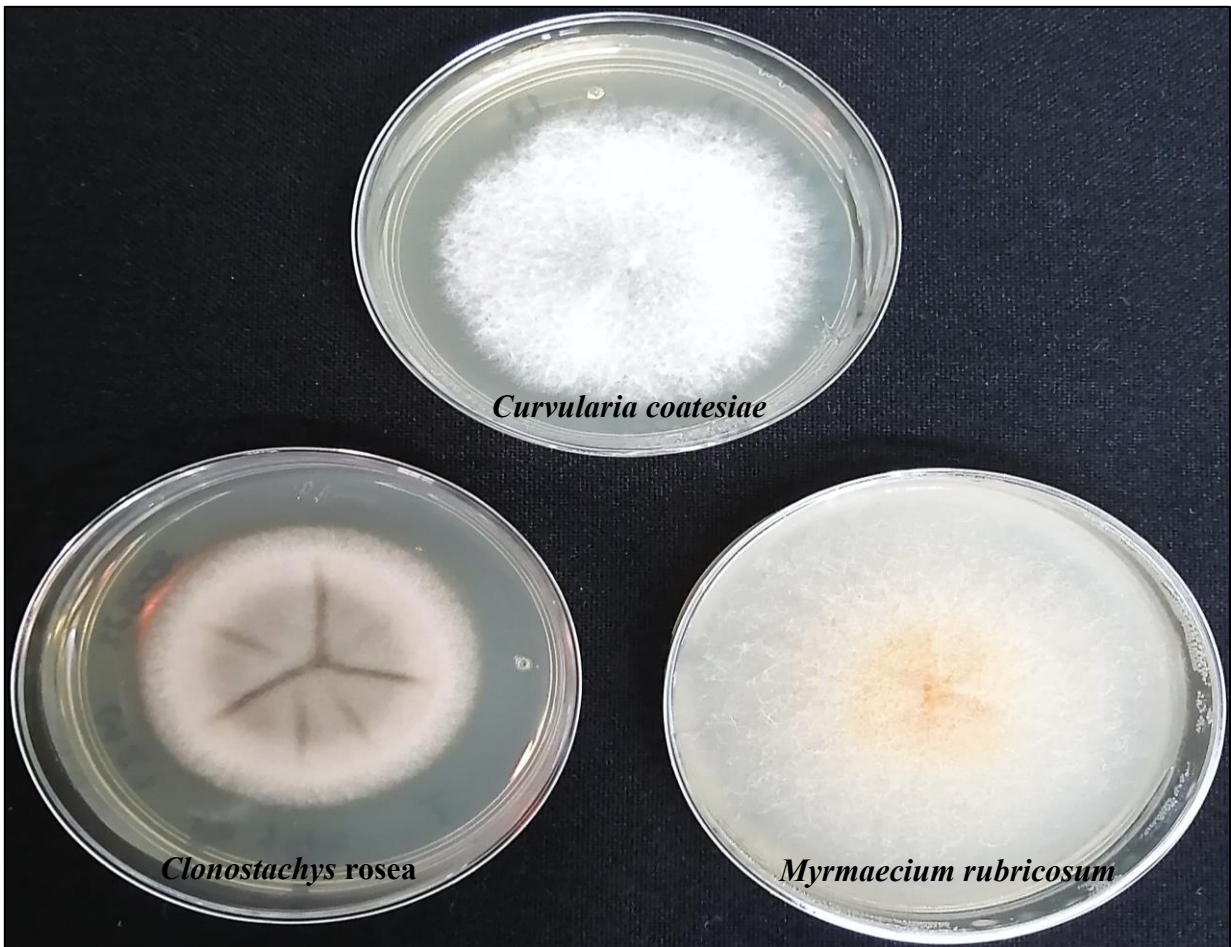
### X.3 Aislamiento y caracterización de hongos asociados a pino

Se realizó el aislamiento e identificación de los hongos presentes en las muestras de acícula de pino en agar dextrosa papa (Figura 22). Se aislaron un total de 43 hongos a partir de las lesiones encontradas en las acículas: 8 de *P. montezumae*, 25 de *P. patula* y 10 de *P. pseudostrobus*.



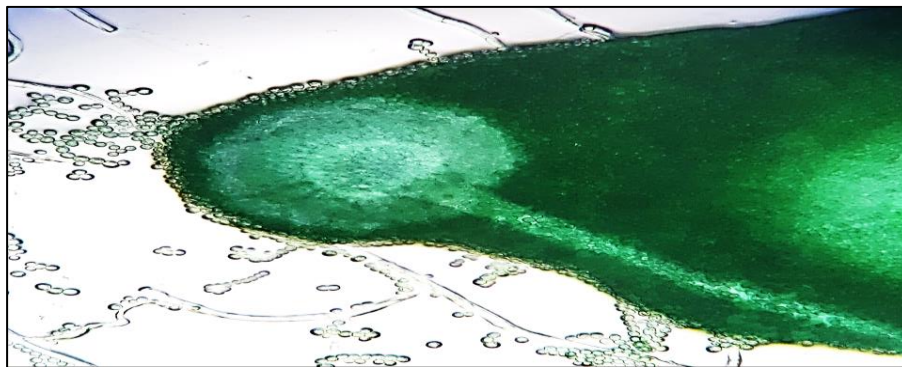
**Figura 22.** Aislamiento de hongos asociados a *Pinus* spp. en agar papa dextrosa

Se observó que existen tres hongos fitopatógenos compartidos entre las especies de pino; dos de ellos, identificados como *Curvularia coatesiae* y *Myrmaecium rubricosum*, se encontraron presentes en acículas de *P. patula* y *P. montezumae*; además de que el hongo *Clonostachys rosea* se identificó como relacionado con la defoliación de *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* al aislarse de hojas de pino afectadas (Figura 23).



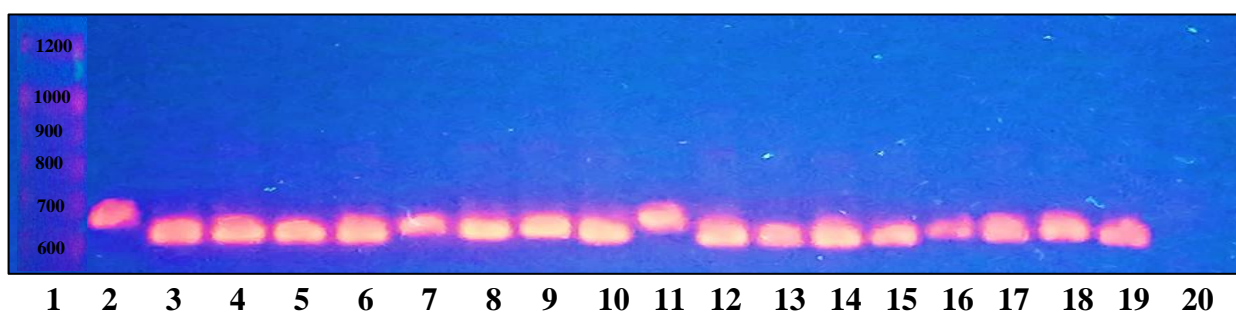
**Figura 23.** Hongos en común entre las especies *P. montezumae*, *P. patula* y *P. pseudostrobis*

Una vez obtenidos cultivos axénicos, se observan a microscopio sus estructuras reproductivas para clasificarlos fenotípicamente, empleando la técnica de microcultivo en caja Petri (Figura 24).



**Figura 24.** Estructura reproductiva de *Aspergillus* sp. observada en microscopio óptico 40x

Al mismo tiempo, se seleccionaron los nueve hongos que más afectan a las especies *P. patula*, *P. montezumae* y *P. pseudostrobilus*, para ser identificados molecularmente mediante la amplificación y secuenciación de las regiones intergénicas ITS1 e ITS2 (Figura 25).




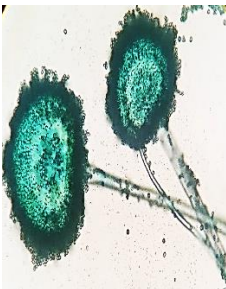

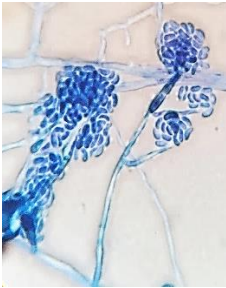




**Figura 25.** Gel de agarosa al 3% con productos de PCR de hongos aislados de pino. Carril 1: marcador, carriles 2 al 19: productos de PCR de los hongos *Aspergillus flavus*, *Chaetomium globosum*, *Clonostachys rosea*, *Coprinellus disseminatus*, *Curvularia coatesiae*, *Hypoxylon texense*, *Myrmaecium rubricosum*, *Paecilomyces formosus*, *Sordaria fimicola* y carril 20: Testigo negativo






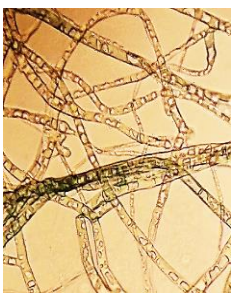


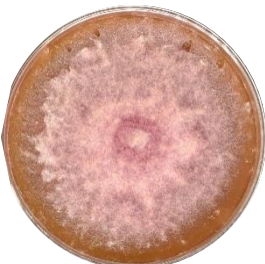

La identificación molecular mostró que los hongos seleccionados con mayor representatividad pertenecen a diferentes géneros fúngicos (Cuadro 11). El hongo con clave M3MZPP (3) se identificó como *Sordaria fimicola*, una especie microscópica de distribución cosmopolita que se encuentra comúnmente en las heces de los animales herbívoros. También, *S. fimicola* se ha encontrado como biocontroladora de hongos fitopatógenos *in vitro*, inhibiendo en porcentajes superiores al 50% el crecimiento micelial de *Pestalotiopsis guepinii*, *Colletotrichum capsici*, *Curvularia lunata*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum* [Jeamjitt *et al.*, 2007]. Asimismo, se identificó otro hongo como *Aspergillus flavus*, un saprófito del suelo y patógeno oportunista de humanos y plantas. Este hongo causa intoxicación alimentaria y también produce metabolitos secundarios tóxicos y cancerígenos conocidos como aflatoxinas [Majumdar *et al.*, 2018]. También, *Clonostachys rosea* se encontró relacionado a la pérdida foliar. Esta especie fúngica se ha descrito como importante biocontroladora de hongos de plantas por producir enzimas quitinasas y glucanasas; así como también produce metabolitos secundarios como péptidos e induce la respuesta sistémica de las plantas [Roberti *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2011]. Además, se ha observado a

*Clonostachys rosea* como un hongo presente en lesiones necróticas en acículas de *Pinus coulteri* y *P. ponderosa* [Ivanova *et al.*, 2017]. Se identificó también a *Hypoxylon texense*, que es uno de los géneros más grandes de *Xylariales* y comprende más de 200 especies. Este género se encuentra principalmente asociado con árboles de angiospermas como saprófitos y endófitos con presencia en todos los ecosistemas forestales del mundo [Pourmoghaddam *et al.*, 2020].

**Cuadro 11.** Identidad de los hongos asociados a *Pinus* spp. de la Sierra Norte de Puebla.

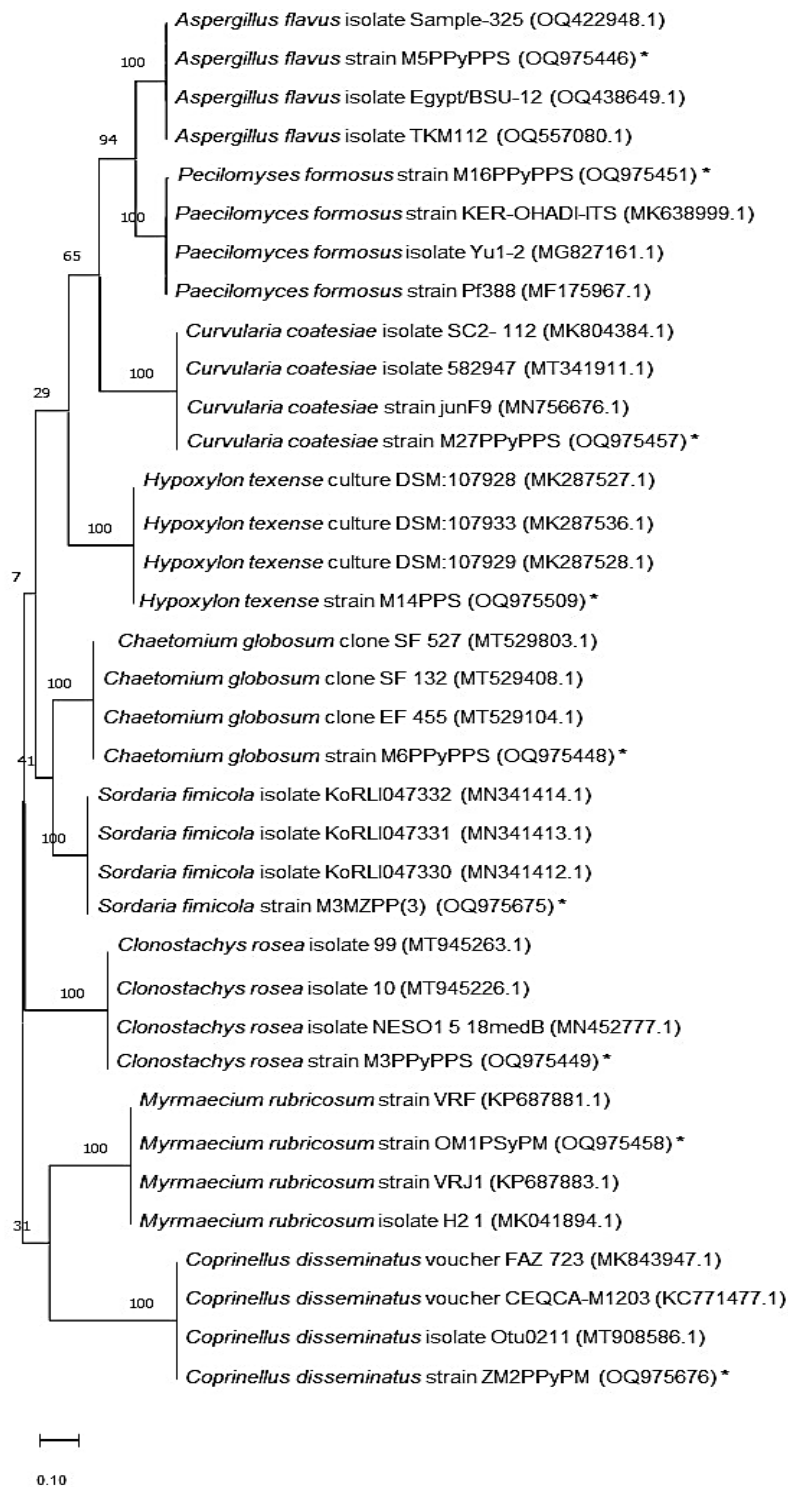
Clave	Especie	Similitud (%)	Número de acceso	Morfología macroscópica	Morfología microscópica
M3MZPP (3)	<i>Sordaria fimicola</i>	100.00	OQ975675		
M5PPYPPS	<i>Aspergillus flavus</i>	100.00	OQ975446		
M3PPYPPS	<i>Clonostachys rosea</i>	99.81	OQ975449		
M14PPS	<i>Hypoxylon texense</i>	100.00	OQ975509		

**Cuadro 11.** Continuación

M16PPYPPS	<i>Paecilomyces formosus</i>	99.85	OQ975451		
M27PPYPPS	<i>Curvularia coatesiae</i>	99.83	OQ975457		
OM1PSYPM	<i>Myrmaecium rubricosum</i>	100.00	OQ975458		
M6PPYPPS	<i>Chaetomium globosum</i>	100.00	OQ975448		
ZM2PPYPM	<i>Coprinellus disseminatus</i>	99.84	OQ975676		

El porcentaje de similitud corresponde al obtenido una vez comparadas las secuencias de las cepas fúngicas aisladas de *Pinus* spp. en el banco de genes de NCBI.

Igualmente, se halló relacionado a la pérdida de acículas en *Pinus* spp. al hongo *P. formosus*, que es un patógeno de plantas que se ha identificado en el sector forestal como el agente causal de la muerte regresiva del roble, provocando el amarillamiento de las hojas y la muerte de ramas y tallos [Sabernasab *et al.*, 2019]. A la par, otro microorganismo que se identificó corresponde al género *Curvularia*, el cual está compuesto por saprófitos cosmopolitas que incluyen especies patógenas de plantas, animales y humanos [Marin-Felix *et al.*, 2020]. Particularmente, la especie *C. coatesiae* se ha descrito como el agente causal del tizón de las plantas de arroz [Liu *et al.*, 2020]. Del mismo modo, *M. rubricosum* también se encontró asociado a la defoliación en pinos. Los miembros del género *Myrmaecium* tienen una distribución mundial y son saprófitos que afectan árboles coníferos y de hoja ancha que se encuentran inmunocomprometidos [Jaklitsch *et al.*, 2015]. Además, *M. rubricosum* se ha reportado como patógeno de plantas de agave al causar marchitamiento, manchas y clorosis [Campos-Rivero *et al.*, 2019]. Asimismo, se identificó al hongo *Coprinellus disseminatus* que corresponde a la familia *Psathyrellaceae*, especie que desarrolla cuerpos fructíferos acampanados y son comúnmente saprófitos [Menéndez, 2006]. De la misma manera, se ha demostrado que *C. disseminatus* puede proporcionar nutrientes para promover la germinación de semillas y el desarrollo de plántulas de *C. appendiculata* [Gao *et al.*, 2022]. Además, *C. disseminatus* es considerado como una fuente alternativa de compuestos biológicamente activos [Novaković *et al.*, 2016]. *C. globosum* es un hongo reportado como biocontrolador del nematodo del quiste de la papa (*Globodera rostochiensis*), que es una de las plagas de *Solanum tuberosum* L. de mayor importancia económica a nivel mundial [Bairwa *et al.*, 2023]. También se ha reportado como un hongo endófito de plantas medicinales con la capacidad de producir compuestos bioactivos naturales y con potencial uso en la industria, representando un recurso importante que tiene aplicaciones biotecnológicas en la agricultura, la industria y la medicina [Lata *et al.*, 2020]. Además, se realizó un árbol filogenético de las especies identificadas genéticamente, utilizando el método neighbor joining (NJ) y el modelo de evolución Jukes-Cantor con valores de bootstrap de 1000 réplicas usando el programa Mega X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Figura 26).












**Figura 26.** Árbol filogenético de hongos asociados a la defoliación en *Pinus* spp. de la Sierra Norte de Puebla basado en la distancia de Neighbor-joining (NJ). La barra de escala indica el número de sustituciones de base por sitio. Se muestran los valores de Bootstrap junto a los nodos, así como las especies de los hongos y los números entre paréntesis indica los números de acceso de las secuencias de ADNr 16S en GenBank. \* Hongos aislados de la Sierra Norte de Puebla

#### X.4 Patogenicidad y control biológico en condiciones de cámara húmeda

En los ensayos de patogenicidad se observó que las acículas de pino con mayor susceptibilidad a los tres hongos representativos fueron las de *P. patula*, ya que mostraron desarrollo micelial considerable respecto al testigo y un proceso de enfermedad avanzada a los siete días de infección. Asimismo, se alcanzó un porcentaje de infección del 50% respecto a la aplicación del hongo *M. rubricosum* y del 75% respecto a los hongos *C. coatesiae* y *C. rosea*. También se encontró la formación de abundantes puntos negros, debido a la presencia de los hongos *C. coatesiae* y *M. rubricosum*; así como de color blanco ocasionados por la infección con el hongo *C. rosea* (Cuadro 12).

**Cuadro 12.** Ensayos de patogenicidad en cámara húmeda










Pino/Hongo	<i>C. coatesiae</i>	<i>M. rubricosum</i>	<i>Clonostachys rosea</i>
<i>Pinus patula</i>			
<i>Pinus montezumae</i>			
<i>Pinus pseudostrobus</i>			

En el cuadro se observa la afectación causada siete días posteriores a la infección de los hongos *C. coatesiae*, *M. rubricosum* y *C. rosea* a las acículas de *P. patula*, *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*.

Las acículas de la especie *P. montezumae* mostraron susceptibilidad a la presencia de los tres hongos seleccionados en diferente proporción, encontrando mayor vulnerabilidad a la presencia del hongo *C. rosea* con un porcentaje de superficie afectada del 50% y de los hongos *C. coatesiae* y *M. rubricosum* con porcentajes del 25%. Se observó la presencia de abundantes puntos blancos en las acículas de *P. montezumae* por la infección con el hongo *Clonostachys rosea* y de algunos puntos negros por el hongo *C. coatesiae* y *M. rubricosum*. Las acículas de la especie *P. pseudostrobus* presentaron la mayor resistencia a la infección por los tres hongos seleccionados, mostrando un bajo desarrollo de la enfermedad en porcentajes de hasta 10% para los hongos *C. coatesiae* y *M. rubricosum*; así como de 25% para el hongo *C. rosea*. También, se encontraron algunos puntos de color blanco en las acículas de *P. pseudostrobus* debido a la presencia del hongo *C. rosea* y de color negro para los hongos *C. coatesiae* y *M. rubricosum*.

Simultáneamente, se realizaron los ensayos de control biológico con las bacterias seleccionadas de suelo forestal. Después de siete días de tratamiento, se observó que la inoculación con la mezcla bacteriana (*P. simplex*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* (2), *B. simplex* y *B. cereus*) brindó un efecto protector al desarrollo de hongos en el tejido de las acículas. La aplicación del consorcio inhibió el desarrollo de micelio en las hojas de los pinos bajo condiciones de humedad y la afectación a la superficie de las acículas fue menor al 10% (severidad). La diferencia en el crecimiento de los hongos, con y sin la presencia bacteriana, nos muestra que las cepas forestales seleccionadas pueden limitar el desarrollo de los organismos fúngicos en el tejido de las acículas de *Pinus* spp. bajo condiciones de humedad. En las hojas de *Pinus patula* tratadas con bacterias, se observó un cambio de coloración por necrosis foliar con afectación de hasta 10% de la superficie de la hoja sin desarrollo de micelio. Para las acículas de *P. montezumae*, no se encontró desarrollo de micelio o cambios de coloración ocasionados por la presencia de los agentes fúngicos, pero si necrosis en la superficie menor al 10%. Mientras que las hojas de la especie *P. pseudostrobus*, se vieron afectadas en porcentajes menores al 10% por la acción de los hongos (Cuadro 13).

**Cuadro 13.** Ensayos de control biológico en cámara húmeda

Pino/Hongo	<i>C. coatesiae</i>	<i>M. rubricosum</i>	<i>Clonostachys rosea</i>
<i>Pinus patula</i>			
<i>Pinus montezumae</i>			
<i>Pinus pseudostrobus</i>			

En el cuadro se observan las acículas de *P. patula*, *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* tratadas con bacterias aisladas de suelo forestal e infectadas con hongos asociados a la defoliación.

## X.5 Patogenicidad y control biológico bajo condiciones de invernadero



**Figura 27.** Producción de pinos en vivero en la localidad de Pueblo Nuevo

Se realizaron visitas al vivero forestal “Peñuelas, Pueblo Nuevo”, ubicado en el municipio de Zacatlán para la obtención de plantas pequeñas de pino y la aplicación de la herramienta para el análisis social. En este vivero se producen cerca de 500 000 plantas por año de cinco especies de pino diferentes: *P. patula*, *P. greggi*, *P. pseudostrobus*, *P. ayacahuite* y *P. montezumae* (Figura 27). Este vivero provee plantas de pino para plantaciones de aprovechamiento maderable y también para los procesos de reforestación de la Comisión Nacional Forestal. En este sitio laboran de 5 a 10 viveristas cuya presencia está definida por la necesidad en la producción a lo largo del año. Se obtuvieron 150 árboles pequeños de las especies: *P. patula*, *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* para utilizarlos en las pruebas de patogenicidad y control biológico bajo condiciones de invernadero. Estos árboles de pino se colocaron en bolsas de plástico con sustrato forestal y se mantuvieron en condiciones de invernadero para su uso en los ensayos de patogenicidad y antagonismo *in vivo* (Figura 28).



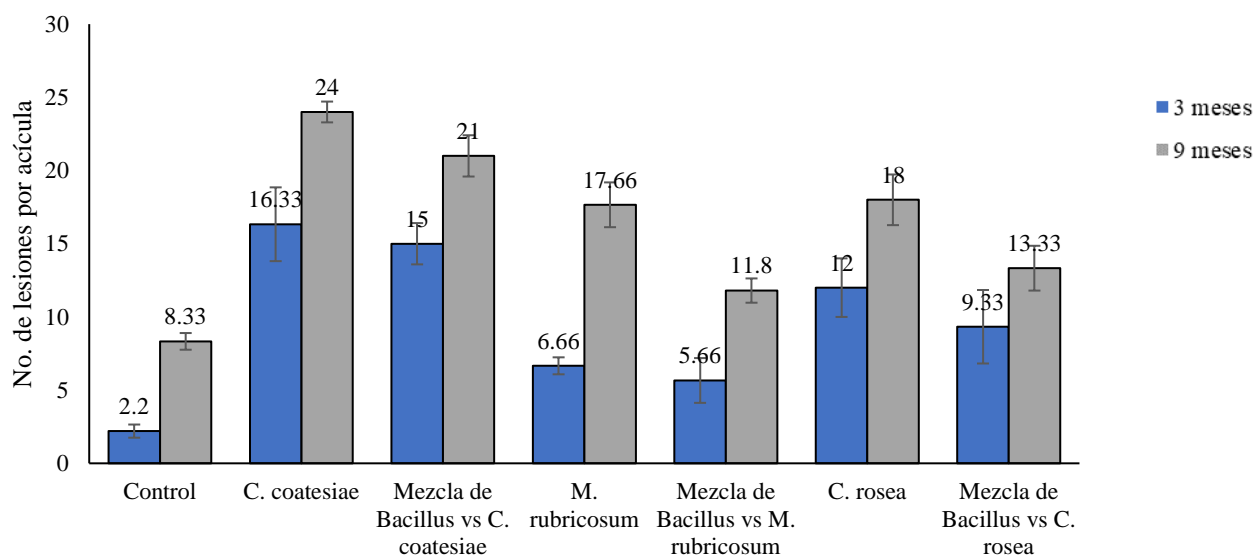
**Figura 28.** Plantas de *Pinus* spp. con diferentes tratamientos

Para determinar si las lesiones observadas en las hojas de los pinos y la caída de acículas se encontraban relacionadas con la presencia de hongos, plantas pequeñas de *P. patula*, *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* se infectaron con los hongos aislados en común entre las tres especies y se observaron las afectaciones causadas por estos durante nueve meses. Se detectó que la infección de las plantas con los organismos fúngicos llevó al desarrollo de enfermedad en las plantas de pino, causando el crecimiento de micelio en las hojas de las plantas de pino, clorosis, desecamiento y defoliación (Figura 29).

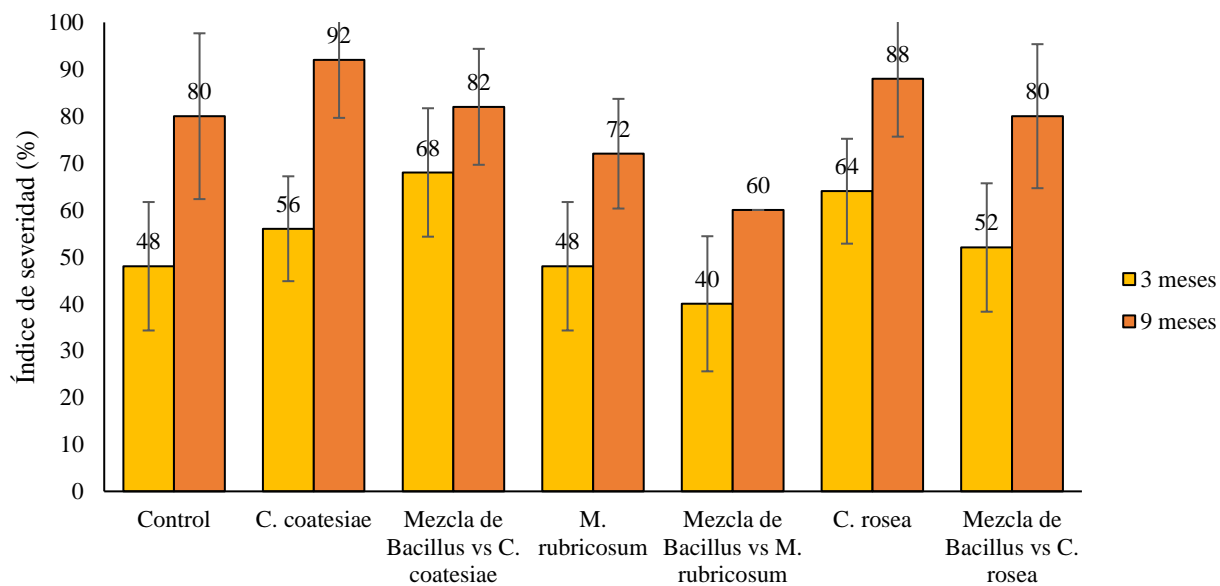


**Figura 29.** Crecimiento de *C. rosea* en las acículas de *P. pseudostrobus* de invernadero

A los tres y nueve meses de aplicados los tratamientos se evaluaron los parámetros de incidencia y severidad provocados por la presencia de los agentes fúngicos; así como su biocontrol mediante bacterias endémicas del sitio de estudio. Se encontró que la infección con hongos causó múltiples lesiones a las acículas de los pinos, lo que ocasionó la pérdida foliar en las tres especies y en casos graves la muerte de las plantas.

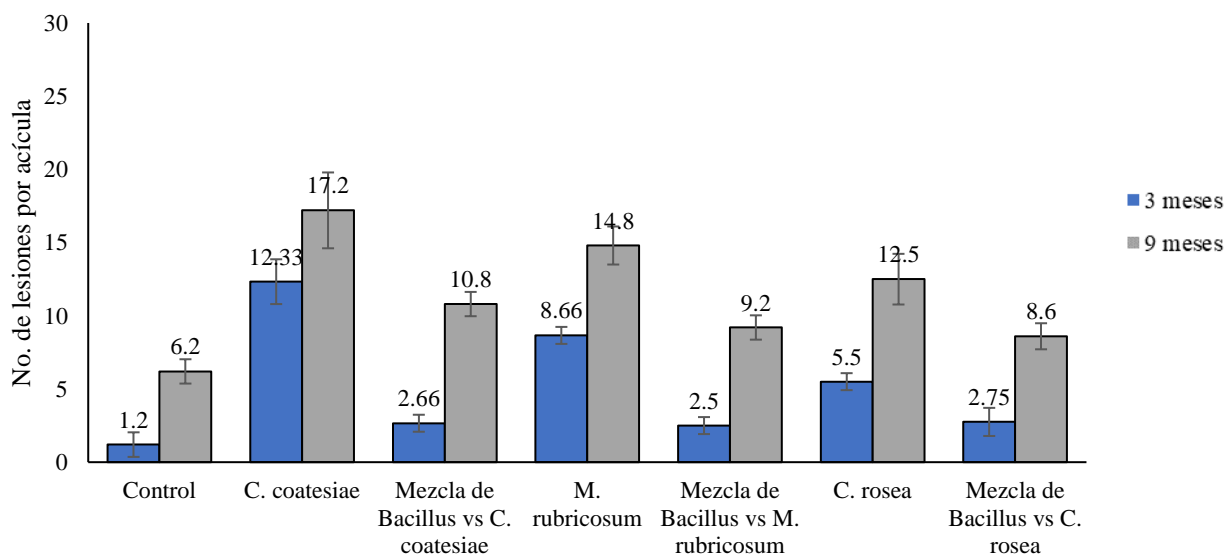


**Figura 30.** Incidencia de la enfermedad en *P. patula*. Lesiones presentes por cada acícula en los ensayos de patogenicidad y biocontrol con la mezcla de *Bacillus* (*P. simplex*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* (2), *B. simplex* y *B. cereus*) a los 3 y 9 meses posteriores a la aplicación de los tratamientos.

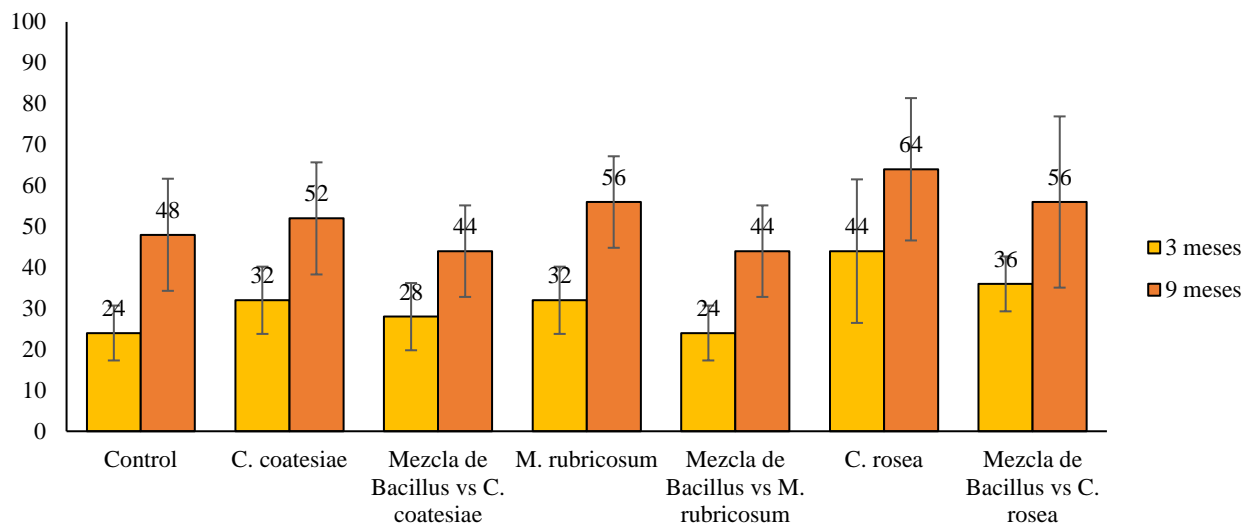


**Figura 31.** Índice de severidad de la enfermedad en *P. patula*. Índice de severidad de los ensayos de patogenicidad y biocontrol con la mezcla de *Bacillus* (*P. simplex*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* (2), *B. simplex* y *B. cereus*) a los 3 y 9 meses posteriores a la aplicación de los tratamientos.

A los tres meses de tratamiento, la especie *P. patula* presentó la mayor incidencia ( $16.33 \pm 0.52$  lesiones por acícula) e índice de severidad de la enfermedad ( $56.00 \pm 0.50\%$ ) con la presencia del hongo *C. coatesiae* (Figura 30 y 31). Por su parte, la especie *P. pseudostrobus* tuvo la mayor incidencia por la afectación de los hongos *M. rubricosum* y *C. rosea* con  $09.0 \pm 1.00$  y  $13.5 \pm 0.1.29$  lesiones por acícula respectivamente (Figura 34). También, en el de índice de severidad, las especies *P. patula* y *P. pseudostrobus* mostraron el mayor porcentaje de superficie afectada con  $48.00 \pm 0.55\%$  por la presencia del hongo *M. rubricosum*. Así como la especie *P. pseudostrobus* tuvo la mayor área de daño en las acículas debido al hongo *C. rosea* con un valor de  $64 \pm 0.84\%$ . En la segunda evaluación, a los nueve meses de tratamiento, se observó el incremento de las lesiones y la severidad en todas las plantas. La especie *P. patula* presentó la mayor cantidad de lesiones por la presencia de los tres hongos, con valores de  $24 \pm 0.71$  lesiones por acícula por la presencia de *C. coatesiae*,  $17.66 \pm 1.53$  lesiones por acícula con *M. rubricosum* y  $18 \pm 1.73$  lesiones por acícula con *Clonostachys rosea*. Además, para el índice de severidad, la especie *P. patula* mostró la mayor afectación por los tres hongos, con valores de  $92 \pm 12.36\%$  para *C. coatesiae*,  $72 \pm 11.69\%$  para *M. rubricosum* y  $88 \pm 12.36\%$  para *C. rosea*. Estos resultados nos muestran que los hongos no son específicos y tienen la capacidad de afectar a las tres especies de pino en diferente proporción. Además, los ensayos de patogenicidad evidenciaron que la presencia fúngica ocasionó una mayor afectación a la especie *P. patula*, cuya susceptibilidad puede deberse a su fisiología.

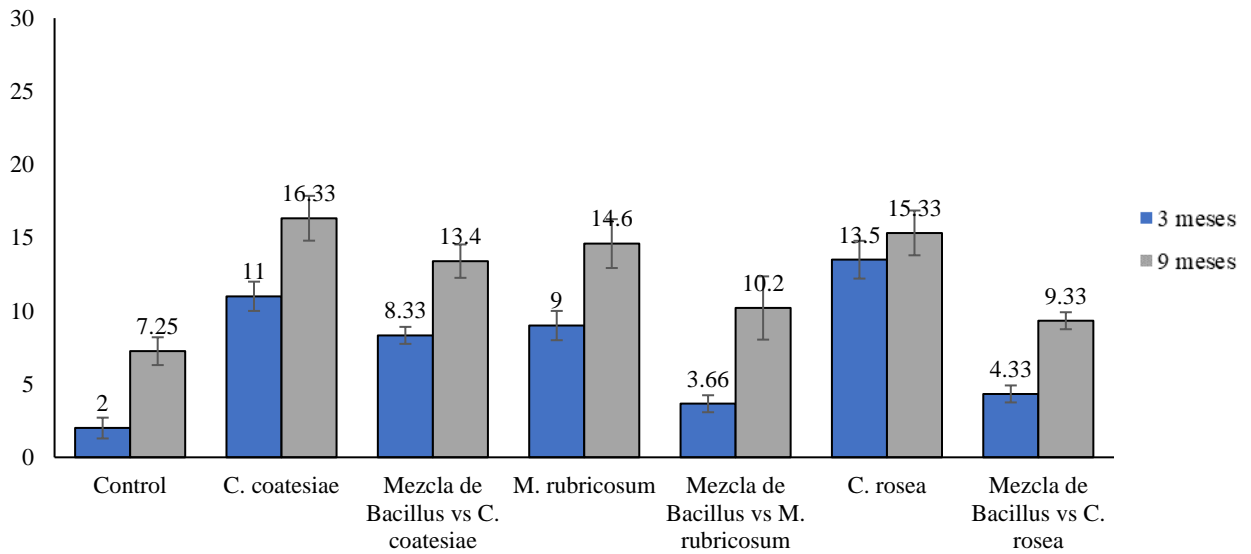


**Figura 32.** Incidencia de la enfermedad en *P. montezumae*. Lesiones presentes por cada acícula en los ensayos de patogenicidad y biocontrol con la mezcla de *Bacillus* (*P. simplex*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* (2), *B. simplex* y *B. cereus*) a los 3 y 9 meses posteriores a la aplicación de los tratamientos.

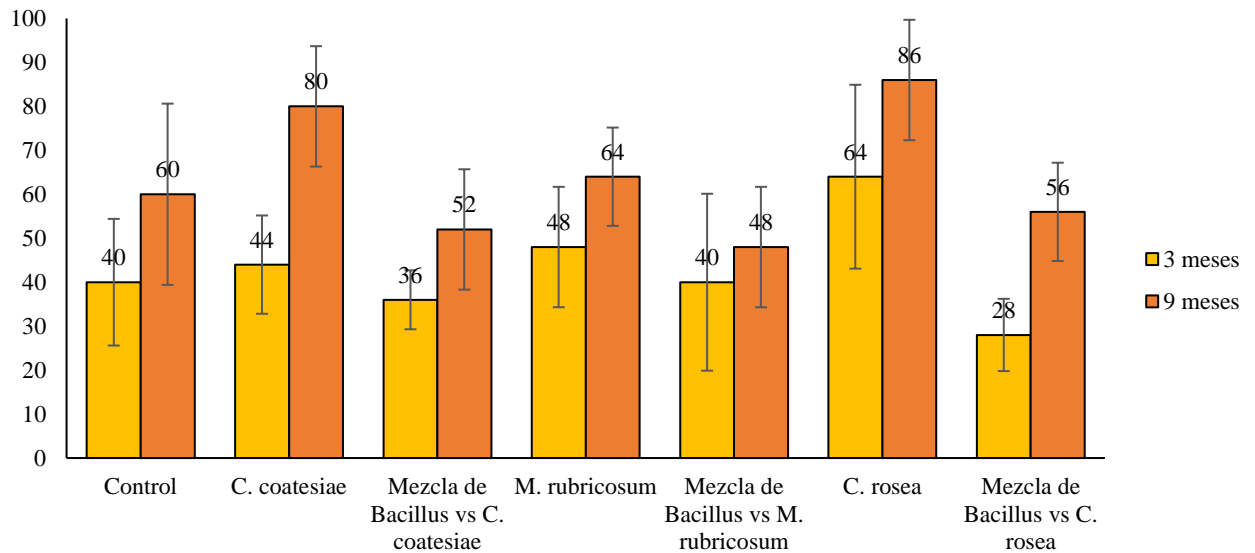


**Figura 33.** Índice de severidad de la enfermedad en *P. montezumae*. Índice de severidad de los ensayos de patogenicidad y biocontrol con la mezcla de *Bacillus* (*P. simplex*, *B. thuringiensis*, *B. mycooides* (2), *B. simplex* y *B. cereus*) a los 3 y 9 meses posteriores a la aplicación de los tratamientos.

Paralelamente a los ensayos de patogenicidad se evaluó el efecto biocontrolador de las bacterias bajo condiciones de invernadero. Para ello, plantas pequeñas de pino de las tres especies en estudio se inocularon con las bacterias antagonistas seleccionadas (*P. simplex*, *B. thuringiensis*, *B. mycooides* (2), *B. simplex* y *B. cereus*) y se infectaron con los hongos encontrados en común (*C. coatesiae*, *M. rubricosum* y *C. rosea*). Después de tres y nueve meses de tratamiento se realizó la evaluación del control de la incidencia y severidad de la enfermedad causada por la presencia de los hongos. En estas evaluaciones se encontró que la afectación producida por la presencia de los hongos disminuye en las tres especies de pino al ser inoculados con bacterias con capacidad antagónica, en comparación a los tratamientos de patogenicidad. En ambas evaluaciones la especie *P. montezumae* mostró la menor incidencia y severidad de la enfermedad causada por la infección con los tres hongos (Figura 32 y 33). A los tres meses de tratamiento, el menor índice de severidad de la enfermedad se encontró en los pinos de la especie *P. montezumae* en los tratamientos contra la infección de *C. coatesiae* y *M. rubricosum*, con valores de  $28 \pm 0.45$  y  $24 \pm 0.55$  % respectivamente. Para el control del hongo *C. rosea*, la especie que tuvo la menor severidad fue *P. pseudostrobus* con un valor de  $28 \pm 0.55$  % (Figura 35). También, la especie que mostró el menor número de lesiones por acícula debido a la presencia de los hongos fue *P. montezumae*, con valores de  $2.66 \pm 0.58$  para *C. coatesiae*,  $2.5 \pm 0.59$  para *M. rubricosum* y  $2.75 \pm 0.82$  para *C. rosea*.



**Figura 34.** Incidencia de la enfermedad en *P. pseudostrobus*. Lesiones presentes por cada acícula en los ensayos de patogenicidad y biocontrol con la mezcla de *Bacillus* (*P. simplex*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* (2), *B. simplex* y *B. cereus*) a los 3 y 9 meses posteriores a la aplicación de los tratamientos.



**Figura 35.** Índice de severidad de la enfermedad en *P. pseudostrobus*. Índice de severidad de los ensayos de patogenicidad y biocontrol con la mezcla de *Bacillus* (*P. simplex*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* (2), *B. simplex* y *B. cereus*) a los 3 y 9 meses posteriores a la aplicación de los tratamientos.

A los nueve meses de tratamiento se observó un comportamiento semejante al de la primera evaluación. La especie que tuvo el menor número de lesiones fue *P. montezumae*, con  $10.8 \pm 0.83$  lesiones por la presencia de *C. coatesiae*,  $9.2 \pm 0.83$  con *M. rubricosum* y  $8.6 \pm 0.89$  con *C. rosea*. Además, nuevamente la especie que mostró el mayor número de lesiones por cada acícula e índice de severidad debido a la presencia de los hongos fue *P. patula*. Para el parámetro de severidad, la especie que tuvo mayor beneficio por el biocontrol fue *P. montezumae*, con valores de  $44 \pm 11.18\%$  contra *C. coatesiae*,  $44 \pm 11.18\%$  contra *M. rubricosum* y  $56 \pm 20.91\%$  contra *C. rosea*. Asimismo, la especie *P. pseudostrobus* se benefició con la aplicación de bacterias al disminuir la severidad de la enfermedad en porcentajes del 16 al 30%. Los resultados de control biológico en condiciones de invernadero coinciden con los obtenidos en los ensayos de patogenicidad al mostrar que la especie *P. pseudostrobus* es la más resistente a la presencia de los hongos, mientras que la especie *P. patula* es la que presenta la mayor susceptibilidad a las enfermedades fúngicas. En otras investigaciones también se ha demostrado que el uso de bacterias aisladas de la rizosfera de las plantas del género *Bacillus*, como *B. subtilis*, *B. megaterium*, y *B. brevis* son eficientes para el biocontrol del desarrollo de hongos del género *Fusarium* en plantas de romero bajo condiciones de invernadero, ya que logran disminuir del 20 al 38% la severidad ocasionada por la enfermedad [Haggag, 2008; Saleh *et al.*, 2021]. Igualmente se ha encontrado que *B. simplex* es capaz de reducir la incidencia de infección por los hongos *Heterobasidion annosum* y *Armillaria mellea*, en porcentajes de 55% y 46.9% en plántulas de invernadero de *Pinus radiata* [Mesanza *et al.*, 2016]. Por otro lado, también se ha probado que *B. pumilus* aislada de *P. massoniana* puede biocontrolar el 85% de la afectación causada por *Sphaeropsis sapinea* a nivel *in vitro* y 90% bajo condiciones de invernadero en plantas de pino, debido a la producción de metabolitos secundarios que dañan al micelio y retrasan la germinación de esporas [Dai *et al.*, 2021].

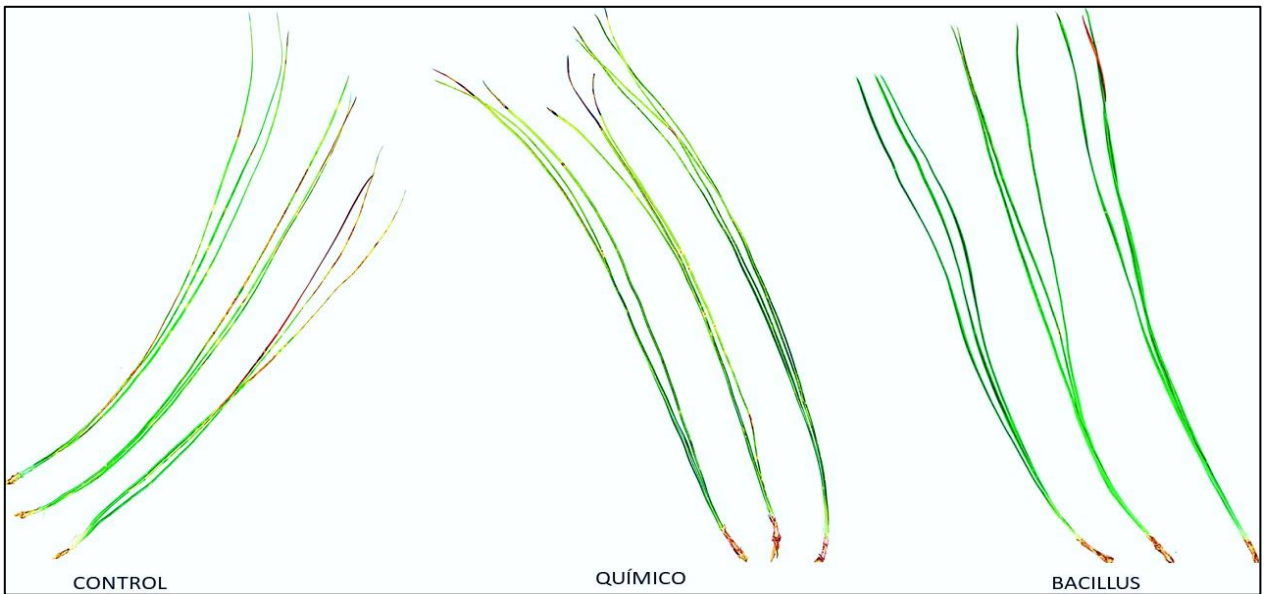
## **X.6** Evaluación de control biológico bajo condiciones naturales

Se valoró el control biológico de organismos fúngicos asociados a la defoliación en un predio forestal ubicado en Chignahuapan, Puebla. El procedimiento se realizó mediante la inoculación de árboles de la especie *P. patula* afectados por hongos, con tres tratamientos. Cada tratamiento se aplicó por aspersión con motobombas siguiendo el protocolo elaborado en esta investigación (Anexo XIII.2). Un tratamiento consistió en la inoculación de pinos con la mezcla de tres bacterias

seleccionadas con mayor eficiencia biocontroladora en los ensayos *in vitro* y que no presentaron hemólisis en agar gelosa sangre (*P. simplex*, *B. thuringiensis* y *B. simplex*). Del mismo modo, se trataron árboles enfermos con un fungicida comercial para contrastar el efecto bacteriano con el uso de un producto químico y el tratamiento control sin aplicación de sustancias. Se realizó la validación del control biológico de los hongos a los siete meses posteriores a la aplicación de estos tratamientos al evaluar la presencia de lesiones en las acículas de los pinos y la severidad de la enfermedad causada por los fitopatógenos (Figura 36).



**Figura 36.** Aplicación de mezcla bacteriana a *P. patula*



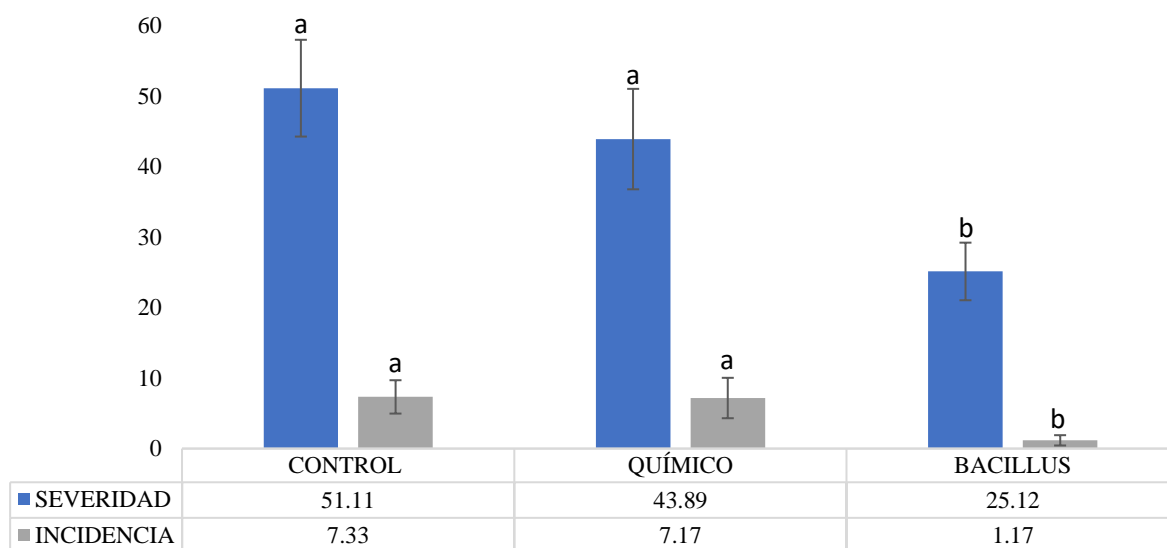
**Figura 37.** Acículas de *P. patula* con diferentes tratamientos

En las acículas de las plantas de pino de los tratamientos control y químico se observó la presencia de las afectaciones ocasionadas por los hongos en forma de amarillamiento y desecación del tejido, condición que posteriormente lleva a la defoliación en los árboles de pino. En cambio, el tratamiento con bacterias colaboró en el control de la enfermedad al disminuir visiblemente la presencia de los hongos (Figura 37). Asimismo, se encontró que la aplicación bacteriana benefició la salud de las plantas de pino al reducir el índice de severidad de enfermedad por hongos en un 50% respecto al control (Figura 38). Además, el control biológico mostró el número menor de lesiones por acícula en las hojas de los pinos con  $1.17 \pm 0.73$ , mientras que el tratamiento control y el químico presentaron una incidencia de lesiones por acícula superior a siete sin diferencias significativas entre ellos (Cuadro 14).

**Cuadro 14.** Parámetros de sanidad en plantas de *Pinus patula* bajo condiciones de campo

Tratamiento	Índice de severidad	Incidencia de lesiones
Control	$51.11 \pm 6.86$ a	$7.33 \pm 2.36$ a
Químico (2,4,5,6-tetracloroisoflato-nitrilo)	$43.89 \pm 7.12$ a	$7.17 \pm 2.85$ a
Bacillus ( <i>P. simplex</i> , <i>B. thuringiensis</i> y <i>B. simplex</i> )	$25.12 \pm 1.17$ b	$1.17 \pm 0.73$ b

Las medias estadísticas con la misma letra para la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey,  $p \leq 0,05$ ).



**Figura 38.** Índice de severidad e incidencia de lesiones a árboles de *Pinus patula* tratados

Los resultados obtenidos en los ensayos *in situ* demuestran que el uso de bacterias endémicas del bosque de la Sierra Norte de Puebla con capacidades antagonicas son una alternativa al manejo de hongos patógenos en el sistema natural al controlar las afectaciones que llevan a la defoliación en *Pinus* spp. En otras investigaciones ya se ha demostrado que el uso de bacterias para control biológico es eficiente en el combate de enfermedades en ambientes naturales, por ejemplo, se ha observado que aislados de *P. fluorescens*, *E. billingiae* y *B. simplex* tienen efectos antagonicos contra *F. circinatum* en árboles jóvenes de *P. radiata* y se puede reducir el crecimiento del hongo *in vitro* entre un 17% y 29%; así como en condiciones naturales se disminuye la incidencia de las lesiones entre un 22 % y un 25 % [Iturrutxa *et al.*, 2017]. Además, también en árboles de *P. radiata* la cepa *B. simplex* S11R41, aislada de la rizosfera de plantas de pino ha demostrado ser antagonista de los hongos de la pudrición de la raíz del pino *Heterobasidion annosum* y *Armillaria mellea*, bajo condiciones *in vitro* y en árboles jóvenes [Mesanza *et al.*, 2019].

## X.7 Caracterización de la importancia social

### X.7.1 Mapeo de la cadena productiva

La cadena productiva del pino en la Sierra Norte de Puebla tiene una composición simple con dos tipos de producción inicial, la primera de ellas es la producción realizada en los viveros forestales y la segunda es la reproducción natural que se da en el bosque de la región. Ambos tipos de producción tienen los mismos usos y beneficios e incluyen actores en común. Sin embargo, se componen de rutas de producción con etapas distintas (Figura 39).

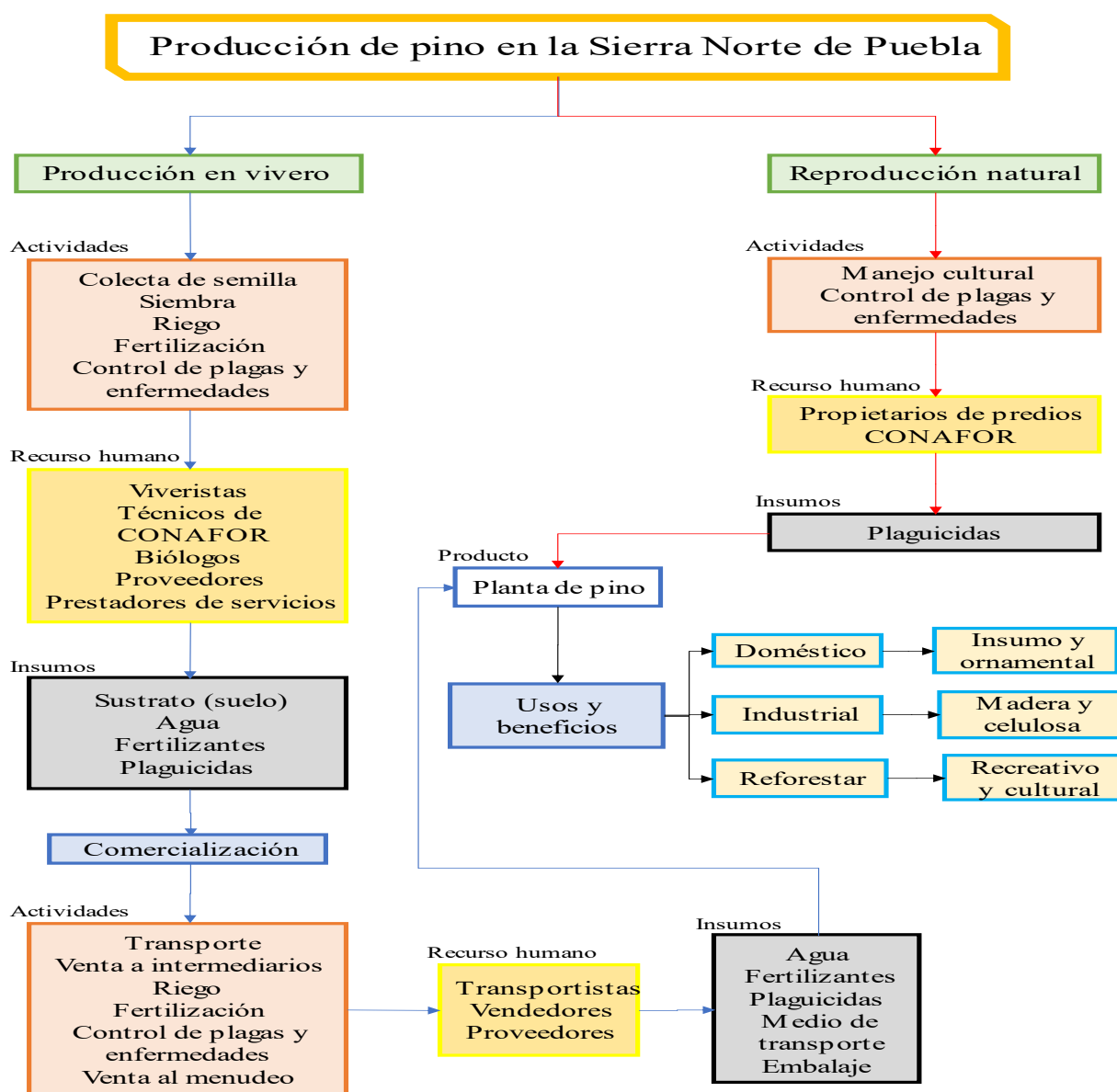


Figura 39. Mapeo de la cadena productiva del pino de la Sierra Norte de Puebla

La producción en vivero es completamente dependiente de la mano del hombre y consta de las diversas actividades. Lo primero que se realiza es la colecta de semilla, por el personal que labora en los viveros en ubicaciones cercanas a la plantación, con lo que se incrementa la posibilidad de adaptación de las plantas. Es una labor complicada por las características de los árboles de pino, ya que se encuentran dispersos, con cosechas variables y poseen gran altura. Esta es una actividad clave en la multiplicación de las especies de pino de la región, pues cada una de las semillas es potencialmente un nuevo individuo. Una vez recolectadas, las semillas requieren ser almacenadas con condiciones de humedad y temperatura reguladas, así como un manejo adecuado para evitar la presencia de plagas y/o enfermedades en ellas y prepararlas para su germinación [Willan, 2001].

Es importante señalar que, a mención de los viveristas de la región, las semillas reciben tratamiento químico para evitar su infección por patógenos. Se continúa con la siembra de cada una de las semillas en un sustrato nutritivo que beneficie su germinación y crecimiento como plántula. Las principales características que debe tener el sustrato son: buena porosidad, permitiendo la disponibilidad de agua y oxígeno, así como del movimiento radical; facilitar el acceso a los nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas que sean complementados con los fertilizantes; brindar el soporte físico para la posición vertical de las plantas y su rigidez. La mayoría de los sustratos en los viveros forestales son formulados a base de: agrolita, vermiculita, tierra de monte y peat moss, en diferentes proporciones [Rodríguez-Laguna, 2010]. Una vez germinadas se realizan riegos periódicos a las plántulas, comúnmente aplicando la técnica de aspersión, la cual requiere de una bomba, tuberías y aspersores o mangueras. El agua utilizada en el riego es la obtenida a partir de los sistemas de agua municipales y pozos profundos. El riego es una parte crítica de las labores culturales de un vivero, y la aplicación de agua en las plantas depende de las necesidades por especie y las condiciones climáticas del lugar [Quiroz *et al.*, 2009].

Posteriormente, se les adiciona fertilizante para colaborar en su desarrollo; esto debido a que el sustrato en el que se encuentran las plantas regularmente tiene un bajo contenido nutritivo y es necesario el suministro de los nutrientes minerales requeridos para el crecimiento normal de la planta. Este proceso se realiza principalmente a través del suministro de fertilizantes sólidos al sustrato [Prieto *et al.*, 2009]. Además, en caso de presentarse algún agente patógeno que limite el desarrollo de las plantas, se aplican formulaciones químicas de amplio espectro para su control y/o erradicación. Aunque se debe mencionar que en los viveros de la región también se aplican

biológicos para la prevención de enfermedades como lo son las formulaciones a partir de hongos del género *Trichoderma*, los cuales colaboran en el desarrollo de la planta al promover su crecimiento y brindarles protección contra patógenos. En todas las actividades se involucra personal dedicado a la producción de plantas de pino en viveros forestales, los cuales laboran de forma estacional, dependiendo de la demanda de actividades en el vivero. Además, se implican técnicos de la Comisión Nacional Forestal para regular los procedimientos productivos y biólogos que apoyan en el proceso; también son necesarios proveedores de productos como los plaguicidas y fertilizantes, y prestadores de servicio para el mantenimiento de los viveros. De esta producción en vivero se obtienen plántulas de pino que se comercializan al menudeo. Para ello se realizan las siguientes actividades: primero se empacan los pinos en bolsa para su transporte hacia un punto de comercialización que actúa como intermediario, en el proceso se brindan los cuidados necesarios para el manejo y desarrollo de las plantas de pino, se realizan riegos, la adición de nutrientes al sustrato y plaguicidas de ser necesarios. En esta etapa de producción se ven implicados principalmente transportistas, vendedores y proveedores. Todos estos actores obtienen un beneficio económico por su labor en medida de lo realizado. Una vez en la ubicación de venta al menudeo, las plantas de pino ahora en condiciones de bolsa tienen tres posibles destinos que marcarán su uso y manejo final. El primero de estos es el uso doméstico, el cual tiene como finalidad brindar una planta en el hogar de carácter puramente ornamental. El segundo es el uso industrial, enfocado a la generación de pinos de talla grande para la obtención de productos como la madera y la celulosa, lo cual abre entonces nuevas cadenas productivas para la obtención de productos terminados como lo son tablas y muebles. Y el tercero son los pinos destinados a reforestación de parcelas, es decir, las plantas de pino que son plantadas donde se requiere un incremento en la densidad arbórea. La mayoría de las plantas de pino producidas bajo condiciones de invernadero tienen como uso la reforestación del bosque para posteriormente ser aprovechadas para la obtención de recursos materiales y beneficios ecosistémicos como la generación de oxígeno, la regulación del clima y mejora del paisaje.

La cadena de producción que sigue la ruta natural es muy simplificada, comprende únicamente dos actividades: la primera es el manejo cultural de los predios forestales llevado a cabo por los propietarios, personal de los distintos ejidos encontrados en la Sierra Norte de Puebla y técnicos de la Comisión Nacional Forestal. Este manejo involucra una serie de prácticas de limpieza y poda, la recolección de semillas y el monitoreo de la presencia de plagas y enfermedades en los árboles de

pino. Y la segunda actividad es el control de plagas y enfermedades que realiza la Comisión Nacional Forestal a partir de brigadas, acción que se efectúa principalmente a partir de la aplicación de formulaciones químicas de amplio espectro. Las plantas de pino obtenidas en esta producción tienen como uso principal la reforestación, seguida del aprovechamiento industrial para la obtención de madera. El mapeo de la cadena productiva de pino ayudó a identificar los actores que tienen injerencia en la producción de pino. Se encontró que para la producción realizada en viveros forestales se tiene como actores principales a los viveristas, pues ellos desarrollan la mayoría de las labores de producción del pino, regulados por las autoridades ejidales y la CONAFOR; actúan también como actores secundarios los transportistas, intermediarios y proveedores de insumos como fertilizantes y plaguicidas. Finalmente, como último eslabón de la cadena artificial tenemos a la sociedad en general si su uso es doméstico o para reforestación y la apertura de una nueva cadena productiva si su uso es de carácter industrial. Por otra parte, en la ruta que se sigue a partir de la reproducción natural se ven involucrados como actores clave a los dueños de los predios forestales y el personal de la CONAFOR.

### X.7.2 Identificación de actores clave

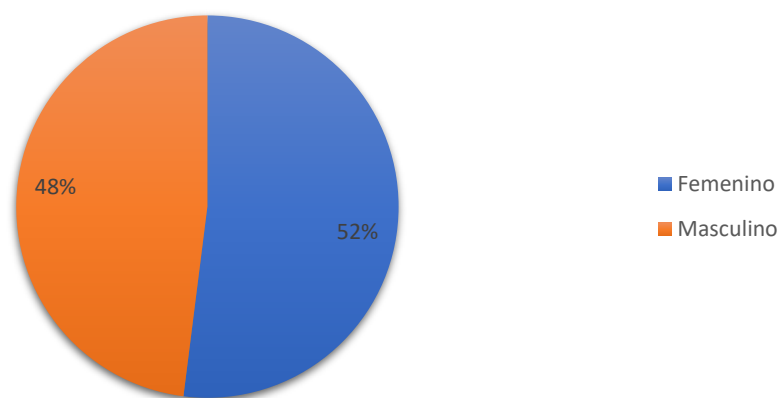
La caracterización de los diferentes eslabones que conforman la cadena productiva forestal en el sitio de estudio nos permitió identificar a los personajes con mayor importancia en la producción del pino de la región. Por lo que se sugiere a partir de este análisis, la inclusión como actores clave para aplicar la encuesta de valoración social de la importancia que tiene el bosque de pino a los viveristas que laboran en la producción de pino, así como a los propietarios de predios forestales de la Sierra Norte de Puebla y los miembros de la CONAFOR que brindan apoyo para el manejo del bosque de pino (Cuadro 15).

**Cuadro 15.** Actores clave identificados en la cadena productiva del pino de la Sierra Norte de Puebla

<b>Producción en vivero</b>	<b>Reproducción natural</b>
Viveristas	Propietarios de predios forestales
Personal de CONAFOR	Personal de CONAFOR

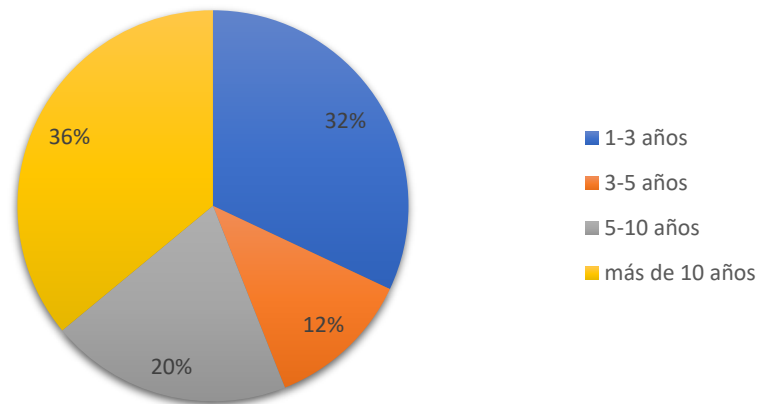
### X.7.3 Diseño y aplicación del instrumento de valoración social

Se formuló el instrumento para la valoración social de la importancia que tiene el bosque de pino en la Sierra Norte de Puebla (Anexo A), el cual permitió valorar la importancia del sector forestal y los posibles beneficios obtenidos a partir del control biológico de las enfermedades causadas por hongos en el Norte de Puebla. La encuesta se dirigió a los actores clave detectados en la cadena productiva del pino en la región (Viveristas, propietarios de predios forestales y personal de CONAFOR). A partir de esta herramienta se valoró la percepción de la importancia que tiene el bosque de pino a 25 actores clave de la producción del pino en el norte de Puebla, que incluyeron 13 mujeres y 12 hombres, lo que indica que la proporción de sexos es homogénea (Figura 40). La población presentó edades de entre 21 y 62 años, con los individuos de menor edad entre el personal dedicado a la producción de pinos en viveros forestales.



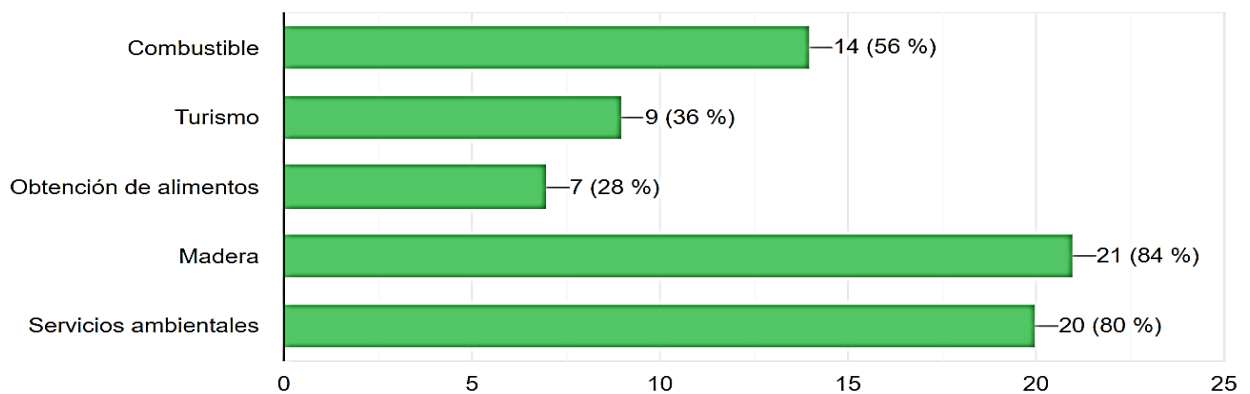
**Figura 40.** Sexo de los actores clave de la cadena productiva del pino de la Sierra Norte de Puebla

Se observó que el 36% de los actores clave tienen más de 10 años dedicados a actividades relacionadas con el sector forestal, en su mayoría están representados por el personal de CONAFOR y propietarios de predios forestales (Figura 41).



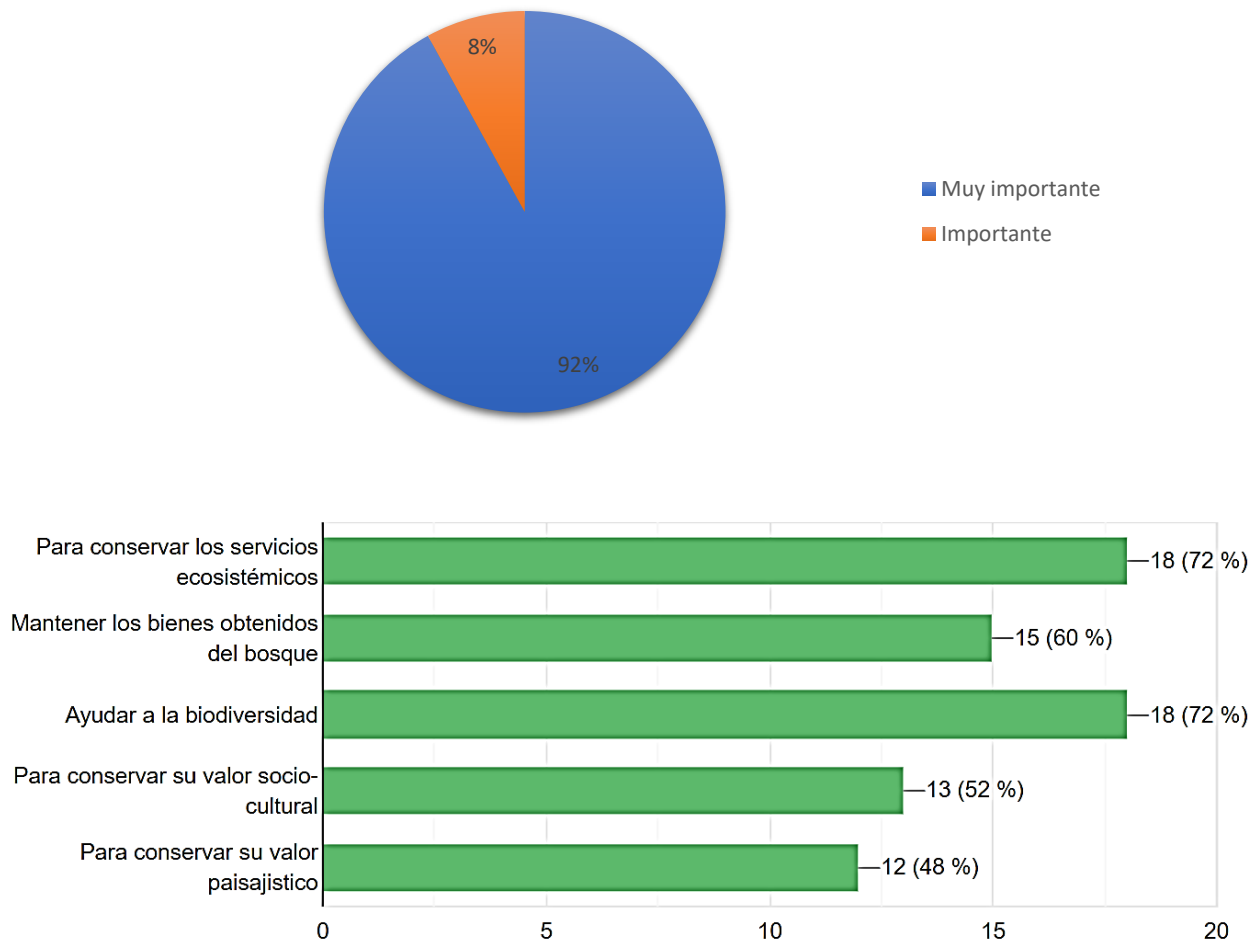
**Figura 41.** Tiempo dedicado a actividades relacionadas con el sector forestal de los actores clave

Además, el 100% de la población encuestada considera que los recursos forestales son de utilidad en su comunidad, debido principalmente a que colabora en la obtención de madera, combustible y servicios ambientales (Figura 42).



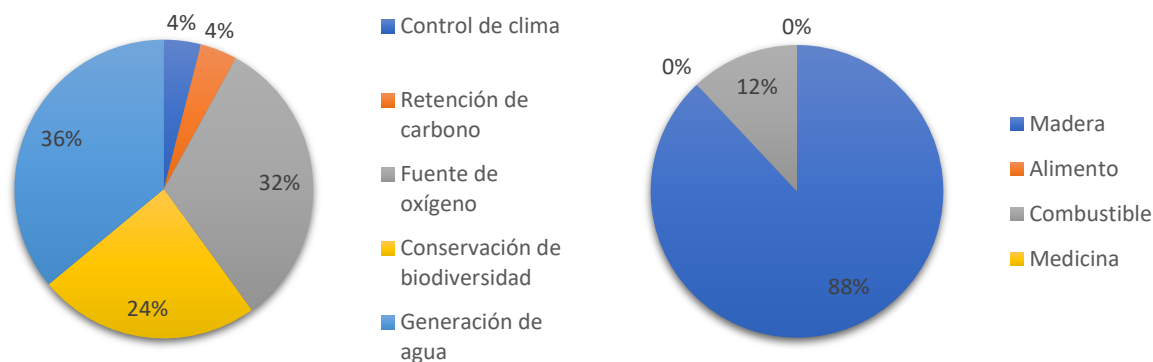
**Figura 42.** Uso de los recursos forestales en la Sierra Norte de Puebla

También, es significativo destacar que el 92% de las personas encuestadas cree que es muy importante preservar el bosque de pino, considerándolo así principalmente por la necesidad de conservar los servicios ecosistémicos, ayudar a la biodiversidad y mantener los bienes naturales que brinda el bosque de pino (Figura 43).



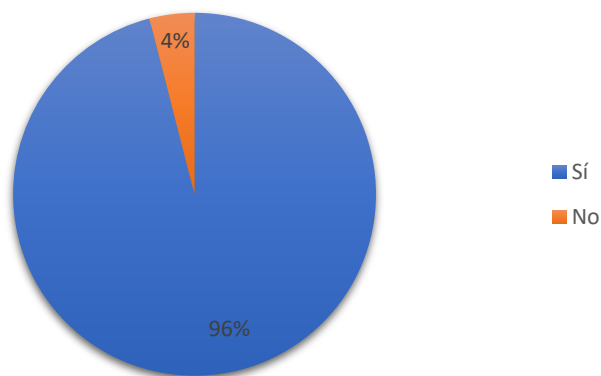
**Figura 43.** Importancia de la conservación del bosque de pino del norte de Puebla

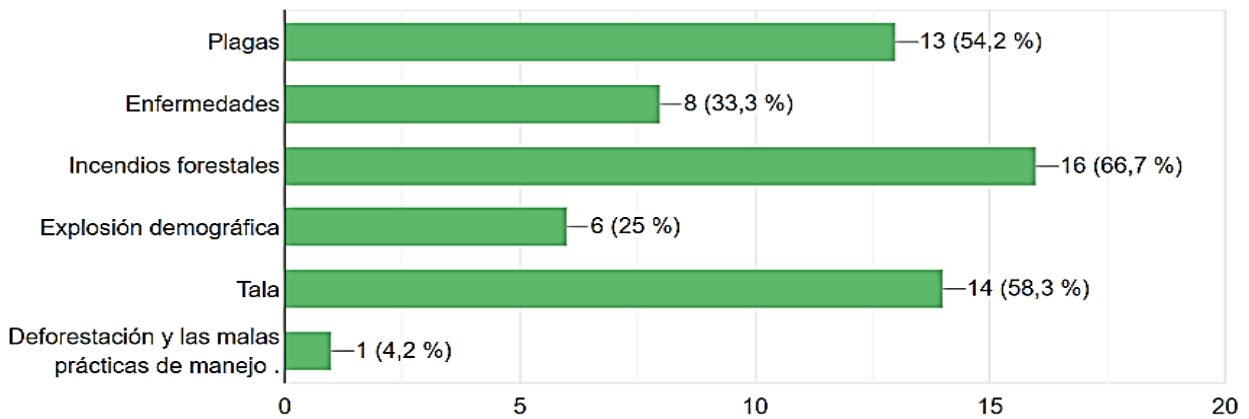
Asimismo, se observó que existe diferencia de opinión en el principal servicio ecosistémico obtenido a partir del bosque de pino, ya que 36% de la población menciona que es la generación de agua y 32% la generación de oxígeno. Así como también consideran que el principal bien obtenido a partir de la explotación de los recursos del bosque es la madera (88%), seguido del combustible (12%); resultado que se encuentra relacionado con la obtención de leña y carbón, que es la principal actividad económica practicada a partir del bosque en la región (Figura 44).



**Figura 44.** Principales bienes y servicios obtenidos del bosque de pino en el norte de Puebla

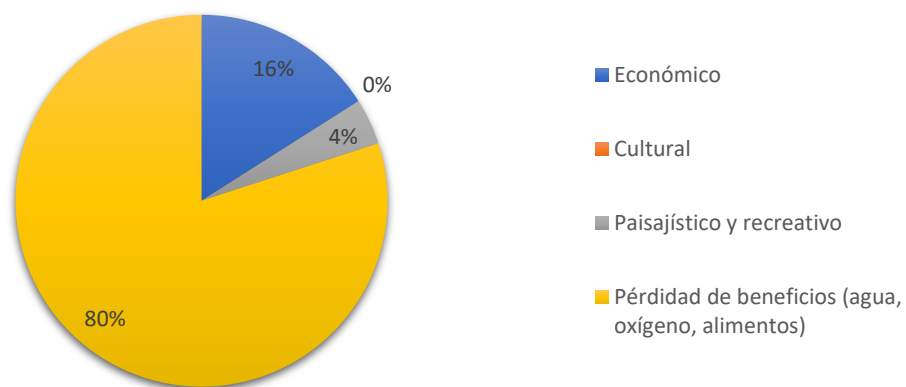
La mayor proporción de los encuestados (96%) consideran que en los últimos cinco años ha disminuido la superficie forestal en el norte del estado de Puebla y lo atribuyen a diversas causas, entre las que se encuentran los incendios forestales, la tala inmoderada, la presencia de plagas y la afectación por enfermedades. Debido a esta disminución, el 92% de los encuestados consideran que la obtención de bienes y servicios se ha visto afectada al disminuir la biomasa forestal, el abastecimiento de agua y se ha perjudicado a la biodiversidad (Figura 45).





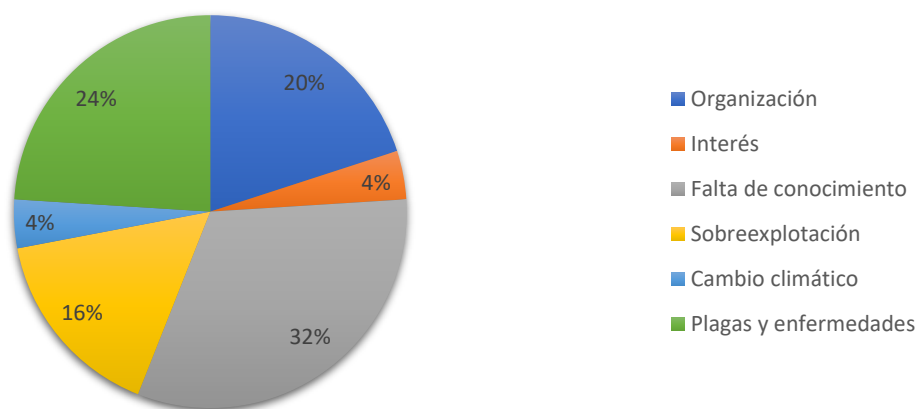
**Figura 45.** Disminución forestal en la Sierra Norte de Puebla y sus causas

Además, el 100% de los encuestados se ha percatado de que los árboles de pino se han afectado en los últimos cinco años por plagas y enfermedades, las cuales son tratadas principalmente mediante la aplicación de plaguicidas de formulación química. Igualmente, los actores clave piensan que el principal impacto ocasionado por la degradación y pérdida del bosque de pino en la población es la disminución de los beneficios ecosistémicos que brinda, como lo son la obtención de agua, oxígeno y alimentos (Figura 46).



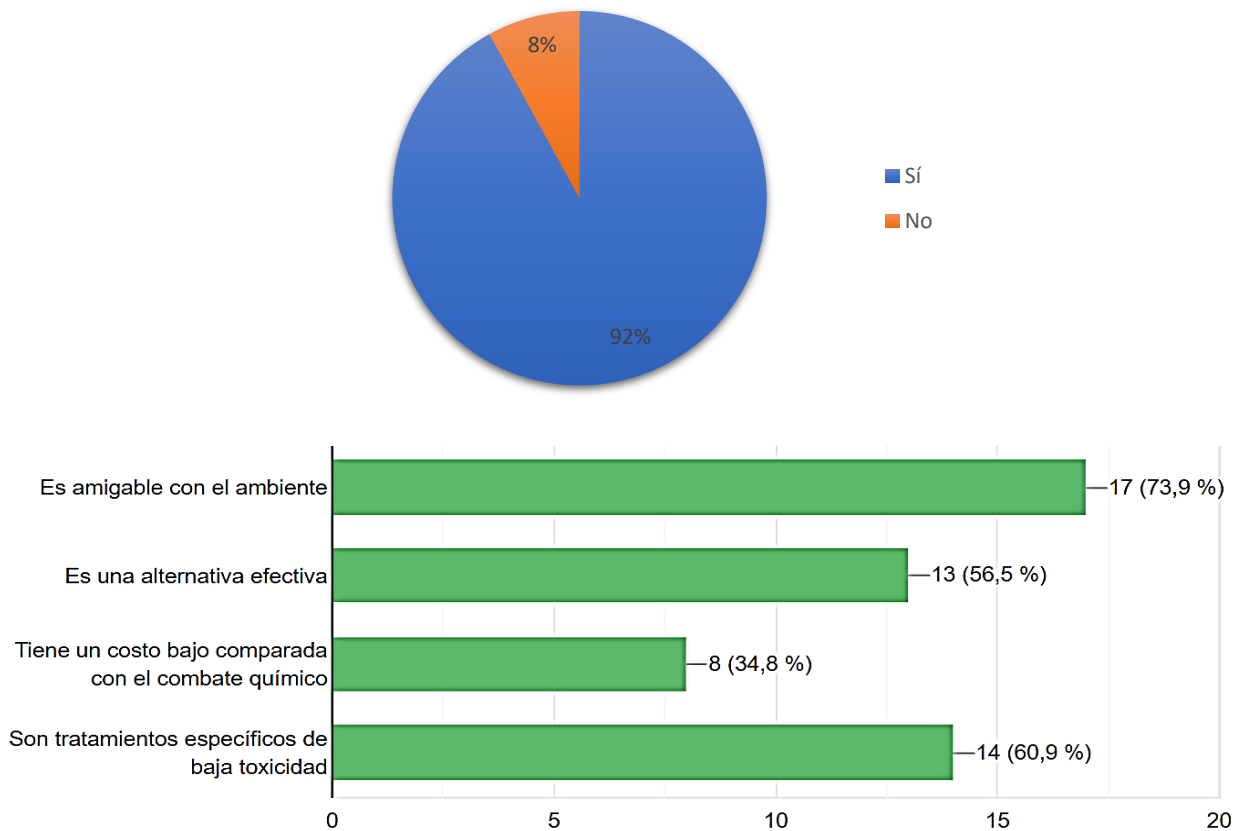
**Figura 46.** Afectación del bosque por plagas y enfermedades y sus impactos observados

También, según la experiencia de los actores clave, el principal problema que existe en el manejo y conservación del bosque de pino de la región es la falta de conocimiento del problema, seguido de la presencia de plagas y enfermedades; considerándolo así porque la falta de comprensión sobre los múltiples factores que llevan a la degradación y pérdida del bosque de la región dificultan su manejo (Figura 47).



**Figura 47.** Problemática para el manejo del bosque de pino de la Sierra Norte de Puebla

Finalmente, el 92% de los actores clave cree que la aplicación del control biológico para el combate de enfermedades es una opción adecuada, al considerarlo una alternativa amigable con el ambiente, de alta especificidad, baja toxicidad y alta efectividad (Figura 48).



**Figura 48.** El control biológico como alternativa al manejo de hongos en el bosque

Los resultados de la encuesta nos permiten encontrar que en el norte del estado de Puebla el bosque de pino tiene gran importancia para la generación de bienes y servicios, los cuales son valiosos para la sociedad a nivel ecológico, económico y social. Para población del norte del estado, el bosque es de gran importancia económica por aprovechar los recursos maderables, ya que la Sierra Norte de Puebla es la zona forestal con mayor aprovechamiento, encontrando a Chignahuapan como el primer productor de madera en rollo (35% del total estatal) [CONAFOR, 2013]. Además, Puebla es uno de los estados de la República Mexicana con mayor aprovechamiento forestal debido a su gran extensión superficial maderable [INEGI, 2011]. La superficie forestal es aprovechada en su mayoría por ejidos, quienes a partir de su organización y capacitación siguen planes de manejo forestal [Salinas *et al.*, 2017]. Por otra parte, se manifestó que la obtención de servicios forestales como el agua y el oxígeno es importante en la Sierra Norte de Puebla. Los bosques juegan un papel crucial en el ciclo del agua, ya que favorecen a los procesos de recarga de las fuentes de este líquido

vital, ocupado principalmente para el consumo humano y animal, y el riego de los cultivos [CONAFOR, 2020]. Igualmente, es necesario el manejo de estos ecosistemas ya que a través del proceso químico de la fotosíntesis aportan una tercera parte del oxígeno necesario para la vida en el planeta, colaborando también a la mitigación del cambio climático [FAO, 2018]. Sin embargo, en los últimos cinco años los actores clave han observado la degradación y pérdida de la biomasa del bosque debida a múltiples causas, dentro de las que encontramos como de mayor relevancia a las enfermedades forestales causadas por hongos asociados a la defoliación. Además, estos actores manifiestan que la principal alternativa a la presencia de agentes patógenos es el uso de químicos de amplio espectro, lo cual tiene efectos negativos en el ambiente. A pesar de ello, la concientización de la importancia que tiene el bosque y sabiendo los efectos contaminantes y negativos a la salud que tiene el uso de plaguicidas, el uso del control biológico adquiere una gran importancia al colaborar en el manejo forestal sujeto a la presencia de hongos asociados a la defoliación por ser una opción efectiva, de bajo costo, con baja o nula toxicidad y, además, amigable con el ambiente. Relacionando los resultados obtenidos en los ensayos de bioncontrol con el análisis social, se demuestra que la aplicación de esta técnica puede colaborar a la mejora de la salud del bosque de la Sierra Norte de Puebla y conjuntamente a la conservación de un ecosistema con alto valor económico, que también es importante ecológicamente por ser el hábitat de una amplia biodiversidad y, socialmente trascendental al representar una importante fuente de empleo, de obtención de materia prima y de servicios ecosistémicos.

## XI. CONCLUSIONES

La defoliación en *Pinus* spp. presente en la Sierra Norte del Estado de Puebla se asocia a la presencia de diferentes hongos, incluidos patógenos fúngicos de distribución cosmopólita. Se identificaron nueve hongos mayormente relacionados a la defoliación de *P. patula*, *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*, como: *A. flavus*, *C. globosum*, *C. rosea*, *C. disseminatus*, *C. coatesiae*, *H. texense*, *M. rubricosum*, *P. formosus* y *S. fimicola*. Además, los hongos *C. coatesiae*, *M. rubricosum* y *C. rosea* son patógenos en común que perjudican a las tres especies de pino. Las pruebas de patogenicidad de estos tres hongos relacionados, bajo condiciones de laboratorio e invernadero, confirman que los organismos fúngicos pueden dañar a las tres especies de pino en diferente proporción, al provocar afectación al tejido de las acículas de los pinos en condiciones de humedad y lesiones en las hojas; así como defoliación de las plantas bajo condiciones de invernadero y su muerte en casos graves.

La obtención de bacterias endémicas del bosque de pino de la Sierra Norte de Puebla y su caracterización, nos permitió seleccionar seis cepas de las especies *B. mycooides* (2), *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. simplex* y *P. simplex* para realizar ensayos de control biológico *in vitro* e *in vivo*. Estos ensayos de biocontrol demuestran que las cepas aisladas de suelo forestal tienen la capacidad de limitar el desarrollo fúngico bajo condiciones controladas, al inhibir el crecimiento micelial en placa y colaborar en la disminución de la presencia de la enfermedad en plantas de invernadero al reducir el número de lesiones en las acículas, así como la superficie foliar dañada por los patógenos.

Asimismo, se observó que las cepas con capacidad antagónica *B. simplex*, *B. thuringiensis* y *P. simplex* son compatibles y no producen hemólisis en agar gelosa sangre, por lo cual se utilizaron para realizar ensayos de control biológico *in situ* en un predio forestal en Chignahuapan, Puebla. Ensayo que evidenció que el control biológico de hongos con bacterias propias del bosque favorece la sanidad de los árboles de pino, ya que disminuye la incidencia de lesiones y el índice de severidad de la enfermedad, respecto al tratamiento químico; lo que se demuestra, que el uso de esta técnica representa una alternativa al tratamiento con fungicidas en plantas de pino de sistemas naturales en la Sierra Norte de Puebla.

En el ámbito social, se encontró que los actores de mayor injerencia en la producción de pino en la Sierra Norte del Estado de Puebla son el personal que labora en los viveros forestales, los

propietarios de los predios forestales de la región y el personal de la CONAFOR. Para estos actores clave, es importante preservar el bosque de pino de la Sierra Norte de Puebla por los bienes y servicios que brinda al ecosistema, la necesidad de conservar su biodiversidad y los beneficios económicos que se obtienen a partir de la explotación de sus recursos. Igualmente, son conscientes de la degradación del bosque debido a diferentes causas entre las que se encuentran las plagas y enfermedades. Además, consideran que la aplicación de tratamientos biológicos es una opción adecuada para el combate de enfermedades en el bosque por ser una opción efectiva, económica y amigable con el ambiente. Por lo tanto, el uso del control biológico en el manejo de sistemas forestales es una alternativa aceptada por la sociedad, que puede colaborar a la conservación del bosque de pino de la Sierra Norte de Puebla y beneficiar a la salud de un ecosistema que posee un alto valor ambiental por los beneficios que aporta a la biodiversidad y a la sociedad.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

Adang MJ, Crickmore N, Jurat-Fuentes JL. 2014. Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action In: Dhadialla TS, Gill SS, editors. *Advances in insect physiology*. Oxford: Academic Press; p. 39–87.

Adusei-Fosu K and Rolando CA. 2018. Chemical control -review of control methods and fungicides. Ministry for Primary Industries Biosecurity. New Zealand Technical Paper No. 2019/24. Wellington, New Zealand. 31p. [http:// www.mpi.govt.nz/news-and-resources/publications/](http://www.mpi.govt.nz/news-and-resources/publications/)

Aguado-Santacruz, Gerardo A., Moreno-Gómez, Blanca, Jiménez-Francisco, Betzaida, García-Moya, Edmundo, & Preciado-Ortiz, Ricardo E. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosidéforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista fitotecnia mexicana*, 35(1), 9-21.

Al-Sman, K. M., Abo-Elyousr, K., Eraky, A., & El-Zawahry, A. (2019). Potential activities of *Bacillus simplex* as a biocontrol agent against root rot of *Nigella sativa* caused by *Fusarium camptoceras*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29(1). <https://doi.bibliotecabuap.elogim.com/10.1186/s41938-019-0191-z>

Alenezi FN, Fraser S, Bełka M, Doğmuş TH, Heckova Z, Oskay F, Belbahri L, and Woodward S. 2016. Biological control of *Dothistroma* needle blight on pine with *Aneurinibacillus migulanus*. *Forest Pathology* 46:555–558. <https://doi.org/10.1111/efp.12237>

Almeida, M. A., Thomaz S. V., Soccol C. (2016). *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review, *Critical Reviews in Biotechnology*, 36:2, 317-326, DOI: [10.3109/07388551.2014.960793](https://doi.org/10.3109/07388551.2014.960793)

Alvarado, L. y García, M. (2008). Características más relevantes del paradigma socio-crítico: su aplicación en investigaciones de educación ambiental y de enseñanza de las ciencias realizadas en el Doctorado de Educación del Instituto Pedagógico de Caracas. *Sapiens. Revista Universitaria de Investigación*, año 9, no.2.

Álvarez, C., Osorio, N., Marín, M. (2013). Molecular Identification of Microorganisms Associated to the Rhizosphere of Vanilla Plants in Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, vol. 18, núm. 2, pp. 293-305

Angelsen, A., Jagger, P., Babigumira, R., Belcher, B., Hogarth, N.J., Bauch, S., Börner, J., Smith-Hall, C. y Wunder, S. (2014). Environmental income and rural livelihoods: a global-comparative analysis. *World Development*, 64: S12–S28.

Antúnez, V.I., Ferrer, M. (2016). El Enfoque de cadenas productivas y la planificación estratégica como herramientas para el desarrollo sostenible en Cuba RIPS. *Revista de Investigaciones Políticas y Sociológicas*, vol. 15, núm. 2, 2016, pp. 99- 130

Apaza, R., Moreno, S. (2008). Reciprocidad, asociatividad y cooperación. Programa Modular: Emprendimientos para pueblos indígenas. Organización Internacional del Trabajo – Centro Internacional de Formación, 2008 Primera Edición 2008 ISBN 978-92-9049-466-9

Arango-Velez, A., El Kayal, W., Copeland, C., Zaharia, L., Lusebrink, I., Cooke, J. Differences in defence responses of *Pinus contorta* and *Pinus banksiana* to the mountain pine beetle fungal associate *Grosmannia clavigera* are affected by water deficit. *Plant, Cell & Environment* (2016) 39, 726–744. doi: 10.1111/pce.12615

Ávalos A. y Pérez E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145, 2009 ISSN: 1989-3620.

Bairwa, A., Dipta, B., Mhatre, P. H., Venkatasalam, E. P., Sharma, S., Tiwari, R., Singh, B., Thakur, D., Naga, K. C., Maharana, C., & Sharma, A. K. (2023). *Chaetomium globosum* KPC3: An Antagonistic Fungus Against the Potato Cyst Nematode, *Globodera rostochiensis*. *Current Microbiology*, 80(4), 125. <https://doi.bibliotecabuap.elogim.com/10.1007/s00284-023-03228-w>

Baker, K.I. y Cook, R.J. (1974). *Biological Control of Plant Pathogens*. W.H. Freeman and Company (San Francisco). 433

Balvanera, P. (2012). Los servicios ecosistémicos que ofrecen los bosques tropicales. *Ecosistemas* 21(1-2):136-147.

Bargabus, R.L., Zidack, N.K., Sherwood, J.E., Jacobsen, B.J. (2002). Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. Volume 61, Issue 5, Pages 289-298

Bautista, D., Corrales Ramírez MSC, L. C., Cuervo Andrade PhD, J. L., González, L., Guevara, M., & Sánchez Leal MSC, L. C. (2010). Evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* spp., bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis* L. *Nova*, 8(13), 63–75. <https://doi.org/10.22490/24629448.440>

Bear, R., Rintoul, D. (2014). Community ecology. Op enStax-CNX module: m4688. Last edited by Robert Bear on Jan 10, 1:55 pm -0600.

Begon, M., Harper, J. L. y Towsend, C. R. (1999). *Ecología*. Editorial Omega. 3ª Edición.

Benítez, H. y Bellot, M. (2007). BIODIVERSIDAD: USO, AMENAZAS Y CONSERVACIÓN. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (Conabio). Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. [http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/395/benitez\\_bellot.html](http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/395/benitez_bellot.html)

Bhattacharyya, P.N., & Jha, D.K. (2012). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28(4):1327-1350.

Blodgett, J., Eyles, A., Bonello, P. (2007). Organ-dependent induction of systemic resistance and systemic susceptibility in *Pinus nigra* inoculated with *Sphaeropsis sapinea* and *Diplodia scrobiculata*. *Tree Physiology* 27, 511-517

Bonello, P., Blodgett, J. (2004). *Pinus nigra*–*Sphaeropsis sapinea* as a model pathosystem to investigate local and systemic effects of fungal infection of pines. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 63 (2003) 249–261

Bottone E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* Apr 2010, 23 (2) 382-398; DOI: 10.1128/CMR.00073-09.

Bravo, A., Likitvivanavong S., Gill, S., Soberón, M. (2011). Insect Biochemistry and Molecular Biology. Volume 41, Issue 7, July 2011, Pages 423-431

Bravo N, Grimalt JO, Mazej D, Tratnik JS, Sarigiannis DA, and Horvat M. 2020. Mother/child organophosphate and pyrethroid distributions. *Environment International* 134:105264. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105264>

Bush, L.M., (2019). Introducción a las bacterias grampositivas. Manual MSD. Charles E. Schmidt College of Medicine, Florida Atlantic University.

Calvo, P., Zuñiga, D. (2010). CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE CEPAS de *Bacillus* spp. AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DE PAPA (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*, 9(1), 2010

Campo, J., García, F., Navarrete, A. y Siebe, C. (2016). Almacenes y dinámica del carbono orgánico en ecosistemas forestales tropicales de México. *Terra Latinoamericana* 34: 31-38.

Campos-Rivero, G., Sánchez-Teyer, L.F., De la Cruz-Arguijo, E.A., Ramírez-González, M.S., Larralde-Corona, C.P., Narváez-Zapata, J.A. (2019). Bioprospecting for fungi with potential pathogenic activity on leaves of *Agave tequilana* Weber var. Azul. *Journal of Phytopathology*. 2019; 167:283–294. DOI: 10.1111/jph.12797

Campuzano, F., Urquijo, T., Valderrama, J., (2017). Evaluación de la actividad celulolítica y quitinolítica de hongos filamentosos aislados de rizósfera de cultivos de papa para control de *rhizoctonia solani*. *NOVA*. 2017; 15 (28): 45-55

Cancino & Rodríguez (2009). *Revista Iberoamericana de Economía Ecológica* Vol. 10: 1-13

Cano, M.A., (2011). A REVIEW OF INTERACTION OF BENEFICIAL MICROORGANISMS IN PLANTS: Mycorrhizae, *Trichoderma* spp. and *Pseudomonas* spp. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 14 (2): 15 – 31

Cantón, R., Ruiz-Garbajosa, P. (2013). Infecciones causadas por bacterias grampositivas multirresistentes (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* spp.). Vol. 31. Núm. 8. Páginas 543-551 DOI: 10.1016/j.eimc.2013.08.001

Cañedo V., Ames, T. (2004). Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima, Perú; Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, 62 p. <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>

Capieau, K., Stenlid, J., y Stenström E. (2004). Potential for Biological Control of *Botrytis cinerea* in *Pinus sylvestris* Seedlings. *Scandinavian Journal of Forest Research*. 19:4, 312-319. DOI: [10.1080/02827580310019293](https://doi.org/10.1080/02827580310019293)

Carballo M. (2002). Manejo de insectos mediante parasitoides. *Manejo integrado de plagas y agroecología* (Costa Rica). 66: 118-122.

Carranza, Y., Morales, J. L., Pedraza, M. E., Chávez, A. T., Morales, K. L. (2015). Aislamiento, identificación y patogenicidad de hongos asociados a la tristeza del aguacatero en Michoacán, México. Unidad de Investigaciones Avanzadas en Agrobiotecnología, Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, U.M.S.N.H., Uruapan, Michoacán, México. Actas del congreso internacional de la palta 2015. Lima, Perú.2015.

Castro, Rocío, Álvarez, Adriana, Machado, Elwi, Mendoza, Mónica, Gómez, Rubén, & García, Pablo. (2011). Caracterización de una quitinasa extracelular producida por *Serratia* sp. BIOMI-363706 usando quitina coloidal como sustrato. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 77(2), 101-108.

Chen, L., Bóka, B., Kedves, O., Nagy, V.D., Szucs, A., Champramary, S., Roszik, R., Patocskai, R., Münsterkötter, M., Huynh, T., Indic, B., Vágvölgyi, C., Sipos, G. y Kredics, L. (2019). Towards the Biological Control of Devastating Forest Pathogens from the Genus *Armillaria*. *Forests* 2019, 10, 1013; doi:10.3390/f10111013

Chen, Y., Chen, Y. Difference in toxicity of Pd (II) and mechanism of action before and after reduction by *Bacillus wiedmannii* MSM. *Environ Sci Pollut Res* **29**, 1824–1835 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15736-y>

Choi HK, Song GC, Yi HS, Ryu CM. (2014). Field Evaluation of the Bacterial volatile derivative 3-Pentanol in priming for induced resistance in Pepper. *Journal of Chemical Ecology*. 40(8):882-92.

Cid, FD., Antón, R. y Caviedes-Vidal, E. (2007). Organochlorine pesticide contamination in three bird species of the Embalse La Florida water reservoir in the semiarid midwest of Argentina. *Science of the Total Environment*. 385(1-3): p. 86-96.

Cillóniz, F., Grozo, J., Riva, L., Guzmán, A. (2003). Cadenas Productivas y Desarrollo Empresarial. Banco Interamericano de Desarrollo. Documento de Trabajo. Foro Nacional sobre Competitividad.

Codato, D. (2015). Estudio de la percepción social del territorio y de los servicios ecosistémicos en el Alto Mayo, Región San Martín, Perú. *Espacio y Desarrollo* N° 27, 2015, pp. 7-31 (ISSN 1016-9148).

Comisión europea. (UE). (2006). La política comunitaria para un uso sostenible de los plaguicidas. Origen de la estrategia. Luxemburgo: Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas.

Comisión Nacional Forestal. (2003). Estudio de tendencias y perspectivas del sector forestal en América Latina al año 2020. Informe Nacional, México. CONAFOR.

Comisión Nacional Forestal. (2011). Estudio Regional Forestal de la Unidad de Manejo Forestal Teziutlán, Puebla. SEMARNAT-CONAFOR, México.

Comisión Nacional Forestal. (2013). Anteproyecto para el estudio de la cuenca de abasto Chignahuapan-Zacatlán. Zapopan: CONAFOR.

Comisión Nacional Forestal. (2015). Enfermedad de caída Foliar de los pinos. Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales. CONAFOR. Desplegable. Zapopan, Jalisco, México.

Comisión Nacional Forestal. (2018). Inventario Nacional Forestal 2009-2014. SEMARNAT México

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. CONABIO. (2006). Capital natural y bienestar social. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.

Consejo Civil para la Silvicultura Sostenible. CCMSS. (2016). Nota informativa 46, Plagas y enfermedades forestales en México: urgen políticas públicas para fomentar la acción de los dueños y habitantes de bosques y selvas. Sanidad forestal.

Corrales, L.C., Sánchez, L.G., Cuervo, J., Bautista, D., González, L., Guevara, M. (2011). Evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* spp., bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis* L. Nova, ciencias biomédicas. issn:1794-2470.

Corrales, L.C., Caycedo, L., Gómez, M.A., Ramos, S.J., Rodríguez, J.N. (2016). *Bacillus* spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. NOVA. 2017; 15 (27): 45-65

Crissman, C. (2002). Los Plaguicidas. Impactos en producción, salud y medio ambiente en Carchi, Ecuador. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Abya-Yala. 197.

Del Puerto, A. M., Suárez, S. y Palacio, D. E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 372-387.

Deras, JE. (2003). Análisis de la cadena productiva del bambú en Costa Rica. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 135.

Diario Oficial de la Federación. (1996). Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-70-FITO-1995. Última Reforma DOF 25-04-1996. Cámara de Diputados de H. Congreso de la Unión.

Diario Oficial de la Federación. (1996). Norma Oficial Mexicana NOM-052-FITO- 1995. Última Reforma DOF 11-08-2015. Cámara de Diputados de H. Congreso de la Unión.

Diario Oficial de la Federación. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-232-SSA1-2009. Última Reforma DOF 18-12-2018. Cámara de Diputados de H. Congreso de la Unión.

Diario Oficial de la Federación. (2014). DECRETO por el que se reforman, adicionan y derogan diversas disposiciones del Reglamento en Materia de Registros, Autorizaciones de Importación y Exportación y Certificados de Exportación de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y Sustancias y Materiales Tóxicos o Peligrosos. Última Reforma DOF 13-02-2014. Cámara de Diputados de H. Congreso de la Unión.

Diario Oficial de la Federación. (2019). Registro Sanitario de Plaguicidas y Nutrientes Vegetales. Última Reforma DOF 23-09-2019. Cámara de Diputados de H. Congreso de la Unión.

Diario Oficial de la Federación. (2020). Ley General de Desarrollo Forestal Sustentable. Última Reforma DOF 13-04-2020. Cámara de Diputados de H. Congreso de la Unión.

Diccionario de Especialidades Agroquímicas (DEAQ). (2018). ISBN: 978-607-625-052-5 Vigésimo octava edición. PLM, México. Royce Editores. Emilio R. Ster 1993.

Douglas, W. y Jean, B. (2016). "Predation in Communities". CK-12 Foundation. <http://www.ck12.org/book/CK-12-Biology-Advanced-Concepts/section/18.22/>.

Droby S, Wisniewski M, Macarisin D and Wilson C. (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology* 52:137-145.

Ezziyyani, M., Pérez Sánchez, C., Requena, M.E., Ahmed, A.S., & Candela, M.E. (2004a). Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *Anales de Biología*. 26: 61-68.

Ezziyyani, M., Pérez C., Ahmed S., Requena, M.E., Candela, M.E. (2004b). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología* 26: 35-45.

Fait, A., Iversen, B., Tiramani, M., Visenti, S. y Marioni, M. (2004). Prevención de los riesgos para la salud derivados del uso de plaguicidas en la agricultura. Organización Mundial de la Salud. Serie protección de la salud de los trabajadores no. 1. ISBN 92 4 359099 5

Fallahzadeh-Mamaghani, V., Shahbazi-Ezmareh, R., Shirzad, A., Moslehi, S. (2023). Possible mechanisms of action of *Bacillus wiedmannii* AzBw1, a biocontrol agent of the root-knot nematode, *Meloidogyne arenaria*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* (2023) 33:28 <https://doi.org/10.1186/s41938-023-00668-1>

Francely, C. (2016). Influencia de *Azospirillum* sobre el contenido de nitratos en la solución del suelo y en hojas de maíz elotero. Tesis. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Gallego-Roper, M., & Armbrrecht, I. (2005). Depredación por hormigas sobre la broca del café *Hypothenemus hampei* (Curculionidae: Scolytinae) en cafetales cultivados bajo dos niveles de sombra en Colombia. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, (76), 32-40.

Gao, Y., Peng, S., Hang, Y., Xie, G., Ji, N., Zhang, M. (2022). Mycorrhizal fungus *Coprinellus disseminatus* influences seed germination of the terrestrial orchid *Cremastra appendiculata* (D.

Don) Makino. Scientia Horticulturae. Volume 293. ISSN 0304-4238.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110724>.

García, R. (2006). Sistemas complejos. Conceptos, método y fundamentación epistemológica de la investigación interdisciplinaria. Barcelona, España: Gedisa.

Gardi, C., Angelini, M., Barceló, S., Comerma, J., Cruz-Gaistardo, C., Encina-Rojas, A., Jones, A., Krasilnikov, P., Mendonça-Santos-Brefin, M. L., Montanarella, L., Muñiz-Ugarte, O., Schad, P., Vara-Rodríguez, M. I., & Vargas, R. (2014). Atlas de suelos de América Latina y el Caribe. In L-2995. Comision Europea - Oficina de Publicaciones de la Unión Europea. <https://doi.org/10.1111/rda.12542>

Gepp V, Vero S, Cassanello ME, Romero G, Silvera E, González P, Rebellato J, Ferreira Y, Bentancur O. 2012. Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en el Uruguay. *Agrociencia Uruguay* 16:97–107. [http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2301-15482012000100012](http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2301-15482012000100012)

Ghazal, M.F., Moussa, L.A., Fayed, S.A., Mostfa, A.A., (2013). The use of *bacillus mycoides* and *bacillus subtilis* as biocontrol agents for the fungi causing root rot disease in common bean. *Egypt. J. Biotechnol.* Vol. 44.

Gielser, J., Gustafson, C., Jackson, A., Harveson, M., y Wegulo, N. (2008). Safe Use Of Foliar Fungicides to Manage Crop Diseases. University of Nebraska-Lincoln Extension, Institute of Agriculture and Natural Resources.

Gordon, T.R.; Kirkpatrick, S.C.; Aegerter, B.J.; Wood, D.L.; Storer, A.J. Susceptibility of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) to pitch canker, caused by *Gibberella circinata* (anamorph = *Fusarium circinatum*). *Plant Pathol.* 2006, 55, 231–237.

Gottret y Cordoba. (2006). Gobernabilidad y Articulación de Productores de Pequeña Escala a Cadenas Productivas. Marco Analítico y Metodología para la Realización de Estudios de Caso. Proyecto de Desarrollo Empresarial Rural. CIAT.

Govin, S.A., Leal, S.G., López, H.D. (2019). Actividad antagónica de bacterias endófitas de *Leucocroton havanensis* Borhidi frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, Vol. 34, No. 2, mayo-agosto 2019, E-ISSN: 2224-4697.

Green, DG y S. Sadedin. 2005 .Las interacciones importan: complejidad en paisajes y ecosistemas. *Complejidad Ecológica* 2:117 – 130

Guédez C, Castillo C, Cañizales L y Olivar R. 2008. “Control biológico” una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. *Academia* 7(13): 50-74. <http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/academia/article/view/6030>

Guerrero, V. M., Pérez, B. Ana Cristina, López G., Tamayo, C., Corral M, Berlanga F.J., Carvajal, D. Millán, E., Quezada, A., Dolores, G. (2011). Competencia por Nutrientes; Modo de Acción de *Candida oleophila* Contra *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*. *Revista mexicana de fitopatología*, 29(2), 90-97.

Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., Fischer, E., Dinooor, A., (2007). Improving Biological Control by Combining Biocontrol Agents Each with Several Mechanisms of Disease Suppression. The American Phytopathological Society. *Biological Control*. Vol. 92, No. 9.

Gunderson, LH y CS Holling, editores. 2002. *Panarquía: comprensión de las transformaciones en los sistemas humanos y naturales*. Island Press, Washington, DC, Estados Unidos.

Guo S, Li X, He P, Ho H, Wu Y, He Y. (2015). Whole-genome sequencing of *Bacillus subtilis* XF-1 reveals mechanisms for biological control and multiple beneficial properties in plants. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*.

Gutiérrez-Flores, L.M., López-Reyes, L., Mauricio-Gutiérrez, A., Carcaño-Montiel, M.G., Avelino-Flores, F., Torres-Trejo, E., Peña-Moreno, R.D., (2018). Diagnóstico de la enfermedad fúngica de *Pinus patula* y propuesta de biocontrol en Tetela de Ocampo, Puebla. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias Ambientales. Instituto de Ciencias. Universidad Autónoma de Puebla.

Gutiérrez-Flores, L.M., López-Reyes, L., Hipólito-Romero, E., Torres-Ramírez, E., Castañeda-Roldán, E.I., Mauricio-Gutiérrez, A. (2021). El Control Biológico, una alternativa al uso de plaguicidas en bosques de pino. *Revista Mexicana de Fitopatología*. (enviado).

Hael-Conrad, V., Perato, S. A., Arias, M. E., Martínez-Zamora, M. G., Di Peto, P., Martos, G. G., Castagnaro, A. P., Díaz-Ricci, J.C., Chalfoun, N. R. (2018). The Elicitor Protein AsES Induces a Systemic Acquired Resistance Responce Accompanied by Systemic Microburts and Micro-

Hypersensitive Responses in *Fragaria ananassa*. MPMI Vol. 31, No. 1, 2018, pp. 46-60.  
<https://doi.org/10.1094/MPMI-0517-0121-FI>

Haggag W. (2008). Isolation of bioactive antibiotic peptides from *Bacillus brevis* and *Bacillus polymyxa* against *Botrytis grey* mould in strawberry. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 41(7): 477 – 491

Heidt, J., Papaloukas, N., Timmerman, C.P. (2019). A rare bloodstream infection: *Bacillus mycoides*. The Netherlands Journal of Medicine. Vol. 77, No. 06

Hegetschweiler, K.T., Plum, C., Fischer, C., Brändli, U.B., Ginzler, C. y Hunziker, M. (2017). Towards a comprehensive social and natural scientific forest-recreation monitoring instrument – A prototypical approach. Landscape and Urban Planning, 167: 84–97.

Heinrichs, H., Wiek, A., Martens, P., Michelsen, G. (2016). Sustainability Science. Springer. DOI 10.1007/978-94-017-7242-6\_1

Hernández, A. N., Bautista, S., Velázquez, M. G. y Hernández, A. (2007). Uso de Microorganismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos. *Revista mexicana de fitopatología*, 25(1), 66-74.  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S018533092007000100009&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018533092007000100009&lng=es&tlng=es)

Hernandez-Díaz, Jose. (2017). LA SILVICULTURA EN MÉXICO, EN EL CONTEXTO DE LA CADENA PRODUCTIVA FORESTAL. Material de apoyo para la conferencia del mismo nombre, presentada en el marco de la XLII sesión anual ordinaria de la asamblea general de la academia nacional de ciencias forestales, el 25 de agosto de 2017, Ciudad de México.

Heydari A, and Pessarakli M. 2010. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. Journal of Biological Sciences 10:273–290.  
<https://doi.org/10.3923/jbs.2010.273.290>

Hinke, N. (2006). Fragmentos de una historia del Instituto Médico Nacional. *Ciencias* 83, julio-septiembre, 56-67.

Huang, C.-J., Wang, T.-K., Chung, S.-C., & Chen, C.-Y. (2005). Identification of an Antifungal Chitinase from a Potential Biocontrol Agent, *Bacillus cereus* 28-9. *BMB Reports*, 38(1), 82–88. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2005.38.1.082>

Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal (INAFED). (2010). Los Municipios del Estado de Puebla. Enciclopedia de los Municipios de México. <http://siglo.inafed.gob.mx/enciclopedia/EMM21puebla/index.html>

Infante, D., Martínez, B., González, N. y Reyes, Y. (2009). MECANISMOS DE ACCIÓN DE *Trichoderma* FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14-21. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522009000100002&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002&lng=es&tlng=es).

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (2010). Compendio de información geográfica municipal 2010 Puebla. [https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos\\_geograficos/21/21114.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/21/21114.pdf)

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (2011). Anuario estadístico del estado de Puebla 2011, resultados definitivos. Tabulados básicos, México. INEGI.

Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. (2007). México y el cambio climático capítulo III Contexto Nacional. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/32/cap3.html>

Iturrutxa, E., Trask, T., Mesanza, N., Raposo, R., Elvira-Recuenco, M. y Patten C.L. (2017). Biocontrol of *Fusarium circinatum* Infection of Young *Pinus radiata* Trees. *Forests* 2017, 8, 32; doi:10.3390/f8020032

Ivanová, H., Hamarová, H., Pristaš, P. (2017). *Clonostachys rosea* associated with ponderosa and Coulter pine needles in Slovakia. *Biologia* 72/11: 1258—1263 Section Botany DOI: 10.1515/biolog-2017-0145

Shaffi, J., Tian, H., Ji, M. (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31:3, 446-459, DOI: 10.1080/13102818.2017.1286950

Jaklitsch, W.M., Fournier, J., Dai, D.Q., Hyde, K.D., Voglmayr, H. (2015). *Valsaria* and the *Valsariales*. Fungal Diversity. 73. 10.1007/s13225-015-0330-0.

Jardel, E.J. (2006). Viejos y nuevos problemas en el sector forestal en México. Instituto Manantlán de Ecología y Conservación de la Biodiversidad Centro Universitario de la Costa Sur Universidad de Guadalajara. p. 1-12.

Jeamjitt, O., Manoch, L., Visarathanonth, N., Chamswarng, C., Pikulklin, S. (2007). Coprophilous fungi and antagonistic effect of *Sordaria fimicola* against plant pathogenic fungi *in vitro*. Proceedings of the 45th Kasetsart University Annual Conference, Bangkok, Thailand, 30 January-2 February 2007. Subject: Plants 2007 pp.593-600 ISBN : 9789745379961

Jiménez, J. y Alanís, E. (2011). Análisis de la frecuencia de los incendios forestales en la Sierra Madre Oriental y Occidental del norte de México y sur de Estados Unidos de América. Ciencia UANL, 14 (3), 255-263.

Kalyoncu, L., Agca, I y Aktumsek, A. (2009). Some organochlorine pesticide residues in fish species in Konya, Turkey. Chemosphere. 74(7): p. 885-889.

Kang, X., Guo, Y., Leng, S., Xiao, L., Wang, L., Xue, Y., Liu, C. (2019). Comparative Transcriptome Profiling of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in Wheat Roots in the Absence and Presence of Biocontrol *Bacillus velezensis* CC09. Front. Microbiol. 10:1474. doi: 10.3389/fmicb.2019.01474

Ken S, Sasaki N, Entani T, Ma HO, Thuch P, and Tsusaka TW. 2020. Assessment of the local perceptions on the drivers of deforestation and forest degradation, agents of drivers, and appropriate activities in Cambodia. Sustainability 12:9987. <https://doi.org/10.3390/su12239987>

Kokalis-Burelle, N., Backman, P.A., Rodríguez-Kábana, R., Ploper L.D. (1992). Potential for biological control of early leafspot of peanut using *Bacillus cereus* and chitin as foliar amendments. Biological Control. Volume 2, Issue 4, Pages 321-328

Kornberg, H. (2020). Metabolism. Encyclopædia Britannica. <https://www.britannica.com/science/metabolism>

Kotiranta, A., Lounatmaa, K., Haapasalo, M. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection*. Volume 2, Issue 2, Pages 189-198.

Kumar, P., Dubey, R.C., Maheshwari, D.K. (2012). *Las cepas de Bacillus aisladas de la rizosfera mostraron actividad promotora y antagonista del crecimiento de las plantas contra los fitopatógenos*. *Investigación microbiológica*. Volumen 167, Número 8, páginas 493-499.

Kurniawan, A., Chuang, H. (2021). Rhizobacterial *Bacillus mycoides* functions in stimulating the antioxidant defence system and multiple phytohormone signalling pathways to regulate plant growth and stress tolerance. *Journal of Applied Microbiology*. 2022;132:1260–1274.

Landis, T.D. 1989. Disease and Pest Management. In: Landis, T.D.; Tinus, R. W.; McDonald, S. E.; Barnett, J. P. *The Container Tree Nursery Manual*, Volume 5. Agric. Handbk. 674. Washington, D. C.: U.S. Department Of Agriculture, Forest Service: 1- 99.

Kusam Lata Rana, Divjot Kour, Tanvir Kaur, Rubee Devi, Chandranandani Negi, Ajar Nath Yadav, Neelam Yadav, Karan Singh, Anil Kumar Saxena,

Lata, R.K., Kour, D., Kaur, T., Devi, R., Negi, C., Yadav, A.N., Yadav, N., Singh, K., Kumar A. (2020). Endophytic fungi from medicinal plants: biodiversity and biotechnological applications. *Microbial Endophytes*. Woodhead Publishing. Pages 273-305, ISBN 9780128196540. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819654-0.00011-9>.

Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Corrales, L.C., Sánchez, L.C. (2011). *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *Revista NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 9:177-187. <http://dx.doi.org/10.22490/24629448.501>

Lazarte, N. J., Lopez, R.P., Ghiringhelli, P.D., Beron, C.M. (2018). *Bacillus wiedmannii* biovar *thuringiensis*: A Specialized Mosquitocidal Pathogen with Plasmids from Diverse Origins. *Genome Biol. Evol.* 10(10):2823–2833. doi:10.1093/gbe/evy211

Lazzarini, SG; Chaddad, FR; Cook, ML. (2001). Integrating supply chain and network analyses: the study of netchains. *Journal Chain and Network Science* 1(1): 7-17.

Leautaud, P. y López, J. (2017). Detección de árboles dañados por plaga en bosques de *Abies religiosa* en la Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca, mediante fotografías aéreas infrarroja. *Investigaciones geográficas*. p. 92

Li, Y., Gu, Y., Li, J., Xu, M., Wei, Q. Wang, Y. (2015). Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew. *Frontiers Microbiology*. 6:883. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00883>

Liu, D., Cai, J., Xiea, C., Liu C., Chen, Y. (2010). Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri*, and its biocontrol potential. *Enzyme and Microbial Technology* 46 (2010) 252–256

Liu, J.X., Cai, Y.N., Jiang, W.Y., Li, Y.G., Zhang, Q.F., Pan, H.Y. (2020). Population Structure and Genetic Diversity of Fungi Causing Rice Seedling Blight in Northeast China Based on Microsatellite Markers. *Plant Disease* 2020 104:3, 868-874

Liu X, Cao A, Yan D, Ouyang C, Wang Q, and Li Y. 2021. Overview of mechanisms and uses of biopesticides. *International Journal of Pest Management* 67:65–72. <https://doi.org/10.1080/09670874.2019.1664789>

Llorente, J. y Ocegueda, S. (2008). Estado del conocimiento de la biota, en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 283-322.

López, J.A., Aguirre, O. A., Alanís, E., Monárrez, J. C., González, M. A. y Jiménez, J. (2017). Composición y diversidad de especies forestales en bosques templados de Puebla, México. *Madera y Bosques*, 23(1), 39-51. doi:10.21829/myb.2017.2311518.

López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C.A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad*. Vol. 3, Núm. 1 pp 10-18

Lundy, M., Gottret, M.V., Cifuentes, W., Ostertag, C.F., Best, R. (2004). Diseño de estrategias para aumentar la competitividad de cadenas productivas con productores de pequeña escala. *Manual de campo. Proyecto de desarrollo de agroempresas rurales*. CIAT.

- Maciel, C. G., Walker, C., Muniz, M. F., Araújo, M. M. (2014). Antagonismo de *Trichoderma* SPP. E *Bacillus subtilis* (UFV3918) a *Fusarium sambucinum* em *Pinus elliottii* engelm. *Revista Árvore*, 38(3), 505-512. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622014000300013>
- Majumdar, R., Lebar, M., Mack, B., Minocha, R., Minocha, S., Carter-Wientjes, C., Sickler, C., Rajasekaran, K., Cary, J.W. (2018). The *Aspergillus flavus* Spermidine Synthase (spds) Gene, Is Required for Normal Development, Aflatoxin Production, and Pathogenesis During Infection of Maize Kernels. *Front. Plant Sci.* 9:317. doi: 10.3389/fpls.2018.00317
- Marcello, C.M., Steindorff, A.S., Silva, S.P., Silva, R.N., Bataus, L.A.M, Ulhoa, C.J. (2010). Expression analysis of the exo- $\beta$ -1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. *Microbiological Research* 165: 75-81
- Marin-Felix, Y., Hernández-Restrepo, M. & Crous, P.W. Multi-locus phylogeny of the genus *Curvularia* and description of ten new species. *Mycol Progress* 19, 559–588 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11557-020-01576-6>
- Márquez, R., Blanco, E.L., & Aranguren, Y. (2020). *Bacillus* strain selection with plant growth-promoting mechanisms as potential elicitors of systemic resistance to gray mold in pepper plants. *Saudi Journal of Biological Sciences.* 27: 1913–1922.
- Marschner, P., Timonen, S. (2005). Interactions between plant species and mycorrhizal colonization on the bacterial community composition in the rhizosphere. *Applied Soil Ecology.* 28:23-36.
- Martínez A. (2014). *Parasitismo: Origen e interés biológico.* Instituto de España. Real academia nacional de farmacia. I.S.B.N.: 9788494229008
- Martínez-Álvarez, P., Fernández-González, R.A., Sanz-Ros, A.V., Pando, V., Diez, J.J. (2015). Two fungal endophytes reduce the severity of pitch canker disease in *Pinus radiata* seedlings. *Biological Control* 94 1-10 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.11.011> 1049-9644/ 2015
- Martínez, B., Infante, D. y Reyes, Y. (2013). *Trichoderma spp.* y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), 1-11. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S101027522013000100001&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101027522013000100001&lng=es&tlng=es).

- Maughan, H., van der Auwera, G. (2011). *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution*. 11:789-797. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.001>
- McGee, D.C. (1988) *Maize Diseases: A reference source for seed technologists*. APS press, Minnesota, USA.
- Melgarejo, P., (2006) *Biofungicidas y control biológico de hongos fitopatógenos: aplicación en la filofera*. *Phytohemeroteca*. Número 182.
- Menéndez Valderrey, J.L. *Coprinellus disseminatus. asturnatura.com* Num. 98, 23/10/2006. ISSN 1887-5068.
- Mesanza, N., Iturritxa, E., Patten, C.L. (2016). Rizobacterias nativas como agentes de biocontrol de *Heterobasidion annosum* ss y la infección por *Armillaria mellea* de *Pinus radiata*. *Control biológico*. Volumen 101, páginas 8-16.
- Mesanza, N., Crawford, B. D., Coulson, T. J. D., Iturritxa, E., & Patten, C. L. (2019). Colonization of *Pinus radiata* D. Don Seedling Roots by Biocontrol Bacteria *Erwinia billingiae* and *Bacillus simplex*. *Forests* (19994907), 10(7), 552. <https://doi.bibliotecabuap.elogim.com/10.3390/f1007055>
- Micheli, J. (2001). *Política ambiental en México y su dimensión regional*. *Región y sociedad* vol.14 no.23 Hermosillo ene./abr. 2002. ISSN 1870-3925
- Milán, O. (2010). Los coccinélidos benéficos en Cuba. *Historia y actividad entomófaga*. *Fitosanidad*, 14(2), 127-135.
- Millennium Ecosystem Assessment. (2005). *Ecosystems and human well-being: current state and trends*. Washington, DC, Island Press
- Moreno, A., García, V., Reyes, J., Vásquez, J., Cano, P. (2018) Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*. Vol. XX No. 1, 68 – 83
- Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., Tenover, R.H. (1999). *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

- Nárdiz, P., De Cal, A. (2006). Biofungicidas y control biológico de hongos fitopatógenos aplicación en la filofera. Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal. ISSN 1131-8988. N° 182. págs. 59-63. <https://www.phytoma.com/larevista/phytohemeroteca/182-octubre-2006/biofungicidas-y-control-biologico-de-hongos-fitopatgenos-aplicacin-en-la-filosfera>
- Navarro-Navarro, Moisés, Robles-Zepeda, Ramón Enrique, Garibay-Escobar, Adriana, & Ruiz-Bustos, Eduardo. (2011). *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* comunitarias y hospitalarias productoras de  $\beta$ -lactamasas en hospitales de Hermosillo, Sonora. Salud Pública de México, 53(4), 341-344.
- Navas-Cortes, J.A., Landa, B.B., (2019). Impacto potencial del cambio climático en enfermedades causadas por hongos y oomicetos. Fitopatología. Sociedad Española de Fitopatología.
- New Jersey Department of Health. (NJDEP). (2005). Information sheet on dangerous substances: Chlorothalonil.
- Novaković, A., Karaman M.A., Kaišarević, S.N., Belović, M.M., Radusin, T.I., Beribaka, M.B., Ilić, N.M. *Coprinellus disseminatus* (Pers.) J.E. Lange 1938: *in vitro* antioxidant and antiproliferative effects, Food and Feed Research, 43 (2), 93-101, 2016
- Oberá, R., Pérez, I., Ferrer, D., Cortés, N., González, Z. (2005). Aislamiento de cepas del género *bacillus* sp. con potencialidades para la bioprotección y la estimulación del crecimiento vegetal. Revista cuaban de química. Vol. XVII, No 1, 2005.
- Okumoto, S. (2001). Actividad de cepas de bacterias quitinolíticas antagonistas a *Alternaria solani* *in vitro*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 59: 58-62.
- Ongena, M., Jacques, P. (2008). *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiolgy. 16:115-125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Orberá R., de los Milagros, T., Díaz, S., de Jesús, M., y González G. (2009). Potencialidades de bacterias aerobias formadoras de endosporas para el biocontrol en plantas ornamentales. *Fitosanidad*, 13(2), 95-100.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2012). El estado de los bosques del mundo. Roma. Licencia: SBN 978-92-5-307292-7

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2011). Situación de los bosques del mundo. Roma. <http://www.fao.org/docrep/013/i2000s/i2000s00.htm>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2018). El estado de los bosques del mundo - Las vías forestales hacia el desarrollo sostenible. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2017). Lucha de la contaminación agrícola de los recursos hídricos. Estudio FAO Riego y drenaje. p. 55.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y Organización Mundial de la Salud. (2019). Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas - Directrices sobre los Plaguicidas Altamente Peligrosos. Roma. 46 pp. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. (2020). El estado de los bosques del mundo 2020. Los bosques, la biodiversidad y las personas. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca8642es>

Orozco-Mosqueda, Ma. del Carmen, Peña-Cabriales, Juan José, Santoyo, Gustavo, Valencia-Cantero, Eduardo, Farías-Rodríguez, Rodolfo. (2010). PAPEL DE LOS SIDERÓFOROS EN LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 HACIA HONGOS FITOPATÓGENOS. *Terra Latinoamericana*, 28(1),53-60.

Ortíz, I., Avila-Chávez, M.A., Torres, L.G. (2014). Plaguicidas en México: usos, riesgos y marco regulatorio. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal* Vol. 5 No. 1 p. 26-46.

Palavecino R., Elizabeth. (2004). *Streptococcus* grupo *anginosus*: ¿Es su identificación clínicamente importante? *Revista chilena de infectología*, 21(3), 261-267. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182004000300021>

Pal, K. K., B. McSpadden Gardener. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.

Parra-Cota1, F. I., de Los Santos-Villalobos S., Lugo-Valdez, M. A., Cruz-Ibarra, R. A., Fuentes-Dávila G., Peinado Fuentes, L. A. (2017). Potencial agrobiotecnológico de bacterias aisladas de suelos agrícolas asociados al cultivo de maíz en el Valle del Fuerte, Sinaloa. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* 13 (2): 51-57, 2017

Programa Nacional Forestal 2020-2024 (2020). Gobierno de la República Mexicana. [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5609275&fecha=31/12/2020#gsc.tab=0](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5609275&fecha=31/12/2020#gsc.tab=0)

Ponce, G., Cantú, P.G., Flores, A., Badii, M., Zapata, R., López, B., Fernández, I. (2006). Modo de acción de los insecticidas. *Revista Salud Pública y Nutrición*. Octubre-Diciembre Vol .7 No. 4 2006.

Portela-Dussán, D.D., Chaparro-Giraldo, A., López-Pazos, S.A. (2013). La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. *Nova*, 11(20), 87-96. Retrieved May 12, 2020, from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-24702013000200010&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702013000200010&lng=en&tlng=es).

Pourmoghaddam, M.J., Lambert, C., Surup, F., Khodaparast, S.A., Krisai-Greilhuber, I., Voglmayr, H., Stadler, M. (2020). Discovery of a new species of the *Hypoxyton rubiginosum* complex from Iran and antagonistic activities of *Hypoxyton* spp. against the Ash Dieback pathogen, *Hymenoscyphus fraxineus*, in dual culture. *MycKeys* 66: 105–133. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.66.50946>

Prasannath, K. (2017). Plant defense-related enzymes against pathogens: A Review. Department of Agricultural Biology, Faculty of Agriculture, Eastern University Sri Lanka, Chenkalady. DOI: <http://doi.org/10.4038/agriest.v11i1.33>

Prieto, J.A., García, J.L., Mejía, J.M., Huchín, S., Aguilar, J.L. (2009). Producción de planta del género *pinus* en vivero en clima templado frío. Publicación especial número 28. INIFAP. ISBN: 978-607-425-133-3-

Quiroz, I., García, E., González, M., Chung, P., Soto, H. (2009). Vivero forestal: producción de plantas nativas a raíz cubierta. Centro tecnológico de la planta forestal. Gobierno de Chile.

Ramírez J.A., Lacasaña M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. 67-75. [http://www.sistemamid.com/panel/uploads/biblioteca/2014-05-01\\_11-59-0899004.pdf](http://www.sistemamid.com/panel/uploads/biblioteca/2014-05-01_11-59-0899004.pdf)

Red de acción en plaguicidas y sus alternativas en América latina. (RAPAL). (2007). Cuba reduce el uso de plaguicidas químicos en 50 %. [http://www.rapal.org/index.php?seccion=8&f=news\\_view.php&id=207](http://www.rapal.org/index.php?seccion=8&f=news_view.php&id=207)

Red de Acción en Plaguicidas del Reino Unido. (PAN UK). (2009). Catálogo de listas de plaguicidas que identifican aquellos asociados con impactos particularmente dañinos para la salud o el medio ambiente. Documento informativo. [http://www.rapaluruaguay.org/agrotoxicos/Prensa/La\\_lista\\_de\\_listas.pdf](http://www.rapaluruaguay.org/agrotoxicos/Prensa/La_lista_de_listas.pdf)

Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México, A. C. (RAPAM). (2017). Los Plaguicidas Altamente Peligrosos en México. Primera Edición.

Reed, J, van Vianen, J., Foli, S., Clendenning, J., Yang, K., MacDonald, M., Petrokofsky, G., Padoch, Ch., Sunderland, T. 2017. Trees for life: The ecosystem service contribution of trees to food production and livelihoods in the tropics. *Forest Policy and Economics*, 84: 62–71.

Reece, J. B., Lisa A. U., Michael L. C., Steven A. W., Peter V. M., y Robert B. J. (2011). "Predation" (Depredación). En *Campbell Biology*, 1211-1213. 10th ed. San Francisco: Pearson.

Reglinski, T. y Dick, M., (2005). Biocontrol of forest nursery pathogens. *New Zealand Journal of forestry*. 50. 19-26

Roberti, R., Verones, A.R., Cesari, A., Cascone, A., Di Berardina, I., Bertini, L., Caruso C. (2008). Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent *Clonostachys rosea* in wheat plants infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Sci*. 175: 339–347.

Rodríguez, J. G., Pedroso, M., Olivares, J., Sánchez-Castilleja, Y., Arece, J. (2014). La interacción hospedero-parásito. Una visión evolutiva. *Revista de Salud Animal* vol.36 no.1

Rodríguez-Laguna, R. (2010). Manual de prácticas de viveros forestales. Manuales de ingeniería forestal. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Rodríguez, M.A., Cabrera, G., Gozzo, F.C., Eberlin, M.N., Godeas A. (2011). *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. *J. Appl. Microb.* 110: 1177–1186.

Rodríguez M, Reina JC, Sampedro I, Llamas I and Martínez-Checa F (2022) *Peribacillus castrilensis* sp. nov.: A Plant-Growth-Promoting and Biocontrol Species Isolated From a River Otter in Castril, Granada, Southern Spain. *Front. Plant Sci.* 13:896728. doi: 10.3389/fpls.2022.896728

Rodríguez Zúñiga, Joel, González Guillén, Manuel de Jesús, & Valtierra Pacheco, Esteban. (2018). Análisis estratégico de la cadena productiva forestal en la región de la Reserva de la Biosfera de la Mariposa Monarca. *Madera y bosques*, 24(1), e2411404.

Rojas-Badía, M., Sánchez-Castro, D., Rosales-Perdomo, K. y Lugo-Moya, D. (2017). Antagonismo de *Bacillus* frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas. *Revista de Protección Vegetal*, 32(2), 00.

Ruiz-Pérez, M., García-Fernández, C., Sayer, J.A. (2007). Los servicios ambientales de los bosques Ecosistemas, vol. 16, núm. 3, pp. 80-89 Asociación Española de Ecología Terrestre Alicante, España

Ruralter. (2004). Guía Metodológica para el Análisis de Cadenas Productivas. Lima, Perú.

Rzedowski, J. (2006). Vegetación de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, pp. 247-273.

Sabernasab, M., Jamali, S., Marefat, A., Abbasi, S. (2019). Molecular and Pathogenic Characteristics of *Paecilomyces formosus*, a New Causal Agent of Oak Tree Dieback in Iran, *Forest Science*, vol. 65, 6, 743–750, <https://doi.org/10.1093/forsci/fxz045>

Saleh, A.E., Ul-Hassan, Z., Zeidan, R., Al-Shamary, N., Al-Yafei, T., Alnaimi, H., Higazy, N.S., Migheli, Q., Jaoua, S. (2021). Biocontrol Activity of *Bacillus megaterium* BM344-1 against Toxigenic Fungi. *ACS Omega*. 6(16):10984-10990. doi: 10.1021/acsomega.1c00816

Salinas, E., González, Manuel de J., León, A., Rodríguez, F.R. (2017). La actividad forestal en el desarrollo económico de Chignahuapan, Puebla. *Región y sociedad*. No. 69

Samaniego-Gómez, Blanca Y., Reyes-Ramírez, Arturo, Moreno-Valenzuela, Oscar A., & Tun-Suárez, José M. (2017). Resistencia sistémica inducida contra virus fitopatógenos mediada por la inoculación con la rizobacteria *Bacillus* spp. *Revista de Protección Vegetal*, 32(1), 10-22.

Sánchez C. (2000). Origen y evolución del parasitismo. Academia de ciencias exactas, físicas, químicas y naturales de Zaragoza. Depósito legal: Z-2.957-2000.

Sánchez, E., Núñez, D., Cruz, R., Torres, M., Herrera E. (2017). Simulación y Conteo de Unidades Formadoras de Colonias. *Revista electrónica de Computación, Informática, Biomédica y Electrónica*, vol. 6, núm. 1.

Sánchez, J, Correa, M, Castañeda-Sandoval, LM. (2016). *Bacillus cereus* un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública* 34(2): 230-242. DOI: 10.17533/udea.rfnsp.v34n2a12

Sánchez, P., Barboza, J., Generación y caracterización de una cepa recombinante de *Bacillus thuringiensis* que exprese una versión truncada de la endoquitinasa Chia74. *Jóvenes en la ciencia*. Vol. 3 no. 2, Verano de la Investigación Científica.

Santoyo, G., Valencia-Cantero, E., Orozco-Mosqueda, M., Peña-Cabriales, J., Farías-Rodríguez, R. (2010). PAPEL DE LOS SIDERÓFOROS EN LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 HACIA HONGOS FITOPATÓGENOS. *Terra Latinoamericana* 28: 53-60.

Schimpf, R., Ugalde, R., Ludueña, M. y Renolfi, M. (2019). La cadena productiva de la industria de la madera de Santiago del Estero (Argentina). *Ingeniería Solidaria*. 15. 1-27. 10.16925/2357-6014.2019.01.04.

Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2016). Resumen ejecutivo estrategia de integración para la conservación y el uso sustentable de la biodiversidad. Sector Forestal (2016-2022). [https://www.biodiversidad.gob.mx/planeta/internacional/pdf/Forestal\\_SP-S.pdf](https://www.biodiversidad.gob.mx/planeta/internacional/pdf/Forestal_SP-S.pdf)

Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. SEMARNAT. (2001). EVALUACIÓN DEL PROGRAMA NACIONAL DE REFORESTACIÓN ESTADO DE PUEBLA (PRONARE 2000-2001).

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. SEMARNAT. (2016). Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave, de Desempeño Ambiental y de Crecimiento Verde. Edición 2015. Semarnat. México.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. SEMARNAT. (2020). Programa para la integración de cadenas productivas. Gobierno Federal.

Serra AA, Bittebière AK, Mony C, Slimani K, Pallois F, Renault D, Couée I, Gouesbet G, and Sulmon C. 2020. Local-scale dynamics of plant-pesticide interactions in a northern Brittany agricultural landscape. *Science of the Total Environment* 744:140772. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140772>

Serrano Carreón, L. y Galindo Fentanes. (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *E. Revista Ciencia. UNAM.* p. 77-88 <http://www.ibt.unam.mx/Geg/lineas/Control%20Biologico%20Ciencia.pdf>

Sharma R, Singh D and Singh R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control* 50:205-221.

Sherwood, S.G., Cole, D.C., y Paredes, M. (2001). Reduction of risks associated with fungicides: Technically easy, socially complex. Pages in: *Proceedings of the International Workshop on Complementing Resistance to Late Blight (Phytophthora infestans) in the Andes. GILB Latin American Workshops 1.*

Siddiqui, Z.A., Akhtar, M.S. (2008). Synergistic effects of antagonistic fungi and a plant growth promoting rhizobacterium, an arbuscular mycorrhizal fungus, or composted cow manure on populations of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. *Biocontrol Sci. Techn.* 18(3):279-290.

Soria, S., Alonso, R. y Bettucci, L. (2012). ENDOPHYTIC BACTERIA FROM *Pinus taeda* L. AS BIOCONTROL AGENTS OF *Fusarium circinatum* NIRENBERG & O'DONNELL. *CHILEAN JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH* 72(2) APRIL-JUNE 2012.

Sosa, L.A., Álvarez-Rivera, V.P., Torres, C.D., Casadesus, R.L. (2011). IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SEIS AISLADOS PERTENECIENTES AL GÉNERO *BACILLUS*

PROMISORIOS PARA EL CONTROL DE *RHIZOCTONIA SOLANI* KÜNH Y *SCLEROTIUM ROLFSII* SACC. FITOSANIDAD vol. 15, no. 1, marzo 2011, pp. 39-43

Sosa, T., Chaves, N., Alías, J. C., Escudero, J. C., Henao, F., y Gutiérrez-Merino, C. (2004). Inhibition of mouth skeletal muscle relaxation by flavonoids of *Cistus ladanifer* L.: a plant defense mechanism against herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 30: 1087-1101.

Summy, K.R. y J.V. French. (1988). Biological control of agricultural pest: concepts every producer should understand, *J. Rio Grande Valley Hort. Soc*, 41: 119-133

Tapia, E. C. y Reyes, R. (2008). Productos forestales no maderables en México: aspectos económicos para el desarrollo sustentable. *Madera y Bosques* 14(3):95-112.

Tejera, B, Heydrich, Mayra, & Rojas, Marcia M. (2012). Antagonismo de *Bacillus* spp. frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista de Protección Vegetal*, 27(2), 117-122.

Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M.M., Heydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control de hongos fitopatógenos. *CENIC Ciencias Biológicas*. 42:131-138.

United States Environmental Protection Agency. (USEPA). Biopesticides. (2017). [www.epa.gov/pesticides/biopesticides/](http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/)

Valverde, T., Meave, J. A., Carabias, J., Cano-Santana, Z. (2005). *Ecología y medio ambiente*. Pearson educación, México. ISBN:970-26-0536-9. p.240

Van der Werf, H.M.G., (1996). Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 60(2-3): p. 81-96.

Van Driesche, R. G., Hoddle, M. S., Center, T. D. (2007). Control de plagas y malezas por enemigos naturales. Forest Health Technology Enterprise Team (FHTET). USDA Forest Service.

Van Lenteren, J. C., Bolckmans, K., Köhl, J., Ravensberg, W. J., & Urbaneja, A. (2018). Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *Biocontrol*, 63(1), 39-59. doi:10.1007/s10526-017-9801-4.

Vargas-Hoyos, H. A., Gilchrist-Ramelli E., (2015). Producción de enzimas hidrolíticas y actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre dos cepas de *Fusarium* aisladas de cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*). Revista Mexicana de Micología. vol. 42: 9-16.

Vázquez, M.M., César, S., Azcón, R., Barea, J.M. (2000). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. Applied Soil Ecology. 15:261-272.

Verdú, M. J., Pina, T. (2002). Control biológico del piojo rojo de California, *Aonidiella aurantii* (Mask.). Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal, ISSN 1131-8988, N° 140, 2002, págs. 18-27.

Verschuuren, B. y Brown, S. (2018). Cultural and spiritual significance of nature in protected areas: Governance, management and policy. Abingdon, Reino Unido, Routledge.

Vinod, K., Sabah, A. (2018). Plant Defense against Pathogens: The Role of Salicylic Acid. Research Journal of Biotechnology. Vol. 13 (12). Review paper.

Wang, X., Wang, L., Wang, J., Jin, P., Liu, H., Zheng, Y. (2014). *Bacillus cereus* AR156-Induced Resistance to *Colletotrichum acutatum* Is Associated with Priming of Defense Responses in Loquat Fruit. PLoS ONE. 9(11): e112494. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0112494>

Willan, R.L. (2001). Guía para la manipulación de semillas forestales. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). ISBN 92-5-302291-4

Xue, Ch., Penton, C.R., Shen, Z., Zhang, R., Huang, Q, Li, R., Ruan, Y., & Shen, Q. (2015). Manipulating the banana rhizosphere microbiome for biological control of Panama disease. Scientific Reports. 5: 11124.

Yang LN, He MH, Ouyang HB, Zhu W, Pan ZC, Sui QJ, Shang LP, and Zhan J. 2019. Cross-resistance of the pathogenic fungus *Alternaria alternata* to fungicides with different modes of action. BMC Microbiology 19:205. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1574-8>

Yan L, Jing T, Yujun Y, Bin L, Hui L and Chun L. 2011. Biocontrol Efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and Characterization of an Antifungal Chitinase. Chinese Journal Chemical Engineering. 19:128-134. [http://dx.doi.org/10.1016/s1004-9541\(09\)60188-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1004-9541(09)60188-9)

Yáñez, A. (2004). La captura de carbono en bosques: ¿una herramienta para la gestión ambiental? Gaceta Ecológica, núm. 70. pp. 5-18 <https://www.redalyc.org/pdf/539/53907001.pdf>

Yu, X., Ai, C., Xin, L., Zhou, G. (2011). The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. Eur J Soil Biol. 47(2):138–145. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.11.001>

Zamora, M. C. (2016). Superficie Forestal actual. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 7(35), 4-5.

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S200711322016000300004&lng=es&tlng=es.](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S200711322016000300004&lng=es&tlng=es)

### XIII. ANEXOS

#### XIII.1 Encuesta de percepción social de los servicios ecosistémicos del bosque

Encuestador: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

**Objetivo:** Integrar la importancia social del control biológico en el bosque de pino de la Sierra Norte del Estado de Puebla.

**Instrucciones:** Lea cada una de las siguientes preguntas y marque con una “x” en los cuadros que correspondan a su respuesta. Puede elegir más de una opción por pregunta.

#### 1. Datos generales:

a) \_\_\_\_\_ Nombre completo: \_\_\_\_\_

b) \_\_\_\_\_ Lugar de procedencia: \_\_\_\_\_

c) Edad: \_\_\_\_\_ d) Sexo: M  F  e) Ocupación y/o cargo actual: \_\_\_\_\_

f) Último grado escolar:

Ninguna  Primaria  Secundaria  Preparatoria  Profesional: Agrónomo   
Biólogo   
Agroforestal

Otros: \_\_\_\_\_

g) Tiempo que lleva dedicado a actividades relacionadas con el sector forestal: \_\_\_\_\_

#### 2. Valoración directa del bosque

a) ¿Considera que los recursos forestales son útiles para su comunidad?

Sí  No  ¿Por qué? \_\_\_\_\_

b) ¿Los árboles de pino generan algún beneficio económico a su comunidad?

Sí  No  ¿Cuál? \_\_\_\_\_

c) ¿Cuál considera que es el principal bien que se obtiene del bosque de pino de la región?

Madera  Agua  Alimentos  Combustible  Otro: \_\_\_\_\_

d) ¿Cuál es la principal actividad económica que se practica a partir del bosque de pino?

Aserradero  Ebanistería y carpintería  Construcción  Otra: \_\_\_\_\_

e) La obtención de bienes se ha afectado por la disminución o pérdida del bosque de pino?

Sí  No  Si su respuesta es sí, ¿Cómo? \_\_\_\_\_

### 3. Valoración indirecta del bosque

a) ¿Cuál es el principal servicio ecosistémico que obtienen las comunidades aledañas a partir del bosque de pino?

Control del clima  Retención de carbono  Fuente de oxígeno  Otra: \_\_\_\_\_

b) ¿Cuál considera que sería el principal impacto que tendría la degradación y pérdida del bosque de pino en la población?

Cultural  Paisajístico y recreativo  Pérdida de beneficios (agua, oxígeno, alimentos)   
Económico

Otro: \_\_\_\_\_

### 4. Valoración intrínseca del bosque

a) ¿Considera que ha habido cambios en la superficie del bosque de pino en los últimos 5 años?

Incrementa su superficie  Mantiene su superficie  Disminuye su superficie

b) ¿Ha detectado degradación y/o pérdida del bosque de pino en los últimos 5 años?

Sí  No

Si su respuesta anterior es sí, ¿Cuáles considera que son los principales factores que afectan al bosque de pino de la región?

Plagas  Enfermedades  Incendios forestales  Explosión demográfica  Tala

Otra: \_\_\_\_\_

c) ¿Es importante para usted preservar el bosque de pino?

Muy importante  Importante  Poco importante  Nada importante

¿Por qué? \_\_\_\_\_

### 5. Valoración de opción (control biológico)

a) ¿Qué problemas existen en el manejo y conservación del bosque de pino de la región?

Organización  Interés  Ignorancia  Sobreexplotación  Otro: \_\_\_\_\_

b) ¿Considera que los árboles de pino de la región han sido afectados en los últimos 5 años por plagas y enfermedades?

Sí  No

Si su respuesta anterior es sí, ¿Cuál de las siguientes opciones considera una causa?

Cambio climático  Desnutrición  Cambio de uso de suelo  Contaminación

Otro: \_\_\_\_\_

c) ¿Sabe cuál es la principal plaga y/o enfermedad que afecta los pinos del bosque de la región?

Sí  ¿Cuál? \_\_\_\_\_ No

Si su respuesta anterior es sí, ¿Qué acciones se emplean en su combate?

Aplicación de químicos  Manejo cultural  Aplicación de biológicos  Ninguna

Otra: \_\_\_\_\_

d) Enumere de forma ascendente (1 al 5) los medios que propondría para el combate de las enfermedades en el bosque:

Formulaciones químicas  Manejo cultural  Formulaciones biológicas  Educación ambiental

Áreas protegidas

¿Por qué la selección 1 es su principal opción?: \_\_\_\_\_

e) ¿Usted cree que la aplicación de tratamientos biológicos (control biológico) para el combate de enfermedades en el bosque sea una opción adecuada?

Sí  No  ¿Por qué? \_\_\_\_\_

f) ¿Cuáles son las características ideales de un producto para el control de plagas y enfermedades del bosque de pino?

Efectivo  Fácil manejo y aplicación  No contamine  No dañe la salud de las personas

Económico

Otra: \_\_\_\_\_

¡Gracias por su tiempo y colaboración!

### XIII.2 Protocolo para la aplicación de biofungicida en campo

#### Recomendaciones generales:

- Es necesario el uso de equipo de protección personal: mascarilla, guantes y botas, camisa de manga larga, gafas y sombrero.
- No ingerir alimentos o bebidas durante la aplicación.

#### Materiales para utilizar (para 1000 m<sup>2</sup>):

- Aspersora de motor con capacidad mínima de 25 litros
- Equipo de protección personal recomendado
- Agua (20 L)
- Formulaci3n bacteriana (5 L de Biofungicida)
- Adherente foliar (40 mL)

#### Preparaci3n de la soluci3n:

- Dosis: Se recomienda mezclar 5 litros de concentrado bacteriano con 20 litros de agua y 40 mililitros de adherente foliar para aplicar en 1000 metros cuadrados.

#### Para la aplicaci3n:

- El mejor momento para aplicaci3n del biofungicida foliar es por la mañana o al atardecer. La aplicaci3n se sugiere que sea cuando la temperatura ambiente es menor a 27 ° C.
- Es recomendable aplicar en dıas sin amenaza de lluvia para evitar el lavado del biofungicida.
- Es necesario calibrar el equipo de aspersi3n de acuerdo con la altura de los 3rboles a irrigar.
- Se vierte la mezcla bacteriana (*Bacillus* sp.) en la fumigadora junto con el adherente y agua y se revuelve para uniformizar la soluci3n. Posteriormente, la mezcla se aplica por aspersi3n sobre el follaje y con ayuda de una aspersora, a una distancia y con una presi3n suficiente para rociar el follaje del 3rbol desde la copa.
- Para un predio forestal con un 3rea de 1000 metros cuadrados que contiene 3rboles de pino con alturas de aproximadamente 15 metros se requieren 5 litros del biofungicida concentrado m3s 20 litros de agua y 40 mililitros de adherente.
- Es necesario realizar un muestreo de hojas antes de la aplicaci3n del tratamiento para validar su efectividad. Ası como tambi3n se sugiere evidencia fotogr3fica.

### **XIII.3** Procedimiento de validación del control biológico en campo

Material necesario:

- Aerosol de varios colores o banderas para diferenciar los tratamientos
- Pala
- Tijeras con extensión
- Tijeras de jardinería
- Machete
- Bolsas de diferentes tamaños (10 grandes (negras) y 20 medianas (transparentes))
- Plumones de aceite para rotular
- Hielera
- Guantes
- Vasos estériles
- Navaja
- Masking tape
- Formulación biológica
- Adherente
- Agua estéril
- Aspersor (motobomba)
- Aspersores manuales (en caso de ser necesarios)
- Equipo de protección personal (guantes, botas, camisa de manga larga, gafas y sombrero)

Pasos para seguir:

1. Georreferenciar el predio forestal para su ubicación en el mapa.
2. Se debe tomar evidencia fotográfica del antes de la aplicación de los tratamientos para su contraste.
3. Dividir el predio de acuerdo con los tratamientos a aplicar.
4. Es necesario marcar los árboles según el tratamiento a aplicar para su diferenciación.
5. Una vez marcados los árboles, se toman muestras de acículas y suelo antes de la aplicación de los tratamientos. Es importante etiquetar y georreferenciar cada muestra.

6. Se realiza la calibración de la fumigadora.
7. Se prepara la mezcla de agua con adherente (20 litros de agua y 40 mililitros de adherente foliar) y se vierte en el aspersor, posteriormente se agregan 5 litros de formulación bacteriana y se mezcla bien. Esta solución sirve para irrigar 1000 metros cuadrados de árboles con alturas de 15 metros aproximadamente.
8. Se realiza la aplicación de los diferentes tratamientos bacterianos con ayuda de la fumigadora.
9. Se prepara la solución de fungicida químico de acuerdo con las indicaciones de su etiqueta y se aplica con la fumigadora.
10. El material utilizado es lavado y guardado adecuadamente para su transporte.
11. Las muestras recolectadas se colocan en la hielera para su transporte al laboratorio.
12. Al llegar al laboratorio el material se guarda en el lugar que corresponda y las muestras se llevan al congelador para su conservación.

Tratamientos para validar el control biológico *In situ*

#### 1.- CONTROL

El grupo de árboles que lo conforman no reciben tratamiento alguno y sirven como referencia de los otros tratamientos. Superficie para utilizar: 1000 metros cuadrados.

#### 2.- BIOFUNGICIDA

Al grupo de árboles que lo conforman se les inocula por aspersión foliar con bacterias del género *Bacillus* para evaluar su capacidad de control biológico *in situ*. Superficie de aplicación: 1000 metros cuadrados.

#### 3.- FUNGICIDA QUÍMICO

Al grupo de árboles que lo conforman se les aplica por aspersión foliar un fungicida químico (clorotalonil). Superficie de aplicación: 1000 metros cuadrados.

## XIII.4 Hoja de seguridad del fungicida químico




Fecha de publicación: 04-ago-2019  
Fecha de revisión: 04-ago-2019  
Versión: 002

### HOJA DE DATOS DE SEGURIDAD (HDS)

#### SECCIÓN 1. Identificación de la sustancia química peligrosa o mezcla y del proveedor o fabricante.

<b>Nombre de la sustancia química peligrosa o mezcla</b>	DACONIL 2787 W-75%
<b>Otros medios de identificación</b>	
Nombre(s) común(es), sinónimo(s)	Clorotalonil
<b>Uso recomendado de la sustancia química peligrosa o mezcla, y restricciones de uso</b>	Fungicida
<b>Datos del proveedor o fabricante</b>	
Nombre de la compañía	AMVAC México, S. de R.L. de C.V.
Dirección	Plaza Concentro Local B17 Avenida Vallarta 6503 Colonia Ciudad Granja, C.P. 45010 Zapopan, Jalisco, México
Teléfono	(33) 31 10 19 76
Fax	(33) 31 10 19 36
Correo electrónico	regulatorio@amvac.com.mx
Sitio web	www.amvac.com.mx
<b>Número de teléfono en caso de emergencia</b>	
Centro De Tratamiento En Intoxicaciones Por Agroquímicos, ATOX	800 000 ATOX (2869)
Servicio De Información Toxicológica, SINTOX (24 HRS)	(55) 5598-6659, 5611-2634, 800-009-2800

#### SECCIÓN 2. Identificación de los peligros.

<b>Clasificación de la sustancia química peligrosa o mezcla</b>	
Peligros para la salud	Toxicidad aguda, Oral: Categoría 2 Toxicidad aguda, Dermal: Categoría 2 Toxicidad aguda, Inhalatoria: Categoría 2
<b>Elementos de la señalización, incluidos los consejos de prudencia y pictogramas de precaución</b>	
<b>Palabra de advertencia</b>	Peligro
<b>Indicación de peligro</b>	H300 + H310 + H330 Mortal en caso de ingestión, en contacto con la piel o si se inhala.

HDS MÉXICO  
1 / 8

**Daconil<sup>®</sup> 2787 w-75%**

**Consejos de prudencia**  
**Prevención**

P260 No respirar polvos.  
P262 Evitar todo contacto con los ojos, la piel o la ropa.  
P264 Lavarse las manos cuidadosamente después de la manipulación.  
P270 No comer, beber o fumar mientras se manipula este producto.  
P271 Utilizar sólo al aire libre o en un lugar bien ventilado.  
P280 Usar guantes de protección.  
P284 Llevar equipo de protección respiratoria.

**Intervención**

P301 + P310 EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico.  
P302 + P350 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con cuidado utilizando agua y jabón abundantes.  
P304 + P340 EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración.  
P310 Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico.  
P320 Es necesario un tratamiento específico urgente (véase en la etiqueta del producto).  
P321 Tratamiento específico (véase en la etiqueta).  
P330 Enjuagarse la boca.  
P332 Medidas específicas (véase en la etiqueta del producto).  
P361 Quitar inmediatamente toda la ropa contaminada.  
P363 Lavar la ropa contaminada antes de volverla a usar.

**Almacenamiento**

P403 + P233 Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener el recipiente herméticamente cerrado.  
P405 Guardar bajo llave.

**Eliminación**

P501 Eliminar el contenido y/o recipiente conforme a la reglamentación nacional, establecida en la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos, su Reglamento o al Plan de Manejo de Envases Vacíos de Plaguicidas, registrado ante la SEMARNAT.

Otros peligros que no contribuyen en la clasificación. Ninguno conocido.

**SECCIÓN 3. Composición/información sobre los componentes.**

Nombre químico	Nombre común	Número CAS	Concentración
Tetracloroisoflato-nitrilo	Clortalonil	1897-45-6	75.0 %
Ingredientes Inertes			25.0 %

**SECCIÓN 4. Primeros auxilios.**

**Descripción de los primeros auxilios**  
**En caso de ingestión**

Llame al centro de información toxicológica o al médico inmediatamente para tratamiento. No dé ningún líquido a la persona. No induzca el vómito a menos que se haya indicado por un médico. No dé nada por la boca a una persona inconsciente.

**En caso de contacto con la piel**

Mantenga el ojo abierto y enjuague lentamente con agua durante 15-20 minutos. Remueva los lentes de contacto si están presentes, después de 5 minutos, después continúe enjuagando el ojo. Llame al centro de información toxicológica o al médico para tratamiento.

**En caso de contacto con los ojos**

<b>En caso de inhalación</b>	Retire la ropa contaminada. Enjuague inmediatamente con abundante agua por 15-20 minutos. Llame al centro de información toxicológica o a un médico para tratamiento.
	Mueva a la persona al aire fresco. Si la persona no respira, llame al 911 o a una ambulancia, después, dé respiración artificial, preferentemente boca a boca de ser posible. Llame al centro de información toxicológica o a un médico para tratamiento.
<b>Síntomas y efectos más importantes, agudos y crónicos</b>	Reacción alérgica en la piel e irritación respiratoria.
	No tiene antídoto específico.
<b>Indicación de la necesidad de recibir atención médica inmediata y, en su caso, tratamiento especial</b>	El tratamiento es sintomático y fortalecimiento general. Las personas que sufren reacciones alérgicas temporales pueden responder a tratamiento con antihistamínicos o cremas de esteroides sistémicos.
<b>Información general</b>	Tener el contenedor del producto, etiqueta u Hoja de Seguridad con usted cuando llame al médico o al Centro de información toxicológica para el tratamiento.

#### Sección 5. Medidas contra incendios.

<b>Medios de extinción apropiados</b>	Incendio pequeño: Polvo químico seco, CO <sub>2</sub> , agua pulverizada o espuma resistente al alcohol.  Incendio grande: Agua pulverizada, niebla o espuma resistente al alcohol.
<b>Peligros específicos de las sustancias químicas peligrosas o mezclas</b>	Puede descomponerse a altas temperaturas para emitir cloruro de hidrógeno.
<b>Medidas especiales que deberán seguir los grupos de combate contra incendio</b>	Usar equipo de protección completo y aparatos de respiración autocontenida. Evacúe al personal no esencial del área para prevenir exposición humana al fuego, humo, fumarolas o productos de combustión.  MEDIDAS ESPECIALES: Aproximarse al fuego desde la dirección que sople el viento. Evitar los vapores peligrosos y productos de descomposición tóxicos. Combatir el fuego desde una posición protegida o a la distancia más larga posible. Evitar fuertes chorros de manguera. Aislar la zona para impedir que se escape el agua.

#### Sección 6. Medidas que deben tomarse en caso de derrame accidental o fuga accidental.

<b>Precauciones personales, equipos de protección y procedimientos de emergencia</b>	Siga los controles de exposición y protección personal indicados en la Sección 8.  No tocar ni caminar sobre el material derramado. Detenga la fuga, en caso de poder hacerlo sin riesgo.
<b>Precauciones relativas al medio ambiente</b>	Impedir la entrada hacia canales de agua, alcantarillas, sótanos o áreas confinadas.
<b>Métodos y materiales para la contención y limpieza de derrames o fugas</b>	<b>Derrame Seco Pequeño:</b> Con una pala limpia, colocar el material en un contenedor limpio y seco y cubrir holgadamente; quitar los contenedores del

área del derrame. Prevenga la entrada hacia vías navegables, alcantarillas, sótanos o áreas confinadas.

Controle el derrame y la fuente del derrame. Contenga el derrame para prevenir la contaminación de suelos o que entre en el drenaje o cuerpos de agua. Limpie el derrame inmediatamente, observando las precauciones indicadas en la Sección 8. Recuperar el producto que sea útil hasta donde sea posible, y lo demás recogerlo en un recipiente hermético y llevarlo al centro de acopio de residuos peligrosos autorizado más cercano. Friegue el área con agua y detergente. Tome el líquido de lavado con material absorbente adicional y colóquelo en el contenedor de desechos compatible. Una vez que el material fue limpiado y colocado en el contenedor de desechos, selle el contenedor y póngalo a disposición de acuerdo con lo indicado en la Sección 13 de esta HDS.

### Sección 7. Manejo y almacenamiento.

<b>Precauciones que se deben tomar para garantizar un manejo seguro</b>	Almacene el material en un lugar bien ventilado, seguro y fuera del alcance de los niños y animales domésticos. No almacene junto con alimentos, bebidas o tabaco. Evite comer, beber, fumar y aplicar cosméticos en áreas donde hay una exposición potencial al material. Lave cuidadosamente con agua y jabón después del manejo.
<b>Condiciones de almacenamiento seguro, incluida cualquier incompatibilidad</b>	Transporte y almacene este producto en su empaque original, claramente etiquetado con su correspondiente panfleto en un área seca y segura separado de productos de consumo animal y humano; lejos de alimentos, semillas, medicinas, plaguicidas y fertilizantes.

### Sección 8. Controles de exposición/protección personal.

#### Parámetros de control

**LAS SIGUIENTES RECOMENDACIONES PARA EL CONTROL DE EXPOSICIÓN Y PROTECCIÓN PERSONAL SON DIRIGIDOS A LA FABRICACIÓN, FORMULACIÓN Y EMPAQUE DE ESTE PRODUCTO.**

**PARA APLICACIONES COMERCIALES Y/O APLICACIONES EN CAMPO, CONSULTE LA ETIQUETA.**

#### Límite(s) de exposición ocupacional

Nombre químico	TWA	Fuente
Clorotalonil	0.1 mg/m <sup>3</sup>	Fabricante

**Controles técnicos apropiados** Proporcionar ventilación general y/o local para controlar los niveles de aire por debajo de los límites de exposición.

#### Medidas de protección individual, como equipo de protección personal, EPP

<b>Protección para los ojos/la cara</b>	Evite comer, beber, fumar o aplicar cosméticos en áreas donde existe una potencial exposición al producto. Lave cuidadosamente con agua y jabón después del manejo.
<b>Protección para la piel</b>	Donde sea probable el contacto con los ojos, use gafas contra salpicaduras químicas. Las instalaciones que almacenan o utilizan este material deben estar equipadas con lavadores de ojos y regadera.
<b>Protección para las manos</b>	Donde sea probable el contacto con la piel, use guantes resistentes a químicos (barrera laminada, caucho, nitrilo, neopreno, polietileno, PVC o Viton) overol, calcetines y calzado resistente a químicos.

#### Protección para vías respiratorias

Se debe usar un respirador combinado para partículas/vapor orgánico hasta que sean instalados los controles técnicos efectivos para dar cumplimiento con los límites de exposición ocupacional o hasta que se establezcan estos límites. Use un respirador certificado NIOSH con un cartucho de vapor orgánico (OV) o canister con filtro R, P o HE.

Use un aparato de auto-respiración en caso de derrames de emergencia cuando los niveles de exposición se desconocen o bajo cualquier circunstancia en donde los purificadores de aire no provean la protección adecuada.

### Sección 9. Propiedades físicas y químicas.

<b>Apariencia</b>	Sólido. Polvo humectable-
<b>Olor</b>	Ligeramente aromático.
<b>Umbral del olor</b>	No disponible.
<b>Potencial de hidrógeno, Ph</b>	No disponible.
<b>Punto de fusión/punto de congelación</b>	Clorotalonil: 252.1 °C.
<b>Punto inicial e intervalo de ebullición</b>	Clorotalonil: 100 °C.
<b>Punto de inflamación</b>	No se espera que sea inflamable.
<b>Velocidad de evaporación</b>	No disponible.
<b>Inflamabilidad (sólido/gas)</b>	No se espera que sea inflamable.
<b>Límite superior/inferior de inflamabilidad o explosividad</b>	No se espera que sea inflamable.
<b>Presión de vapor</b>	Clorotalonil: 0.076 mPa a 20 °C.
<b>Densidad de vapor</b>	Clorotalonil: $2.50 \times 10^{-2}$ Pa m <sup>3</sup> /mol a 25 °C.
<b>Densidad relativa</b>	No disponible.
<b>Solubilidad(es)</b>	Clorotalonil: Agua: 0.81 mg/L a 20 °C. Acetato de etilo: 13600 mg/L a 20 °C. Acetona: 18000 mg/L a 20 °C. Metanol: 1700 mg/L a 20 °C. Xileno: 74400 mg/L a 20 °C. Clorotalonil: $6.71 \times 10^2$ a 20 °C, pH 7.
<b>Coefficiente de partición n-octanol/agua</b>	
<b>Temperatura de autoinflamación</b>	No se espera que sea inflamable.
<b>Temperatura de descomposición</b>	No disponible.
<b>Viscosidad</b>	No disponible.
<b>Peso molecular</b>	265.91 g/mol.
<b>Otros datos relevantes</b>	Ninguno.

### Sección 10. Estabilidad y reactividad.

<b>Reactividad</b>	Puede reaccionar con cianuros y con aceites agrícolas.
<b>Estabilidad química</b>	Estable en condiciones normales de temperatura y almacenaje. Se descompone en calentamiento prolongado de 120 °C (248 °F) o más.
<b>Posibilidad de reacciones peligrosas</b>	Este producto no se polimeriza.
<b>Condiciones que deberán evitarse</b>	No disponible.
<b>Materiales incompatibles</b>	Incompatible con cianuros. No compatible con aceites agrícolas.
<b>Productos de descomposición peligrosos</b>	Puede descomponerse a altas temperaturas para emitir cloruro de hidrógeno.

## Sección 11. Información toxicológica.

<b>Información sobre las vías probables de ingreso</b>	Oral, dermal e inhalación.	
<b>Síntomas relacionados con las características físicas, químicas y toxicológicas</b>	A concentraciones mayores a 0.1% en disolventes orgánicos el producto es moderadamente irritante a la piel en animales y se espera que sea irritante para los ojos y el tracto gastrointestinal. Se han reportado casos de asma ocupacional después de la exposición por inhalación. Las concentraciones de clorotalonil al 0.01% causan una reacción anafilactoide. Debido a los disolventes del producto, puede ocurrir neumonitis por aspiración	
<b>Efectos inmediatos y retardados, así como efectos crónicos producidos por una exposición a corto o largo plazo</b>	Sarpullido, enrojecimiento o picazón, irritación respiratoria.  Posible carcinogenicidad, reacción alérgica en la piel y efectos en el sistema respiratorio.	
<b>Medidas numéricas de toxicidad</b>		
<b>Toxicidad aguda</b>		
Oral:	Oral (DL <sub>50</sub> Ratas):	< 50 mg/kg peso corporal
Dermal:	Dermal (DL <sub>50</sub> Ratas):	< 200 mg/kg peso corporal
Inhalación:	Inhalación (CL <sub>50</sub> Ratas):	< 0.5 mg/L
Contacto con los ojos:	Moderadamente irritante (Conejos)	
Contacto con la piel:	Ligeramente irritante (Conejos)	
Sensibilización de la piel:	Es sensibilizador de la piel (Cobayos)	
<b>Mutagenicidad</b>	No mostró efectos mutagénicos en experimentos con animales.	
<b>Carcinogenicidad</b>	Clorotalonil: Posible carcinógeno en humanos. Clasificación 2B de IARC.	
<b>Toxicidad para la reproducción</b>	No mostró efectos de toxicidad reproductiva en experimentos con animales.	
<b>Toxicidad crónica/subcrónica</b>	Clorotalonil causa tumores renales en ratas y ratones a través de un modo de acción no genotóxico secundario a la toxicidad de órganos diana.	
<b>Órganos diana</b>	Riñón.	
<b>Otra información</b>	Ninguna.	

## Sección 12. Información ecotoxicológica.

<b>Ecotoxicidad:</b>		
Clorotalonil:		
	Pez ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) 96-horas CL <sub>50</sub> 0.017 mg/L	
	Pez ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) 21 días NOEC 0.003 mg/L	
	Alga verde 72-horas CE <sub>50</sub> 0.21 mg/L	
	Invertebrados (Pulga de agua) <i>Daphnia Magna</i> 48-horas CE <sub>50</sub> 0.0541 mg/L.	
	Abejas Contacto DL <sub>50</sub> 48-horas > 40 µg/abeja	
	Abejas Oral DL <sub>50</sub> 48-horas > 40 µg/abeja	
	Lombriz ( <i>Eisenia foetida</i> ) 14 días CL <sub>50</sub> 268.5 mg/kg	
<b>Persistencia y degradabilidad</b>	Clorotalonil: Tiende a no ser persistente en los sistemas del suelo, pero puede ser persistente en el agua.	
<b>Potencial de bioacumulación</b>	BCF Clorotalonil: 100 L/kg.	
<b>Movilidad en el suelo</b>	K <sub>oc</sub> Clorotalonil: 2632.	

Otros efectos adversos Ninguno.

**Sección 13. Información relativa a la eliminación de los productos.**

Maneje el envase vacío y los residuos del producto conforme a lo establecido en la ley general para la prevención y gestión integral de los residuos, su reglamento o al plan de manejo de envases vacíos de plaguicidas, registrado ante la SEMARNAT.

<b>Residuos</b>	Incineración en hornos tipo Standard a más de 1100 °C, 2" de residencia y una eficiencia de combustión y destrucción de 99.9%.
<b>Envases y embalajes contaminados</b>	Realizar el triple lavado de los envases, inutilizarlos y enviarlos a un Centro de Acopio autorizado por la Secretaría correspondiente. Confinar los envases en un lugar claramente identificado, hasta que la autoridad defina el destino final.
<b>Material contaminado</b>	Recoger en recipientes claramente identificados, finalmente, trasladar a un depósito autorizado para este tipo de sustancias para su posterior eliminación de acuerdo a lo dispuesto por la autoridad competente.

**Sección 14. Información relativa al transporte.**

**DOT**

**Transporte Terrestre – NAFTA**

Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas	Sustancia sólida peligrosa para el medio ambiente, N.E.P. (Clorotalonil)
Clase de peligro en el transporte	9
Número UN	3077
Grupo de embalaje/envasado, si se aplica	PG III

**Transporte marítimo – Internacional**

Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas	Sustancia sólida peligrosa para el medio ambiente, N.E.P. (Clorotalonil)
Clase de peligro en el transporte	9
Número UN	3077
Grupo de embalaje/envasado, si se aplica	PG III

**Transporte aéreo – NAFTA**

Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas	Sustancia sólida peligrosa para el medio ambiente, N.E.P. (Clorotalonil)
Clase de peligro en el transporte	9
Número UN	3077
Grupo de embalaje/envasado, si se aplica	PG III

**Sección 15. Información reglamentaria.**

Disposiciones específicas sobre seguridad, salud y medio ambiente para las sustancias químicas peligrosas o mezcla de que se trate.

México. NORMA Oficial Mexicana NOM-018-STPS-2015, Sistema para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo (DOF 04/07/2015)

ACUERDO por el que se determina el listado de sustancias sujetas a No reporte de competencia federal para el registro de emisiones y transferencia de contaminantes. (DOF 31/03/2005)

Reglamentación Internacional  
Protocolo de Montreal No

<b>Convenio de Estocolmo</b>	No
<b>Convenio de Rotterdam</b>	No
<b>Convenio de Basilea</b>	No
<b>Registro Sanitario en México:</b>	RSCO-FUNG-0309-438-002-075

**Sección 16. Otras informaciones incluidas las relativas a la preparación y actualización de las hojas de datos de seguridad.**

La información se considera correcta, pero no es exhaustiva y se utilizará únicamente como orientación, la cual está basada en el conocimiento actual de la sustancia química o mezcla y es aplicable a las precauciones de seguridad apropiadas para el producto.

**Fecha de emisión** 04-ago-2019

**Lista de abreviaturas**

<b>AIHA</b>	American Industrial Hygiene Association (Asociación Americana de Higiene Industrial).
<b>ATOX</b>	Centro De Tratamiento En Intoxicaciones Por Agroquímicos
<b>CAS</b>	Chemical Abstracts Service
<b>DOF</b>	Diario Oficial de la Federación
<b>EPP</b>	Equipo de Protección Personal
<b>HDS</b>	Hoja de seguridad
<b>IARC</b>	International Agency for Research on Cancer (Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer).
<b>NAFTA</b>	North American Free Trade Agreement (Tratado de Libre Comercio de América del Norte)
<b>N.E.P</b>	No Especificados en otra Parte
<b>NIOSH</b>	National Institute for Occupational Safety and Health (Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional)
<b>NOM</b>	Norma Oficial Mexicana
<b>OSHA</b>	Occupational Safety and Health Administration (Administración de Seguridad y Salud Ocupacional)
<b>PEL</b>	Permissible Exposure Limits (Límites de exposición permisibles)
<b>PVC</b>	Policloruro de vinilo
<b>SEMARNAT</b>	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
<b>SINTOX</b>	Servicio De Información Toxicológica
<b>SUVA</b>	Swiss National Accident Insurance Fund (Fondo Nacional de Seguros de Accidentes de Suiza)
<b>TWA</b>	Time-Weighted Average (Promedio ponderado en el tiempo)

**Cláusula de exención de responsabilidad** La información suministrada en este documento es una guía para el usuario. A pesar de que el distribuidor y el fabricante garantizan que la información es confiable, es responsabilidad del usuario determinar la especificidad de la información aquí suministrada. El usuario está advertido de no interpretar la información suministrada como absolutamente completa, ya que puede que se requiera información adicional para circunstancias o casos especiales (como la combinación con otros materiales), o debido a regulaciones aplicables. Este producto debe ser almacenado, manipulado y usado de acuerdo con los procedimientos de una buena higiene industrial y de conformidad con cualquier regulación legal. La información aquí suministrada está basada en el estado actual de los conocimientos de la empresa AMVAC México, S. de R.L. de C.V. acerca del producto e intenta describir el producto desde el punto de vista de los requerimientos de seguridad. Por lo tanto, esto no debe ser interpretado como garantía de propiedades específicas. El fabricante y distribuidor no pueden anticiparse a todas las condiciones bajo las cuales se puede usar esta información y su producto o los productos de otros fabricantes en combinación con su producto. Es responsabilidad del usuario cerciorarse de que haya condiciones seguras para el manejo, almacenamiento y desecho del producto y sus envases, así como asumir la responsabilidad de pérdida, lesión, daño o gasto debido a un uso inapropiado.