BENEMÉRITA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIÓLOGO

INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE SUELOS

TESIS

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS Y PRUEBAS DE ANTAGONISMO *IN VITRO* Y EN PLANTAS DE *Pinus patula y Pinus pseudostrobus*

PRESENTA

Manuel Jonathan Rivera Sosa

Directora de tesis

D.C. Lucía López Reyes

Co-director de tesis

M.C. Moisés Graciano Carcaño Montiel

Asesor Interno

M.C. Patricia Guadalupe Suarez Albores

Facultad de Ciencias Químicas BUAP

Puebla, Pue. Septiembre 2022

El presente trabajo ha sido soportado por:

El proyecto de investigación **AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS PATÓGENOS EN ESPECIES DE *Pinus patula y Pinus pseudostrobus* DE LA SIERRA NORTE DE PUEBLA** *con financiamiento* VIEP-BUAP año y número. Recursos del programa de mejoramiento al profesorado (SEP-PRODEP-RED) para el fortalecimiento del Cuerpo Académico de Microbiología de Suelos BUAP-CA-99. Y con apoyo de redes temáticas de colaboración académica SEP-PRODEP (Modelos microbianos de importancia agrobiotecnológica)., así como de CONAFOR, Delegación Puebla.

Agradecimientos

Agradezco primeramente a Dios todo poderoso por darme la vida, por bridarme salud en tiempos difíciles y no soltarme.

A mis abuelitos Manuel Rivera, Epifania Mateo, Bonifacio sosa, Elena sosa por enseñarme a vivir la vida con valores de respeto y responsabilidad

Agradezco a mis padres por su apoyo, paciencia en todo momento que estuve en mi carrera universitaria.

Agradezco a mis hermanos por escucharme y entenderme en esta etapa, son mi ejemplo a seguir.

A mis tíos Felix Rocha Flores, Emilia Micaela Rivera Mateo por su atención en mi estancia en la Ciudad de Puebla

Agradezco a mis profesores de Tesis, la Doctora Lucia López Reyes por saber esperar a su alumno Manolo, gracias por ser un ejemplo de profesionalidad con mucha pasión por su trabajo, además de ser una persona muy humilde con un gran sentido del humor gracias por todos los momentos compartidos. Al maestro Moisés Graciano Carcaño Montiel por sus enseñanzas profesionales, explicaciones y saber escucharme y apoyarme en mi desarrollo Profesional.

A la Bióloga Leticia Gómez por enseñarme y tenerme paciencia. Y por ser una gran amiga.

A la Doctora Guadalupe Medina por su comprensión en todo momento y brindarme asesorías.

A Liliana Chena, Elizabeth Portillo, Yolanda, Guillermo, por compartir sus conocimientos y su amistad.

A María del Carmen Merino Vidal por enseñarme a, ser constante y apasionado en mis objetivos.

A mi comisión revisora y mi asesor interno la M.C. Patricia Guadalupe Suarez Albores, por su atención en mi tesis.

Contenido

1	**Introducción**	9
2	**Revisión de literatura**	10
2.1	Importancia de los bosques	10
2.2	Beneficios que suministran los bosques	11
2.3	Bosques nacionales	12
2.4	Bosques estatales	13
2.5	*Pinus patula*	14
2.6	*Pinus pseudostrobus*	14
2.7	Reforestación	14
2.8	Enfermedades de pinos	15
1.9	Perdida de acículas *(Lophodermium seditosium)*	16
2.10	Suelos forestales	16
2.11	Importancia biológica de los microorganismos del suelo	17
2.12	Control biológico	17
2.13	Antagonismo microbiano	18
2.14	Bacterias y hongos protectores frente a hongos del suelo	19
2.15	Fungistasis y Micoparasitismo	19
3	**Justificación**	20
4	**Objetivos**	21
4.1	Objetivo	21
4.2	Objetivos específicos	21
5	**Hipótesis**	22
6	**Diseño de la investigación**	23
7	**Metodología**	25
7.1	Recepción de muestra	25
7.2	Registro de datos	25
7.3	Aislamiento de bacterias y hongos	25
7.3.1	Lavado de acículas	25

7.3.2 Sembrado de acículas en cajas Petri con medio PDA 25
7.3.3 Cámara húmeda 25
7.3.4 Sembrado en placa PDA 26
7.3.5 Sembrado en placa TSA 26
7.3.6 Conservación de cepas 26
7.4 Identificación 26
7.4.1 Microcultivo 26
7.4.2 Observación a microscopio 27
7.5 Caracterización de bacterias 27
7.6 Antagonismo en placa 27
7.7 Biodegradación de micelio fúngico con bacterias quitinoliticas 27
7.8 Antagonismo entre hongos y bacterias en invernadero 28
7.9 Diseño experimental 29
7.9.1 Análisis estadístico 31
8 Resultados 34
9 Discusión 52
10 Conclusión 56
11 Bibliografía 58

Índice de cuadros

Cuadro 1 Tratamientos de *Pinus patula en invernadero*……..…..…..29

Cuadro 2. Tratamientos de *Pinus pseudostrobus en invernadero*……..30

Cuadro 3. Resultados de identificación hongos por PCR…….……37

Cuadro 4. Crecimiento radial del hongo *Diplodia seriata* con bacterias antagonistas……40

Cuadro 5. Halo de degradación de micelio…….……....41

Cuadro 6. Porcentaje de lesiones causadas por *Colletotrichum boniense* y *Diplodia seriata* en acículas de *Pinus patula* frente a bacterias antagonistas a la altura de 15 cm……..43

Cuadro 7. Porcentaje de lesiones causadas por *Colletotrichum boniense* y *Diplodia seriata* en acículas de Pinus patula a una altura de 40 cm de la planta…….……44

Cuadro 8. Evaluación de la altura de las plantas de *Pinus patula* a los seis meses después de la inoculación con bacterias benéficas y hongos patógenos…….……45

Cuadro 9. Evaluación del diámetro de las plantas de *Pinus patula* a la altura de 15 cm inoculados con bacterias benéficas y hongos patógenos…….....46

Cuadro 10. Porcentaje de lesiones causadas por *Diplodia seriata* y *Biscougnauxia mediterranea* en *Pinus pseudsotrobus a* la altura de 15 cm……..…….47

Cuadro 11. Evaluación de la altura de plantas de *Pinus pseudsotrobus* inoculados con bacterias benéficas y hongos patógenos…….……..…….48

Cuadro 12. Evaluación de la medición del diámetro de plantas de *Pinus pseudsotrobus* inoculadas con bacterias benéficas y hongos patógenos a los 15 cm…….…….…….49

Cuadro 13. Evaluación del número de braquiblastos presentes en ramas de *Pinus patula* medidos a la altura de 15 cm…….…….……50

Cuadro 14. Evaluación del número de braquiblastos en *Pinus patula* medidos a la altura de 40 cm…….…….…….……..51

Índice de figuras

Figura 1 Zona de recolección de acículas de *Pinus* ……33

Figura 2 Características de acículas con enfermedad en *Pinus patula*……..34

Figura 3 hongos puros en medio Agar Papa Dextrosa de *Pinus patula* región de Amixtlan Puebla. Mex.……..35

Figura 4 Características de la enfermedad: en *Pinus pseudostrobus* ……..……35

Figura 5 hongos aislados de acículas enfermas de *Pinus pseudsotrobus* de la región de Zacatlán Puebla…….35

Figura 6 Microcultivo de hongos aislados de *Pinus patula y Pinus pseudostrobus*……..36

Figura 7 Características macroscópicas y microscópicas de hongos seleccionados para las pruebas de antagonismo…….37

Figura 8. Ensayo de antagonismo entre bacterias aisladas de pino y *Diplodia* sp. proveniente de *P. patula* de Amixtlan, Puebla, México……39

Figura 9. Inhibición del crecimiento fúngico de la cepa *Burkholderia cepacia* sobre el hongo *Diplodia seriata*……40

Figura 10. Esquema de medición de las variables…….....42

Resumen

La Sierra Norte de Puebla y sus bosques son de suma importancia en la economía de los habitantes de municipios y localidades aledañas, ellos contribuyen en la mejora de la calidad de vida local, regional y global. Se seleccionaron acículas de pino con síntomas de enfermedad de las especies *Pinus patula* y *P. pseudostrobus* procedentes de la Sierra Norte de Puebla, México. El objetivo fue estudiar los hongos asociados a las acículas de las plantas de pino enfermas para identificarlas y proponer una alternativa biotecnológica bacteriana para su control en condiciones de laboratorio e invernadero. Se encontró que existen diferentes hongos asociados a *P. patula* y *P*. *pseudostrobus* de los cuales *Diplodia* sp. es uno de los hongos más frecuentes e importante en la enfermedad de pinos de la Sierra de Puebla. Además de que se pudo demostrar su inhibición en medio de cultivo por el 45% de las bacterias ensayadas. Los resultados sugieren el uso de bacterias de bosque como mecanismo de control de las enfermedades fúngicas en *Pinus* sp.

Palabras clave

Hongos; *Pinus patula*; *Pinus pseudostrobus.*

1. INTRODUCCIÓN

Los bosques son ecosistemas en los cuales se desarrolla un gran número de interacciones entre la comunidad biótica y abióticas en las que viven sus elementos. (Teomitzi, 2014). Una de las interacciones de interés es la promoción de sustancias antagonistas de algunos microorganismos, que podrán controlar, mediar enfermedades causadas por hongos, para que otorguen protección a la planta, en este caso a *Pinus patula* y *Pinus pseudostrobus*. Es importante aislar e identificar los hongos patógenos de acículas infectadas de pino y realizar pruebas de antagonismo *in vitro* con bacterias aisladas de suelo de pinos sanos, previamente caracterizadas.

El uso excesivo de plaguicidas químicos provoca resistencia en los fitopatógenos, influencia negativa sobre el ambiente y la salud humana, por lo que se propone la implantación de estrategias de control con MICROORGANISMOS BENÉFICOS, como *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomona*s spp. y otros agentes promisorios. *Bacillus thuringiensis* es el insecticida biológico más utilizado en el mundo para controlar diversos insectos y organismos plaga que afectan la agricultura, la actividad forestal y que transmiten patógenos a humanos y animales. (Carreras, B 2011).

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Importancia de los bosques

Los bosques, gestionados de forma sostenible contribuyen en gran medida a disminuir la erosión local del suelo, así como los sedimentos en las masas de agua (humedales, estanques, lagos, arroyos y ríos) y detienen o filtran los contaminantes del agua en la hojarasca, lo que permite una disponibilidad regular de agua superficial y subterránea de alta calidad. De los bosques se obtiene el 75% del agua dulce mundial, que es utilizada para satisfacer las necesidades humanas como son: las domésticas, agrícolas, industriales y ecológicas. A su vez, las cuencas hidrológicas arboladas son fuente primordial de agua potable para alrededor de un tercio de las ciudades más grandes del mundo, tales como Bombay, Bogotá y Nueva York (INEGI, 2016).

En México, los pinos tienen gran importancia ecológica, económica y social. A menudo son el componente dominante de la vegetación, influyen en los procesos funcionales del ecosistema tales como los ciclos biogeoquímicos, hidrológicos, los regímenes de fuego, son hábitat y fuente de alimento para la fauna silvestre. Tienen un alto valor económico, ya que son fuente de madera, leña, pulpa, resinas, semillas comestibles y otros productos, además, los pinos ofrecen importantes servicios ambientales (agua, oxígeno, recreación, captura de carbono) e influyen en el clima regional (García y González, 2003; Ramírez-Herrera *et al.,* 2005). Estudios sobre vegetación estiman que el país cuenta con 33.5 millones de hectáreas de bosques, 32.11 millones de hectáreas de selvas, 58.08 millones de hectáreas de zonas áridas y semiáridas, 2.58 millones de hectáreas de vegetación hidrófila, 6.95 millones de hectáreas de vegetación inducida y 12.38 millones de hectáreas de pastizales (INEGI 2005). El 80% de los ecosistemas forestales concentran gran parte de la biodiversidad y es de propiedad ejidal y comunal. Los habitantes de estas zonas son en consecuencia, los dueños de una importante riqueza biológica. De esta superficie, aquellas zonas que ocupan los pueblos indígenas tienen una cubierta de vegetación primaria y secundaria de 18 millones de hectáreas (75%); el resto son áreas de pastizales (11.3%) y tierras de uso

agrícola (11.9%), las que se alberga una parte importante de la agrobiodiversidad mesoamericana, los cuerpos de agua y zonas urbanas cubren el resto de la superficie del país (1.8%) (CONABIO, 2006).

La participación del sector forestal en el Producto Interno Bruto (PIB) fue de 1.3% en 1987 y de 0.5% en 1996. En 1999, el valor de la producción forestal fue del orden de 17 mil millones de pesos y su participación en el PIB, fue de 1.2% (PEFM-2001). Según el Inventario Nacional Forestal Periódico, de la superficie total de bosques con que cuenta el país, 21.6 millones de ha tiene potencial comercial. De esta superficie, sólo se aprovechan actualmente 8.6 millones de hectáreas, de esta superficie potencial al manejo producirían alrededor de 30 millones de m^3 de madera, de los cuales 38% podría provenir de coníferas, 32% de especies tropicales y 30% de encinos y otros árboles latifoliados (PEFM-2001).

Se reconoce que México presenta una degradación ambiental de gran magnitud, ya que existen importantes factores antropogénicos como los cambios de uso de suelo, el sobrepastoreo, el avance de la mancha urbana y los incendios forestales que, aunados a las plagas y enfermedades, afectan la salud forestal en los ambientes naturales. Por ejemplo, en bosques de coníferas, se encuentran infecciones en el fuste que causan pudriciones de duramen. El hongo *Phellinus pini* es el de mayor importancia en bosques de coníferas de Durango y Chihuahua (Cibrián *et al*., 2007).

2.2 Beneficios que suministran los bosques

Los bosques suministran gran cantidad de beneficios, los cuales pueden enmarcarse dentro de tres grandes categorías (Pagiola *et al*., 2002).

1. Protección de cuencas hidrográficas. Los bosques representan un papel importante en la regulación de los flujos hidrológicos y en la reducción de la sedimentación.
2. Conservación de la biodiversidad. Los bosques tienen una proporción significativa de la diversidad del mundo. La pérdida de estos hábitats constituye una causa que conduce a la pérdida de especies.

3. Secuestro de carbono. Los bosques en pie son grandes depósitos de carbono y los bosques en crecimiento secuestran carbono de la atmósfera.

2.3 Bosques nacionales

Las áreas forestales que están cubiertas por bosques, selvas, matorrales xerófilos, pastizales, vegetación hidrófila, áreas con otros tipos de vegetación y áreas sin vegetación aparente, comprenden más de dos tercios del territorio terrestre del país. El 60% de las áreas terrestres de México están cubiertas por bosques y selvas, el 11% por otras áreas silvestres (Chapela *et al*., 2012). Recientemente se reconocen para México 46 especies, 3 subespecies y 22 variedades de pinos. El 55% de estos taxa son endémicos. Lo que nos convierte en la nación con mayor diversidad al contar con alrededor de 42% de las especies del mundo. Los pinos mexicanos son uno de los recursos naturales más valiosos por su uso tradicional y comercial, por su importancia cultural y por los servicios ambientales que ofrecen. A pesar de ello la continua disminución de la cobertura de los bosques de pino y pino-encino, por causa de las actividades humanas y por los incendios forestales, es alarmante (Sánchez, 2008). En México existen aproximadamente 35 especies endémicas de pino y 109 de encinos. Los bosques de coníferas y encino representan uno de los recursos forestales económicos más importantes de México. Particularmente el género *Pinus*, representado con más del 50% de sus especies maderables comerciales que conforma poco más del 85% de la producción forestal. Se encuentran desde los 300 msnm (metros sobre nivel del mar), como los pinares de las islas de Baja California hasta los 4 000 msnm en el Eje Neo volcánico, la Sierra Madre Oriental. El bosque de coníferas y encinos ocupa 322 672.8 km^2 del territorio mexicano, lo que representa el 16.4% y se extiende a lo largo de la Sierra Madre Occidental, la Sierra Madre Oriental y el Eje Neovolcánico donde México tiene primer lugar mundial por la variedad de pinos endémicos (INEGI, 2013).

2.4 Bosques estatales

Los tipos de vegetación en el estado de Puebla se encuentran principalmente distribuidos en tres grandes grupos que son los bosques, selvas y matorrales; el resto se agrupa en vegetación inducida e hidrófila y por supuesto las grandes zonas agrícolas que cubren nuestro estado (CONABIO 2011).

Los bosques de coníferas se encuentran principalmente en la Sierra Norte del estado de Puebla y ocupan 327 428.83 hectáreas que corresponden al 9.7 % de la superficie total del Estado. El bosque de encino está constituido principalmente por especies de *Quercus* (encino) y *Pinus* (pino); son bosques por lo general bajos, con troncos delgados y de crecimiento lento y ocupan el 4.89% de la superficie total del Estado con 165 216.79 hectáreas. Se distribuye a lo largo de una franja climática norte-sur, que comprende las laderas occidentales de la Sierra Madre Oriental y el Eje Neovolcánico, además de pequeñas zonas sobre laderas y lomeríos pertenecientes a la Sierra Madre del Sur (CONABIO 2011). Dentro de las especies maderables, las coníferas forman masas arbóreas puras o en asociación con especies de los géneros *Quercus* y *Alnus* en gran parte del área montañosa del estado de Puebla. De las 54 especies del género *Pinus* reportadas en México, 17 crecen en el Estado, siendo comunes los bosques dominados por *Pinus patula* en el norte (Ramírez y Villareal, 2011).

2.5. *Pinus patula*

Pinus patula es uno de los pinos mexicanos con mayor potencial productivo, debido a que es de rápido crecimiento, tiene buena conformación de copa y poda natural, su fuste es recto, y su madera es de calidad, al estar relativamente libre de nudos y presentar bajo contenido de resinas La distribución natural altitudinal de *P. patula* oscila entre 1.600 y 3.100 msnm (Nyoka 2002). *Pinus patula* se usa intensivamente en plantaciones con árboles mejorados en países de África y América, pero en su área de origen se aprovecha sólo del bosque natural y hay esfuerzos aislados como el establecimiento de áreas y huertos semilleros (Sáenz *et al.,* 1994; Rebolledo *et al.,* 1999; Valencia y Vargas, 2001).

2.6*. Pinus pseudostrobus*

En México es encontrado en Jalisco, Michoacán, Estado de México, Distrito Federal, Morelos, Puebla, Tlaxcala, Veracruz, Oaxaca, Guerrero y Chiapas (Perry, 1991).

Es buen productor de resina, es ampliamente explotada en los estados del centro y sur del país (Eguiluz, 1978). La madera es de buena calidad se usa en aserrío, triplay, chapa, para cajas de empaque, molduras, en la construcción, en la fabricación de ventanas y muebles finos, artesanías, ebanistería y pulpa para papel (CATIE 1997; Eguiluz, 1978). Es una especie recomendable para plantaciones comerciales, también para su uso ornamental en campos deportivos y parques, debido a que su follaje semicolgante desprende un aroma agradable a resina (Eguiluz, 1978).

2.7. Reforestación

México enfrenta procesos crecientes de deforestación, pérdida y degradación de los ecosistemas, generalmente relacionados con los avances de las fronteras agrícola y pecuaria. A través de los años la demanda de terrenos para agricultura, ganadería, desarrollos urbanos y turísticos ha destruido totalmente o degradado grandes superficies forestales, hoy convertidas en inmensos problemas ecológicos (Conafor 2010). La reforestación es una actividad forestal de más importancia cada año, debido a las altas tasas de deforestación. En México, se ha perdido cerca del 50% de la superficie arbolada, unos 44.2 millones de hectáreas, mayormente durante los últimos 60 años (Arriaga, 2000). En un país con casi 130 millones de personas existen grandes presiones sobre todos los recursos naturales. Aldana (2000) afirma que se debe reforestar 600 mil hectáreas anualmente para poder reemplazar las pérdidas en la cobertura vegetal.

2.8. Enfermedades de los pinos

Los organismos patógenos constituyen un componente importante en los ecosistemas forestales. Un gran número de ellos no causan daños severos, pero otros producen pérdidas significativas; entre los patógenos asociados a las semillas, viveros, plantaciones y madera se incluyen a las bacterias, virus y hongos. Estos últimos son los más frecuentes y de mayor importancia para las

especies forestales (Guerra *et al.,* 2004). Las enfermedades constituyen el principal factor que determina la dinámica de los ecosistemas forestales junto con las plagas, el fuego y las condiciones climáticas. Los hongos son los principales agentes causantes de enfermedades forestales pudiendo atacar diferentes partes de las plantas afectando su funcionamiento en varias formas por ejemplo, aquellos hongos que causan defoliación provocan una disminución en la tasa fotosintética; los causantes de cancros debilitan el tronco o reducen el transporte desde y hacia las raíces; los pudridores de raíz incrementan el riesgo a la caída por viento y reducen la absorción de agua y minerales (Pildain, M. B., A. de Errasti. 2011). Se ha demostrado que los daños visibles en el 93% de los árboles de *Pinus* y *Quercus,* fueron causados por patógenos fúngicos, encontrando que las enfermedades más frecuentes en *Pinus* son tizónes foliares y las royas de las acículas (García *et al.,* 2012).

En un catálogo del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), se menciona a los hongos que tienen como hospedero a *Pinus patula*: *Alternaria alternata, Alternaria tenuis*, *Aspergillus umbrosus*, *Cladosporium* spp., *Cylindrocarpon* spp*., Fusarium oxysporum, Fusarium roseaum*, *Pestalotia* spp., *Peyronellae* spp., *Phoma* spp., *Rhyzoctonia dichotoma* (Gómez y Contreras, 1981).

2.9. Pérdida de acículas

La infección se puede presentar a mediados o a finales de la época seca cuando maduran las acículas. Los síntomas de la enfermedad se pueden observar varias semanas después de la infección o posiblemente hasta el siguiente año (Guide of tree of Ontario 2003).

Lophodermium sp. se caracteriza por estar durante todo el ciclo de vida en el género *Pinus* sp. Se presenta en árboles poco desarrollados y débiles. En condiciones ambientales desfavorables puede causar defoliación. Los síntomas se presentan como manchas cloróticas que luego se necrosan para formar el cuerpo fructífero tipo apotecio. Cuando la severidad es mayor puede afectar a plantas

jóvenes. En una plantación que se encuentra en la fase de establecimiento puede afectar a toda la población de pinos hasta la pérdida total (Guide of tree of Ontario 2003).

En entornos naturales, *Lophodermium pinastri* coloniza las agujas sanas latentemente como endófita, inicia el crecimiento activo de las hifas al inicio de la senescencia de la aguja y esporula después de la abscisión de la aguja para infectar las agujas vivas de nuevo para completar su ciclo de vida. Este hongo es un colonizador dominante de agujas muertas en etapas tempranas y participa en la descomposición de la aguja como un saprófito (Hirose y Osono 2006).

2.10 Suelo

La Norma Oficial Mexicana (NOM-021-SEMARNAT-2000) define al suelo como una colección de cuerpos naturales formados por sólidos (minerales y orgánicos), líquidos y gases sobre la superficie de los terrenos. Presenta ya sea, horizontes o capas, que se diferencian del material de origen como resultados de adiciones o pérdidas, migraciones y transformaciones de energía y materia; o por la habilidad de soportar raíces de plantas en un ambiente natural (DOF, 2002). El suelo es un componente esencial de la "**Tierra**" y "**Ecosistemas**". Ambos son conceptos más amplios que abarcan la vegetación, el agua y el clima en el caso de la tierra, y además abarca también las consideraciones sociales y económicas en el caso de los ecosistemas (FAO 2016).

2.11. Importancia biológica de los microorganismos del suelo

El sistema radical de las plantas en el agrosistema se encuentra asociado con el ambiente inanimado, compuesto de sustancias orgánicas e inorgánicas y con una abundante comunidad de microorganismos metabólicamente activos. La región de la raíz en la que se presenta la proliferación de microorganismos se ha dividido en diferentes áreas como: rizoplano, el cual constituye la superficie de la raíz y la fina capa de suelo adherida firmemente a ella y la rizósfera, definida por Hiltner en 1904 como la región del suelo que es fuertemente influenciada por la raíz (Cante, 2011).

Los organismos del suelo aportan una amplia gama de servicios esenciales para el funcionamiento sostenible de todos los ecosistemas, al actuar como los principales agentes conductores en los ciclos de nutrientes; regulando las dinámicas de la materia orgánica del suelo, la fijación del carbono del mismo y las emisiones de gases invernadero; modificando la estructura física del suelo y los regímenes del agua; aumentando la cantidad y la eficiencia en la absorción de nutrientes por la vegetación; y mejorando la salud de las plantas. Estos servicios no son sólo esenciales para el funcionamiento de los ecosistemas naturales, sino que también constituyen un importante recurso para la gestión sostenible de los sistemas agrícolas (FAO 2008). La actividad microbiana es importante para mantener la fertilidad del suelo y en la nutrición de las plantas (Álvarez y Anzueto 2004).

2.12. Control biológico

El control biológico es una práctica muy importante para el manejo de plagas, que consiste en la utilización de organismos vivos para reducir y mantener la abundancia poblacional de una plaga por debajo de los niveles de daño económico. Su valor recae en que puede resultar en un control eficiente de una plaga tanto a mediano como a largo plazo, compatible con un bajo riesgo ambiental y una producción sustentable. Resulta fundamental para los programas de control biológico considerar la ecología, biología y comportamiento de los enemigos naturales de la plaga y de la plaga misma, además de aquellos factores que podrían ser causantes de cambios poblacionales (Fischbein, 2012). El control biológico es un método que emplea organismos vivos para reducir la densidad de la población de otros organismos plaga. Una plaga es cualquier organismo que produce un daño o reduce la disponibilidad y la calidad de un recurso humano (Hajek, 2004). Se han hecho numerosos estudios para utilizar los organismos quitinolíticos como controladores naturales de hongos patógenos y nematodos; no obstante, estos estudios han procurado identificar el efecto de las quitinasas sobre la estructura de los estadios larvales en insectos y en hongos. Por ejemplo, desde 1963 Mitchell y Alexander observaron que todas las bacterias micolíticas

producían quitinasa, lo cual podía degradar la pared celular del hongo que contenía quitina, como uno de sus principales componentes (Okumoto *et al.,* 2001).

Clorotalonil

Entre los fungicidas disponibles actualmente en el ámbito mundial, los más utilizados forman parte de los siguientes grupos químicos: ditiocarbamatos, clorotalonil, benzimidazoles, morfolinas, triazoles, inhibidores (DMI) y estrobirulinas]. El clorotalonil, es un fungicida de acción preventiva, protectora (contacto) y curativa de amplio espectro. Tiene una acción local sistémica, de alta persistencia para el control de enfermedades fungosas producidas por ascomicetos, hongos imperfectos y varios basidiomicetos, en frutales, hortalizas, plantas ornamentales y otros cultivos (Lazo *et al*., 2012).

2.13. Antagonismo microbiano

En el mundo biológico existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen para que en la mayoría de los casos no desarrollen la enfermedad. En las plantas, los microorganismos están en un equilibrio dinámico en su superficie en condiciones naturales (Orrieta y Larrea 2001). Cuando las poblaciones de organismos se encuentran reducidas debido a las acciones naturales de sus depredadores, parásitos, antagonistas y enfermedades, el proceso se conoce como “control natural”, pero cuando se utiliza para el control de plagas es llamado control biológico o biocontrol (Hajek E. Ann 2004).

Las características óptimas que debe poseer un antagonista microbiano útil en cultivos vegetales son: ser genéticamente estable, eficaz a bajas concentraciones, hábil para sobrevivir condiciones adversas del medio ambiente, incluyendo refrigeración y almacenamiento controlado, resistente al ataque de hiperparásitos, efectivo para una amplia gama de microorganismos patógenos en una variedad de frutas y hortalizas, fácil de producir en medios de bajo costo, compatible con procedimientos de procesos comerciales, poder establecerse con rapidez para minimizar la destrucción realizada por la plaga, no ser patogénico en el hospedero

y que no produzca metabolitos secundarios dañinos a la salud humana (Baños, 2006)

2.14. Competencia

La competencia constituye un mecanismo de antagonismo muy importante. Se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes), siempre y cuando la utilización de este por uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás. Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características del agente control biológico como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, y por otro lado por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, entre otros (Ahmad-Baker 1987; Hjeljord-Tronsmo 1998).

2.1.5. Fungistasis y Micoparasitismo

Un buen antagonista es capaz de superar el efecto fungistático que resulta de la presencia de diferentes metabolitos producidos por otras especies, incluyendo plantas y sobrevivir bajo condiciones adversas o competitivas (Benítez *et al*., 2004)

El ataque directo de un hongo a otro es un proceso muy complejo que involucra eventos secuenciales, incluye reconocimiento, ataque y penetración subsecuente y muerte al huésped. *Trichoderma* spp. puede ejercer control directo por el rango de parasitismo de hongo, detectando otros hongos y creciendo sobre el (Benítez et al., 2004).

La capacidad antagonista de *Trichoderma* es muy variable, el Micoparasitismo que presenta es un proceso complejo que incluye una serie de eventos sucesivos. Cuando el antagonista hace contacto físico con el fitopatógeno, sus hifas se enrollan alrededor de éste o se le adhieren por medio de estructuras especializadas (Manocha y Sahai, 1993; Cuervo-Parra *et al.,* 2011a). La interacción que presenta *Trichoderma* con su huésped es específica y está

controlada por lectinas, presentes en su pared celular. Las observaciones al microscopio electrónico muestran que *Trichoderma* produce y secreta enzimas micolíticas responsables de la degradación parcial de la pared celular de su huésped (Cuervo-Parra *et al.,* 2011a).

Competencia por los nutrientes. El hambre es lo más común. causa de muerte de los microorganismos, por lo que la competencia por limitar los nutrientes da como resultado el control biológico de fitopatógenos fúngicos (Chet *et al*., 1997).

Se ha demostrado que las bacterias del género *Bacillus* presentan un gran potencial como antagonistas, principalmente por la gran cantidad de enzimas líticas, antibióticos y otras sustancias con actividad biocida, que son capaces de producir efectos de control sobre varias especies de organismos fitopatógenos (Sosa *et al*., 2005; Castillo-Reyes *et al*., 2015). El efecto biocontrolador *de Bacillus* spp. frente a Fusarium spp. bajo condiciones de invernadero en el cultivo de Romero (Rosmarinus officinalis L) fue evaluado por (Corrales *et al*., 2011), obteniendo que todos los aislamientos de Bacillus spp., presentaron efecto biocontrolador sobre *Fusarium* spp. en romero al disminuir la severidad de la marchitez vascular en las plántulas por debajo del 50%, lo que valida los resultados obtenidos en las pruebas in vitro y lo señalado en la literatura acerca de estas bacterias.

3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años los bosques de pinos de la Sierra Norte de Puebla están siendo severamente afectados por enfermedades fúngicas. Por lo tanto, en el presente proyecto se estudiará a los hongos asociados a las acículas de las plantas de pino de las especies *Pinus patula* y *Pinus pseudostrobus* con síntomas de enfermedad, para obtener una colección de hongos asociados a la enfermedad e identificación de los mismos. Se busca una alternativa biológica con el uso de bacterias, para disminuir la patología en los pinos en ensayos de invernadero.

Este estudio tendrá un alto beneficio en las comunidades de la Sierra Norte de Puebla, ya que estos árboles disminuyen la erosión del suelo, filtran contaminantes que dañan los mantos acuíferos y agua superficial. También proveen madera, leña, resinas entre otros productos con un valor económico muy importante en la zona para sus habitantes.

Además, se tendrá un conocimiento nuevo de las poblaciones fúngicas y bacterianas en las acículas de dichos pinos antes mencionados obteniendo una colección de hongos asociados a la enfermedad e identificación de los mismos. Se buscará una alternativa biológica con el uso de bacterias, para disminuir la patología en los pinos en ensayos de invernadero.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Realizar el aislamiento, identificación y pruebas de antagonismo entre bacterias y hongos causantes de la defoliación de Pinos de la Sierra Norte de Puebla.

4.2. Objetivos específicos.

- Efectuar el aislamiento de hongos en muestras de acículas infectadas de *Pinus patula* y *Pinus pseudostrobus* procedentes de la Sierra Norte de Puebla.

- Formar una colección de hongos aislados de acículas infectadas de *Pinus patula* y *Pinus pseudostrobus.*

- Identificar los hongos causantes de la caída foliar que afectan a *Pinus patula* y *Pinus pseudostrobus* de la Sierra Norte de Puebla.

- Caracterizar las bacterias aisladas de bosque más eficientes con actividad anti fúngica en *Pinus patula* mediante sistemas bioquímicos para realizar prueba de antagonismo.

- Realizar prueba de antagonismo microbiano entre bacterias y hongos que causen enfermedades en ensayos *in vitro*.

- Realizar pruebas de inoculación de bacterias antagonistas en *Pinus patula* y *Pinus pseudostrobus* previamente infectados por hongos patógenos.

5. HIPÓTESIS

Es posible disminuir las enfermedades causantes de la caída foliar en arboles de pino en condiciones de invernadero, utilizando bacterias antagonistas de crecimiento fúngico.

6. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Sede y lugar de estudio

Bosques de los municipios de Amixtlán Puebla, Méx. y Zacatlán Puebla, Méx.

Tipo de estudio

Se realizó un estudio aleatorio, prospectivo y transversal de las muestras de acículas de pinos.

Tamaño de muestra

De la zona de estudio se recolectaron cinco muestras representativas.

Periodo de muestreo

Septiembre 2022

Criterios de inclusión

Muestras de acículas con evidencia de daño foliar

Criterios de exclusión

Se rechazaron muestras de acículas con ausencia de daño.

Análisis estadístico de la información

Los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza y prueba de comparación de medias para observar las diferencias existentes entre los diferentes tratamientos y se utilizara la prueba de Tukey con $P \leq 0.05$

Recursos humanos

Directora de tesis: Dra. Lucía López Reyes

Co-director de tesis: M.C. Moisés Carcaño Montiel

Tesista: Manuel Jonathan Rivera Sosa

Recursos materiales

Material de vidrio y plástico, equipos, medios de cultivo, reactivos, materiales de invernadero y sustratos vegetales que serán suministrados por el cuerpo académico de Microbiología Suelos del CICM ICUAP.

Recursos financieros

Esta investigación fue financiada por el proyecto BUAP–CONAFOR **“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS PATÓGENOS EN ESPECIES DE PINOS DE LA SIERRA NORTE DE PUEBLA”** y con apoyo de redes temáticas de colaboración académica SEP-PRODEP (Modelos microbianos de importancia agrobiotecnológica). Con el proyecto: Identificación y caracterización de microorganismos de interés agrobiotecnológico.

7. METODOLOGÍA

7.1 Recepción de muestra.

Las muestras de pinos se recibieron en el Laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la BUAP, ubicado en el Edificio IC-11 en Ciudad Universitaria Puebla, Pue. Donde se observaron macroscópicamente las lesiones que se presentaron en acículas y tallos, posteriormente se sembraron en un medio de cultivo. Se tomaron fotos de resguardo.

7.2 Registro de datos

Se llevaron a cabo las siguientes actividades: recibir, revisar, registrar, identificar, procesar, analizar, almacenar y descartar las muestras.

7.3 Aislamiento de hongos y bacterias

7.3.1 Lavado de acículas

Primero se realizaron cortes de 3-5 cm de largo de las acículas donde se presentó la lesión. Después se trataron los cortes enfermos de cada una de las especies de *Pinus* con una solución de hipoclorito de sodio al 6%, se lavaron tres veces con agua destilada estéril para evitar la presencia de microorganismos saprófitos del árbol.

7.3.2 Sembrado de acículas en cajas Petri con medio PDA

Las acículas fueron desinfectadas y se procedió a colocarlas de dos a tres en cajas Petri con medio PDA. Se mantuvieron a una temperatura de 30°C de dos a tres días y se observó el crecimiento de hongos y bacterias.

7.3.3 Cámara húmeda

Se utilizaron cajas de Petri de vidrio sin división, papel absorbente y agua destilada estériles, también se utilizó un recipiente de plástico con tapa y cajas de Petri de vidrio que se emplearon como base.

7.3.4. Sembrado en placa de PDA

Se empleo el medio selectivo Agar Papa Dextrosa para hongos, cuando crecieron uno o más hongos en cámara húmeda, se procedió a tomar cuidadosamente un inóculo del hongo con el asa bacteriológica en punta y se depositaron en la placa de PDA para su purificación.

7.3.5. Sembrado en placa de TSA

Se uso el medio Agar Soya tripticaseína para bacterias, cuando crecieron una o más colonias en cámara húmeda, se procedió a tomar cuidadosamente un inóculo de la bacteria con el asa bacteriológica con terminación en aro y se depositaron en la placa de TSA para su purificación.

7.3.6. Conservación de cepas

Para los hongos se realizó la conservación en aceite mineral y caldo de papa.

Para las bacterias se realizó un crecimiento masivo en caldo soya tripticasa posteriormente se conservó en caldo triptona de soya y se llevo a ultracongelación.

7.4 Identificación de hongos

7.4.1. Microcultivo

Consistió en inocular el hongo con aguja estéril pequeños cubos de medio PDA con aproximadamente 1 x 1 cm dispuestos sobre portaobjetos, la cual estuvo dentro de una cámara húmeda. Posteriormente se colocó un cubreobjetos. Tras varios días, cuando el crecimiento sobre el bloque fue evidente, se recogió el cubreobjetos y portaobjetos con una pinza estéril y se instaló sobre un portaobjetos donde previamente fue colocada una gota azul de metileno y el portaobjetos donde estuvo el medio, se le agregó una gota de azul de metileno. Y se selló para su conservación.

7.4.2. Observación a microscopio

Se observaron las estructuras de los distintos hongos primero a 10X para enfocar todo el campo. Posteriormente se colocó el lente de 40X para su interpretación e identificación a través de bibliografías, manuales, y otros. Finalmente, para enfocar una imagen de interés se observó a 100X.

7.5. Caracterización de bacterias

Una vez teniendo las cepas bacterianas puras, se tomó inóculo de una a dos colonias de bacterias de cada cepa y se adiciono en tubo de ensaye con caldo soya tripticasa y se dejó crecer 24 horas. Después se ajustó la población bacteriana con la escala de McFarland 0.5 y se colocaron en el sistema bioquímico de galerías API de Biomerieux 20NE. Los Apis se dejaron en Incubación a 30 °C durante 48 h y se anotaron resultados.

7.6. Antagonismo en placa

Los ensayos se realizaron en agar de infusión de papa con minerales, las bacterias se propagaron en caldo soya tripticaseína por 24 h a 30 °C hasta tener una población de 10^8 UFC mL^{-1}. El método usado consistió en la inhibición del crecimiento radial del hongo que se determinó con el registro del diámetro del crecimiento radial del hongo en presencia de las bacterias antagonistas y como control se sembró el hongo en ausencia de bacterias.

7.7. Biodegradación de micelio fúngico con bacterias quitinolíticas

Se ensayó con bacterias que tienen mayor actividad quitinolítica contra los hongos representativos de daño en acículas de pino. Los ensayos se realizaron en Medio Papa para propagación de hongos; se inocularon los frascos de Medio Papa con esporas de cada hongo y se dejaron en agitación a 160 rpm durante 5 días a temperatura ambiente con luminosidad. Posteriormente se esterilizaron los frascos con micelio durante 40 minutos, después se centrifugaron durante 15 minutos a 5000 rpm, se decantó el exceso de líquido. Después se le agrego agua estéril y agito en vortex 20 segundos, este paso se repitió 3 veces. Posteriormente se

decantó al vaso de licuadora agregando 50ml de agua estéril y se molió. Posteriormente se adicionaron 150 ml de medio mínimo más 25 ml de micelio. Las bacterias se propagaron en caldo soya tripticaseína por 24 h a 30 °C hasta tener una población de 10^8 UFC mL^{-1}. El método usado consistió en la solubilización radial del micelio en placa que se determinó con el registro del diámetro del halo de degradación en presencia de las bacterias antagonistas y como control se sembraron bacterias sin solubilización de quitina.

7.8. Antagonismo entre bacterias y hongos en invernadero.

Se realizaron ensayos en plantas de pino en condiciones de invernadero dónde se incluyeron a *P. patula* y *P. pseudostrobus* de 20 cm de altura, las cuales se trasplantaron en un sustrato de crecimiento compuesto de Peatmoss:suelo:composta:perlita:vermiculita:hojarasca (2.5:50:20:15:2.5:10). Manteniendo la humedad relativa alrededor del 80 % con agua destilada y a una temperatura promedio de 30°C. Se inocularon los hongos y bacterias antagonistas en 13 tratamientos que incluyeron bacterias antagónicas y hongos patógenos (solos y combinados) y un control sin inocular y con cinco repeticiones cada uno, se evaluaron a los seis meses daños foliares desde decoloración de acículas y manchas oscura.

7.9 Diseño experimental

Cuadro 1. Tratamientos de *Pinus Patula* en Invernadero.

Tratamientos	Volumen utilizado para inoculo mL
*Burkholderia cepacia(*B1)	35
Aeromonas sp (B2)	35
Clorotalonil	(200 g 100 L)
Control	--------
Burkholderia cepacia + *Colletotrichum boniense* (B1+ H1)	35
Burkholderia cepacia + *Diplodia seriata* (B1+ H2)	35
Aeromonas sp+ *Colletotrichum boniense* (B2+H1)	35+35
Aeromonas sp + *Diplodia seriata* (B2+H2)	35+35
Colletotrichum boniense(H1)	35+35
Diplodia seriata (H2)	35+35
Colletotrichum boniense + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp (H1+B1+B2)	35+17.5+17.5
Diplodia seriata + *Burkholderia cepacia*+ *Aeromonas* sp (H2+B1+B2)	35+17.5+17.5
Colletotrichum boniense + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp (H1+B1+B2) PICADURA	35+17.5+17.5
Diplodia seriata + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp (H2+B1+B2) PICADURA	35+17.5+17.5

Cuadro 1. Se observan los tratamientos que se aplicaron a los árboles de *Pinus patula*, las bacterias que se usaron para el ensayo de invernadero fueron *Burkholderia cepacia* y *Aeromonas* sp. También se muestran los hongos que fueron seleccionados para la prueba de antagonismo los cuales fueron *Colletotrichum boniense* y *Diplodia seriata.* En la columna de la derecha se plasma el volumen de inoculo utilizado para cada tratamiento.

Cuadro 2. Tratamientos de *Pinus pseudsotrobus* en invernadero

Nomenclatura	Volumen utilizado para inoculo mL
Control	--------
Clorotalonil	(200 g/100 ml)
Burkholderia cepacia (B1)	35
Aeromonas sp (B2)	35
Diplodia seriata (H1)	35+35
Biscougnauxia mediterrenea (H2	35+35
Burkholderia cepacia + *Diplodia seriata* (B1+ H1)	35
Burkholderia cepacia+ Biscougnauxia mediterránea (B1+ H2)	35
Aeromonas sp. + Diplodia seriata (B2+H1)	35+35
Aeromonas sp. + Biscougnauxia mediterrenea (B2+H2)	35+35
Diplodia seriata + Burkholderia + Aeromonas sp. (H1+B1+B2)	35+17.5+17.5
Biscougnauxia mediterrenea + Burkholderia cepacia + Aeromonas sp (H2+B1+B2	35+17.5+17.5
Diplodia seriata + Burkholderia cepacia + Aeromonas sp. (H1+B1+B2) PICADURA	35+17.5+17.5
Biscougnauxia mediterrenea + Burkholderia cepacia + Aeromonas sp. (H2+B1+B2) PICADURA	35+17.5+17.5

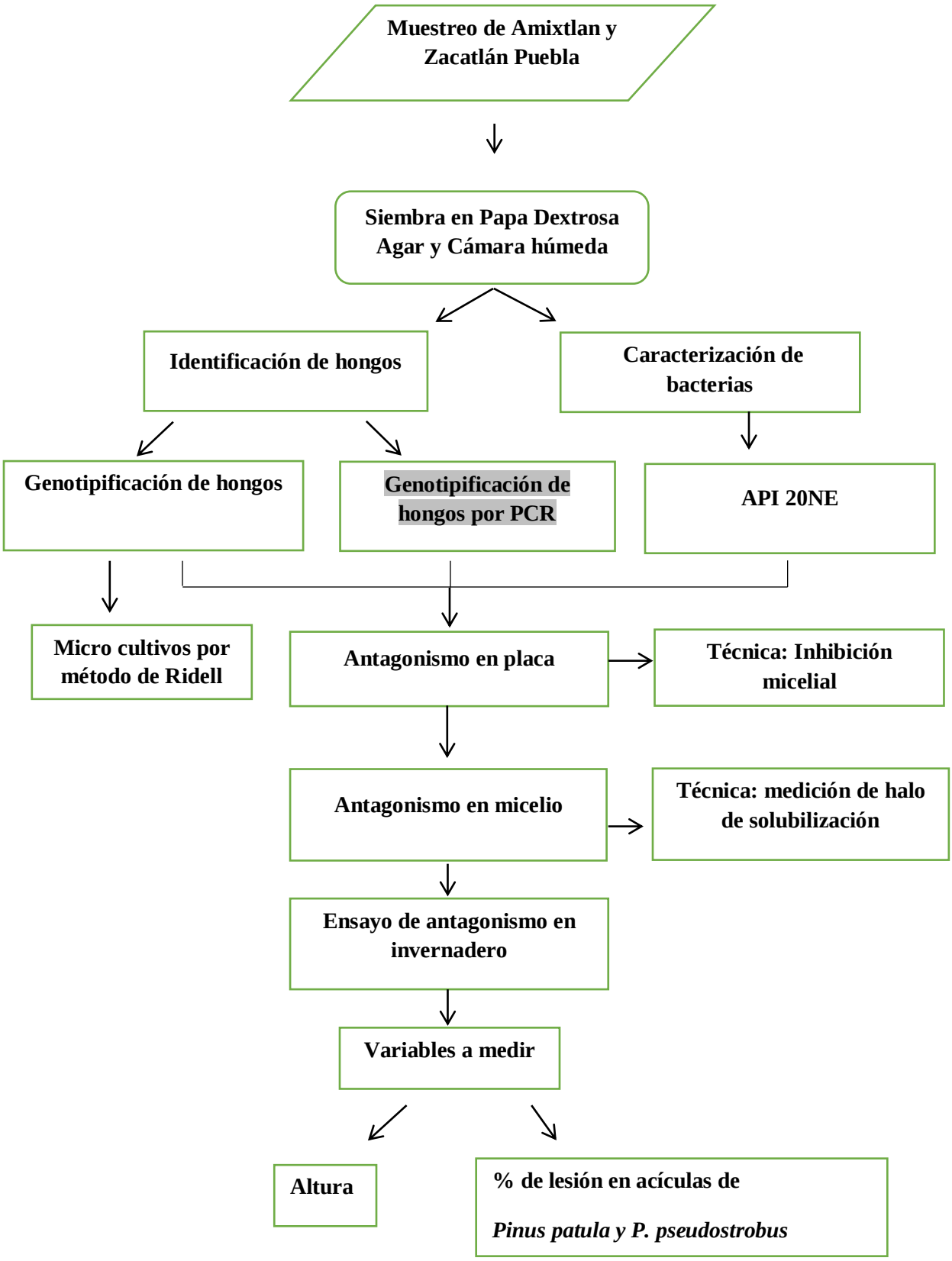
Cuadro 2. Se observan los tratamientos que se aplicaron a los árboles de *Pinus pseudostrobus*, las bacterias que se usaron para el ensayo de invernadero fueron *Burkholderia cepacia* y *Aeromonas* sp. También se muestran los hongos que fueron seleccionados para la prueba de antagonismo los cuales fueron Diplodia *seriata y Biscougnauxia mediterránea.* En la columna de la derecha se plasma el volumen de inoculo utilizado para cada tratamiento.

7.9.1 Análisis estadístico

Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) en el diseño experimental, que prueba la hipótesis de que las medias de dos o más poblaciones son iguales.

Los ANOVA evalúan la importancia de uno o más factores al comparar las medias de la variable de respuesta en los diferentes niveles de los factores (Barón, 2006). Se aplicó ANOVA y la comparación entre pares usando una prueba de Tukey, ambos con un valor de significancia $p \leq 0.05$ El ANOVA de un solo factor es una prueba de hipótesis que evalúa dos enunciados. La hipótesis nula ($H0$), todas las medias grupales son iguales. Contra, la hipótesis alternativa (HA), alguna de las medias grupales es distinta. Es decir: Si, (p-valor) > 0.05 aceptamos $H0$ → todas las medias grupales son iguales. Si, (p-valor) < 0.05 rechazamos $H0$ → alguna de las medias grupales es distinta.

ESQUEMA GENERAL



Zona de estudio

Se recolectaron acículas de pino de las especies *Pinus patula* y *P. pseudostrobus* con síntomas de enfermedad presentes en las mismas, procedentes de la Sierra Norte de Puebla, México. Localizadas en los municipios de Zacatlán (19° 53´ 43.71´´N) (97° 54´ 20.1¨

O), Amixtlan (20° 04´ 36.3¨ N) (97° 47´26.1´´O) y Aquixtla (19° 47´ 15.8¨ N) (97° 52´3.5¨ O).

Se observa en la (Figura 1) la localización donde fueron recolectadas las muestras de acículas de los pinos enfermos de las especies de pino plasmadas anteriormente, cabe resaltar que los bosques son en su totalidad de coníferas que es de suma importancia en la derrama económica, social y cultural en los habitantes de la región de la Sierra Norte de Puebla.

8. RESULTADOS

8.1. Aislamiento de hongos

Durante el proceso de aislamiento se obtuvieron 26 hongos diferentes asociados a pinos de los cuales 21 proceden de *P. patula* y 5 de *P. pseudsotrobus* a partir de acículas infectadas. Se detectaron diferentes especies fúngicas asociadas a pino, dentro de las que se encuentran especies saprófitas y patógenas.

Se observaron los braquiblastos que contienen las acículas de *P. patula* de la región de Amixtlan Puebla (Figura 2a). Acículas con presencia de descoloramiento amarillo a café con oscurecimiento de la parte foliar dañada (Figura 2b). Sembrado de acículas en medio PDA con crecimiento fúngico (Figura 2c). Se incubaron a 30 °C.

Figura 2 Características de acículas con enfermedad en *Pinus patula* a) braquiblastos con daño foliar, b) acículas con síntomas de enfermedad, c) crecimiento fúngico en medio PDA.

Se obtuvieron las cepas de hongos puros en medio PDA correspondiente a *Pinus patula* de la región de Amixtlan Puebla y se anotaron sus características macroscópicas de los hongos. Figura 3 (1,2,3) posteriormente se resguardaron en el revco del laboratorio de microbiología de suelos

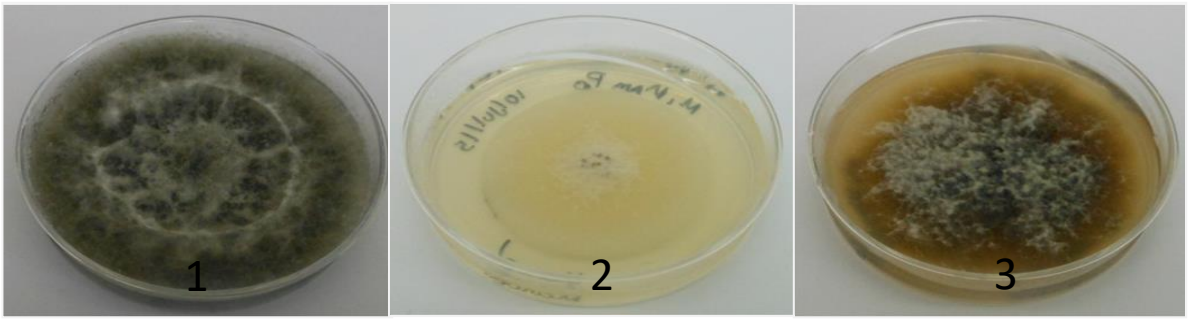


Figura 3 hongos puros en medio Agar Papa Dextrosa de *Pinus patula* región de Amixtlan Puebla. Mex.

Pinus pseudsotrobus

Acículas de *Pinus pseudsotrobus* con aparente daño foliar (Figura 4a).al observar en estereoscopio la acícula se pudo ver la lesión en color café. (Figura 4b), sembrado de acículas en media PDA con crecimiento fúngico (Figura 4c).

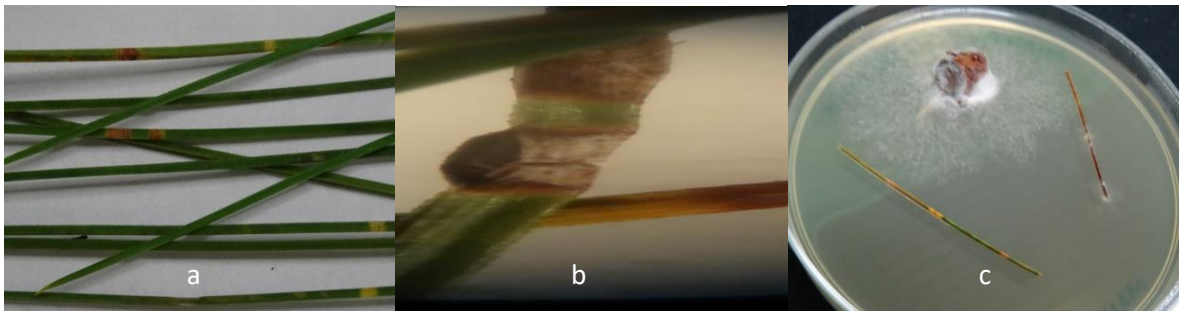


Figura 4 Características de la enfermedad: en *Pinus pseudostrobus* a) síntomas de acícula de *P. pseudsotrobus* b) acículas de *Pinus Pseudsotrobus* con infección c). sembrado en PDA

Hongos aislados y purificados en medio PDA, obtenidos de acículas de *Pinus Pseudsotrobus* con presencia de la enfermedad. (Figura 5 a, b, c, d)

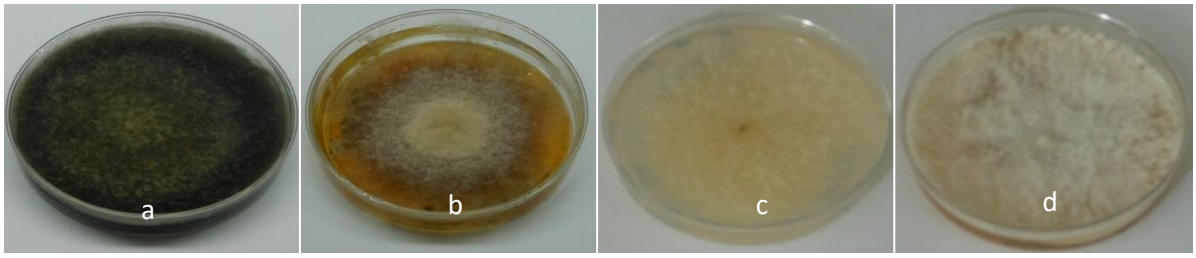


Figura 5 Hongos puros aislados de acículas enfermas de *Pinus Pseudsotrobus* de la región de Zacatlán Puebla.

8.2. Identificación de hongos

Técnica de microcultivos

Esta técnica se observa en la (Figura 6 a, b) se llevó a cabo en las inmediaciones de laboratorio, para la identificación de los hongos de importancia patológica en las especies de Pinus de la Sierra Norte de Puebla. Se distinguieron los hongos seleccionados *Diplodia seriata, Colletotrichum boniense*, y *Biscougnauxia mediterranea.*

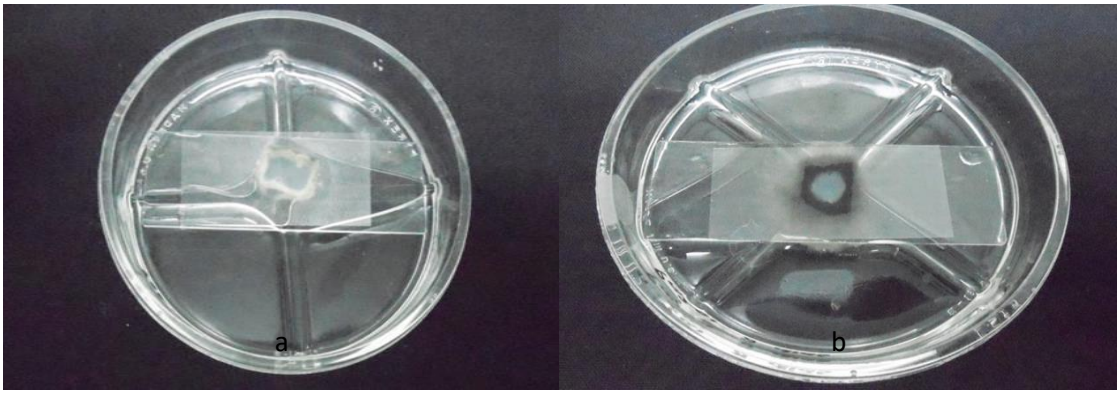


Figura 6 Microcultivo de hongos aislados de *Pinus Patula y Pinus Pseudostrobus*

Se identificaron molecularmente seis hongos de *P. patula* y dos hongos de *P. pseudostrobus.* (cuadro 3) representativos y presentes en las lesiones de acículas de pino, lugar dónde se han encontrado desarrollando diferentes especies causantes de la caída foliar y muerte de árboles (Lilja *et al.,* 2010). Los hongos más frecuentes asociados a la enfermedad de los pinos fueron *Diplodia* sp*.* ya que se encontró en árboles de los bosques de Aquixtla, Amixtlan y Zacatlán infectando a *P. patula* y *P pseudostrobus*. Además, se encontró a otros géneros patógenos como *Colletotrichum, Hypocreales, Alternaria, Penicillium y Biscogniauxia*.

Todos los hongos asociados a las acículas de pino son considerados como especies patógenas, aunque es importante resaltar la mayor incidencia de *Diplodia* sp*.* ya se considera como un patógeno que causa enfermedades graves en coníferas (Cram *et al.,* 2012).

Cuadro 3. Resultados de identificación hongos por PCR

Planta	Municipio de Puebla, México	Clave	Género	Identificación %
P. patula	Amixtlán	PpAm3	*Colletotrichum boniense*	99
P. patula	Amixtlán	PpAm5	*Diplodia seriata.*	98
P. patula	Aquixtla	PpAq3	*Diplodia* sp.	99
P. patula	Aquixtla	PpAq8	*Hypocreales sp.*	*98*
P. patula	Zacatlán	PpZa6	*Alternaria* sp.	99
P. patula	Zacatlán	PpZa3	*Penicillium* sp.	98
P. pseudostrobus	Zacatlán	PpsZa1	*Diplodia seriata*.	99
P. pseudostrobus	Zacatlán	PpsZa2	*Biscogniauxia mediterranium*	99

Cuadro 3. Se seleccionaron 4 hongos patógenos encontrados en las especies *de P. patula* y *P. pseudostrobus* dada su importancia económica en esta región. En esta etapa se observaron macro y microscópicamente los hongos de interés.

En la figura 6. Se plasmo el esquema de figuras a, b, c y se observaron los síntomas en las acículas del árbol de Pinus patula con un crecimiento fúngico en medio de cultivo de PDA, el color característico es pigmentación obscura en el fondo con desarrollo algodonoso en la parte superior.

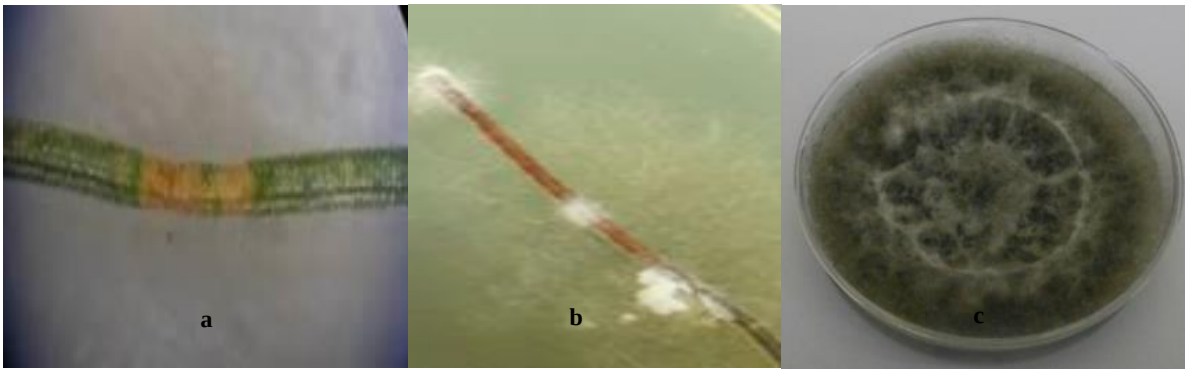


Figura 6.Hongo *Dipodia seriata proveniente* de *P. patula* de Amixtlan Puebla, México.

Observación de hongos al microscopio y macroscópica

Hongo puro en medio PDA con un crecimiento algodonoso de color negro tornando a un gris en la parte central que se refiere a *Diplodia seriata* observación en microscopio con crecimiento de hifas segmentadas, aislado de *Pinus Patula* (figura 7a). Crecimiento de hongo diplodia aislado de acículas de *Pinus pseudsotrobus* (figura 7b). Hongo *Colletotrichum boniense* patógeno en pimiento (figura 7c). *Biscougnauxia mediterránea* patógeno de encinos.

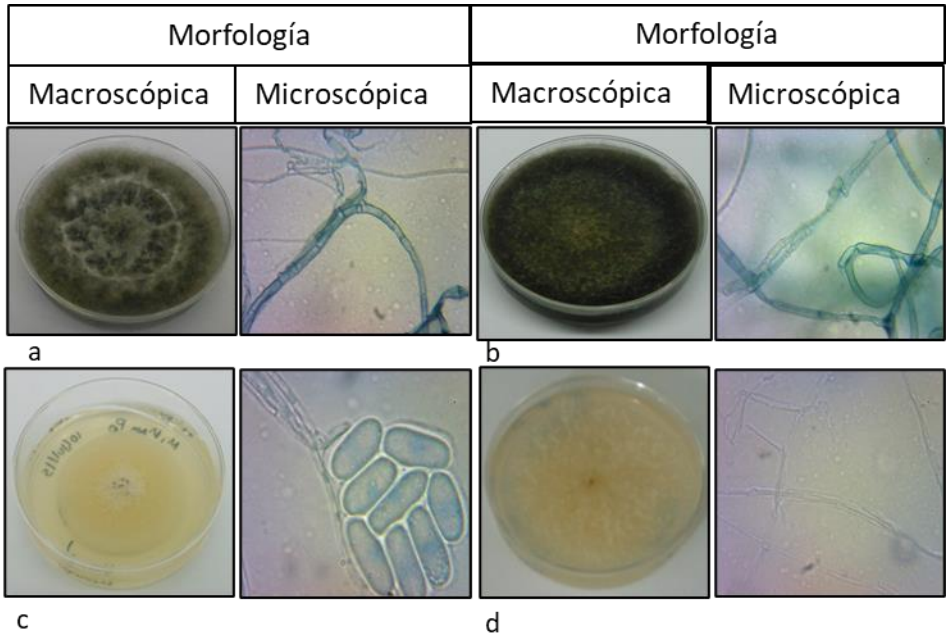


Figura (7) Características macroscópicas y microscópicas de hongos seleccionados para las pruebas de antagonismo. a) diplodia seriata en *Pinus patula* b) diplodia seriata en *Pinus pseudostrobus* c) *Colletotrichum boniense, Pinus patula* d) *Biscougnauxia mediterránea*.

8.3. Aislamiento de bacterias

Se detectó que, de las 22 bacterias aisladas de bosque, el 41% mostró actividad quitinolítica mismas que produjeron la inhibición de los hongos asociados a las acículas de pino, lo que puede estar involucrado en los mecanismos de inhibición de hongos patógenos (Ramírez y Kloepper, 2012). Las bacterias identificadas por el sistema Api 20 NE, más eficientes fueron *Burkholderia cepacia* (P3S-B) y *Aeromonas* sp. (P1R-D), procedentes de bosque y se utilizaron en los ensayos en plantas de pino.

8.4. Antagonismo en placa

Los hongos de los géneros *Colletotrichum boniense* (PpAm3) y *Diplodia seriata*. (PpAm5) provenientes de *Pinus patula* del Municipio de Amixtlan se utilizaron para el ensayo de antagonismo.

La evaluación mostró que los hongos fitopatógenos disminuyen su crecimiento en presencia de las bacterias antagonistas (Figura 8 b) se observó el crecimiento del hongo *Diplodia seriata*. En la figura 8 a y b se notó la inhibición del hongo con las bacterias que se utilizaron en el ensayo. Las enfermedades por hongos son de gran interés ya que por ejemplo *Diplodia seriata* es un patógeno que causa efectos adversos en las plantas. (Cram *et al.,* 2012).

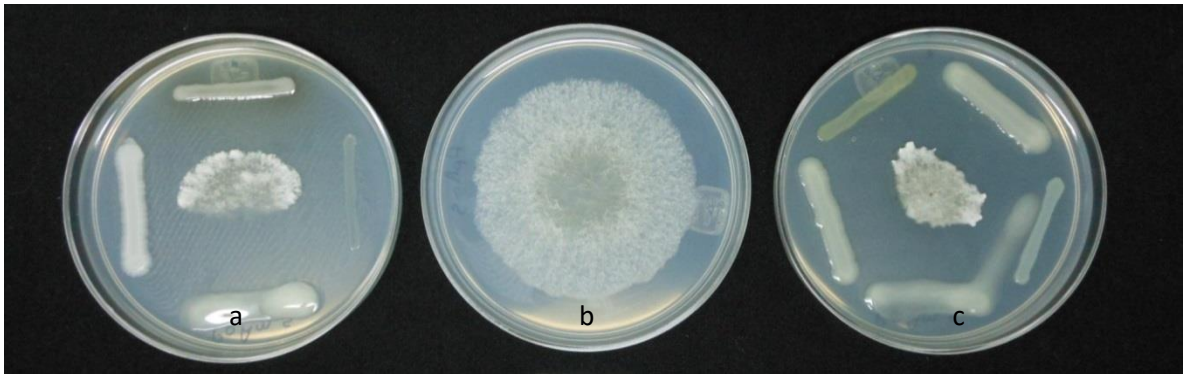


Figura 8. Ensayo de antagonismo entre bacterias aisladas de pino y *Diplodia* sp. proveniente de *P. patula* de Amixtlan, Puebla, México.

El crecimiento radial del hongo nos indica un efecto inhibitorio de los metabolitos producidos por las bacterias que se aislaron de las muestras de pinos. Se seleccionaron 11 bacterias de los suelos de bosques de Puebla que estaban en congelación, para hacer la prueba de antagonismo. Se realizaron tres mediciones del crecimiento radial del hongo, la primera fue a las 72 horas, la segunda a las 90 horas y posteriormente se realizó la última medición a las 120 horas. (Figura 9). La cepa de *Burkholderia cepacia* fue la que mejor inhibió el crecimiento del hongo *Diplodia seriata.*

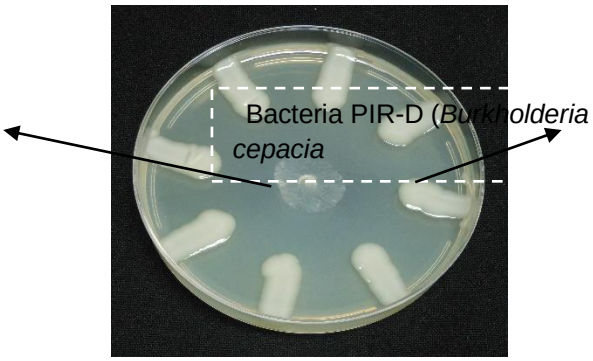


Figura 9. Inhibición del crecimiento fúngico de la cepa *Burkholderia cepacia* sobre el hongo *Diplodia seriata.*

En el cuadro 4 se observó el crecimiento radial del hongo con la inoculación de las bacterias antagonistas seleccionadas

Cuadro 4. Crecimiento radial del hongo *Diplodia seriata* con bacterias antagonistas.

Cepa	Crecimiento de hongo
M1MIPm	6.53± 0.85 a
CONTROL	5.97± 0.74 a
(-3 M.C Pps H1)	3.66± 0.37 b
CA48	3.04± 0.40 bc
P34	3.01± 0.38 bc
P3S-B +	2.41± 0.25 cd
P7R-A	2.21± 0.07 de
AM12	2.18± 0.13 de
PIR-D	2.03± 0.00 de
P3S-B	1.87± 0.00 de
P5S-A	1.67± 0.06 e

Se evaluaron las bacterias con mayor actividad quitonolitica las 3 mejores cepas fueron PIR-D, P3S-B Y P5S-A, que presentaron un menor crecimiento del hongo a nivel placa por lo tanto se seleccionaron 2 cepas *Burkholderia cepacia* (PIR-D) Y *Aeromonas* sp (P3S-B)

8.5. Índice de degradación de micelio

Para obtener el halo de degradación se utilizó la siguiente formula:

Índice de Solubilización: **A/B**

A = diámetro (colonia + zona de halo)

B = diámetro de la colonia

Cuadro 5. Halo de degradación de micelio

Hongo	AM12	(-)3MZ Pps 2	P1R-D	P5S-A	P34	P3S-B	CA48
Diplodia seriata (Pps Za 1)	1.1	-----	-----	-----	1.07	-----	-----
Biscougnuaxia mediterranea (Pps Za 2)	1.31	1.13	1.19	1.13	1.32	-----	-----
Colletotrichum boniense (Pp Am5)	1.33	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Diplodia seriata (Pp Am3)	1.62	-----	-----	----	----	-----	-----

En la evaluación del halo de degradación de micelio en placa, se observó (Cuadro 5) que las bacterias con un efecto antagónico son AM12, interviniendo en degradación de micelio de los hongos *Diplodia seriata* y *Biscougnauxia mediterránea* de *Pinus pseudostrobus*, asimismo de los hongos *Diplodia seriata* con *Colletotrichum boniense* en *Pinus patula* (-)3MZ Pps 2, PIR-D, P5S-A, P34, de estas cepas se encontró que degradan el hongo *Biscougnuaxia mediterranea* similar en el halo sin embargo en la cepa P34 se observó que además degrada el hongo *Diplodia seriata*.

Al analizar las cepas P35-B y CA48 no se observó el halo de solubilización para las cepas de hongos seleccionados.

Esquema de medición de las variables de los *Pinus patula y Pinus pseudostrobus.*

La inoculación de los hongos patógenos y bacterias antagonistas fue en el mes de noviembre de 2020. (Figura 10). El esquema de medición de variables, porcentaje de lesión, altura, diámetro y número de braquiblastos se hicieron a los seis meses después de la inoculación en el mes de abril a mayo de 2021.

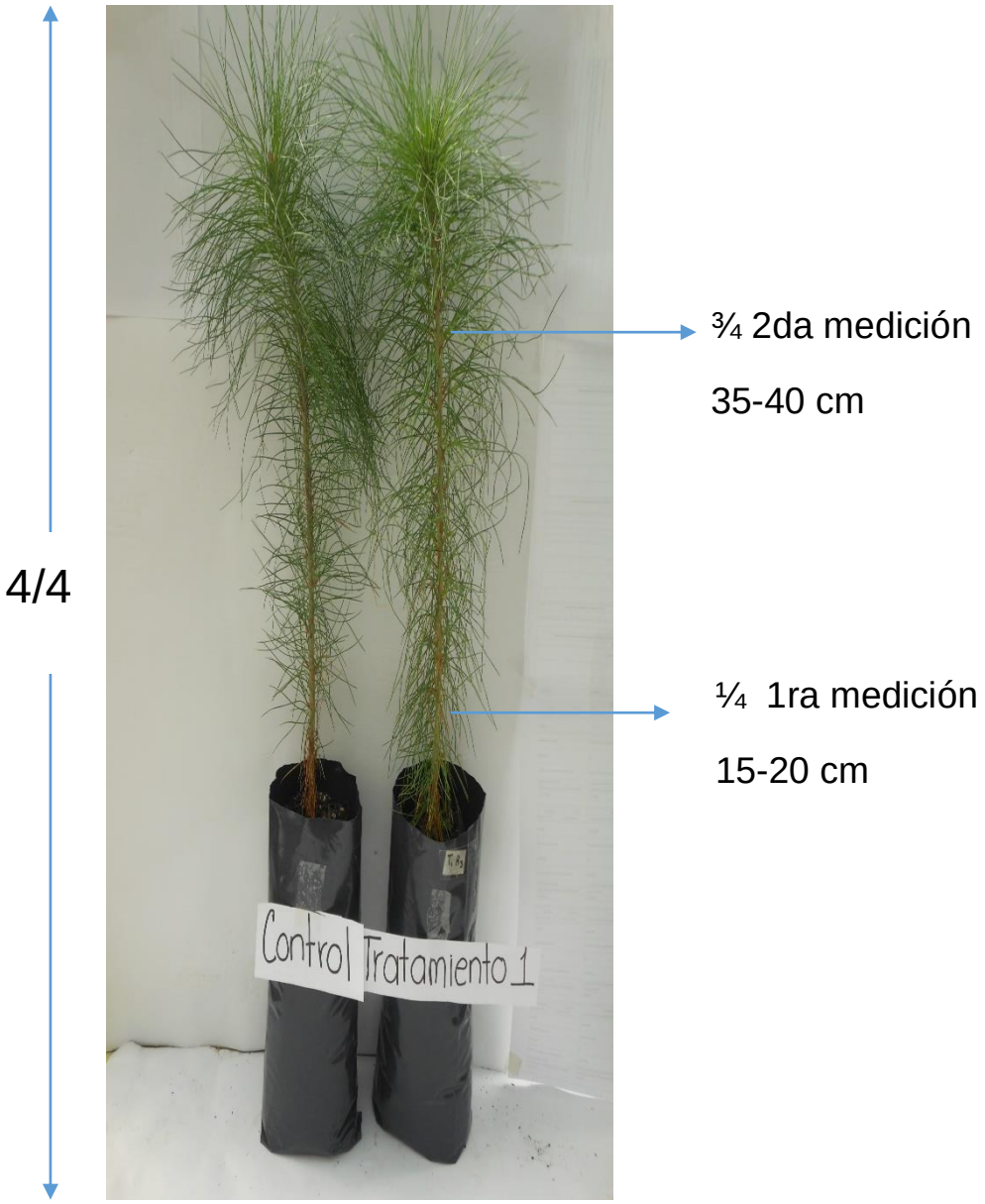


Figura 10. Esquema de medición de las variables

8.6. Ensayo de Antagonismo en invernadero

Cuadro 6. Porcentaje de lesiones causadas por *Colletotrichum boniense* y *Diplodia seriata* en acículas de *Pinus patula* frente a bacterias antagonistas a la altura de 15 cm.

Tratamientos	Porcentaje de lesiones	Porcentaje de variación
Control	6.00 ± 1.15 bcd	---
Clorotalonil	4.75 ± 0.50 d	-20.83
Burkholderia (B1)	6.50 ± 1.91 bcd	8.3
Aeromonas sp. (B2)	5.75 ± 0.96 bcd	-4.16
Colletotrichum boniense (H1)	5.50 ± 058 cd	-8.3
Diplodia seriata (H2)	7.25 ± 1.71 bcd	20.83
Burkholderia cepacia + *Colletotrichum boniense* (B1+ H1)	5.50 ± 1.73 cd	-8.3
Burkholderia cepacia + *Diplodia seriata* (B1+ H2)	8.25 ± 1.50 b	37.5
Aeromonas sp. + *Colletotrichum boniense* (B2+H1)	8.13 ± 1.65 b	35.5
Aeromonas sp. + *Diplodia seriata* (B2+H2)	6.75 ± 0.50 bcd	12.5
Colletotrichum boniense + *Burkholderia* + *Aeromonas* sp. (H1+B1+B2)	7.75 ± 1.50 bc	29.16
Diplodia seriata + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H2+B1+B2)	8.25 ± 3.30 b	37.5
Colletotrichum boniense + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H1+B1+B2) PICADURA	8.00 ± 1.83 bc	33.3
Diplodia seriata + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H2+B1+B2) PICADURA	18.75 ± 1.00 a	212.5

Al evaluar el porcentaje de lesiones en acículas de *Pinus patula* infectadas con los hongos *Diplodia seriata* y *Colletotrichum boniense* hay una diferencia entre el control y la aplicación de clorotalonil, al presentar menor número de lesiones (Cuadro 6). Cuando se aplicó *Burkholderia cepacia* y *Aeromonas* sp no se encuentra diferencia significativa con el control en el porcentaje de lesiones, ahora bien, en la inoculación del hongo *Colletotrichum boniense* no hay diferencia significativa con respecto al control presentando menor lesión en las acículas de *Pinus patula*, en cambio cuando se aplicó *Diplodia seriata* se obtuvo mayor en el porcentaje de lesiones en las acículas con respecto al control, sin diferencia significativa. En la aplicación de mezclas de bacterias y hongos, se observó un mayor porcentaje de lesiones. Sin embargo, en la presencia del hongo *Colletotrichum boniense* con *Burkholderia cepacia* hay menor número de lesiones,

pero no hay una diferencia significativa con el control, pero se puede pensar que ejercen una protección mínima.

Cuadro 7. Porcentaje de lesiones causadas por *Colletotrichum boniense* y *Diplodia seriata* en acículas de *Pinus patula* a una altura de 40 cm de la planta.

Nomenclatura tratamiento	% lesiones		Porcentaje de variación
Control	1.68 ± 2.31	de	---
Clorotalonil	2.05 ± 0.19	de	22.0
Burkholderia (B1)	4.25 ± 0.96	abc	152.9
Aeromonas sp. (B2)	3.50 ± 0.74	bcd	108.3
Colletotrichum boniense(H1)	1.63 ± 0.42	de	-3.0
Diplodia seriata (H2)	2.10 ± 0.35	de	25.0
Burkholderia cepacia + *Colletotrichum boniense* (B1+ H1)	2.50 ± 2.07	bcde	48.8
Burkholderia cepacia+ *Diplodia seriata* (B1+ H2)	2.40 ± 1.43	cde	42.9
Aeromonas sp. + *Colletotrichum boniense* (B2+H1)	4.40 ± 1.45	ab	161.9
Aeromonas sp. + *Diplodia seriata* (B2+H2)	5.65 ± 2.49	a	236.3
Colletotrichum boniense + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H1+B1+B2)	2.25 ± 1.53	de	33.9
Diplodia seriata + *Burkholderia cepacia*+ *Aeromonas* sp. (H2+B1+B2	0.65 ± 0.64	e	-38.7
Colletotrichum boniense + *Burkholderia cepacia*+ *Aeromonas* sp. (H1+B1+B2) PICADURA	1.23 ± 0.46	e	-26.8
Diplodia seriata + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H2+B1+B2) PICADURA	2.13 ± 0.85	de	26.8

Cuando se realizó la evaluación del número de acículas infectadas por la presencia de bacterias y hongos solos y combinados, (Cuadro 7) se observó que no existen diferencias significativas con el tratamiento control sin embargo se observa que cuando se hace una inoculación combinada de hongos con bacterias por ejemplo *Diplodia seriata* más *Burkholderia cepacia* y *Aeromonas* se presenta un menor número de lesiones, pero sin diferencia estadística, se puede inferir que la combinación de *Burkholderia cepacia* más *Aeromonas* sp fungen un efecto protector contra el hongo *Diplodia seriata*. Cuando se evaluó el hongo *Diplodia seriata* con las bacterias juntas se observó un incremento en porcentaje de lesiones, pero sin diferencia con el tratamiento control.

Cuadro 8. Evaluación de la altura de las plantas de *Pinus patula* a los seis meses después de la inoculación con bacterias benéficas y hongos patógenos

Tratamiento	Altura	Porcentaje de variación
Control	43.75 ± 2.22 cd	---
Clorotalonil	50.62 ± 5.74 a	15.7
Burkholderia cepacia (B1)	49.25 ± 2.87 ab	12.6
Aeromonas sp. (B2)	40.12 ± 1.65 d	-7.7
Colletotrichum boniense (H1)	45.37 ± 2.56 bc	3.70
Diplodia seriata (H2)	43.00 ± 2.94 cd	-1.7
Burkholderia cepacia + *Colletotrichum boniense* (B1+ H1)	45.87 ± 1.93 bc	4.8
Burkholderia cepacia + *Diplodia seriata* (B1+ H2)	44.75± 1.94 bcd	2.3
Aeromonas sp. + *Colletotrichum boniense* (B2+H1)	41.75 ± 4.65 cd	-4.6
Aeromonas sp. + *Diplodia seriata* (B2+H2)	43.75± 3.57 cd	0.0
Colletotrichum boniense + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp (H1+B1+B2)	49.25 ± 2.22 ab	12.6
Diplodia seriata + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H2+B1+B2	42.75 ± 2.50 cd	-2.3
Colletotrichum boniense + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H1+B1+B2) PICADURA	45.37 ± 1.80 bc	3.7
Diplodia seriata + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H2+B1+B2) PICADURA	46.25 ± 5.68 abc	5.7

Al evaluar la altura de las plantas de *Pinus patula* se observa en el (Cuadro 8) que existe diferencia significativa de clorotalonil comparado con el control, con la bacteria *Burkholderia cepacia,* se obtuvo diferencia significativa respecto al control, lo que indica un efecto de protección en la planta con mayor altura, sin embargo, cuando aplicamos *Aeromonas* sp. como bacteria antagonista de los hongos la altura de la planta es menor. Cuando se inoculan los hongos *Colletotrichum boniense* y *Diplodia seriata* por separado no se observan diferencias significativas con el control y quizás la presencia de estos hongos estén afectando en el crecimiento de la planta.

Con el objetivo de observar el comportamiento de *Colletotrichum boniense* más *Burkholderia cepacia* se observa una mayor altura de las plantas de pino y se puede pensar que *Burkholderia cepacia* y *Aeromonas* sp. están ejerciendo un efecto protector, con diferencias estadísticas con el tratamiento control, pero no con clorotalonil. Los otros tratamientos no se observan diferencias significativas con el tratamiento control, aunque hay diferencias numéricas en alguno de ellos.

Cuadro 9. Evaluación del diámetro de las plantas de *Pinus patula* a la altura de 15 cm inoculados con bacterias benéficas y hongos patógenos

Tratamiento	Diámetro 1
Control	0.70 ± 0.036 a
Clorotalonil	0.70 ± 0.057 ab
Burkholderia cepacia(B1)	0.70 ± 0.020 ab
Aeromonas sp. (B2)	0.59 ± 0.079 e
Colletotrichum boniense(H1)	0.65 ± 0.033 abcd
Diplodia seriata (H2)	0.62 ± 0.014 cde
Burkholderia cepacia + *Colletotrichum boniense* (B1+ H1)	0.68 ± 0.027 ab
Burkholderia cepacia+ *Diplodia seriata* (B1+ H2)	0.62 ± 0.025 cde
Aeromonas sp.+ *Colletotrichum boniense* (B2+H1)	0.65 ± 0.079 bcde
Aeromonas sp. + *Diplodia seriata* (B2+H2)	0.66 ± 0.017 abc
Colletotrichum boniense + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H1+B1+B2)	0.60 ± 0.049 e
Diplodia seriata + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H2+B1+B2	0.63 ± 0.030 cde
Colletotrichum + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H1+B1+B2) PICADURA	0.60 ± 0.035 de
Diplodia seriata + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H2+B1+B2) PICADURA	0.66 ± 0.022 abc

En la evaluación del diámetro de los tallos de plantas de pino, no se observan diferencias significativas en comparación con el tratamiento control, ya sea aplicando clorotalonil y los tratamientos con bacterias y hongos. También se observa en el (Cuadro 9) que el diámetro de las plantas es menor con el control, al aplicar las bacterias y hongos solos o con la mezcla de ellos. Nos hace suponer que no existe un efecto directo de protección sobre las plantas de *Pinus patula*, al menos en este parámetro.

Cuadro 10. Porcentaje de lesiones causadas por *Diplodia seriata* y *Biscougnauxia mediterranea* en *Pinus pseudsotrobus a* la altura de 15 cm.

Tratamiento	Porcentaje de lesiones		Porcentaje de variación
Control	3.75±0.50	cdefg	---
Clorotalonil	2.25±0.50	g	-40.0
Burkholderia cepacia (B1)	5.60±0.95	b	49.3
Aeromonas sp. (B2)	4.50±0.58	bcde	20,0
Diplodia seriata (H1)	3.00±1.15	efg	-20.0
Biscougnauxia mediterrenea (H2)	2.75±1.50	fg	-26.7
Burkholderia cepacia + *diplodia seriata* (B1+ H1)	2.25±0.50	g	-40.0
Burkholderia cepacia+ *Biscougnauxia mediterrenea* (B1+ H2)	5.25±0.96	bc	40.0
Aeromonas sp. + *diplodia seriata* (B2+H1)	3.50±1.29	defg	-6.7
Aeromonas sp. + *Biscougnauxia mediterrenea* (B2+H2)	4.00±0.82	bcdef	6.7
Diplodia seriata + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H1+B1+B2)	4.10±0.66	bcdef	9.3
Biscougnauxia mediterrenea + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H2+B1+B2	3.75±1.26	cdefg	0.0
Diplodia seriata + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H1+B1+B2) PICADURA	7.50±2.89	a	100.0
Biscougnauxia mediterrenea + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H2+B1+B2) PICADURA	4.75±1.26	bcd	26.7

En la evaluación de las lesiones en acículas de *Pinus pseudostrobus*. (Cuadro 10), se observa que con la aplicación de clorotalonil se observó baja incidencia de lesiones en las acículas de *Pinus* comparado con el control, asimismo cuando se inóculo el hongo Biscougnauxia *mediterránea* y *Diplodia seriata* se comportan muy similares al tratamiento con clorotalonil.

Al aplicar la mezcla *Diplodia seriata* con la bacteria *Burkholderia cepacia* se observó la disminución de lesiones en acículas de *Pinus pseudsotrobus* pudiendo afirmar que tuvo un efecto protector en las plantas de pinos, ya que el tratamiento solo con *Diplodia seriata* presento más lesiones, aunque sin diferencias estadísticas significativas.

Cuadro 11. Evaluación de la altura de plantas de *Pinus pseudsotrobus* inoculados con bacterias benéficas y hongos patógenos.

Tratamiento	Altura		Porcentaje de variación
Control	70.25 ± 8.18	abcd	---
Clorotalonil	77.00 ± 11.60	a	9.6
Burkholderia cepacia (B1)	79.63 ± 6.94	a	13.4
Aeromonas sp. (B2)	72.25 ± 15.71	abc	2.8
Diplodia seriata (H1)	75.50 ± 3.94	ab	7.5
Biscougnauxia mediterrenea (H2)	60.88 ± 1.84	cde	-13.3
Burkholderia cepacia + *diplodia seriata* (B1+ H1)	72.00 ± 4.76	abc	2.5
Burkholderia cepacia+ *Biscougnauxia mediterrenea* (B1+ H2)	63.50 ± 3.00	bcde	-9.6
Aeromonas sp. + diplodia *seriata* (B2+H1)	77.25 ± 12.92	a	10.0
Aeromonas sp. + *Biscougnauxia mediterrenea* (B2+H2)	59.67 ± 7.04	de	-15.1
Diplodia seriata + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H1+B1+B2)	74.13 ± 8.37	ab	5.5
Biscougnauxia mediterrenea + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp (H2+B1+B2	69.00 ± 10.00	abcd	-1.8
Diplodia seriata + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H1+B1+B2) PICADURA	51.13 ± 4.91	e	-72.8
Biscougnauxia mediterrenea + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp (H2+B1+B2) PICADURA	69.75 ± 7.41	abcd	-0.7

En la evaluación de la altura de las plantas de *Pinus pseudostrobus* con tratamientos biológicos y químicos, en el (Cuadro 11) no se observan diferencias significativas con respecto al control ya que la mayoría de los casos la altura de las plantas es menor sin embargo, cuando se aplica clorotalonil se encuentra un 9.6 % más en la altura, cuando se aplica *Burkholderia cepacia* se observa un 13.35 % más de altura, cuando se inocula *Biscougnauxia mediterranea* afecta este parámetro ya que encontramos un -13.33 % menor de atura en comparación con el control. Pudiendo notar que el hongo *Biscougnauxia mediterranea* tiene un efecto adverso en la altura de *Pinus pseudostrobus*.

En las mezclas de bacterias con los hongos se observó que el tratamiento con la bacteria *Aeromonas* sp. ofrece una protección.

Cuadro 12. Evaluación de la medición del diámetro de plantas de *Pinus pseudsotrobus* inoculadas con bacterias benéficas y hongos patógenos a los 15 cm

Nomenclatura	Diámetro 1
Control	0.68 ± 0.027 abc
Clorotalonil	0.67 ± 0.046 abc
Burkholderia cepacia (B1)	0.70 ± 0.020 abc
Aeromonas sp. (B2)	0.68 ± 0.026 abc
Diplodia seriata(H1)	0.70 ± 0.051 abc
*Biscougnauxia mediterrenea (*H2)	0.62 ± 0.069 bcd
Burkholderia cepacia + *diplodia seriata* (B1+ H1)	0.62 ± 0.030 cd
Burkholderia cepacia + Biscougnauxia *mediterrenea* (B1+ H2)	0.57 ± 0.175 d
Aeromonas sp. + *diplodia seriata* (B2+H1)	0.68 ± 0.040 abc
Aeromonas sp. + *Biscougnauxia mediterrenea* (B2+H2)	0.70 ± 0.039 ab
Diplodia seriata + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H1+B1+B2)	0.68 ± 0.039 abc
Biscougnauxia mediterrenea + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H2+B1+B2	0.62 ± 0.088 cd
Diplodia seriata + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H1+B1+B2) PICADURA	0.70 ± 0.034 ab
Biscougnauxia mediterrenea + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H2+B1+B2) PICADURA	0.71 ± 0.067 a

En la determinación del diámetro del tallo de *Pinus pseudostrobus* (Cuadro 12), se observa que no hay diferencias significativas con el control y clorotalonil, al igual con las bacterias *Burkholderia cepacia* y *Aeromonas* sp. Sin embargo, cuando se compara el hongo *Biscougnauxia mediterranea* con el control se obtuvo una diferencia de diámetro menor, podemos pensar que se debió a la presencia del hongo *Biscougnauxia mediterranea* que produce una disminución en el diámetro del tallo.

Al aplicar el inóculo del hongo *Biscougnauxia mediterranea* con *Burkholderia cepacia* y *Aeromonas* sp con picadura se observó un ligero aumento del diámetro de los *Pinus pseudsotrobus*, pudiendo decir que actuó con un efecto de mayor crecimiento en el tallo, sin diferencias estadísticas significativas.

Cuadro 13. Evaluación del número de braquiblastos presentes en ramas de *Pinus patula* medidos a la altura de 15 cm.

Nomenclatura	Braquiblastos
Control	5.4±1.95 b
Clorotalonil	5.2±1.48 b
Burkholderia (B1)	6.2±0.45 b
Aeromonas sp. (B2)	6.0±1.00 b
Colletotichum boniense(H1)	5.8±1.30 b
Diplodia seriata (H2)	5.8±1.64 b
Burkholderia cepacia + *Colletotrichum boniense* (B1+ H1)	6.2±1.48 b
Burkholderia cepacia + *Diplodia seriata* (B1+ H2)	5.4±1.14 b
Aeromonas sp. + *Colletotrichum boniense* (B2+H1)	8.4±2.07 a
Aeromonas sp. + *Diplodia seriata* (B2+H2)	6.6±1.82 ab
Colletotrichum boniense + *Burkholderia* cepacia + *Aeromonas* sp. (H1+B1+B2)	6.0±1.41 b
Diplodia seriata + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H2+B1+B2	3.0±0.71 c
Colletotrichum boniense + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H1+B1+B2) PICADURA	2.8±1.64 c
Diplodia seriata + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H2+B1+B2) PICADURA	2.4±2.30 c

En el parámetro de número de braquiblastos en plantas de *Pinus patula* (Cuadro 13). Se observa que no existen diferencias significativas entre el control y clorotalonil y con los tratamientos biológicos, sin embargo, se observan que las bacterias *Burkholderia cepacia* y *Aeromonas* sp hay un ligero aumento en el número de braquiblastos probablemente por el efecto antagónico y su efecto protector de las bacterias. También se nota que el tratamiento de *Burkholderia cepacia* más *Colletotrichum boniense*, *Aeromonas* más *Diplodia seriata* y *Colletotrichum boniense* más *Burkholderia cepacia* y *Aeromonas* sp también presentan mayor número de braquiblastos en comparación con el control, cabe notar que el tratamiento de *Aeromonas* más *Colletotrichum boniense* presenta mayor número de braquiblastos y con diferencias significativas con los demás tratamientos.

Cuadro 14. Evaluación del número de braquiblastos en *Pinus patula* medidos a la altura de 40 cm

Nomenclatura	Braquiblastos
Control	20.75 ± 3.20 ab
Clorotalonil	12.25 ± 1.50 bc
Burkholderia (B1)	11.25 ± 0.96 c
Aeromonas sp. (B2)	13.25 ± 5.44 bc
Colletotichum boniense(H1)	11.00 ± 1.83 b
Diplodia seriata (H2)	16.00 ± 7.87 abc
Burkholderia cepacia + *Colletotrichum boniense* (B1+ H1)	23.50 ± 5.20 a
Burkholderia cepacia + *Diplodia seriata* (B1+ H2)	19.25 ± 8.66 abc
Aeromonas sp. + *Colletotrichum boniense* (B2+H1)	14.50 ± 3.70 bc
Aeromonas sp. + *Diplodia seriata* (B2+H2)	24.00 ± 8.60 a
Colletotrichum boniense + *Burkholderia* cepacia + *Aeromonas* sp. (H1+B1+B2)	13.50± 1.73 bc
Diplodia seriata + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp (H2+B1+B2	17.00 ±3.37 abc
Colletotrichum boniense + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H1+B1+B2) PICADURA	23.25 ± 7.80 a
Diplodia seriata + *Burkholderia cepacia* + *Aeromonas* sp. (H2+B1+B2) PICADURA	17.50 ± 11.09 abc

En la evaluación del número de braquiblastos en plantas de *Pinus patula* (Cuadro 14), se observa el tratamiento de clorotalonil con menores braquiblastos en comparación con el control.

Al analizar las bacterias *Burkholderia cepacia* y *Aeromonas* sp, no existe diferencia significativa con respecto al control, sin embargo, el número de braquiblastos es menor con el tratamiento control. Asimismo, en la inoculación de los hongos se observó un número menor de braquiblastos. En cambio, al comparar las combinaciones de hongos y bacterias por ejemplo se analizaron 3 tratamientos con un número mayor de braquiblastos, podemos decir que hubo una protección por parte de las bacterias antagonistas.

9. Discusión

Los hongos fitopatógenos representan una amenaza porque son uno de los principales factores de deforestación (Alvarado, 1997); sus efectos se perciben con la pudrición del sistema del sostén, la reducción del porcentaje de crecimiento, la disminución de la regeneración o su demora, el incremento de la mortandad, la degradación de la composición de las especies, sustitución forzosa de especies o cambio de uso de suelo (Hawley y Smith, 1972; Daniel *et al*, 1982; Machin, 1991). Por lo anterior, en las áreas forestales, es esencial el diagnóstico de los daños por hongos fitopatógenos, para que los programas de manejo se asienten en fundamentos sólidos, ya que, a falta de esta información, ha conducido a la adopción de medidas de dudosa justificación (Romero *et al*, 2005).

En el presente trabajo, a partir de los hallazgos encontrados aceptamos la hipótesis basada en la reducción o disminución de la enfermedad causante de la caída foliar en *Pinus patula* y *Pinus pseudostrobus*, usando las bacterias más eficientes en este caso, *Burkholderia cepacia* y *Aeromonas* sp en condiciones *in vitro* las cuales mostraron efectos benéficos. Así también, se demostró que las cepas *Burkholderia cepacia* y *Aeromonas* sp. tienen un efecto antagónico sobre los hongos *Diplodia seriata* y *Colletotrichum boniense en Pinus patula*. Las cepas bacterianas anteriormente descritas respondieron de manera positiva al efecto inhibitorio del hongo *Biscougnauxia mediterránea* en *Pinus pseudostrobus* lo que confirman lo descrito por Gutierrez- Flores (2018) observó que la cepa AM6 (*Burkholderia* sp.) limitó el crecimiento fúngico de 9 de los 10 hongos seleccionados.

En las pruebas de antagonismo bacteria-hongo aplicada en invernadero se observaron acículas dañadas con presencia de manchas de color amarillas, café marrón tornándose a rojo con puntos negros en ambas especies de pino. El mejor efecto antagónico por parte de las bacterias *Aeromonas* sp. y *Burkholderia cepacia* se presentó contra *Colletotrichum boniense,* ya que contra *Diplodia seriata* los resultados demuestran una mayor incidencia de la enfermedad. Los datos

sugieren ampliar las investigaciones encaminadas a una selección más rigurosa de las bacterias antagónicas y su efectividad en planta. En el porcentaje de lesiones en las acículas de *Pinus patula* no hay diferencia significativa entre el control y clorotalonil, pero se observó que con clorotalonil existe una incidencia menor de la enfermedad. Al comparar el tratamiento control con las bacterias no hubo diferencias significativas, pero existe un porcentaje menor de lesión en el tratamiento de *Burkholderia cepacia* contra *Colletotrichum boniense,* se observa una protección contra los hongos. En las demás mezclas no hay disminución de la lesión. Algunos ejemplos de microorganismos antagonistas utilizados exitosamente para controlar enfermedades en poscosecha son: *B. licheniformis* contra *C. gloeosporioides e*n mango (Govender et al., 2005).

La baja respuesta del antagonismo de la bacteria hacia el hongo, se puede deber a la forma de inoculación, (vía por aspersión foliar) o al número de unidades formadoras de colonias en los inóculos o puede deberse al mecanismo de resistencia que tenga la planta para soportar la colonización por otros organismos. (Burbano-Figueroa, 2020)

Respecto a la variable altura se observa una mayor longitud de la planta con el tratamiento de clorotalonil respecto al control, este le confiere protección dando como resultado un mayor crecimiento de las plantas. Lo mismo se observa con la bacteria *Burkholderia cepacia,* en la protección de las plantas de *Pinus pseudostrobus* y *Pinus patula* mejorando el crecimiento de la planta. (Ahmad *et al*., 2008) mencionan que muchos de los microorganismos del suelo producen sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, así como sustancias antibióticas tipos sideróforos, ya que estos compuestos inciden directamente sobre la proliferación del sistema radical de las plantas confiriendo una mejor nutrición de las plantas.

En la variable diámetro del tallo de *Pinus patula*, el tratamiento de clorotalonil en relación al control muestra un crecimiento mayor del tronco del pino, ya que favorece el control de enfermedades con un excelente efecto y amplio rango de control. En los demás tratamientos no hay una diferencia significativa menor al

control, no hay efecto antagónico. Adusei-Fosu y Rolando, (2018) menciona que el clorotalonil funciona como protectante, residual o de contacto para controlar o prevenir la propagación de los hongos a hospederos sanos y proteger contra nuevas infecciones si su aplicación es correcta.

En la variable de braquiblastos se tiene un número mayor de ellos en las combinaciones de *Burkholderia cepacia* y *Aeromonas* sp., con respecto al control, se dice que existe un efecto protector de la planta por la presencia de las bacterias antagonistas, aumentado el número de braquiblastos en las plantas de *Pinus Patula. Riera et al. (2017), menciona que Burkholderia* ha adquirido gran importancia en la agricultura gracias a sus capacidades de *a)* biocontrol de hongos fitopatógenos como *Phytophthora nicotianae Phytophthora palmivora, Phyllosticta citricarpa, Alternaria alternata, Colletotrichum acutatum.* Gutierrez- Flores, (2018) observó que el tratamiento con la cepa *Serratia* sp presentó un incremento del tallo de 6% respecto al control en plantas de *Pinus patula.*

Para comprobar la patogenicidad de la enfermedad se aplicaron los postulados de Koch para determinar si el supuesto patógeno está siempre asociado a la enfermedad. Esto se usó tanto “in vivo” utilizando plantas de vivero; así como también “in vitro” empleando acículas de pinos sanos de la especie *Pinus patula*, inoculándolos con esporas de los patógenos hallados de los mismos colocándolos en cámara húmeda para el desarrollo de los signos y síntomas. Los dos materiales evaluados, tanto plantas del vivero como las acículas de la especie de *Pinus patula*, desarrollaron la enfermedad tanto en laboratorio como en campo. (Gutierrez- Flores *et al*, 2022). Comenta que disminuyó el crecimiento fúngico en comparación con el testigo, lo que evidenció la eficiencia para el control del crecimiento fúngico a partir del uso de bacterias.

Se evaluaron los microorganismos biocontroladores seleccionados para el control de enfermedades en pinos. Una vez establecidos los mejores biocontroladores y comprobando su eficacia *in vivo*, este estudio será una contribución a procesos de control biológico en *Pinus patula* y *P. pseudostrobus* de México. Con el uso de extractos en dosis controladas (Solange-Benítez, 2007).

10. Conclusiones

Se aislaron 26 hongos asociados a *Pinus patula* y *Pinus pseudostrobus* en la región de la Sierra Norte Puebla, los hongos más frecuentes fueron *Diplodia seriata*, *Colletorichum boniense*, y *Biscougnauxia mediterránea* que se identificaron por el método de PCR.

Las enfermedades de pino en la Sierra Norte de Puebla están asociadas con hongos patógenos y saprofitos. Sin embargo, en el mismo ecosistema pueden encontrarse bacterias que son antagónicas a estos hongos y pudieran ser aplicadas para el control biológico de los hongos.

Se seleccionaron 2 bacterias con efecto antagonista, las cuales se identificaron con el sistema miniaturizado API 20NE, se obtuvieron las cepas de *Burkholderia cepacia* y *Aeromonas* sp.

En los ensayos *in vitro*, se encontró que las bacterias seleccionadas presentaron una capacidad antagónica contra los hongos: *Diplodia seriata*, *Colletorichum boniense*, y *Biscougnauxia mediterránea.* Se disminuyó el crecimiento fúngico en comparación con el testigo, lo que evidenció la eficiencia para el control del crecimiento fúngico a partir del uso de bacterias.

La bacteria *Burkholderia cepacia* fue la más eficiente en los ensayos de antagonismo en laboratorio.

Se demostró en ensayos de invernadero que las bacterias tuvieron un efecto de protección en algunos tratamientos en las variables de porcentaje de infección, altura de las plantas, diámetro del tallo del pino y numero de braquiblastos.

11. Sugerencias

Se abre un nuevo campo para tener nuevos ensayos con mayor control de factores bióticos y abióticos para más resultados en pinos pequeños.

Se sugiere controlar las enfermedades de pino mediante la selección de bacterias antagonistas hacia hongos patógenos de pino en ensayos de laboratorio e invernadero.

12. Bibliografía

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.

Ahmad JS, Baker R. Rhizosphere Competence of *Trichoderma harzianum.* Phytopathol. 1987;77: 182-189

Ahmad F, Ahmad I, Khan M. 2008 Screening of freeliving rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological Research. 163, (2), 173-181.

Aldana, B.M. 2000. Supervisión de Viveros. Resultados de la Supervisión 2000. Memoria del Primer Congreso Nacional de Reforestación, 8- 10 Nov. 2000. Montecillo, México.

Anzueto Martínez, Manuel de J., Álvarez Solís, José D., Actividad microbiana del suelo bajo diferentes sistemas de producción de maíz en los altos de Chiapas, México Agrociencia [en linea] 2004, 38 (enero-febrero) : [Fecha de consulta: 2 de marzo de 2017] Disponible en:<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30238102> ISSN 1405-3195

Arriaga, V.M. 2000. La reforestación en México. Memoria del Primer Congreso Nacional de Reforestación, 8-10 Nov. 2000. Montecillo, México.

Bautista Baños S., El control biológico en la reducción de enfermedades postcosecha en productos hortofrutícolas: uso de microorganismos antagónicos, Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, Julio, vol.8, número 001, Hermosillo Sonora, México, 2006.

Benitez T, Rincón A.M., Limón M.C, and Codon A. 2004. Biocontrol mechanism of trichoderma strains. International Microbiology. 7: 249-260.

Benitez T, Delgado J, Rincon A, Rey M, and Limon MC. 1998. Biofungicides: *Trichoderma* as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi. In: Pandalai SG (ed) Recent research developments in microbiology, vol. 2. Research Signpost, Trivandrum, pp 129-150.

Burbano-Figueroa Ó, 2020. Resistencia de plantas a patógenos: una revisión sobre los conceptos de resistencia vertical y horizontal. Revista Argentina de Microbiología, 52 (3): 245-255.

Cante, M. J. 2011. Influencia de los inoculantes bacterianos como alternativa agroecológica para producir trigo de calidad. Tesis de maestría. Puebla, Mexico. Instituto de Ciencias de Posgrado en Ciencias Ambientales, BUAP. pp123.

Carreras S Bertha. 2011. Aplicaciones de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* en el control de fitopatógenos, Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria vol. 12, núm. 2, pp. 129-133.)

Castillo-Reyes, F., Hernández-Castillo, F., Gallegos-Morales, G., Flores-Olivas, A., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. (2015). Efectividad in vitro de *Bacillus* y polifenoles de plantas nativas de México sobre Rhizoctonia-Solani. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 549-562.

CATIE. 1997. Nota técnica sobre manejo de semillas forestales. *Pinus pseudostrobus* Lindl. No. 13. Turrialba, Costa Rica.

Chapela, F. R.A. Pedraza, R. Alvarez, A. Hoyos, I Trejo J.M. Núñez, Y Rodriguez y K. Carrillo. 2012. El estado de los bosques de Mexico. p 28-68. En: F. Chapela (Coord.) Estado de los bosques de México. Consejo Civil Mexicano para la silvicultura Sostenible A.C. Mexico, D.F.

Chet I, Inbar J, Hadar I (1997) Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow DT, Söderström B (eds) The Mycota IV: Environmental and microbial relationships. Springer-Verlag, Berlin, pp 165-184

Cibrián Tovar, D., D. Alvarado R. y S.E. García D. (Eds). 2007. Enfermedades forestales en México. Universidad Autónoma de Chapingo; CONAFOR-SEMARNAT, México; Forest Service USDA, EUA; NRCAN Forest Service, Canadá y Comisión Forestal de América del Norte, COFAN, FAO. Chapingo, México. 587 p.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) 2011. La Biodiversidad en Puebla: Estudio de Estado. México. CONABIO, GE Puebla, BUAP Especies forestales. Diversidad de Recursos genéticos: 225-226.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2011. La Biodiversidad en Puebla: Estudio de Estado. México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Gobierno del Estado de Puebla, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 440 páginas.

CONABIO 2009. Pinos y cedros (Gimnospermas). 12 Agosto 2015, de Gobierno federal Sitioweb:http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gran_familia/plantas/pinos/pinos.html

CONAFOR 2010. Prácticas de reforestación. Manual básico.

Corrales, L., Sánchez, L., 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-Publicación Científica en Ciencias Biomédica. 8 (13): 63-75.

Cram, M.M., Frank, M.S. & K.M: Mallams. 2012. Forest Nursery Pest. 680: p. 212.

Cuervo-Parra, J.A., M. Ramírez-Suero, V. Sánchez-López, and M. Ramírez-Lepe. 2011a. Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* VSL 291 on phytopathogenic fungi isolated from cocoa *(Theobroma cacao* L.) fruits. Afr. J. Biotechnol. 10(52):10657-10663.

DOF, 2002. NOM-021, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis.

DOF, 2002. Secretaría de medio ambiente y recursos naturales norma oficial mexicana nom-021-semarnat-2000 que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis.

Eguiluz P. T. 1978. Ensayo de integración de los conocimientos sobre el género Pinus en México. Tesis Profesional. Escuela Nacional de Agricultura. Chapingo. México, D. F. 623 p

Orietta, F. y V. Larrea. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Avances en el fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 62:96-100.

Fischbein, D. 2012. Introducción a la teoría del control biológico de plagas. Serie técnica: “Manejo Integrado de Plagas Forestales”. Cuadernillo nº 15.

García, L.E.C., F.G. Rojas, S.L.T. González, R.J. Granados, E.G. Quiñones. 2012. Evaluación de daños por patógenos fúngicos en "*Pinus*" y "*Quercus*" del Área de Protección de Flora y Fauna" La Primavera" Jalisco, México. Acta Universitaria. *22*: 5-12

García A., A. y M. S. González. 2003. Pináceas de Durango. Instituto de Ecología, A.C. Comisión Nacional Forestal. México. 187 p.

Govender, V.; Korsten, L. and Sivakumar, D. 2005. Semicommercial evaluation of Bacillus licheniformis to control mango postharvest diseases in South Africa. Postharvest Biol. Technol. 38:57-65

Guerra, C.,H. Cruz, I. Vila, A. Duarte, & M. O. López, 2004. Principales hongos que afectan a *Pinus tropicalis* morelet en Cuba. Diagnóstico fitosanitario. 8: 9-12.

Gutierrez-Flores L.M,. 2018. Diagnóstico de la enfermedad fúngica de Pinus patula y propuesta de biocontrol en Tetela de Ocampo, Puebla. Tesis de maestría Instituto de Ciencias Posgrado en ciencias ambientales BUAP. Pag, 55-56.

Gutierrez-Flores L.M, 2018. Diagnóstico de la enfermedad fúngica de Pinus patula y propuesta de biocontrol en Tetela de Ocampo, Puebla. Tesis de maestría Instituto de Ciencias Posgrado en ciencias ambientales BUAP. Pag,46.

Guide of the diseases of Ontario: Lophodermium needle cast of pine (en linea). 2003. Ontario, CA. Consultado 15 jun. 2004. Disponible en http://www.glfc.cfs.nrcan.gc.ca/treedisease/lophodermium_needle_cast_e.html., revisar fecha de consulta

Guzmán, G., 1998. Inventorying the fungi of México. Biodiversity and Conservation 7: 369-384

Hajek E. Ann, April 5, 2004: Natural Enemies: An Introduction to Biological Control, Cambridge University Press; First Edition edition, 396 páginas.

Hawksworth, D. L., 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. Mycological Research 105: 1422-1432.

Hirose, D.; Osono, T., 2006: Development and seasonal variations of *Lophodermium* populations on *Pinus thnbergii*needle litter. *Mycoscience* **47**, 242–247

Hjeljord L, Tronsmo A. 1998.*Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. Volumen 2. p.131-151. In: *Trichoderma* & *Gliocladium*: Enzymes, biological control and commercial applications. Harman GE, Kubice CP. (Eds).. Taylor & Francis.

INEGI. (18 de MARZO de 2016). *INEGI*. Recuperado el 17 de OCTUBRE de 2016, de INEGI: http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/bosques2016_0.pdf

Lilja, A., M. Poteri, R.L. Petäistö, R. Rikala, T. Kurkela & R. Kasanen. 2010. Fungal diseases in forest nurseries in Finland. Silva Fennica. 44: 525-545.

Lorito M, Harman G, Prieto A Di, Hayes C. Extracellular chitimolytie enzymes produced by *T.* harzianum, purification, characterization and molecular cloning. Phytopathol. 1990;82(10):10- 77.

Melgarejo P, Sagasta E. 1989. Influence of *Penicillium* frecuentans and two of its antibiotics on production of stromata by Monilinia laxa in culture. Canadian Journal of Botany, 67:83-87.

Mendez, J.M., Flores, M.S., Paramo, L.A. (2017). Aislamiento e Identificación de *Bacillus subtilis* y evaluación del antagonismo in vitro frente a Hongos fitopatógenos. Nexo revista científica. Vol. 30. No. 02, pp.96-110.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentacion y Agricultura. (16 de noviembre de 2016). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentacion y Agricultura Definiciones*. Recuperado el 16 de noviembre de 2016, de Organización de las Naciones Unidas para la Alimentacion y Agricultura Definiciones: http://www.fao.org/home/es/

Okumoto, S. Bustamante, E. Gamboa, A. 2001. Actividad de cepas de bacterias .quitinolíticas antagonistas a Alternaria solani in Vitro. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 59:58 - 62.

Pagiola, S. Landell - Mills, N. Bishop, J. 2002. Market - Based Mechanisms for Forest Conservation and Development. Word Bank Institute. New York: Earthscan Publications Ltd.

Perry, J.P. 1991.The Pines of Mexico and Central America. Timber Press. Portland, Oregon, E.U.A. 137-140 p.

Pildain, M. B., A. de Errasti. 2011. Hongos patógenos de Pinos en la Patagonia y su asociación con plagas entomológicas. Serie técnica: "*Manejo Integrado de Plagas Forestales"*Cambio Rural – Laboratorio de Ecología de Insectos. Villacide, J.M. y J.C. Corley (eds.) Cuadernillo nº 12.

Programa estratégico forestal para México 2025, Comisión Nacional Forestal 2001. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/83406/Documentos rectores CONAFOR Programa Estratégico Forestal 2025.pdf

Ramírez-Herrera, C., J.J. Vargas-Hernández & J. López-Upton. 2005. Distribución y conservación de las poblaciones naturales de *Pinus greggii*. Acta Botánica Mexicana. 72:1-16.

Rebolledo C., V., L. del C. Mendizábal H. y J. Alba L. 1999. Evaluación de familias comunes de *Pinus patula* Schl. *et* Cham. en dos ensayos de progenie. Foresta Veracruzana 1: 19-24.

Sáenz R., C., H. Nienstaedt, and J. J. Vargas H. 1994. Performance of *Pinus patula* genotypes selected in South Africa and growing in their native Mexican environment. Silvae Genética 43: 73-81.

Sánchez-González A. 2008. Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. Madera y bosques 14(1):107-120.

Smit E, Leeflang P, Gommans S, van den Broek J, van Mil S, Wernars K (2001) Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. Appl Environ Microbiol 67 (5):2284–2291.

Solange-Benítez, Johanna Bentley, Paula Bustamante, Ligia Consuelo Sánchez, Lucia Corrales. 2007. Aislamiento de los microorganismos cultivables de la rizosfera de Ornithogalum umbellatum y evaluación del posible efecto biocontrolador en dos patógenos del suelo. Nova- publicación científica en ciencias biomédicas, 5, (8). 147-153.

Sosa, A., Pazos, V., & Torres, D. (2005). Aislamiento y selección de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* con potencialidades para el control biológico en semilleros de tabaco. Centro Agrícola. 32 (3): 25- 29.

Teomitzi-Cuamatzi, D., L. 2014. Aislamiento y caracterización de bacterias Gram negativas asociadas al sistema suelo raíz de *Pinus cembroides.* Tesis de licenciatura facultad de Ciencias Químicas BUAP. Pag, 7.

Ulloa CJ. Enzimas micolíticas produzidasl pelo agente de biocontrole Trichoderma harzianum. En: Actas del V de Simposio de control biológico. Anais: Conferencias y Palestras. Foz de IguaçuParana-Brasil. 1996;234-238.

Valencia M., S., y J. J. Vargas H. 2001. Correlaciones genéticas y selección simultanea del crecimiento y densidad de la madera en *Pinus patula.* Agrociencia 35: 109-120.