



**BENEMÉRITA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**



**INSTITUTO DE CIENCIAS  
POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

TESIS

Diagnóstico de la enfermedad fúngica de *Pinus patula* y  
propuesta de biocontrol en Tetela de Ocampo, Puebla

Tesis presentada para obtener el título de:

**Maestría en Ciencias Ambientales**

Presenta

**Ing. Amb. Luis Martín Gutiérrez Flores**

CVU CONACYT: 686941

Directora de Tesis

**Dra. Lucía López Reyes**

CVU CONACYT: 214682

Co-directora de tesis  
**Dra. Amparo Mauricio Gutiérrez**  
CVU CONACYT: 48911

Octubre de 2018

## Índice

1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	2
3. Introducción .....	3
4. Planteamiento del problema .....	5
4.1 Preguntas de investigación.....	7
5. Justificación.....	8
6. Objetivos .....	9
6.1 Objetivo general .....	9
6.2 Objetivos específicos .....	9
7. Hipótesis.....	10
7.1 Hipótesis general .....	10
8. Marco teórico .....	11
8.1 Tetela de Ocampo.....	13
8.2 <i>Pinus patula</i> .....	15
8.3 Plagas y enfermedades comúnmente asociadas a <i>Pinus patula</i> . .....	17
9. Materiales y métodos. ....	22
9.1 Sitio de estudio. ....	22
9.2 Metodología. ....	25
9.2.1 Fase de muestreo. ....	25
9.2.3 Fase de campo. ....	29
9.3 Análisis estadístico .....	32
10.- Resultados y discusión.....	33
10.1 Fase de muestreo.....	33
10.2 Fase de laboratorio.....	34
10.2.1 Caracterización del suelo. ....	34
10.2.2 Aislamiento de hongos patógenos. ....	37
10.2.3 Identificación de hongos asociados a <i>Pinus patula</i> . ....	38
10.2.4 Identificación genética de hongos asociados a <i>P. patula</i> . ....	40
10.2.5 Pruebas de control biológico en placa.....	46
10.2.6 Ensayo de control biológico en cámara húmeda. ....	51

10.3 Fase de campo.....	53
10.3.1 Aplicación de control biológico en campo en <i>Pinus patula</i> de regeneración natural. ..	53
10.3.2 Aplicación de control biológico en campo en <i>Pinus patula</i> de 15 años.....	59
11. Conclusiones.....	63
12. Perspectivas .....	65
13. Bibliografía.....	66

## Índice de cuadros

Cuadro 1. Claves de bacterias para antagonismo <i>in vitro</i> .....	25
Cuadro 2. Ensayo de antagonismo de bacterias aplicadas a <i>Pinus patula</i> de regeneración natural en condiciones de campo.....	27
Cuadro 3. Ensayos de antagonismo de bacterias aplicadas a <i>Pinus patula</i> en condiciones naturales de campo.....	28
Cuadro 4. Procedencia de las muestras de <i>Pinus patula</i> recolectadas.....	31
Cuadro 5. Análisis fisicoquímico de suelo asociado a <i>Pinus patula</i> de regeneración natural.....	31
Cuadro 6. Análisis fisicoquímico de suelo asociado a <i>Pinus patula</i> de 15 años.....	32
Cuadro 8. Hongos aislados de <i>Pinus patula</i> de Tetela de Ocampo, Puebla.....	34
Cuadro 7. Análisis microbiológico de suelo asociado a <i>Pinus patula</i> .....	33
Cuadro 9. Clave e identificación fenotípica y genética de hongos asociados a <i>P. Patula</i> .....	36
Cuadro 10. Hongos más frecuentes asociados a <i>Pinus patula</i> de Tetela de Ocampo identificados genéticamente.....	38
Cuadro 11. Antagonismo de bacterias contra hongos patógenos asociados a <i>Pinus patula</i> .....	47
Cuadro 12. Evaluación de la severidad e incidencia de la enfermedad en acículas de <i>Pinus patula</i> inoculadas con bacterias antagónicas en cámara húmeda.....	49
Cuadro 13. Evaluación de los parámetros altura y diámetro en <i>P. patula</i> de regeneración natural.....	51
Cuadro 14. Evaluación de la severidad e incidencia de la enfermedad en acículas de <i>Pinus patula</i> de regeneración natural inoculadas con bacterias antagónicas.....	54
Cuadro 15. Control de la enfermedad fúngica de <i>Pinus patula</i> de 15 años a los 8 y 12 meses de evaluación.....	55

## Índice de figuras

Figura 1. Localización del Municipio de Tetela de Ocampo, Puebla.....	12
Figura 2. Causantes de visualización de síntomas de deficiencias, trastornos o enfermedades en sistemas forestales.....	15
Figura 3. Localización geográfica del sitio.....	20
Figura 4. Localización del sitio de pinos de regeneración natural.....	21
Figura 5. Localización del sitio de pinos de 15 años.....	21
Figura 6. Estratos de colección de muestras en <i>Pinus patula</i> .....	22
Figura 7. Escala para calcular el grado de lesión acicular.....	29
Figura 8. Lesiones en acículas de <i>Pinus patula</i> .....	30
Figura 9. Muestreo de suelo.....	30
Figura 10. Aislamiento e identificación de hongos.....	35
Figura 11. Gel de agarosa al 3% de productos de PCR (ITS1-ITS2).....	37
Figura 12. Pruebas de antagonismo.....	43
Figura 13. Crecimiento fúngico en placas Petri de los hongos asociados a <i>Pinus patula</i> con respecto	

al control.....	44
Figura 14. Actividad antifúngica de bacterias antagónicas contra hongos forestales en caja Petri.....	45
Figura 15. Ensayos de antagonismo en cámara húmeda.....	48
Figura 16. Severidad e incidencia en ensayos de cámara húmeda.....	49
Figura 17. <i>Pinus patula</i> de regeneración natural.....	50
Figura 18. Evaluación de altura en <i>P. patula</i> de regeneración natural.....	52
Figura 19. Evaluación de diámetro en <i>P. patula</i> de regeneración natural.....	53
Figura 20. Ramas de <i>Pinus patula</i> de regeneración natural con diferentes tratamientos.....	53
Figura 21. Inoculación de <i>Pinus patula</i> de 15 metros.....	55
Figura 22. Lesiones por acícula en pinos de 15 metros de altura a los 8 y 12 meses.....	56
Figura 23. Acículas de <i>Pinus patula</i> con diferentes tratamientos.....	57
Figura 24. Severidad de la enfermedad en <i>Pinus patula</i> de 15 años.....	57
Figura 25. Ramas de <i>Pinus patula</i> de 15 años con diferentes tratamientos.....	58

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Por la beca tesis que me otorgaron para el curso de la Maestría en Ciencias Ambientales.

A la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) Delegación Puebla. Por el apoyo para la realización de los experimentos en campo.

A la brigada de la Comisión Nacional Forestal región Tetela de Ocampo por su valioso apoyo en la inoculación de los pinos de 15 años.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP). Por el apoyo al proyecto grupal “Diagnóstico de la enfermedad fúngica de *Pinus patula* de Tetela de Ocampo, Puebla y propuesta de biocontrol” con clave 100155588-VIEP2018 (2017-2018) perteneciente al Programa Institucional de Fomento a la Investigación y a la Consolidación de Cuerpos Académicos.

## 1. Resumen

Existe la evidencia de enfermedades en *Pinus patula* (*P. patula*) presentes en la zona forestal del Municipio de Tetela de Ocampo, Puebla que causan pérdida foliar y se considera que los hongos podrían ser los responsables. El objetivo del presente trabajo fue identificar los hongos asociados y proponer su biocontrol con bacterias antagonicas para disminuir las afectaciones en la biomasa forestal provocada por las enfermedades fúngicas. Se realizó el muestreo de acículas enfermas de árboles de pino. Se aislaron 42 hongos provenientes de acículas recolectadas en la zona de estudio. Los más frecuentes fueron: *Diplodia sapinea*, *Curvularia* sp., *Alternaria alternata*, *Myrmaecium rubricosum*, *Daldinia* sp., *Botryosphaeria dothidea*, *Annulohyphoxylon styquium* y *Lophodermium* sp. Se realizaron ensayos de antagonismo *in vitro* con bacterias de los géneros *Burkholderia* sp. (2 cepas), *Serratia* sp. (3 cepas) y *Stenotrophomonas* sp. (1 cepa) que han demostrado efecto inhibitorio contra hongos de origen agrícola y forestal. El género bacteriano más eficiente fue *Burkholderia*. Se evaluó el efecto antagonista de las seis cepas bacterianas contra dos hongos inoculados en acículas de *P. patula* en condiciones de cámara húmeda. La mezcla bacteriana del género *Serratia* sp. (cepas PIR-D, P3S-B y P5S-A) procedente del bosque favoreció la sanidad de follaje y presentó la menor severidad (1.38%) e incidencia (1.66 lesiones por acícula) con respecto al control (4.72% de severidad y 2.77 lesiones por acícula). En experimentos *in situ* (a los 12 meses posteriores de la primera aplicación), la mezcla bacteriana del género *Serratia* sp. (Biologico 1), también presentó menor severidad (1.94%) e incidencia (2.75 lesiones por acícula) en pinos de regeneración natural (3-5 meses de edad). Además, se encontró que la aplicación de la mezcla bacteriana procedente de sistemas forestales estimuló el crecimiento de los árboles, mejoró su sanidad e incrementó la altura (150%) y diámetro (211%). En *Pinus patula* de 15 años de edad, las bacterias favorecieron el menor porcentaje de severidad (1.30%), incidencia (1.50 lesiones por acícula) y un mayor crecimiento de las acículas con respecto al control (22.8 cm). Por lo que, el control biológico con bacterias de origen forestal son una alternativa en la conservación de la salud forestal en la especie *P. patula*, lo que podría beneficiar a los sectores ecológico, económico, social y ambiental.

## 2. Abstract

There is evidence of diseases in *Pinus patula* (*P. patula*) from Tetela de Ocampo, Puebla that causes foliar loss and fungi are probably responsible of the infection. The objective of the present work was the identification of the associated fungus responsible of the *Pinus patula* infection and elaboration of a proposal for its biocontrol using an antagonistic bacteria to reduce the affectations in forest biomass. Sampling of diseased needles of pine plants was carried out from which 42 fungi were isolated in the study area. The most frequent identified fungi were: *Diplodia sapinea*, *Curvularia* sp., *Alternaria alternata*, *Myrmaecium rubricosum*, *Daldinia* sp., *Botryosphaeria dothidea*, *Annulohyphoxylon styquium* and *Lophodermium* sp. *In vitro* antagonism tests were carried out using bacteria of the genera *Burkholderia* sp. (2 strains), *Serratia* sp. (3 strains) and *Stenotrophomonas* sp. (1 strain), that have shown an inhibitory effect against fungi of agricultural and forestry origin. The most efficient bacterial genus was *Burkholderia*. The antagonistic effect of the six bacterial strains against two fungi inoculated in *Pinus patula* needles under humid chamber conditions was evaluated. The bacterial mixture of the genus *Serratia* sp. (strains PIR-D, P3S-B and P5S-A) from the forest favored foliage health and presented the lowest severity (1.38%) and incidence (1.66 lesions per needle) with respect to control assays (4.72% severity and 2.77 injuries by needle). *In situ* experiments (12 months after the first application) the bacterial mixture of the genus *Serratia* sp. (Biologico 1) also presented lower severity (1.94%) and incidence (2.75 lesions per needle) in pines of natural regeneration (3-5 months of age). In addition, it was found that the application of the bacterial mixture from forest systems stimulated the growth of the trees, improved their health, the height (150%) and the diameter (211%) of the pines. In *Pinus patula* of 15 years of age the bacteria (Biologico) favored the lowest percentage of severity (1.30%), incidence (1.50 lesions per needle) and a better growth of the needles with respect to the control assay (22.8 cm). Therefore, biological control with bacteria of forest origin is an alternative in the conservation of forest health in the specie *P. patula*, which could benefit the ecological, economic, social and environmental sectors.

### 3. Introducción

Las zonas forestales son sistemas complejos conformados por organismos vegetales, animales y microorganismos que cumplen un rol específico y contribuyen al mantenimiento de la biosfera. El mantenimiento del equilibrio de estos sistemas es un requisito indispensable para asegurar la interacción de los diferentes factores del ambiente, que hacen que el ecosistema mantenga su estabilidad dinámica. La relación entre los individuos y su medio, determinan la existencia de un equilibrio ecológico indispensable para la vida de todas las especies (CONAFOR, 2016).

Los bosques de coníferas representan un factor de importancia en diferentes áreas:

1. La económica; ya que genera recursos por la venta de madera, que se utiliza en la construcción, muebles, paneles, pisos y para la fabricación de sustancias como trementina, colofonia, celulosa y papel.
2. La ambiental; estas plantas forman densos bosques que humedecen la atmósfera, regulan las lluvias y evitan las erosiones por efecto de las lluvias y el viento. Los pinos brindan la forestación en áreas donde los árboles caducifolios no pueden crecer debido a la extrema elevación y la latitud.
3. La ecológica; ellos proveen hábitat y fuente de alimento para la fauna en estas áreas y purifican el aire.
4. La social; proporcionan alimento para los seres humanos, además del valor paisajístico que aportan a los espacios libres (FAO, 2005).

Las enfermedades que afectan la zona forestal en México se han expandido alarmantemente. Constituyen uno de los cuatro factores principales que determinan la dinámica de los ecosistemas junto con las plagas, el fuego y las condiciones climáticas. Los hongos son los principales agentes asociados de enfermedades forestales pudiendo atacar diferentes partes de las plantas y su funcionamiento en varias formas (síntomas). Por ejemplo, aquellos hongos que causan defoliación provocan una disminución en la tasa fotosintética; los causantes de canchales 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 (Belén *et al.*, 2011).

Algunas enfermedades fúngicas se manejan fácilmente con soluciones químicas, mientras que otras se propagan rápidamente debido a que no hay medios conocidos para controlar la

propagación. Existen alternativas de combate a estas enfermedades, como medidas culturales y la aplicación de biocontroladores. El término biocontrol se refiere a la manipulación de agentes naturales por el hombre para reducir las pérdidas en agricultura, forestación o productos comerciales. Está libre de los efectos secundarios indeseables asociados a los pesticidas de amplio espectro, y es uno de los métodos de mejor relación entre costo y efectividad.

En esta investigación se propuso la búsqueda de los agentes fúngicos asociados a la enfermedad que provoca la pérdida foliar en *P. patula* presente en la zona forestal de Tetela de Ocampo y, la aplicación del biocontrol como una alternativa que disminuya la infección sin afectar el equilibrio del ecosistema.

#### **4. Planteamiento del problema**

México ocupa uno de los primeros lugares en tasas de pérdidas de vegetación forestal en el mundo. Las estimaciones oficiales muestran una pérdida de vegetación arbolada en los últimos años de cerca de 1.08 millones de hectáreas por año (Velázquez *et al.*, 2002).

La degradación de los bosques es frecuentemente determinada por el uso no sustentable de los recursos forestales. En zonas principalmente de clima templado, la extracción de productos es superior a la capacidad de regeneración del bosque. Se estima que sólo el 15.1% de la superficie total arbolada (56.8 millones de ha), está bajo manejo técnico de algún tipo. Se calcula que alrededor de 21.6 millones de hectáreas (38%) tienen potencial para la producción comercial. La alteración del medio y los trastornos ambientales provocados por el hombre han provocado que los bosques sean uno de los ecosistemas con mayor degradación y pérdida de biodiversidad (FAO, 2015).

Las plagas y enfermedades forestales constituyen un factor importante de degradación de los bosques de clima templado. Actualmente la aplicación de fungicidas como método de control de enfermedades por hongos es el más utilizado por su fácil aplicación. Cada uno de ellos tiene una composición y función diferente; así como también ocasionan impactos negativos al medio, al filtrarse a través del suelo o dispersarse en el aire, lo que genera una contaminación que puede extenderse hasta los mantos freáticos. Además, son altamente tóxicos para los seres vivos, ya que perjudican los pulmones, los ojos, la piel y son venenosos al ingerirse (Crissman, 2002).

A pesar de los esfuerzos realizados por el sector forestal, existe una baja proporción de la superficie arbolada sujeta a diagnóstico y detección oportuna de las plagas y enfermedades forestales nativas (CONAFOR, 2003). Puebla es un estado biodiverso ubicado en la parte central de México. Se caracteriza por tener una amplia heterogeneidad de altitudes con extensa variabilidad de climas y tipos de vegetación, predominando los bosques de coníferas y encino. En Puebla los bosques de pinos presentan daños debido a una gran variedad de factores bióticos, abióticos y antrópicos (Ruiz *et al.*, 1998; Cibrián *et al.*, 2007; Conabio, 2011). Lo anterior se debe principalmente al cambio del uso de suelo, incendios forestales, pastoreo intensivo y a las talas clandestinas que provocaron la fragmentación del bosque en una superficie estimada en 107,551 ha (CONAFOR, 2004). Existen defoliaciones en diferentes especies de pino en el estado de Puebla, siendo los hongos uno

de los agentes involucrados de esta pérdida foliar en la Sierra Norte de Puebla. La evolución de la enfermedad fúngica que presentan los árboles de coníferas inicia con la presencia de manchas cloróticas en las acículas. En estado avanzado el color de las hojas se vuelve café-rojizo con pequeñas manchas de color negro que se traduce en daño del pino por defoliación a diferentes niveles, hasta que se llega a provocar la muerte del hospedero en casos graves. El mayor grado de infestación por enfermedades fúngicas, se encuentra en Zacatlán y Tetela de Ocampo, Puebla, con un 100% de incidencia. En los meses entre octubre y mayo, se crean las condiciones climáticas adecuadas de propagación de los hongos y de la caída foliar del pino, consecuencia del estrés hídrico del arbolado y del viento como medio de dispersión (CONAFOR, 2015).

Durante el periodo 2011-2014, fueron detectadas defoliaciones en diferentes especies de pino de la Sierra Norte de Puebla: *P. patula*, *P. pseudostrobus*, *P. oaxacana*, *P. teocote*, *P. leiophylla* y *P. montezumae*; y en menor grado *P. greggii* y *P. ayacahuite* en aproximadamente 14 municipios, entre los que destacan: Zacatlán, Tetela de Ocampo, Aquixtla, Zautla, Xochiapulco y Zacapoaxtla. Durante 2015 se censó alrededor de 3,000 ha infectadas. De no atender este problema se estima que podría extenderse a diferentes estados de la República Mexicana. De acuerdo con los signos y síntomas observados durante diversos recorridos, se ha determinado la presencia de micromicetos del género *Lophodermium* sp., *Pestalotiopsis* spp. y *Coleosporium* sp. (Arriola *et al.*, 2015) e insectos del género *Ocoaxo* sp.

En la región de la Sierra Norte del Estado de Puebla existen afectaciones por plagas y enfermedades que están siendo investigadas para su control o eliminación. Afectan de distinta forma, desde la disminución foliar hasta la pérdida total del árbol cuando el daño persiste, provocando la pérdida de miles de hectáreas de zona forestal. Por lo que, es importante diseñar nuevas estrategias que ayuden a disminuir el daño sin perturbar al ecosistema.

#### 4.1 Preguntas de investigación

- ¿Cuáles son los hongos asociados a la enfermedad fúngica de *P. patula* en Tetela de Ocampo, Puebla?
- ¿Cómo pueden controlarse de forma biológica la presencia de la enfermedad fúngica de *P. patula* en Tetela de Ocampo, Puebla?

## 5. Justificación

Existe la evidencia de enfermedades en *P. patula* presentes en la zona forestal de Tetela de Ocampo, Puebla. Se considera que los hongos son los responsables de la mayoría de las enfermedades. El manejo sustentable de este recurso es de gran importancia, la propuesta de técnicas encauzadas a presentar alternativas de manejo forestal posibilita su conservación y restauración. Dada la importancia comercial y ecológica de esta especie en el estado de Puebla, se pretende realizar una propuesta de biocontrol en *P. patula* con la finalidad de disminuir la incidencia de las enfermedades fúngicas, sin afectar su ecosistema y con ello garantizar la densidad poblacional de la especie, siendo así una respuesta a la necesidad de conservación del bosque de pinos en la región y un aporte al conocimiento en el área de estudio. La atención de la enfermedad podría beneficiar a los sectores ecológico, económico, social y ambiental con la mejora de la salud y biomasa del bosque. Lo que contribuye a restablecer el equilibrio en el desarrollo de la vegetación de *P. patula* afectada por enfermedades fúngicas sin afectar el ecosistema.

## **6. Objetivos**

### **6.1 Objetivo general**

Elaborar una propuesta de biocontrol a través del uso de bacterias antagonicas de la enfermedad fúngica presente en la zona forestal de Tetela de Ocampo, Puebla.

### **6.2 Objetivos específicos**

1. Aislar e identificar los hongos que afectan *P. patula* en Tetela de Ocampo, Puebla.
2. Determinar los hongos de mayor impacto en la zona forestal.
3. Seleccionar y caracterizar bacterias con actividad antifúngica procedentes de zona forestal y agrícola.
4. Evaluar el antagonismo de bacterias como agentes de control biológico de hongos en placas.
5. Desarrollar y aplicar ensayos de biocontrol en acículas de *P. patula* en cámara húmeda.
6. Validar el biocontrol de hongos patógenos en *P. patula* en la zona forestal de Tetela de Ocampo.

## **7. Hipótesis**

### **7.1 Hipótesis general**

La inoculación de bacterias de origen agrícola y forestal tendrán una respuesta antagónica en los hongos patógenos de *P. patula*, lo que permitirá disminuir significativamente la enfermedad.

## 8. Marco teórico

El crecimiento económico mundial ejerce cada vez mayor presión en los recursos forestales. La creciente urbanización y producción de alimentos ha contribuido a que se pierdan alrededor de 130 millones de hectáreas de bosque, lo cual representa un costo para la economía global de entre 2 y 4.5 billones de dólares al año (FAO, 2018). En lo que respecta a las perturbaciones debidas a plagas, enfermedades y fenómenos meteorológicos graves, solamente 75 países (que representan el 70% del total de la superficie forestal mundial) presentaron datos sobre la superficie afectada, y notificaron en total casi 100 millones de hectáreas de bosques afectadas por plagas y enfermedades. América del Norte y Central informaron la superficie forestal afectada más grande (58 millones de hectáreas). La importancia económica y social del sector forestal es indudable. Se estima que la producción de madera y su industria transformadora, representa cerca del 1% del Producto Interno Bruto (PIB) mundial y emplea a 0.4% de la mano de obra total. Puede llegar a representar más de 17% del PIB en algunos países. En el ámbito social, se calcula que alrededor de 1,000 millones de personas en el mundo dependen para su subsistencia de los bosques, ya sea como red de seguridad económica o como fuente directa de ingresos. Sin embargo, el sector forestal es uno de los seis sectores que requieren una transformación tecnológica radical para conseguir la sostenibilidad mundial (FAO, 2012).

Los bosques y los árboles brindan contribuciones decisivas tanto a las personas como al planeta al: 1.- fortalecer los medios de vida, 2.- suministrar aire y agua limpios, 3.- conservar la biodiversidad y 4.- responder al cambio climático.

Los bosques representan fuentes de alimentos, medicinas y combustible para más de mil millones de personas. Además de ayudar a responder al cambio climático y proteger los suelos y el agua, albergan más de tres cuartas partes de la biodiversidad terrestre mundial, proporcionan numerosos productos y servicios que contribuyen al desarrollo socioeconómico y son particularmente importantes para cientos de millones de moradores de las zonas rurales, entre los que se cuentan muchas de las personas más pobres del mundo. La deforestación, es causada principalmente por la conversión de la tierra forestal

en zonas de agricultura y ganadería, amenaza no solo a los medios de vida de los silvicultores, las comunidades forestales y los pueblos indígenas, sino también a la variedad de la vida en nuestro planeta. Los cambios de uso de la tierra dan lugar a una pérdida de hábitats valiosos, a la degradación de la tierra, la erosión del suelo, la disminución del agua limpia y la liberación de carbono a la atmósfera. La calidad del agua, imprescindible para la salud y la vida de las poblaciones tanto rurales como urbanas, está directamente relacionada con la gestión forestal (FAO, 2018).

La respuesta mundial al cambio climático en términos de adaptación, mitigación y resiliencia debe centrarse más en los bosques. Estos desempeñan una función decisiva para determinar la acumulación de gases de efecto invernadero en la atmósfera. Al actuar como sumideros de carbono, absorben el equivalente a aproximadamente 2,000 millones de toneladas de dióxido de carbono cada año. No obstante, la deforestación es la segunda causa más importante del cambio climático después de la quema de combustibles fósiles y representa casi el 20% de todas las emisiones de gases de efecto invernadero; más que todo el sector del transporte a nivel mundial. La gestión eficaz de los bosques puede fortalecer la resiliencia y las capacidades de adaptación a los desastres naturales relacionados con el clima, lo que destaca la importancia de integrar las medidas basadas en los bosques en las estrategias nacionales de reducción del riesgo de catástrofes. Además de esto, los bosques suministran aproximadamente el 40% de la energía renovable mundial en forma de dendrocombustible; esto equivale a la energía solar, la hidroeléctrica y la eólica combinadas (FAO, 2018).

México cuenta con aproximadamente 64 millones de hectáreas de bosques de clima templado y selvas que abarcan el 32% del territorio nacional. Es considerado como uno de los 12 países megadiversos (FAO, 2015). Esta gran diversidad biológica es producto de la compleja topografía, la variedad de climas y la conexión de dos zonas biogeográficas (neártica y neotropical), que constituyen un variado complejo de condiciones ambientales (CONABIO, 2000). En las áreas tropicales y de bosque es donde se encuentra la mayor parte del patrimonio genético (calculada en el 10% del total mundial) que existe en México (Benítez y González, 1997). Tales recursos son de gran importancia para el país desde el punto de vista social, económico y ambiental. Aproximadamente el 80% de los bosques y

selvas del país se encuentran bajo régimen de propiedad social, constituidos en alrededor de 8,500 núcleos agrarios. Las poblaciones comprendidas en estos núcleos están estrechamente relacionadas con los recursos forestales para la obtención de sus principales necesidades (FAO, 2005). Se estima que la remoción anual de madera es del orden de los 56 millones de m<sup>3</sup>/año. Varios centros urbanos dependen en gran medida de los servicios ambientales que generan los bosques aledaños. La contribución directa del sector forestal es de 5,000 millones de dólares por año (0.81% del PIB nacional) y genera alrededor de 100,000 empleos permanentes cuyo sueldo es entre 3-4 veces superior al sueldo derivado de actividades agropecuarias (FAO, 2006). Durante las últimas décadas, la conservación forestal y los servicios ambientales forestales han tenido una importancia nacional y global. La conservación forestal es un tema particularmente sensible en México, uno de los países con una mega diversidad, donde los bosques sostienen una gran parte de dicha diversidad biológica.

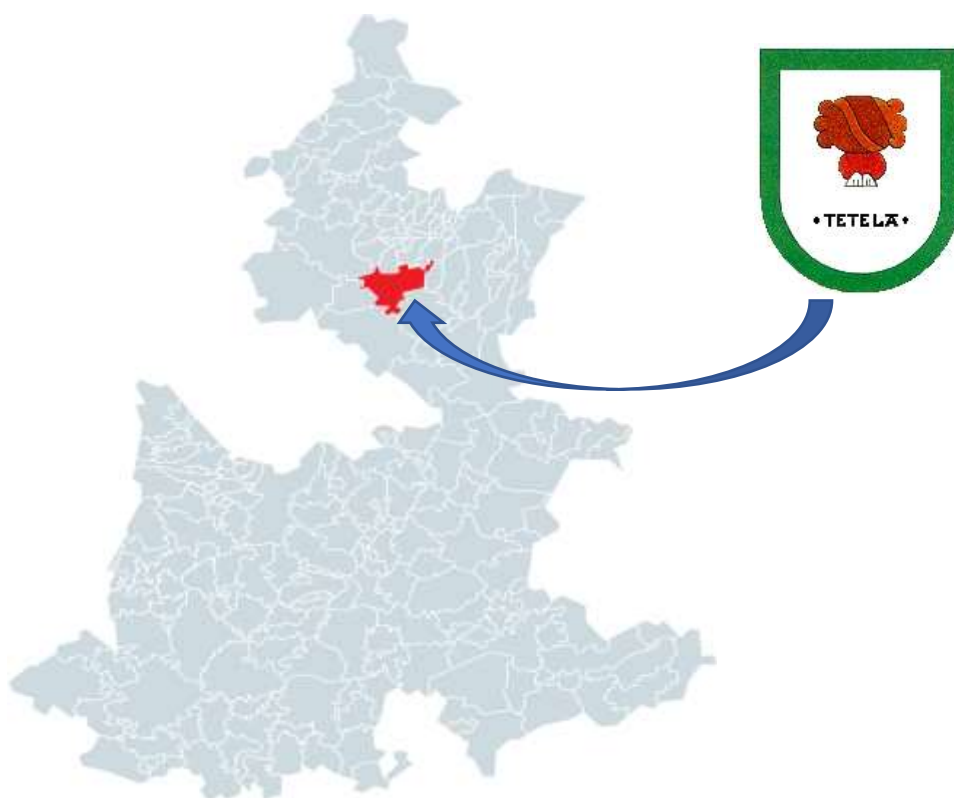
Los principales problemas del sector forestal son:

1. inseguridad de la tenencia de la tierra;
2. organización insuficiente de los ejidos y comunidades como unidades de producción forestal comercial;
3. sobre explotación localizada del recurso;
4. un comercio exterior de productos forestales con un balance negativo de 12,000 millones de pesos por año;
5. un sector privado con una crisis de competitividad internacional;
6. degradación del medio ambiente; y
7. un inadecuado marco institucional y legal para promover la producción forestal sustentable, lo que resulta en altos costos de transacción, caracterizado además por una falta de continuidad administrativa y de políticas (FAO, 2006).

### **8.1. Tetela de Ocampo**

El estado de Puebla está delimitado principalmente por la Sierra Madre Oriental y la Cordillera Neovolcánica. La primera con el nombre de la Sierra Norte de Puebla se

introduce al territorio poblano por el Noroeste, se descompone en las Sierras de Zacapoaxtla, Huauchinango, Teziutlán, Tetela de Ocampo, Chignahuapan y Zacatlán. En el estado de Puebla se encuentra la vegetación de tres ecosistemas: templado-frío (bosques), tropical (selvas) y zonas áridas (árido y semiárido) (INAFED, 2012). Los bosques de clima templado-frío poseen una enorme capacidad de generar beneficios ecosistémicos, sociales y económicos. Tienen un gran valor por ser la fuente principal de madera, por su contribución al ciclo hidrológico, por ser hábitat y fuente de alimento de fauna silvestre y por su valor estético, recreativo y en esta tesis como sitio de estudio. Los bosques presentan evidencias de perturbación, en la calidad y en la superficie arbolada. Esto se debe principalmente a los cambios del uso del suelo, a los incendios forestales, al pastoreo intensivo y a las cortas clandestinas de árboles que han provocado la fragmentación del bosque (INAFED, 2012).



**Figura 1.** Localización del Municipio de Tetela de Ocampo, Puebla. INAFED (2012).

El Municipio de Tetela de Ocampo se ubica dentro de la Sierra Norte de Puebla (Figura 1). Está constituida por sierras más o menos individuales comprimidas unas contra las otras que forman altiplanicies intermontañas escalonadas hacia la costa (INAFED, 2014). La

sierra que se levanta al sureste, al oriente del río Zitalcuautla, tiene 7 kilómetros de recorrido. Se inicia al norte del poblado de Las Canoas y terminan en Capuluaque, con 2,800 metros de altura sobre el nivel del mar. La estructura de la masa forestal es la forma en que los diferentes elementos del sistema se organizan en el espacio (Kimmins, 1997) y se describe mediante tres características: 1) diversidad y mezcla de especies; 2) distribución espacial y 3) variaciones en las dimensiones de los árboles (Gadow y Hui, 1999; Franklin *et al.*, 2002). Estos bosques presentan un clima templado subhúmedo, con lluvias en verano, temperatura media anual de entre 12° y 18° C y la del mes más frío entre 3 y 18° C. La precipitación del mes más seco es menor de 40 mm. Las heladas en los meses de diciembre a enero se presentan con una frecuencia de 20-40 días al año. La cadena montañosa que atraviesa el bosque es parte de la Sierra Madre Oriental, ubicándose en la Sierra Norte del estado de Puebla, situada en la región noroccidental de la sierra (Domínguez-Hernández *et al.*, 2012).

Esta sierra está compuesta principalmente por un bosque de pino. La región está afectada por enfermedades fúngicas que provocan la disminución de la densidad vegetal y ponen en riesgo el equilibrio ecosistémico. La ineficiencia de los tratamientos con fungicidas y los efectos secundarios negativos, promueven la búsqueda de alternativas, cuya finalidad sea el control de las enfermedades sin afectar el ecosistema (Nicolás, 2011).

## **8.2 *Pinus patula***

Es una especie nativa de las regiones subtropicales de México, se distribuye en la parte superior de la Sierra Madre Oriental. Abarca desde el norte del estado de Hidalgo hasta el Cofre de Perote, en latitudes entre 16 °N a 24 °N y altitudes entre 1,500 y 3,100 m.

*P. patula* puede crecer en masas puras o asociado con otras especies como *Pinus teocote*. En general se restringe a sitios húmedos, subtropicales a cálido-templado, con una precipitación anual 1000-1500 mm (Dvorak y Donahue, 1992).

*Pinus patula* es el pino mexicano más plantado dentro y fuera de México, valioso por su velocidad de crecimiento y calidad de su madera para producción de madera en rollo y material para celulosa (Gillespie, 1992; Dvorak *et al.*, 2000; Velázquez *et al.*, 2004). El interés en la especie aumenta por su facilidad de manejo (Dvorak *et al.*, 2000). Esta especie puede crecer más de 1 metro de altura por año (Vela, 1980; Monroy, 1995). Es un árbol de

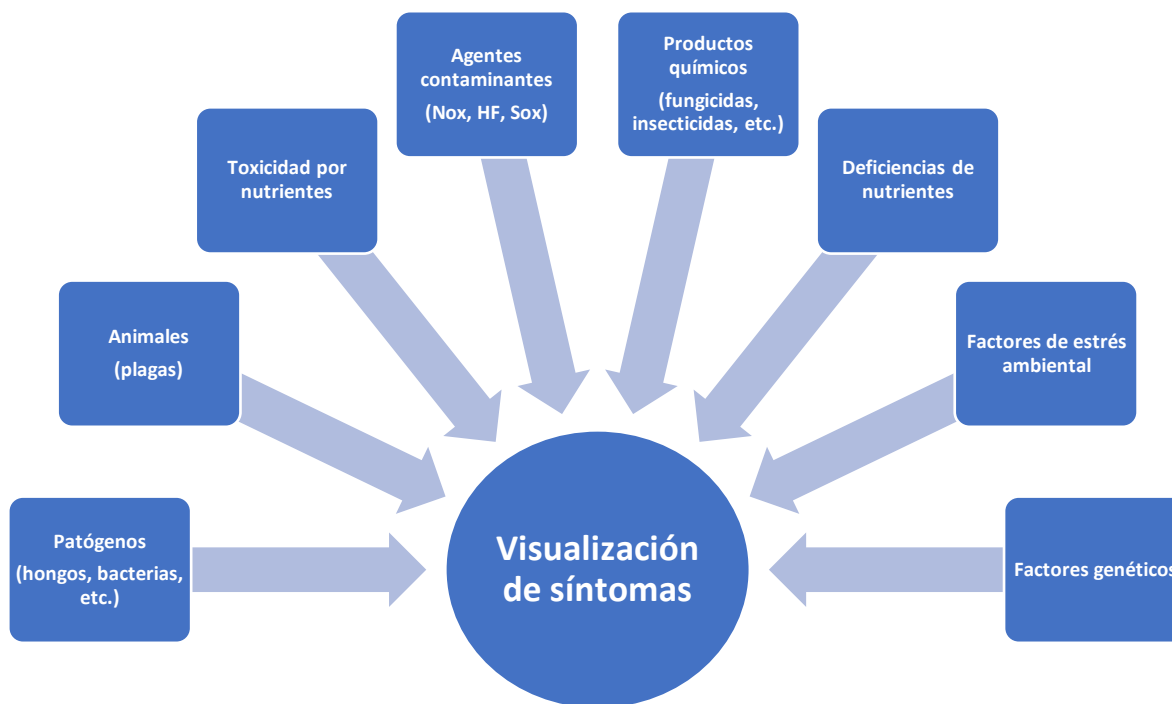
porte mediano a grande, que en ejemplares longevos puede alcanzar alturas de hasta 40 m y 120 cm de diámetro. El tronco es recto, cilíndrico en un comienzo y bastante cónico en casi toda su longitud. En árboles jóvenes, inicialmente la corteza es lisa y rojiza, y luego, ésta se torna marrón, áspera y se desprende en escamas. La distribución de las ramas es variada, aunque en general son verticiladas, las ramas pequeñas son escamosas y rojizas. Los rebrotes con algunos nódulos son verde pálido hasta pardo rojizos. La copa es extendida con ramas largas y colgantes. Esta especie desarrolla un buen sistema radical, pivotante y profundo (Martín, 2015). Las hojas son acúculadas, agrupadas en fascículos de 3 ó 4 agujas, raramente presentan 2 ó 5, persistentes en el árbol por 2 a 4 años, de 20 cm por lo general, aunque alcanzan longitudes entre 15 y 30 cm, son flexibles y péndulas de color verde-azulado, brillantes, con los bordes finamente aserrados y dos haces fibrovasculares. Las vainas de las acúculas son de color ceniza, persistentes y de 1.5 cm de largo. Las yemas terminales son largas, erguidas y amarillentas (Parent, 1989). Sus flores son estróbilos unisexuales sobre el mismo árbol. Las inflorescencias femeninas son de color púrpura, principalmente laterales, pedunculadas, solitarias o en pequeños racimos de hasta ocho escamas, con pequeñas espinas deciduas. Los frutos tienen forma de conos ovoides, duros, puntiagudos, asimétricos, curvados en el extremo, persistentes en el árbol, de 4 a 12 cm de largo por 2.5 a 5.0 cm de diámetro, dispuestos en pedúnculos cortos hasta de 1.5 cm y, frecuentemente agrupados de tres a siete. Las escamas que recubren los frutos son redondeadas, con espinas deciduas, gruesas, de 2.0 cm de largo por 1.0 cm de ancho y se abren periódicamente (Wormald, 1975). Sus semillas son pequeñas, triangulares, de color marrón a negruzcas, de 3.0 a 5.0 mm de longitud, la membrana que las recubre tiene 2.0 cm de largo y 1.0 cm de ancho, con líneas negruzcas engrosadas al final (Parent, 1989). La madera que posee tiene una densidad anhidra de  $0.48 \text{ g cm}^{-3}$  y una densidad básica de  $0.43 \text{ g cm}^{-3}$  aproximadamente. Es blanda, recién cortada presenta olor agradable a resina, de color ligeramente amarillento, de durabilidad natural baja; debido a la susceptibilidad al ataque insectos xilófagos y de hongos que descomponen la madera. Se seca bien, tanto al aire libre como en el secado artificial, lo que permite que sea ampliamente utilizada como madera de aserrío; cuando se seca al aire tiende a presentar ligeras torceduras. Es de fácil preservación por los métodos de inmersión, baño caliente-frío y vacío-presión, lo cual permite utilizarla en construcción, como tablilla para pisos, postes de transmisión de

energía y telefónicos. Además, es muy empleada en la construcción de viviendas. La especie no se desarrolla bien en suelos poco profundos, debido a su baja retención de humedad. Se ha comprobado que esta especie puede extraer agua hasta 4.3 metros de profundidad y desarrollarse adecuadamente sobre un horizonte endurecido, el cual es capaz de romper (Wormald, 1975).

### **8.3 Plagas y enfermedades comúnmente asociadas a *Pinus patula*.**

Los problemas fitosanitarios que se reportan para pinos están relacionados a plantaciones establecidas con material vegetal de mala calidad. También pueden estar relacionados a condiciones medioambientales inadecuadas para la especie. Algunas enfermedades se manejan fácilmente con soluciones químicas o biológicas, mientras que otras se propagan rápidamente a través de una población infectada debido a que no hay medios conocidos para su control. Es importante no confundir los daños causados por hongos con la toxicidad por herbicidas o con deficiencias nutricionales, donde puedan estar implicados elementos como boro, fósforo y potasio, entre otros (Figura 2). Las enfermedades se propagan de muchas maneras, desde esporas hasta insectos, y muchas infectan a todas las especies de

pino. Los árboles jóvenes son especialmente susceptibles a los hongos (Riley *et al.*, 2002).



**Figura 2.** Causantes de visualización de síntomas de deficiencias, trastornos o enfermedades en sistemas forestales (UDU, 2015).

#### 8.1.3.1 Principales plagas y enfermedades asociadas a la especie.

A) Fusariosis causada por *Fusarium* sp.: Este hongo provoca daños en semillas, en plantas de vivero y en árboles adultos. Penetra a nivel del suelo y luego infecta toda la planta entrando por los conductos vasculares. Su importancia económica aumenta cuando parasita plantaciones jóvenes, les ocasiona necrosis e interfiere en la conducción de nutrientes hacia las hojas, lo que provoca el secamiento de ramas o la muerte descendente de los individuos más susceptibles. La enfermedad está asociada con el encorvamiento de los ápices, la deformación o menor tamaño de los conos y concavidades resinosas en el tallo.

El género *Fusarium* es un patógeno distribuido ampliamente a nivel mundial (en más 32 países) y afecta a más de 80 cultivos de importancia comercial, como el tomate y la cebolla. Es un patógeno facultativo que parasita y enferma tejidos vivos. También puede alimentarse de material muerto y en descomposición. Presenta estructuras de resistencia

que le permite sobrevivir en el suelo, durante 6 años (Ospina *et al.*, 2009). Debido a su capacidad de crecer a 37°C, son considerados oportunistas, dependiendo de las heridas para infectar la planta. En el ser humano puede causar infecciones sistémicas en humanos inmunocomprometidos, con una alta mortalidad (Piontelli, 2011).

B) La banda roja de la acícula, causada por *Mycosphaerella* sp.: Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de bandas que rodean la acícula, inicialmente de color verde claro que pasan a cloróticas y luego a rojizas. Su presencia es más frecuente en acículas mayores de un año, en principio las acículas nuevas permanecen sanas hasta que el proceso se reinicia. En casos graves, la enfermedad puede atacar las acículas del mismo año. Este *Ascomycete*, causa una enfermedad importante en las plantaciones de pino en varios países. Ocasiona el secamiento de las acículas provocando la defoliación de los árboles, lo que trae como consecuencia la reducción del área fotosintética y el vigor de los árboles afectados y, en casos graves la muerte del huésped. En su estado asexual (*Dothristoma pini*) se presenta como un problema de importancia económica. Es frecuentemente encontrado en las plantaciones de pino, sin que amerite la aplicación de correctivos químicos o biológicos; sin embargo, es importante contar con las condiciones edafoclimáticas y de nutrición adecuadas. Sin condiciones que le generen estrés, los árboles van a tener un mejor desarrollo, que se expresa en su capacidad para la defensa contra enfermedades, una mayor producción y madera de mejor calidad (Ospina *et al.*, 2009).

C) Volcamiento o pudrición causada por *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* sp.: Esta enfermedad se encuentra en semillas y plántulas, ocasionando la pudrición del cuello de la raíz. Su presencia está determinada por varios factores como: la humedad excesiva, altos niveles de pH del suelo o del agua, altos niveles de materia orgánica, la aplicación de fertilizantes nitrogenados después de la germinación, la siembra profunda, altas temperaturas, la mala aireación y los daños físicos ocasionados a las plantas. Estos hongos pueden actuar en forma aislada o como un complejo con otros agentes patógenos como *Fusarium* sp. y nematodos. Afectan principalmente la raíz y ocasionan la necrosis del hipocótilo a ras del sustrato, provocando la caída y muerte de la planta. Dañan las semillas en germinación antes y después de emerger. Estos microorganismos patógenos habitan en el suelo durante varios años y parasitan de forma que el micelio invade todo el sistema

radical. *Phytophthora* sp. y *Pythium* sp. son Oomycetes del orden Peronosporales, presentan zoosporas biflageladas, que son atraídas por las heridas o raíces succulentas, por donde entran en contacto, liberan el flagelo y posteriormente producen estructuras de anclaje y penetración, causando la pudrición húmeda de la radícula y la muerte de plantas (Ramírez, 2009).

D) Muerte descendente causada por *Diplodia sapinea*: Deuteromyceto que pertenece al orden Sphaeropsidales, familia *Botryosphaeriaceae*, es un parásito oportunista de coníferas con distribución mundial, pudiendo infectar las especies de abeto, cedro y alerce, observándose los daños más severos en el género *Pinus*. Plantas de todas las edades pueden verse afectadas por este patógeno debido a la plaga del tizón, produciendo chancros en el tallo, manchas en la madera, podredumbre de la corteza y el cuello, lo que puede producir deformidad o la muerte regresiva. Además, estos patógenos pueden persistir en plántulas asintomáticas, ser transportadas con plántulas a los sitios de campo, y proliferar para causar mortalidad después de plantar. La pudrición de semillas jóvenes también se ha atribuido a patógenos de *Diplodia* sp. (USDA, 2012). Situaciones de estrés como sequía, heladas, heridas, insectos y fertilización deficiente, entre otros, llevan a que este microorganismo abandone su condición de saprófito y parasite la planta, generando de esta forma la enfermedad (Ospina *et al.*, 2009). La enfermedad se hace perceptible solo cuando los tejidos muertos del ápice, ramas y brotes. Por lo general, se asocia a clorosis que avanza a decoloraciones pardas rojizas generalizadas y secamiento del follaje de los árboles. Ocasiona marchitamiento, necrosis y encorvamiento de los brotes apicales, además de la producción de abundantes exudados resinosos, seguido por el cambio de coloración, meses después del inicio de la infección. Posteriormente se presenta muerte de acículas y muerte descendente, llegando a provocar en casos graves la muerte de la planta hospedera. Persiste en tejidos sin causar ningún daño visible asociado con un estado latente del patógeno (Stanosz *et al.*, 1997). Se ha demostrado que el estrés ambiental de una variedad de fuentes induce o agrava el daño causado por las especies de *Diplodia*. Entre estos, el estrés hídrico parece ser el más importante (Blodgett *et al.*, 1998) aunque otros factores predisponentes, como un sitio deficiente, el granizo, la nieve, el daño por heladas y los insectos pueden mejorar la colonización de *D. sapinea* (Smith *et al.*, 2002).

E) Mancha azul en trozas de *Pinus patula* causada por el hongo cromógeno *Ceratocystis* sp.: Esta enfermedad ocasiona una coloración azul originada por la acción de varios hongos cromógenos entre los que se encuentra *Ceratocystis* sp. Los hongos de este género afectan principalmente árboles semisecos, muertos o recién cortados. A medida que el hongo penetra hacia el interior de la madera, lentamente colorea azul violáceo toda la sección transversal. Las hifas del micelio se desarrollan principalmente en las células de los radios leñosos (Alemán *et al.*, 2003). Aunque la mancha no deteriora la estructura de la madera, se ha encontrado asociada a la pudrición temprana de la madera (Solano, 1987). La presencia de la enfermedad no afecta la calidad de la madera, ni sus propiedades mecánicas para aserrío o para pulpa. Cambia el color, reduciendo su valor comercial, ya que limita su uso con fines decorativos o donde el brillo y la limpieza sean necesarios. La madera con mancha azul, para el caso de que su uso sea pulpa, incrementa los costos por el proceso de blanqueo y reduce la calidad del papel, lo cual le resta valor comercial (Lambeth *et al.*, 1989). El desarrollo del hongo se facilita a temperaturas entre 20-30°C y humedad del ambiente alrededor del 65%. Su presencia se disminuye entre 0-5°C y 35-45°C, y por debajo del 20% o por encima del 90% de humedad del aire; por ello, dos controles de fácil aplicación son el secado rápido o la irrigación (Lambeth *et al.*, 1989). En la industria de la madera se utilizan fungicidas para preservar la madera de aquellos hongos que causan manchas o pudrición.

#### **8.4 Control biológico.**

El término control biológico es un fenómeno natural que consiste en la regulación poblacional de plantas y animales por medio de enemigos naturales como: parásitos, depredadores y patógenos. También se refiere al control aplicado de plagas, técnica que incluye la manipulación de esos agentes naturales por el hombre para reducir las pérdidas en agricultura, forestación o productos comerciales.

El control biológico se implementa de tres formas diferentes o combinaciones de estas:

1. Conservativo: Consiste en alterar las prácticas culturales en los cultivos con la finalidad de favorecer el desarrollo de los agentes de control biológico natural y sus efectos.

2. Aumentativo: Los agentes de control biológico se producen en forma masiva en el laboratorio y se aplican en forma inoculativa o inundativa.
3. Clásico: Es la aplicación compuesta por el descubrimiento, importación y establecimiento controlado de enemigos naturales exóticos.

El control biológico está libre de los efectos secundarios indeseables asociados a los plaguicidas de amplio espectro y es uno de los métodos de mejor relación entre costo y efectividad. Cuando es aplicado por especialistas, bajo principios establecidos, el control biológico es seguro y no tiene efectos adversos sobre el ecosistema (Rodríguez *et al.*, 2010).

Se denomina natural y artificial o aplicado; cuando se refiere a la acción de los enemigos biológicos sin y con la intervención del hombre respectivamente (Hajek, 2004). Las medidas comunes utilizadas para el control de las enfermedades fúngicas son el uso de productos químicos y prácticas culturales. Sin embargo, el control por medio de dichas prácticas se ve restringido por razones económicas y ecológicas. La aplicación del biocontrol es una alternativa eficiente y se ha producido por la inoculación de diferentes organismos como: *Trichoderma* sp., es uno de los agentes biocontroladores más utilizados, inhibe el crecimiento de *Fusarium circinatum* y de *Diplodia sapinea*, ha mostrado su capacidad antagonista a través de la competencia por recursos. Controla otros hongos fitopatógenos mediante competencia, antibiosis y micoparasitismo, además favorece el desarrollo radical y la asimilación de nutrientes como el fósforo (Romero y Olivera, 2015). *Serratia* sp. ha sido utilizada como biocontrolador de enfermedades fúngicas causantes de pudrición en raíz (Dhar *et al.*, 2018), así como *Burkholderia cepacia* ha mostrado capacidad de biocontrol contra *Colletotrichum gloeosporioides* (de Los Santos-Villalobos *et al.*, 2012).

## **9. Materiales y métodos.**

### **9.1 Sitio de estudio.**

La zona de estudio está ubicada en el Municipio de Tetela de Ocampo, Puebla (Figura 3). Está compuesta por bosque natural con una altitud de 1,830 msnm en el cual la edad del pino oscila entre los 36.90 y 52.27 años, con un promedio de 46.20 años (Domínguez-Hernández *et al.*, 2012). Sin evidencias de aprovechamiento forestal, comprendiendo una

superficie total de 10.55 hectáreas con restricciones de acceso durante la época de lluvias, por sus pendientes pronunciadas.



**Figura 3.** Localización geográfica del sitio. Fuente: Elaboración propia. Mapoteca BUAP. 2018

La validación del biocontrol en condiciones naturales se realizó en dos sitios. El primero de ellos está conformado por una zona de *Pinus patula* de regeneración natural con una edad próxima a los 5 meses (Figura 4). Se aplicó un total de 12 tratamientos a un total de 48 pinos en el primer sitio. El segundo, es una zona de bosque de pino establecida cuya edad promedio de pino fue de aproximadamente 15 años (Figura 5). Se utilizó un total de 5 tratamientos con 10 repeticiones cada uno.



**Figura 4.** Localización del sitio de pinos de regeneración natural. Fuente: Elaboración propia, Mapoteca BUAP.

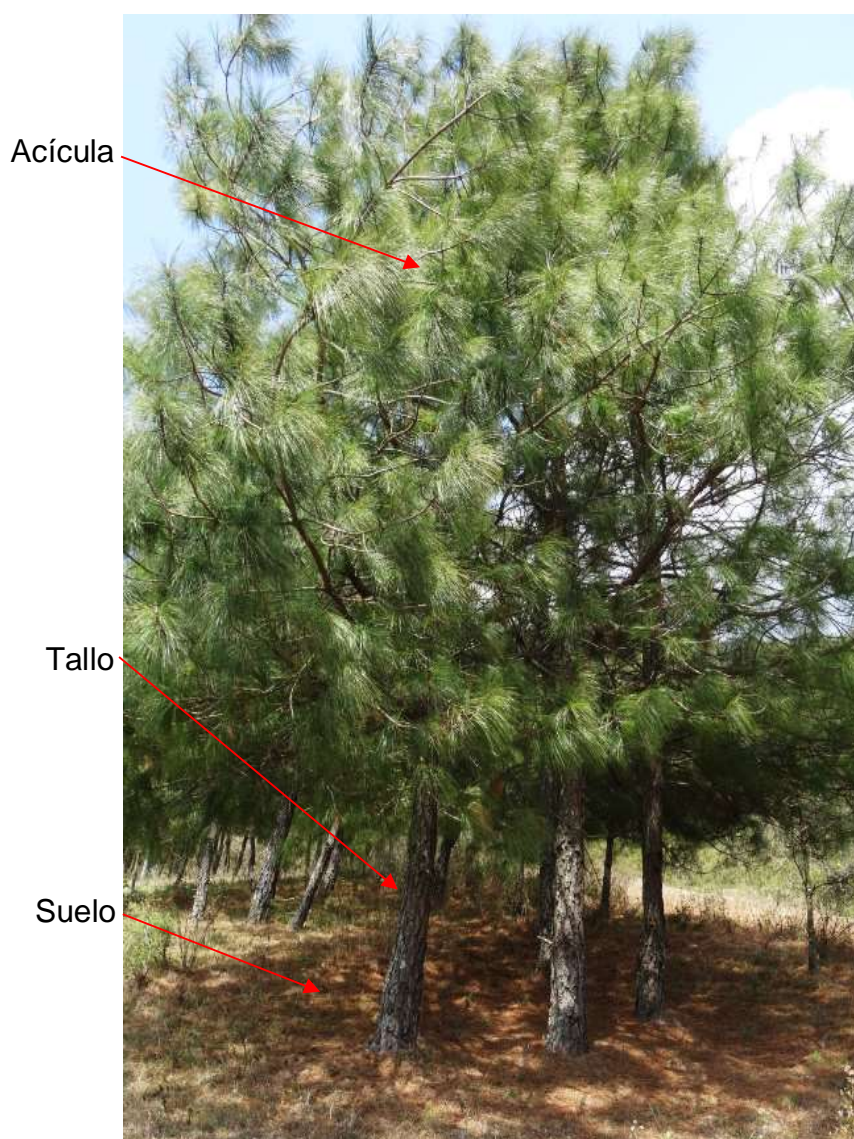


**Figura 5.** Localización del sitio de pinos de 15 años. Fuente: Elaboración propia, Mapoteca BUAP.

## 9.2 Metodología.

### 9.2.1 Fase de muestreo.

Se tomaron 13 muestras: seis de acícula y tres de tallo para su análisis microbiológico y cuatro de suelo para su análisis microbiológico, físico y químico (Figura 6). De cada una de ellas se capturaron los datos respectivos de: Nombre del colector. Nombre de la planta colectada (familia, género, especie). Lugar georreferenciado. Cultivo o ambiente (establecido o introducido). Fecha. Observaciones adicionales (estado de la planta, signo, síntomas, condiciones climáticas, etc.).



**Figura 6.** Estratos de colección de muestras en *Pinus patula*.

## 9.2.2 Fase de laboratorio.

### 9.2.2.1 Caracterización del suelo.

Se efectuaron los análisis físicos y químicos necesarios, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. Con la finalidad de caracterizar el suelo y detectar las deficiencias nutricionales.

Se determinó la población microbiana cultivable en suelo por la técnica de diluciones seriadas y cuenta en placa. La técnica permitió detectar a los organismos presentes en cada muestra. Se determinó el número de microorganismos en relación con las colonias que se forman a partir de unidades formadoras de colonia (UFC). Se realizaron siembras repetitivas hasta lograr que cada colonia formada proviniera de un solo microorganismo. Las diluciones se sembraron en agar de soya y tripticaseína (TSA), agar de MacConkey (AMC), Agar de Papa y Dextrosa (PDA) y Agar Czapek Dox (ACD).

### 9.2.2.2 Aislamiento de hongos patógenos.

Para el aislamiento de los hongos asociados a la enfermedad se sembraron muestras de *P. patula* (acícula, tallo, raíz) y suelo en los medios de cultivo: agar agua, PDA y tejido en cámara húmeda. Se aislaron 42 hongos que se purificaron y se procedió a su identificación.

### 9.2.2.3 Identificación de hongos asociados a *P. patula*.

1) Caracterización fenotípica. Los hongos patógenos se identificaron por observación de la morfología macroscópica de las colonias. La identificación microscópica se realizó por la técnica de microcultivo en caja Petri, a través de la observación de las estructuras fúngicas de reproducción. La técnica consistió en colocar un bloque de agar de 1 cm<sup>2</sup> sobre un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos. Se sembró el bloque con el hongo a identificar y se incubó dentro de una placa de vidrio hasta que el crecimiento del hongo fue evidente. Se prosiguió a colocar una gota de azul de metileno sobre el crecimiento fúngico y se observó al microscopio.

2) La caracterización genética se realizó a los 10 hongos más frecuentes asociados a la enfermedad en *P. patula*. Los hongos fueron cultivados en caldo de papa y dextrosa e incubados a 30°C durante 7 días. La masa micelial fue cosechada por filtración. Se realizó

la lisis celular para la extracción de ADN de acuerdo con el manual Wizard Genomic DNA Purification Kit de Promega. El ADN se usó para la amplificación de las regiones intergénicas ITS1 e ITS2. Se utilizaron los oligonucleótidos ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), para la amplificación de los espacios transcritos internos situados entre los genes ribosomales (rARN) 18S-5.8S y 5.8S-28S (White *et al.*, 1990) por la técnica de la reacción en cadena polimerasa (PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) y sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT) a través de UNIPARTS. La reacción se llevó a cabo dentro de un termociclador (Techne®TC-3000G), en un volumen final de 50 µL, los cuales contenían 17 µL de agua estéril, 2 µL de cada oligonucleótido (ITS1 e ITS4), 25 µL de enzima GoTaq de Promega® (PCR Colorless Master) y 4 µL de DNA genómico. El programa de PCR consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 2 minutos, seguido por 33 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 49 °C por 1 minuto y 72 °C por 3 minutos, y un paso final de 72 °C por 7 minutos. El producto amplificado por PCR se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 3% a 80 V durante 50 min. El gel se tiñó durante 30 minutos con GelRed® Nucleic Acid Gel Stain. Se observaron las bandas obtenidas en el gel con ayuda de un transiluminador (WiseUV® Wisd WUV-L50). Los productos de PCR se purificaron con DNA Wizard® Genomic DNA Purification Kit y fueron secuenciados por Servicios Genómicos Langebio del Centro de Investigación y Servicios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) en Irapuato, Guanajuato, México. Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Chromas Lite®. Y posteriormente fueron comparadas para su alineamiento con la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (The Basic Local Alignment Search Tool: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

#### 9.2.2.4 Selección y caracterización de bacterias con actividad antifúngica.

Se usaron seis bacterias con capacidad antifúngica procedentes del sector agrícola y del sector forestal (Cuadro 1), pertenecientes a la colección del Laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas-ICUAP. Bacterias eficientes en la inhibición de los hongos fitopatógenos fueron caracterizadas genéticamente a partir de la extracción de ADN, realizada de acuerdo con el procedimiento del Kit de

purificación de ADN genómico Wizard de Promega y la técnica PCR para la amplificación del gen 16S ARNr. Se usaron como iniciadores fD1 y rD1 sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT) a través de (UNIPARTS). La reacción se llevó a cabo dentro de un termociclador (Techne®TC-3000G), en un volumen final de 50 µL, los cuales contenían 23.5 µL de agua estéril, 5 µL de cada oligonucleótido (fD1 y rD1), 12.5 µL de enzima GoTaq de Promega® (PCR Colorless Master) y 4 µL de DNA genómico. El programa de PCR consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 3 minutos, seguido por 34 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 63.2 °C por 1 minuto y 72 °C por 2 minutos, y un paso final de 72 °C por 5 minutos. Los productos de PCR se observaron por electroforesis en gel de agarosa al 3% a 80 V durante 120 min. El gel se tiñó con GelRed® Nucleic Acid Gel Stain durante 45 minutos. Se observaron las bandas obtenidas en el gel con ayuda de un transiluminador (WiseUV® Wisd WUV-L50). Los productos de PCR se purificaron con DNA Wizard® Genomic DNA Purification Kit y fueron secuenciados por Servicios Genómicos Langebio del Centro de Investigación y Servicios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) en Irapuato, Guanajuato, México. Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Chromas Lite®. Y posteriormente fueron comparadas para su alineamiento con la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (The Basic Local Alignment Search Tool: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

**Cuadro 1.** Clave, origen, género y especie de bacterias antagónicas hacia hongos patógenos de pino.

Clave	Origen	Especie
PIR-D	Forestal	<i>Serratia proteamaculans</i>
AM12	Agrícola	<i>Burkholderia gladioli</i>
P5S-A	Forestal	<i>Serratia grimesii</i>
CA48	Agrícola	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
P3S-B	Forestal	<i>Serratia</i> sp.
AM6	Agrícola	<i>Burkholderia</i> sp.

#### 9.2.2.5 Pruebas de control biológico en placas de Petri.

Los 10 hongos patógenos más frecuentemente encontrados en asociación con la enfermedad en *P. patula* de Tetela de Ocampo se usaron para ensayos de antagonismo. Se realizaron ensayos de antagonismo en placas de Petri que contenían agar infusión de papa. Se usaron

seis bacterias seleccionadas (Cuadro 1) y caracterizadas contra los 10 hongos patógenos. Las bacterias se inocularon en forma radial sobre el agar. El hongo reto, se sembró por picadura en el centro de la placa y se registró el crecimiento de las colonias del hongo cada 24 horas durante seis días. El experimento se realizó con tres repeticiones por cada uno de los enfrentamientos.

#### 9.2.2.6 Ensayo de control biológico en cámara húmeda.

Se utilizaron charolas de plástico transparente con medidas de 20 cm x 25 cm con la finalidad de favorecer la visibilidad, el desarrollo fúngico y las condiciones de humedad. Las charolas se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 10% y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Se colocó papel absorbente previamente esterilizado en el interior de las charolas y se colocaron cinco acículas en cada uno de los diferentes tratamientos. Se infectaron las acículas con dos de los hongos más frecuentes en la zona forestal (M1MtPpA-PDAR5 y M4<sub>1</sub>MtPpa-PDAR5), tratándose con inoculaciones periódicas de las seis bacterias en estudio (AM6, AM12, CA48, PIR-D, P3S-B y P5S-A) y sus mezclas por 20 días. Las cámaras húmedas se incubaron a temperatura ambiente realizando todo el proceso en condiciones de esterilidad. Se monitoreó el desarrollo fúngico y se evaluó el porcentaje de severidad e incidencia de la enfermedad en los distintos tratamientos al término del experimento (a los 20 días de la primera inoculación bacteriana).

### **9.2.3 Fase de campo.**

#### 9.2.3.1 Aplicación de control biológico en campo.

Las cepas bacterianas que mostraron mayor eficiencia en ensayos de laboratorio fueron evaluadas en las dos parcelas experimentales en la zona afectada. Se realizaron inoculaciones en tres periodos (junio, noviembre y mayo) de 2017-2018. Se trabajaron los tratamientos mostrados en los Cuadros 2 y 3, contrastando en ambos casos con tratamientos control sin la presencia de bacterias. Al término de 12 meses, se evaluó el porcentaje de infección en las plantas de pino y la incidencia de lesiones en las acículas para cada uno de los tratamientos aplicados.

Se evaluó periódicamente el avance de la infección en las plantas con tratamiento y sin tratamiento, obteniendo muestras de las plantas para analizar la presencia de los hongos. Se aplicaron los tratamientos en dos zonas de Tetela de Ocampo, una conformada por pinos pequeños de regeneración natural cuya edad oscila entre los 3 y 6 meses, y otra de pinos de aproximadamente 15 años.

#### 9.2.3.2 Aplicación de control biológico en campo en *Pinus patula* de regeneración natural.

Se inocularon 48 árboles de pino de entre 3 y 6 meses de edad en la zona forestal de Tetela de Ocampo, Puebla para evaluar la capacidad antagonista de las bacterias en condiciones naturales aplicando los siguientes tratamientos:

**Cuadro 2.** Ensayos de antagonismo en campo con bacterias, fungicida, solución nutritiva y promotores de crecimiento aplicadas a *Pinus patula* de regeneración natural.

Tratamiento	Clave	Contenido
Biológico 1	AM6, AM12, CA48	<i>Burkholderia</i> sp., <i>Burkholderia gladioli</i> , <i>Stenotrophomonas</i> sp.
Biológico 2	P5S-A, P3S-B, PIR-D	<i>Serratia</i> sp., <i>Serratia proteamaculans</i> , <i>Serratia grimesii</i>
Biológico 1 y 2	(AM6, AM12, CA48) + (PIR-D, P3S-B, P5S-A)	Biológico 1 + Biológico 2
Control	Control	Agua
Químico	Fungicida	Clorotalonil
Nutritivo	Solución nutritiva (M)	Macronutrientes y micronutrientes
Nutritivo + Biológico 1 y 2	M+B1+B2	NPK + Nutrientes + Biológico 1 + Biológico 2
BPCV	Biofertilizante (BIO)	Biofertilizante
BPCV + Nutritivo	BIO+M	Biofertilizante + Macronutrientes
AS + Biológico 1 y 2	AS+B1+B2	Ácido salicílico + B1 + B2
Ácido salicílico	AS	Ácido salicílico
AS + Biológico 1 y 2 + nutritivo	AS+B1+B2+M	Ácido salicílico + B1 + B2

B1= Biológico 1, B2= Biológico 2, Macronutrientes= M, Biofertilizante = BIO, BPCV= Bacterias promotoras del crecimiento vegetal, AS= Ácido salicílico, PIR-D= *Serratia proteamaculans*, P3S-B= *Serratia* sp., P5S-A= *Serratia grimesii*, AM6= *Burkholderia* sp., AM12= *Burkholderia gladioli*, CA48= *Stenotrophomonas* sp.

Los tratamientos consistieron en la aplicación de bacterias con actividad antifúngica en la zona forestal, la aplicación de fertilización química a través de una solución nutritiva para valorar alguna limitación nutricional que les provocara vulnerabilidad a desarrollar enfermedades fúngicas, así como ácido salicílico para inducir la respuesta sistémica de los pinos. Y la aplicación de un fungicida químico comercial (clorotalonil).

### 9.2.3.3 Control biológico en *Pinus patula* de 15 años en condiciones de campo.

Con apoyo de la Comisión Nacional Forestal a través de la brigada de sanidad forestal, se inocularon árboles de pino con el uso de fumigadoras Hyundai HYD2530V. Se realizaron 10 repeticiones por cada uno de los cinco tratamientos seleccionados en la zona forestal de Tetela de Ocampo, Puebla. Se evaluó la capacidad antagónica de las bacterias en condiciones propias del bosque de pino, la respuesta de la enfermedad con la aplicación de nutrientes y la aplicación de un fungicida químico (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Tratamientos aplicados a *Pinus patula* de 15 años en condiciones de campo.

Tratamiento	Contenido
Biológico	Bacterias: PIR-D, P3S-B, P5S-A
Químico	Clorotalonil
Nutritivo	Solución de macronutrientes
Biológico + nutritivo	Tratamiento Biológico y Nutritivo
Control	.....

PIR-D= *Serratia proteamaculans*, P3S-B= *Serratia* sp., P5S-A= *Serratia grimesii*

La enfermedad se evaluó con base en dos parámetros: el porcentaje de severidad y la incidencia de lesiones en las acículas. Para calcular el porcentaje de severidad se empleó la escala de grado de lesión (Figura 7) y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de severidad} = \Sigma(n * g) / N * G \text{ (Rodas, 2015)}$$

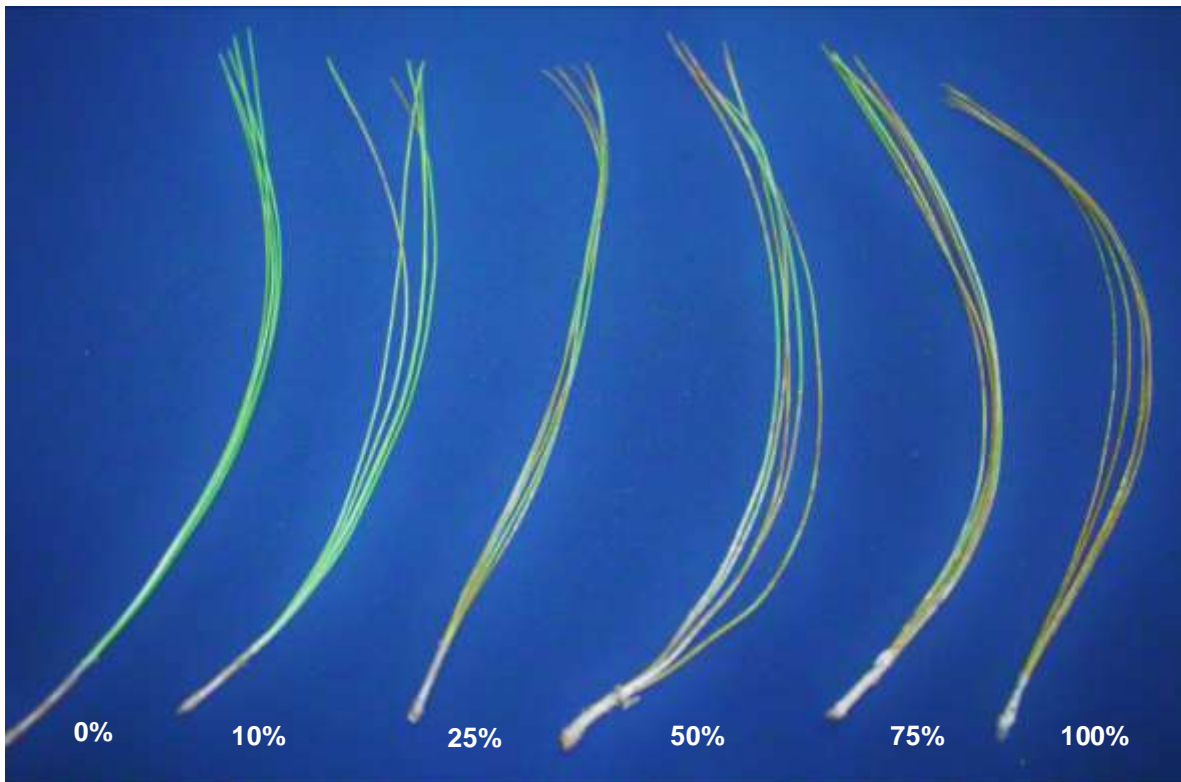
Donde:

n= número de lesiones

g= grado de lesión (evaluado con la escala)

N= número total de lesiones

G= número total de grados de la escala (6)



**Figura 7.** Escala para calcular el grado de lesión acicular.

### 9.3 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 ( $H_0$ ), todas las medias grupales son iguales. Contra, la hipótesis alternativa ( $H_A$ ), alguna de las medias grupales es distinta.

Es decir:

Si,  $(p\text{-valor}) > 0.05$  aceptamos  $H_0 \rightarrow$  todas las medias grupales son iguales.

Si,  $(p\text{-valor}) < 0.05$  rechazamos  $H_0 \rightarrow$  alguna de las medias grupales es distinta.

## 10.- Resultados y discusión

### 10.1 Fase de muestreo.

Las muestras de acícula mostraron lesiones provocadas por los hongos las cuales presentaron coloraciones amarillo-rojiza, puntos rojos, blancos y cafés (Figura 8). Se incluyó muestras de acículas, tallo y suelo de la zona (Figura 9).



**Figura 8.** Lesiones en acículas de *Pinus patula*.



**Figura 9.** Muestreo de suelo.

A las muestras de suelo, tallo y acículas se les asignaron claves para su identificación, con la finalidad de dar uso y manejo adecuado. Se tomaron las coordenadas correspondientes a cada muestra, necesarias para la adecuada ubicación del lugar de muestreo y localización del problema, datos mostrados en la Cuadro 4:

**Cuadro 4.** Procedencia de las muestras de *P. patula* recolectadas en Tetela de Ocampo.

Muestra	Clave	Latitud norte	Longitud oeste	msnm
Acícula	M1MtPpA	19°49'14.25''	97°47'59.11''	1757
Suelo	M1MtPpS			
Acícula	M2 <sub>1</sub> MtPpA	19°49'14.14''	97°47'57.32''	1776
Tallo	M2 <sub>2</sub> MtPpT			
Acícula	M2 <sub>1</sub> MtPpA			
Tallo	M2 <sub>2</sub> MtPpT			
Suelo	M2MtPpS			
Acícula	M3MtPpA	19°49'13.45''	97°47'48.48''	1773
Tallo	M3MtPpT			
Suelo	M3MtPpS			
Suelo	M4MtPpS	19°48'10.45''	97°47'53.48''	1754
Acícula	M4 <sub>1</sub> MtPpA			
Acícula	M7MtPpA	19°49'12.23''	97°47'52.46''	1750

Mn= número de muestra, Mt: municipio de Tetela, Pp: *Pinus patula*, A: acícula, S: suelo, T: tallo  
msnm= metros sobre el nivel del mar.

## 10.2 Fase de laboratorio.

### 10.2.1 Caracterización del suelo.

**Cuadro 5.** Análisis físico y químico de suelo asociado a *P. patula* de regeneración natural.

Parámetro	Unidades	Muestra			
		M1MtPpS	M2MtPpS	M3MtPpS	M4MtPpS
pH		04.90	04.20	04.50	04.50
M.O.	%	<b>01.13</b>	02.47	<b>00.70</b>	<b>00.75</b>
Nt.	%	<b>00.07</b>	00.13	<b>00.05</b>	<b>00.06</b>
Ca	cmol <sub>c</sub> /kg <sup>-1</sup>	<b>01.10</b>	02.20	06.40	08.70
Mg	cmol <sub>c</sub> /kg	<b>00.70</b>	01.70	02.10	02.90
Na	cmol <sub>c</sub> /kg	00.40	00.40	00.50	00.40
K	cmol <sub>c</sub> /kg	<b>00.20</b>	<b>00.20</b>	00.60	<b>00.10</b>
CIC	cmol <sub>c</sub> /kg	<b>14.90</b>	18.50	<b>15.80</b>	16.90
P	mg/kg	<b>01.00</b>	<b>01.10</b>	<b>01.00</b>	<b>01.00</b>
DA	gmL <sup>-1</sup>	01.24	01.21	01.24	01.26
CE	dS/m	00.08	00.08	00.10	00.05

Valores en negritas corresponde a valores bajos (NOM-021-SEMARNAT-2000). Abreviatura: Mn: número de muestra, Mt: municipio de Tetela, Pp: *Pinus patula*, S: suelo.

**Cuadro 6.** Análisis físico y químico de suelo asociado a *P. patula* de 15 años.

Parámetro	Unidades	Muestra				Valores en negritas corresponden a valores bajos (NOM-021-SEMARNAT-2000). Abreviatura: Mn: número de muestra, Mt: municipio
		M1MtPpSF	M2MtPpSF	M3MtPpSF	M4MtPpSF	
pH		07.40	07.20	07.60	05.40	
M.O.	%	02.21	<b>01.40</b>	01.88	02.15	
Nt.	%	00.12	<b>00.09</b>	00.10	00.11	
Ca	cmol <sub>c</sub> /kg <sup>-1</sup>	31.00	38.80	38.80	14.30	
Mg	cmol <sub>c</sub> /kg	<b>00.70</b>	<b>00.80</b>	<b>00.40</b>	<b>00.40</b>	
Na	cmol <sub>c</sub> /kg	00.40	00.40	00.50	00.10	
K	cmol <sub>c</sub> /kg	<b>00.20</b>	<b>00.30</b>	<b>00.20</b>	00.30	
CIC	cmol <sub>c</sub> /kg	28.10	32.50	29.60	23.50	
P	mg/kg	<b>07.00</b>	<b>05.00</b>	<b>05.00</b>	<b>08.00</b>	
DA	gmL <sup>-1</sup>	01.19	01.20	01.21	01.20	
CE	dS/m	00.36	00.37	00.37	00.15	

de Tetela, Pp: *Pinus patula*, S: suelo, F: procedente de zona forestal.

El análisis de suelo se mostró un pH fuertemente ácido correspondiente a las muestras de los pinos de regeneración natural comprendido entre 4.9 y 4.2 como se muestra en el Cuadro 5, valores no favorables para el desarrollo óptimo de *Pinus patula*, que deben oscilar entre 5.0 y 5.5 (Ramírez de G., 1991). Un valor de pH ácido reduce la actividad bacteriana y aumenta la acción de hongos (Porta *et al.*, 2003), estos suelen tener mayor capacidad de adaptación a intervalos de pH más amplios que otros microorganismos en el suelo, siendo óptimo entre 4 y 6 (Rousk *et al.* 2009). Se encontraron valores bajos en contenido de materia orgánica, nitrógeno, fósforo y potasio en las muestras 1, 3 y 4 de los pinos de regeneración natural de acuerdo con la clasificación de la NOM-021-SEMARNAT-2000, condicionantes para el óptimo desarrollo de las plantas (Cuadro 5). En el caso de los pinos de 15 años se encontraron 3 muestras con pH medianamente alcalino (pH entre 7.6 y 7.2), únicamente la muestra M4MtPpSF presentó un pH ácido (pH = 5.4). Esta muestra ostentó un contenido de materia orgánica medio (2.15%) y valores medios de nitrógeno total (0.11%) (Cuadro 6). Las muestras de suelo de los pinos de 15 años tienen valores bajos en contenido de fósforo y potasio, los cuales al ser nutrientes primarios son requeridos en grandes cantidades. El fósforo (P) es importante para la transferencia de energía, la fotosíntesis y procesos químico-fisiológicos, además de ser un factor especialmente limitante para el desarrollo de la especie (Ramírez de G., 1991). El potasio (K) es vital en la síntesis de carbohidratos y de proteínas, mejora el régimen hídrico de la planta y aumenta su tolerancia a la sequía, heladas y salinidad. Las plantas bien provistas con K sufren menos de enfermedades (FAO, 2002). Se encontró además deficiencia en el

contenido de nitrógeno (N), macronutriente principal en el crecimiento, se combina con componentes producidos por el metabolismo de carbohidratos para formar aminoácidos y proteínas (FAO, 2002). La visualización de los síntomas de deficiencias, trastornos o enfermedades presentes en sistemas forestales puede ser ocasionada por diversos factores y relaciones entre estos, siendo la deficiencia nutricional un factor detonante al originar la necrosis, clorosis, deformaciones foliares y marchitamiento de los rebrotes (UDU, 2015). Por ello, puede ser un factor determinante al ocasionar vulnerabilidad en los árboles de pino hacia las enfermedades fúngicas al no ser suficientes para lograr un desarrollo óptimo de la especie.

**Cuadro 7.** Análisis microbiológico de suelo asociado a *Pinus patula*.

Muestra	Bacterias mesófilas aerobias	Bacterias Gram negativas	Actinomicetos	Hongos	Actividad de enzima deshidrogenasa
	UFC g <sup>-1</sup> suelo				UE
M1MtPpS	463,000±72,000	6,000±240	440,000±28,000	16,400±3,100	29.36 ± 3.42
M2MtPpS	61,000±7,000	1,550±110	260,000±78,000	42,000±2,800	28.74 ± 5.66
M3MtPpS	256,300±13,000	6,600±424	425,000±7,000	2,850±236	29.78 ± 9.10
M4MtPpS	836,000±123,000	3,500±141	580,000±113,000	10,450±1,200	43.48 ± 2.84

Mn: número de muestra, MT: municipio de Tetela, PP: *Pinus patula*, A: acícula, S: suelo, T: tallo. UE: Unidades enzimáticas.

El análisis microbiológico de las muestras de suelo evidenció que la muestra M4MtPpS exhibe la mayor actividad microbiológica por gramo de suelo al presentar los valores más elevados correspondientes a la presencia de bacterias mesófilas aerobias ( $8.3 \times 10^{-5}$  UFC g<sup>-1</sup> suelo), actinomicetos ( $5.8 \times 10^{-5}$  UFC g<sup>-1</sup> suelo) y actividad de la enzima deshidrogenasa ( $43.48 \pm 2.84$  UE) (Cuadro 7), indicador biológico utilizado para establecer la actividad microbiológica del suelo en relación con el porcentaje de materia orgánica (Ochoa *et al.*, 2007). Estos valores son el reflejo de las condiciones físicas y químicas características de la muestra de suelo que permiten el desarrollo de los procesos metabólicos de bacterias, actinomicetos y enzimas sobre los substratos orgánicos, siendo también esta diversidad microbiana un indicador de la buena salud de la muestra de suelo (Garbisu *et al.* 2007). La muestra M2MtPpS presentó  $4.2 \times 10^{-4}$  unidades formadoras de colonia por gramo de suelo de hongos, un valor muy elevado en comparación a las demás. También presentó menor cantidad de bacterias mesófilas aerobias ( $6.1 \times 10^{-4}$ ), bacterias Gram negativas ( $1.5 \times 10^{-3}$  UFC g<sup>-1</sup> suelo), actinomicetos ( $2.6 \times 10^{-5}$  UFC g<sup>-1</sup> suelo) y actividad de enzima

deshidrogenasa (28.74 UE), fue la única muestra de pinos de regeneración natural que no presentó deficiencias en contenido de materia orgánica y nitrógeno por lo que se puede inferir que ostenta las condiciones físicas y químicas adecuadas para el desarrollo de hongos, pero no de bacterias.

#### 10.2.2 Aislamiento de hongos patógenos.

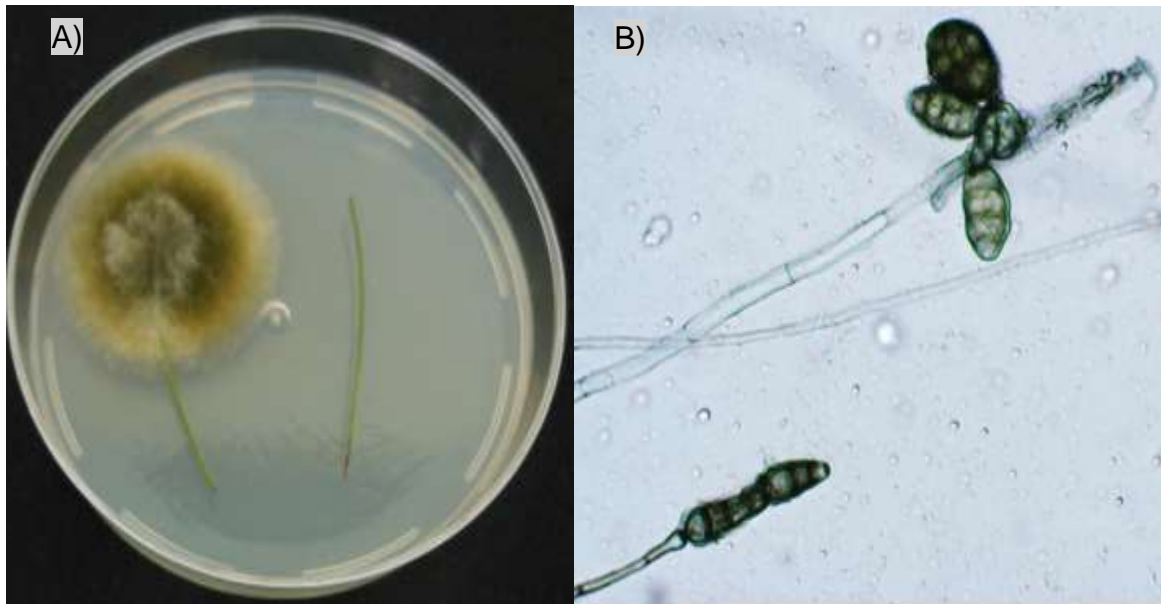
**Cuadro 8.** Hongos aislados de *Pinus patula* de Tetela de Ocampo, Puebla.

Clave	Número de hongos aislados	Hongos seleccionados por muestra
M1MtPpA	9	9
M1MtPpS	9	9
M2 <sub>1</sub> MtPpA	9	6
M2 <sub>2</sub> MtPpA	10	7
M2MtPpS	5	5
M3MtPpA	22	10
M3MtPpS	5	5
M4MtPpS	2	2
M4 <sub>1</sub> MtPpA	16	6
M7MtPpA	7	4

Mn: número de muestra, Mt: municipio de Tetela, Pp: *Pinus patula*, A: acícula, S: suelo, T: tallo

El método de aislamiento usado en este estudio favoreció el rápido crecimiento de los hongos presentes en acículas de pino. Por lo tanto, algunas de las especies de crecimiento lento pudieron haber sido excluidas, así como todas las especies no cultivables en PDA (Sans-Ros *et al.*, 2015). La alta proporción de aislamientos exitosos mostró que algunos de los segmentos de acículas habitaron más de una especie fúngica. De las muestras de acículas y suelo se obtuvieron un total de 94 hongos, siendo las muestras de acícula M3MtPpA y M4<sub>1</sub>MtPpA en las que se encontró una mayor presencia con 22 y 16 colonias de hongo, respectivamente (Cuadro 8). La muestra de suelo M1MtPpS es la más representativa con un total de 9 hongos, coincidiendo esta presencia fúngica con el análisis microbiológico en el que presentó una cantidad significativa de unidades formadoras de colonia (UFC) de hongos por gramo de suelo.

### 10.2.3 Identificación de hongos asociados a *Pinus patula*.



**Figura 10.** Aislamiento e identificación de hongos: A) Crecimiento de hongo a partir de acículas. B) Conidios de *Alternaria* sp. observada con microscopio.

Posterior al aislamiento de los hongos se realizó una depuración por igualdad macroscópica de las muestras, definiendo un total de 42 diferentes taxones fúngicos que colonizan las acículas procedentes de *P. patula* de la zona forestal de Tetela de Ocampo, Puebla. Se les identificó fenotípicamente a partir de sus estructuras reproductivas (Figura 10), obteniendo como resultados los géneros mostrados en el siguiente cuadro:

**Cuadro 9.** Clave e identificación fenotípica y genética de hongos asociados a *P. patula*.

Clave asignada	Hongos identificados con pruebas fenotípicas	Hongos identificados por métodos genéticos
<b>M1MTPPA</b>	<i>Alternaria</i> sp. <i>Annulohyphoxylon</i> sp. <i>Curvularia</i> sp. <i>Lophodermium</i> sp. <i>Myrmaecium</i> sp. <i>Chrysosporium</i> sp. <i>Mucor</i> sp. <i>Rhizopus</i> sp.	<i>Alternaria alternata</i> <i>Annulohyphoxylon stygium</i> <i>Curvularia lunata</i> <i>Lophodermium</i> sp. <i>Myrmaecium rubricosum</i>
<b>M2<sub>1</sub>MTPPA</b>	<i>Curvularia</i> sp. <i>Acremonium</i> sp. <i>Alternaria</i> sp. <i>Bipolaris</i> sp.	<i>Curvularia spicifera</i>
<b>M2<sub>2</sub>MTPPA</b>	<i>Curvularia</i> sp. <i>Bipolaris</i> sp. <i>Chrysosporium</i> sp. <i>Nigrospora</i> sp. <i>Rhizopus</i> sp.	<i>Curvularia trifolii</i>
<b>M3MTPPA</b>	<i>Daldinia</i> sp. <i>Diplodia</i> sp. <i>Alternaria</i> sp. <i>Bipolaris</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp. <i>Curvularia</i> sp. <i>Mucor</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp.	<i>Daldinia</i> sp. <i>Diplodia sapinea</i>
<b>M4<sub>1</sub>MTPPA</b>	<i>Curvularia</i> sp. <i>Daldinia</i> sp. <i>Botryosphaeria</i> sp. <i>Dothistroma</i> sp. <i>Mycosphaerella</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp.	<i>Curvularia pseudobrachyspora</i> <i>Daldinia eschscholtzii</i>
<b>M7MTPPA</b>	<i>Botryosphaeria</i> sp. <i>Curvularia</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Penicillium</i> sp.	<i>Botryosphaeria dothidea</i>

Nota: Mn= Muestra número, Mt= Municipio Tetela de Ocampo, Pp= *Pinus patula*, A= Acícula, T= Tallo, S= Suelo.

#### 10.2.4 Identificación genética de hongos asociados a *P. patula*.

La identificación genética se realizó a los 12 hongos más frecuentes asociados a la enfermedad en *Pinus patula*.















**Figura 11.** Gel de agarosa al 3% de productos de PCR (ITS1-ITS2).

Carriles: 1 Marcador, 2 M2MtPpA-AA, 3 M1MtPpA-AA, 4 M1MtPpA-PDA, 5 M3MtPpA-CH, 6 M2<sub>1</sub>MtPpA-AAR2, 7 M3MtPpA-CHR2(2), 8 M4<sub>1</sub>MtPpA-CHR1, 9 M7MtPpA-CHR3(2), 10 Testigo negativo.

En la Figura 11 se observó que la electroforesis en gel de agarosa del ADN producto de la reacción en cadena de la polimerasa del ADN de los hongos seleccionados amplifica aproximadamente a los 600 pares de bases, tal y como reporta Huzefa *et al.*, (2017). Se continuó con la purificación del ADN para su secuenciación y con ello la obtención de cada especie de hongo al realizar su comparación en GenBank. De los valores cuantitativos generados de máxima identidad, sólo se consideraron los de mayor similitud (Cuadro 10). Se generaron los números de acceso correspondientes a cada hongo en el [National Center for Biotechnology Information](#).

**Cuadro 10.** Hongos más frecuentes asociados a *Pinus patula* de Tetela de Ocampo identificados genéticamente.

Clave	Morfología macroscópica	Especie del hongo (GenBank)*	% de similitud	Número de acceso
M1MtPpA-AAR1		<i>Alternaria alternata</i> (MF038148.1)	99	MH718310
M1MtPpA-PDA		<i>Myrmaecium rubricosum</i> (KP687884.1)	99	MH723584
M1MtPpA-AA		<i>Curvularia lunata</i> (KM979511.1)	99	MH722309
M1MtPpA-PDAR1		<i>Lophodermium</i> sp. (AY100643.2)	98	MH723585
M1MtPpA-PDAR5		<i>Annulohyphoxylon stygium</i> (MF167576.1)	99	MH723604
M2 <sub>1</sub> MtPpA-AAR2		<i>Curvularia spicifera</i> (MH010904.1)	99	MH722387
M2MtPpA-AA		<i>Curvularia trifolii</i> (JN712458.1)	99	MH723582
M3MtPpA-CHR2(2)		<i>Daldinia</i> sp. (JF773600.1)	99	MH723586

M3MtPpA-CH		<i>Diplodia sapinea</i> (NR152452.1)	99	MH729011
M4 <sub>1</sub> MtPpA-CHR1		<i>Curvularia pseudobrachyspora</i> (MG45008.1)	100	MH722358
M4 <sub>1</sub> MtPpA-PDAR5		<i>Daldinia eschscholtzii</i> (KU204523.1)	99	MH723603
M7MtPpA-CHR3(2)		<i>Botryosphaeria dothidea</i> (KY788307.1)	100	MH888017

\*GenBank: se refiere a la secuencia con mayor porcentaje de similitud en el banco de genes NCBI.

La mayoría de los géneros encontrados son patógenos endófitos que se manifiestan bajo condiciones de estrés en los árboles de pino, entrando a estos a partir de cualquier herida. Es recomendable tratar las semillas, eliminar los restos de plantas enfermas y evitar las condiciones de estrés (Cuadro 10).

El hongo con clave M3MtPpA-CH3 presentó un porcentaje de similitud del 99% con *Diplodia sapinea*, patógeno oportunista de coníferas con distribución mundial. Como hospedantes preferentes del hongo, se encuentran las especies del género *Pinus*, dónde *Pinus patula* presenta una mayor susceptibilidad (Morales, 2007). Situaciones de estrés como: la sequía, heladas y deficiencias nutricionales, debilitamiento de los árboles, además de heridas causadas por malas podas, granizadas e insectos, llevan a que este microorganismo abandone su condición de saprófito y parasite la planta, lo que genera la enfermedad (García, 2011). La acción de *Diplodia sapinea* se evidencia por la inhibición de la germinación, chancros en tallos, ramas y yemas, secamiento de yemas y brotes, caída de acículas y deformación de ramas (Ospina *et al.*, 2009). La resistencia intrínseca hacia *Diplodia sapinea* se mantiene evitando tanto el estrés hídrico como la fertilización nitrogenada excesiva, lo que aumenta la susceptibilidad a la enfermedad. Cultivar especies

no hospederas o coníferas menos susceptibles donde hay inóculo es una opción de control a la enfermedad fúngica (USDA, 2012). Los fungicidas protectores pueden reducir la incidencia de la enfermedad, requiriendo aplicaciones repetidas durante largo tiempo. Se debe tener en cuenta que, si hay fuentes de infección, no se ha demostrado que la aplicación de fungicidas reduzca o elimine la persistencia asintomática de estos patógenos en plántulas que parecen ser saludables (USDA, 2012).

El hongo *Botryosphaeria dothidea* (cepa M7MtPpA-CHR3(2)), se encuentra entre los canchros más extendidos e importantes presentes en árboles en todo el mundo. De acuerdo con la CONAFOR (2015), *Botryosphaeria* sp. y *Lophodermium* sp. son de los principales causantes de la caída foliar del pino. Su distribución abarca 18 municipios del estado de Puebla. *Botryosphaeria dothidea* es un hongo endófito que infecta el tejido sano de plantas leñosas y permanece latente hasta el inicio de las condiciones de estrés (Sakalidis *et al.*, 2011), también ha sido catalogado como uno de los más difundidos e importantes patógenos latentes en un gran número de plantas en la agricultura, la silvicultura y los sistemas forestales (Pavlic *et al.*, 2007; Qiu *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2012), dentro de las que se encuentran pino, eucalipto y pistacho (Michailides, 1991; Pérez *et al.*, 2010). El género *Botryosphaeria* sp., se considera dispersado por el viento y lluvia sobre distancias relativamente cortas (Amponsah *et al.*, 2009). Los síntomas de la enfermedad se presentan en hojas, ramas y tallos, provocando la muerte regresiva de las puntas y ramas, manchas azules en la madera y en casos extremos, la muerte de la planta huésped (Swart y Wingfield, 1991).

El género con mayor cantidad de especies encontradas dentro de los hongos más representativos de la zona forestal de Tetela de Ocampo es *Curvularia* sp. que corresponde a las muestras M1MtPpA-AA, M2<sub>1</sub>MtPpA-AAR2, M2MtPpA-AA y M4<sub>1</sub>MtPpA-CHR1. Contiene alrededor de 80 especies que en su mayoría son patógenos de suelo o de plantas, incluyen numerosas especies patógenas, saprófitas y algunas oportunistas emergentes en el ser humano como en otros animales. Su distribución ecológica es cosmopolita en la gran mayoría de sus integrantes, encontrándose frecuentemente en hojas, tallos y raíces de diferentes plantas, aire y suelo en todos los continentes (Piontelli, 2005).

La mayoría de las especies de *Curvularia* sp. se encuentran en regiones subtropicales a tropicales, aunque algunas se encuentran en zonas templadas. Se han identificado como los principales patógenos causales de la caña de azúcar y los pastos (Sivanesan A., 1987, Koo *et al.* 2003, Lin *et al.*, 2012) y granos como el maíz causando mancha foliar (Dalmarcia *et al.*, 2017). Algunas especies de *Curvularia* sp. también son importantes para diferentes industrias debido a su capacidad de producir metabolitos secundarios, incluidas sustancias con propiedades antimicrobianas y enzimáticas (Hansen *et al.* 2003, Van Schijndel *et al.* 1993). *Curvularia spicifera* (*Bipolaris spicifera*) es conocido como un alérgeno común a los humanos. Puede causar infección oportunista en personas inmunocomprometidas, como los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Andrushina *et al.*, 2011, Van Schijndel, 1993, Hansen *et al.*, 2003). *Curvularia lunata* es una especie que ocasionalmente puede producir onicomicosis y endoftalmítis fúngica en humanos inmunodeprimidos (Fraenza *et al.* 2015; Deepu *et al.* 2013).

Las muestras M3MtPpA-CHR2(2) y M4<sub>1</sub>MtPpA- PDAR5 correspondieron al género *Daldinia* sp., un hongo saprófito que generalmente crece en partes muertas y en descomposición de las plantas, desarrollándose preferentemente en la temporada de lluvias debido a las condiciones de humedad, apoyando la germinación de sus esporas y el crecimiento de hifas en la corteza de los árboles. Infecta diversas partes de los árboles tales como hojas, ramas y corteza. Infecta árboles en pie a partir de una herida, creando una entrada para el agente fúngico (Shigo, 1982). Algunas especies, como *D. eschscholtzii* y *D. petriniae*, se encuentran más a menudo en sustratos leñosos muertos, bastante deteriorados. Este género está presente en el tejido del huésped en etapas aparentemente inactivas, presumiblemente durante mucho tiempo sin causar ningún síntoma de enfermedad, desarrollándose preferentemente una vez que el huésped está dañado o estresado (Stadler *et al.*, 2014). Se ha encontrado que los compuestos orgánicos volátiles de *D. concentrica* han mostrado actividad antimicrobiana contra una amplia gama de hongos, entre ellos *Alternaria alternata*, mostrando que tiene potencial para su uso biotecnológico y/o sus VOCs.

La muestra M1MtPpA-AAR1 presento un 99% de similitud con *Alternaria alternata*, el cual es un hongo patógeno oportunista que puede causar manchas en las hojas así como pudriciones y decoloraciones en muchas partes de las plantas. También puede causar en humanos infecciones en el tracto respiratorio superior y asma en personas inmunodeprimidas. Tiene una amplia gama de hospederos, ocasionando manchas en las hojas y halos en muchas partes de las plantas. Este hongo lo podemos encontrar en tomate, trigo, papaya, entre otros (Poton *et al.*, 2002). En el ser humano puede provocar lesiones cutáneas y subcutáneas después de traumatismos en personas con inmunosupresión. Causa la enfermedad conocida como defoliación en coníferas de hojas aciculares provocando necrosis y defoliación en pinos, cedros, piceas, abetos, entre otros (Piontelli *et al.*, 2005). Se ha aislado de *Pinus archeri* y *P. besseyi*, encontrando que incrementaba su frecuencia en invierno y otoño (Guo, 2008).

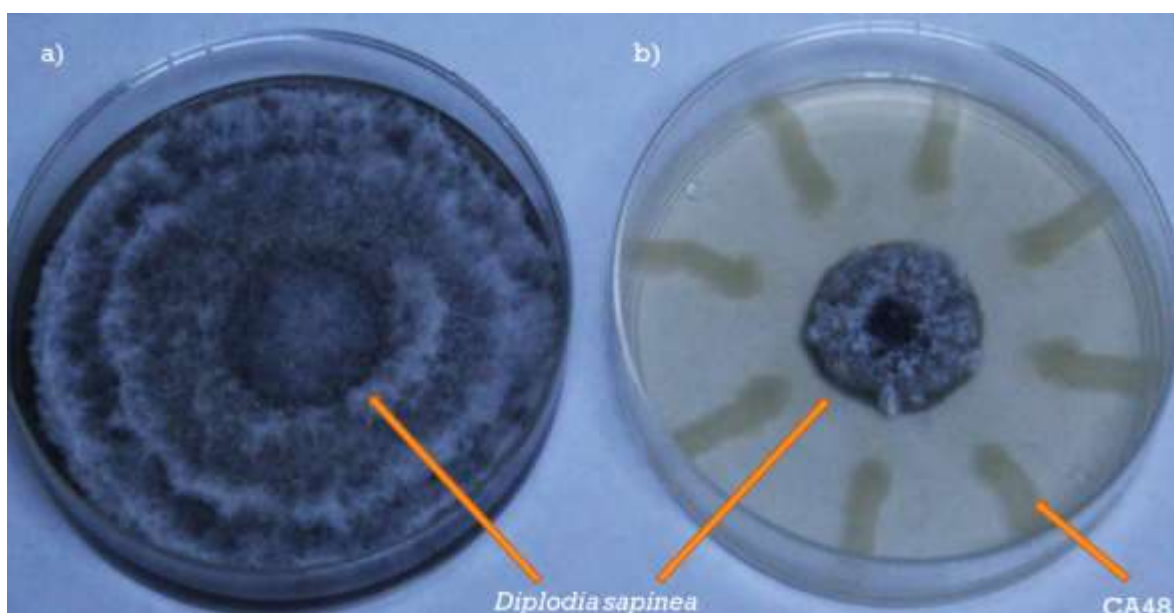
En los bosques de coníferas de los estados de Puebla se han registrado alrededor de 3 000 hectáreas con sintomatología de pérdida foliar y secamiento de follaje, asociado a *Lophodermium* sp. (M1MtPpA-PDAR1) en los municipios de Zacatlán, Aquixtla y Tetela de Ocampo (CONAFOR, 2015). Este hongo permanece durante todo su ciclo de vida en el árbol, atacando individuos poco desarrollados y débiles (González, 2004). Las acículas son infectadas a finales de verano u otoño y el patógeno permanece en ellas el invierno de ese año. En la siguiente primavera, el hongo reinicia su crecimiento, en las acículas infectadas que desarrollan manchas pardas con márgenes amarillos, y, al final de la estación, causan la muerte de sus tejidos (French, 1988; Cibrián *et al.*, 2007). Su dispersión se presenta por acción del viento y la lluvia. La infección ocurre, nuevamente, a través del micelio vegetativo en los tejidos de las hojas durante el invierno (Alvarado, 2005; Cordón, 2009). La distribución de *Lophodermium* es muy abundante en diversos bosques de pino alrededor del mundo, presentándose donde hay contaminación del aire (Minter, 2015), se ha encontrado entre otras especies en pino escoces y *Pinus sylvestris* (Reignoux *et al.*, 2014).

Las cepas M1MtPpA-PDA y M1MtPpA-PDAR5 fueron identificadas como *Myrmaecium rubricosum* y *Annulohyphoxylon stygium* respectivamente con un 99 % de similitud. Los hongos *Annulohyphoxylon* sp. pertenecen al género, *Hyphoxylon* y familia, *Xylariaceae*. Son

omnipresentes con numerosos informes de su presencia en regiones tropicales. Ha sido reportado como agente causal de antracnosis en árboles de roble, presentando síntomas de chancros severos. (Cha *et al.*, 2012).

#### 10.2.5 Pruebas de control biológico en placa.

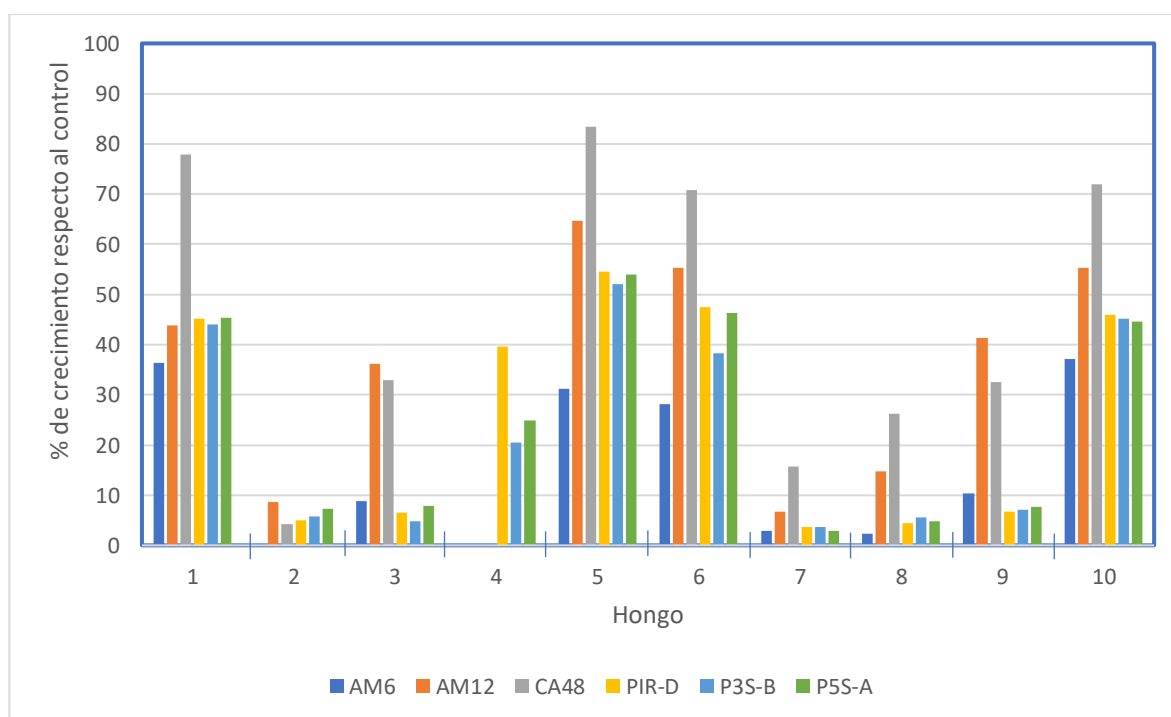
Se realizaron ensayos de antagonismo *in vitro* (Figura 12) por parte de bacterias *Serratia proteamaculans*, *Serratia grimesii*, *Serratia sp.*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia sp.* y *Stenotrophomonas sp.*, que han demostrado efecto inhibitorio contra hongos de origen agrícola y forestal.



**Figura 12.** Pruebas de antagonismo, a) Hongo *Diplodia sapinea* (cepa M3MtPpA-CH) y b) Bacteria *Stenotrophomonas sp.* (cepa CA48).

Se encontró en las pruebas de antagonismo *in vitro* que todas las bacterias presentaron una capacidad antagónica contra los 10 hongos más frecuentes en la zona forestal. Se disminuyó el crecimiento fúngico entre el 17 y 100% en comparación con el testigo (Figura 13), lo que demostró la eficiencia para el control del crecimiento fúngico a partir del uso de bacterias (Figura 14). Se observó que la cepa AM6 (*Burkholderia sp.*) limitó el crecimiento fúngico de 9 de los 10 hongos seleccionados (M1MtPpA-AAR1, M1MtPpA-PDA, M1MtPpA-AA, M1MtPpA-PDAR1, M2<sub>1</sub>MtPpA-AAR2, M2MtPpA-AA, M3MtPpA-CHR2, M3MtPpA-CH, M7MtPpA-CHR3), por lo que se consideró como la bacteria más

eficiente en los ensayos de antagonismo. Este género bacteriano está formado por más de 90 especies, aisladas de una amplia variedad de nichos ecológicos (Euzéby, 1997). Algunas de estas especies son patógenas oportunistas para el hombre y otras son fitopatógenas, llegan a establecer relaciones neutrales o benéficas con las plantas (Onofre-Lemus *et al.*, 2009). *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* (Riera *et al.* 2017), b) fijación biológica de nitrógeno, promoción de crecimiento de plantas y c) biorremediación (Salles *et al.* 2006).



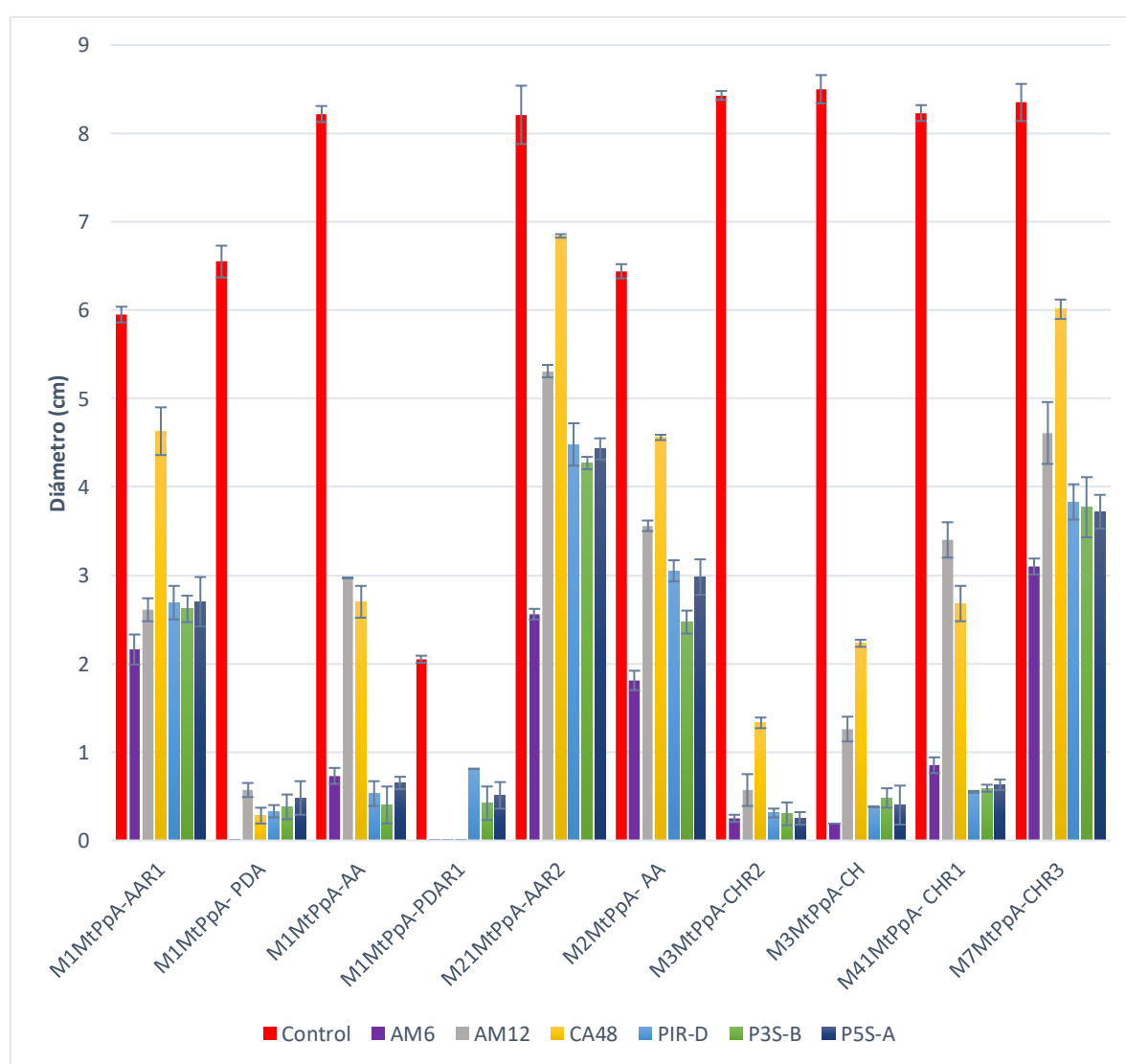
Hongo: 1.-M1MtPpA-AAR1, 2.-M1MtPpA-PDA, 3.-M1MtPpA-AA, 4.-M1MtPpA-PDAR1, 5.-M2<sub>i</sub>MtPpA-AAR2, 6.-M2MtPpA-AA, 7.-M3MtPpA-CHR2, 8.-M3MtPpA-CH, 9.-M4<sub>i</sub>MtPpA-CHR1, 10.-M7MtPpA-CHR3

**Figura 13.** Crecimiento fúngico en placas Petri de los hongos asociados a *Pinus patula* con respecto al control.

Las cepas PIR-D, P3S-B Y P5S-A correspondientes al género *Serratia* sp. mostraron un mayor efecto antagonístico para los hongos M1MtPpA-AA, M3MtPpA-CHR2 y M4<sub>i</sub>MtPpA-CHR1 y la misma capacidad de control del crecimiento sin diferencias significativas entre ellos ( $p \leq 0.05$ ) para 7 de los 10 hongos ensayados, debido a su origen forestal y género (Figura 14). Cabe mencionar que *Serratia* sp. ha sido probada como antagonista de *Fusarium* sp. en plantas de jitomate (Sánchez *et al.*, 1998), *Serratia grimesii* en

plantaciones de papa (Gould *et al.*, 2008), garbanzo (Zaheer, 2016); además de presentar capacidades de una bacteria promotora de crecimiento vegetal (solubilización de fósforo, producción de ácido indol-3-acético) (Zaheer, 2016).

Las bacterias biocontroladoras de hongos poseen diferentes mecanismos de acción como pueden ser mediante la inhibición del crecimiento de fitopatógenos por diversos mecanismos como son la producción de agentes antifúngicos, antibacterianos, competencia por nutrientes o mediante la estimulación de la respuesta sistémica inducida en las plantas (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006).



**Figura 14.** Actividad antifúngica de bacterias antagónicas contra hongos forestales en placas Petri.

Se encontró que la mayor efectividad en la inhibición del crecimiento por las seis bacterias fue contra los hongos *Myrmaecium rubricosum*, *Daldinia sp* y *Diplodia sapinea*, ya que se logró disminuir significativamente su crecimiento en presencia de bacterias con respecto al control. La capacidad antagónica menos eficiente por parte de las bacterias fue contra los hongos M2<sub>1</sub>MtPpA-AAR2 (*Curvularia spicifera*) y M7MtPpA-CHR3 (*Botryosphaeria dothidea*) ya que ambos presentaron un crecimiento considerable. El hongo M1MtPpA-PDAR1 (*Lophodermium sp.*) mostró ser de crecimiento lento, lo que se notó por el menor diámetro a los 6 días de inoculación, factor determinante para que las cepas AM6, AM12 y CA48 inhibieran su crecimiento por completo. También se observó la inhibición completa del hongo M1MtPpA-PDA (*Myrmaecium rubricosum*) por *Burkholderia sp.* cepa AM6 (Cuadro 11).

La cepa CA48 (*Stenotrophomonas sp.*) mostró la menor capacidad antagónica contra seis de los diez hongos más representativos. Sin embargo, presentó el mayor control de crecimiento contra los hongos M1MtPpA-PDA (*Myrmaecium rubricosum*) y M1MtPpA-PDA-R1 (*Lophodermium sp.*). Se ha reportado que la especie *Stenotrophomonas maltophilia* es biocontroladora del hongo *Phytium ultimum* (Dunne *et al.*, 1997) y útil para el control de la pudrición marrón en patatas causado por *Ralstonia solanacearum* (Messiha *et al.*, 2007). Además, *Serratia sp.* y *Stenotrophomonas* se han empleado como biocontroladores en las raíces de aguacate contra *R. necatrix* (Vida *et al.*, 2017). También es un patógeno que afecta principalmente a personas inmunodeprimidas, produciendo celulitis, abscesos cutáneos, infección urinaria, meningitis y endocarditis bacteriana (Corzo-Delgado, 2006).

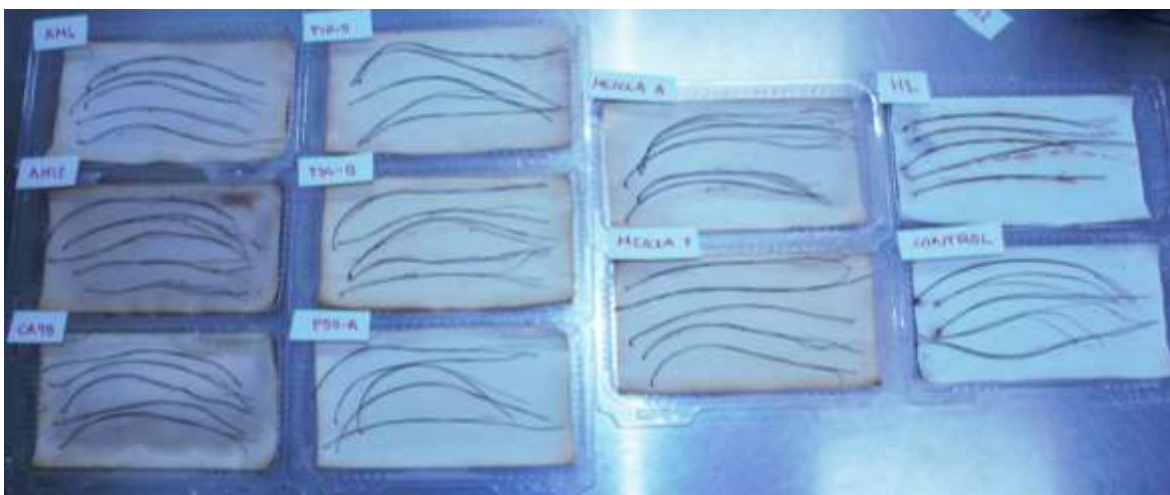
**Cuadro 11.** Antagonismo de bacterias contra hongos patógenos asociados a *Pinus patula*.

Bacteria	Crecimiento de Hongos (cm)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C	5.95±0.89a	6.55±0.66a	8.22±0.09a	2.05±0.04a	8.21±0.33a	6.44±0.08a	8.43±0.05a	8.50±0.16a	8.23±0.09a	8.35±0.21a
AM6	2.16±0.17cd	0.00±0.00d	0.73±0.09d	0.00±0.00d	2.56±0.06e	1.81±0.11e	0.25±0.04cd	0.19±0.00e	0.85±0.09d	3.10±0.09de
AM12	2.61±0.13c	0.57±0.08b	2.97±0.00b	0.00±0.00d	5.31±0.07c	3.56±0.48c	0.57±0.18c	1.26±0.14c	3.40±0.20b	4.61±0.35c
CA48	4.63±0.27b	0.28±0.09bc	2.70±0.18c	0.00±0.00d	6.84±0.43b	4.56±0.49b	1.33±0.06b	2.23±0.04b	2.68±0.20c	6.01±0.47b
PIR-D	2.69±0.19c	0.33±0.07bc	0.53±0.34d	0.81±0.00b	4.48±0.24d	3.05±0.12c	0.31±0.05cd	0.38±0.00d	0.55±0.01de	3.83±0.20d
P3S-B	2.62±0.15c	0.38±0.14bc	0.40±0.21d	0.42±0.19c	4.27±0.07d	2.47±0.13d	0.30±0.13cd	0.48±0.11d	0.59±0.04de	3.77±0.34d
P5S-A	2.70±0.28c	0.48±0.19bc	0.65±0.07d	0.51±0.15c	4.43±0.12d	2.98±0.20c	0.25±0.07cd	0.40±0.20d	0.63±0.06de	3.72±0.19d

Hongos: 1- M1MtPpA-AAR1, 2- M1MtPpA- PDA, 3- M1MtPpA-AA, 4- M1MtPpA-PDAR1, 5- M2MtPpA-AAR2, 6- M2MtPpA- AA, 7- M3MtPpA-CHR2, 8- M3MtPpA-CH, 9- M4MtPpA- CHR1, 10- M7MtPpA-CHR3. C=CONTROL

### 10.2.6 Ensayo de control biológico en cámara húmeda.

Se evaluó el porcentaje de severidad y la incidencia de la enfermedad a los 20 días de infección en condiciones de cámara húmeda para los hongos *Annulohypoxyloium stygium* y *Daldinia eschscholtzii* (Figura 15). Se encontró que los tratamientos correspondientes a la aplicación de las cepas CA48, PIR-D, P5S-A y las mezclas bacterianas (PIR-D, P3S-B, P5S-A) y (AM6, AM12, CA48) fueron los que menor porcentaje de severidad e incidencia de la enfermedad presentaron contra el hongo *Annulohypoxyloium stygium* (Cepa M1MtPpA-PDAR5), además las cepas bacterianas CA48, PIR-D, P3S-B y la mezcla PIR-D, P3S-B y P5S-A son las más efectivas para el control de crecimiento del hongo *Daldinia eschscholtzii* (Cepa M4<sub>1</sub>MtPpA-PDAR5) (Cuadro 12).



**Figura 15.** Ensayos de antagonismo en cámara húmeda.

En ambos enfrentamientos las cepas CA48 (*Stenotrophomonas* sp.), PIR-D (*Serratia proteamaculans*) y la mezcla del género *Serratia* sp. (PIR-D, P3S-B Y P5S-A) fueron las que más contribuyeron a la sanidad de las acículas de *Pinus patula*, demostrando su efectividad antagónica bajo condiciones de cámara húmeda contra los hongos *Annulohypoxyloium stygium* (Cepa M1MtPpA-PDAR5) y *Daldinia eschscholtzii* (Cepa M4<sub>1</sub>MtPpA-PDAR5) (Cuadro 12 y Figura 16). A diferencia de las pruebas de antagonismo en placa, CA48 fue efectiva para el control de crecimiento de los hongos más representativos del sitio de estudio comprendido por arboles de 15 años aproximadamente en ensayos de cámara húmeda. Esta cepa (*Stenotrophomonas* sp.) ha sido encontrada como

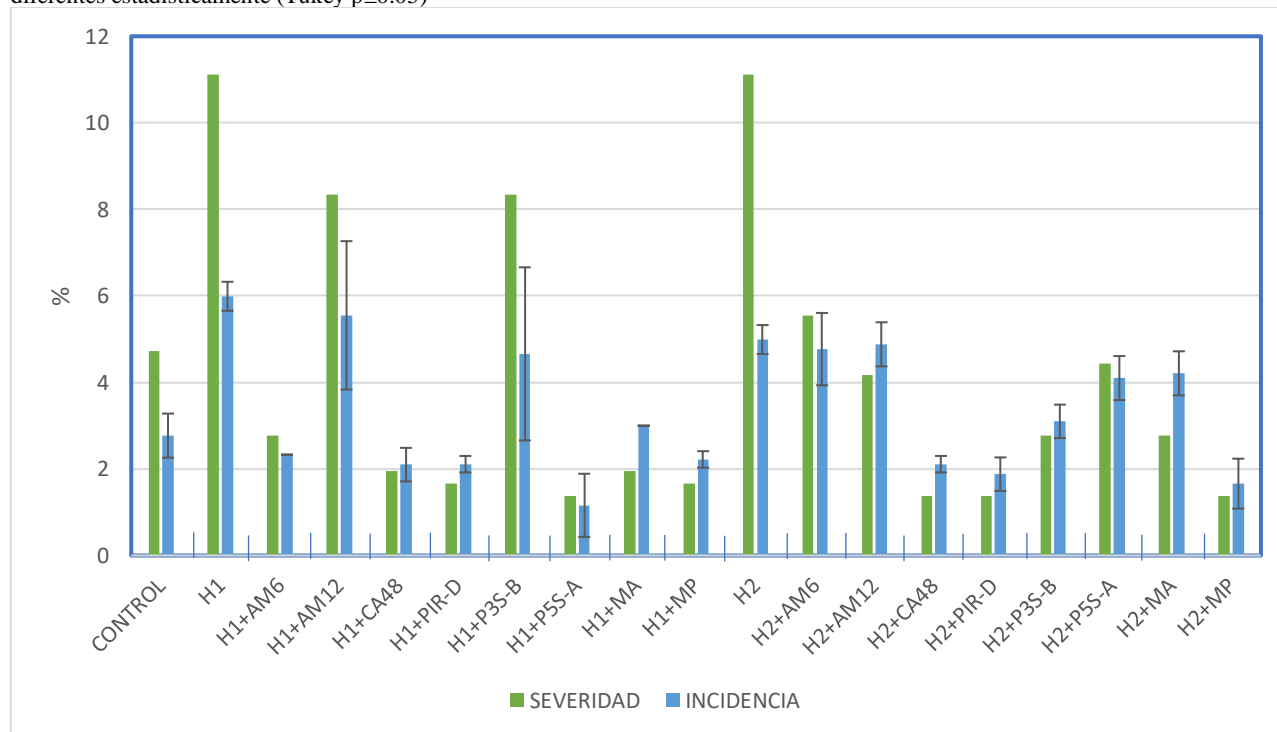
**Cuadro 12.** Evaluación de la severidad e incidencia de la enfermedad en acículas de *Pinus patula* inoculadas con bacterias antagónicas en cámara húmeda.

Tratamiento	Severidad (%)	Incidencia Lesiones por acícula
Control	4.72	2.77±0.50 c
M1MtPpA-PDAR5	11.11	5.99±0.33 a
M1MtPpA-PDAR5 + AM6	2.77	2.33±0.00 c
M1MtPpA-PDAR5 + AM12	8.33	5.44±0.19 a
M1MtPpA-PDAR5 + CA48	1.94	2.10±0.38 cd
M1MtPpA-PDAR5 + PIR-D	1.66	2.11±0.19 cd
M1MtPpA-PDAR5 + P3S-B	8.33	4.66±2.00 ab
M1MtPpA-PDAR5 + P5S-A	1.38	1.16±0.72 cde
M1MtPpA-PDAR5 + AM6, AM12, CA48	1.94	3.00±0.00 cd
M1MtPpA-PDAR5 + PIR-D, P3S-B, P5S-A	1.66	2.22±0.19 cd
Control	4.72	2.77±0.50 d
M4iMtPpA-PDAR5	11.11	4.99±0.33 a
M4iMtPpA-PDAR5 + AM6	5.55	4.77±0.83 ab
M4iMtPpA-PDAR5 + AM12	4.16	4.88±0.50 ab
M4iMtPpA-PDAR5 + CA48	1.38	2.11±0.19 de
M4iMtPpA-PDAR5 + PIR-D	1.38	1.88±0.38 de
M4iMtPpA-PDAR5 + P3S-B	2.77	3.10±0.38 de
M4iMtPpA-PDAR5 + P5S-A	4.44	4.10±0.50 abc

medio biocontrolador para el agente fúngico *Bipolaris sorokiniana* (Zhang y Yuen, 1999) y de *R necatrix* (Vida *et al.*, 2017).

M4 <sub>1</sub> MtPpA-PDAR5 + AM6, AM12, CA48	2.77	4.21±0.50 abc
M4 <sub>1</sub> MtPpA-PDAR5 + PIR-D, P3S-B, P5S-A	1.38	1.66±0.57 de

Mn: número de muestra, Mt: municipio de Tetela, Pp: *Pinus patula*, A: Acícula, PDA: Agar dextrosa papa, R5: Repetición 5, AM6=*Burkholderia* sp., AM12=*Burkholderia gladioli*, CA48=*Stenotrophomonas* sp., PIR-D=*Serratia proteamaculans*, P3S-B=*Serratia* sp., P5S-A=*Serratia grimesii*. Medias con distinta letra en el sentido de la columna son diferentes estadísticamente (Tukey p≤0.05)



**Figura 16.** Severidad e incidencia en ensayos de cámara húmeda.

H1= M1MtPpA-PDAR5, H2=M4<sub>1</sub>MtPpA-PDAR5

### 10.3 Fase de campo.

#### 10.3.1 Aplicación de control biológico en campo en *Pinus patula* de regeneración natural.

En el experimento de pinos de regeneración natural (Figura 17 y 20), se analizaron los parámetros de altura y diámetro al inicio y final del experimento en los distintos tratamientos (Cuadro 13).



**Figura 17.** *Pinus patula* de regeneración natural.

Se observaron en microscopio las lesiones presentes en las acículas a través de microscopio. La enfermedad inició con la presencia de manchas cloróticas en las agujas color café-rojizo y amarillo y en estado avanzado el pino presenta defoliación, pudiendo causar la muerte del árbol (Figura 17 y 20). En evaluaciones realizadas en Tetela de Ocampo, la zona forestal presentó un 100% de infestación fúngica y en la mayoría de los árboles de pino dañados se mostró del 50% al 100% de amarillamiento del follaje (CONAFOR, 2015).

**Cuadro 13.** Evaluación de los parámetros altura y diámetro en *P. patula* de regeneración natural.

Clave	Tratamiento	Incremento de altura por tratamiento (cm)	Incremento de altura respecto al control (%)	Diferencia de diámetro (cm)	Incremento de diámetro respecto al control (%)
T1	Biológico 1 (Cepas PIR-D, P3S-B, P5S-A)	35.00 ± 07.00cd	18	1.80 ± 0.19cd	06
T2	Biológico 2 (Cepas AM6, AM12, CA48)	11.33 ± 01.33a	-65	0.34 ± 0.18a	-80
T3	Mezcla de biológico 1 y 2	69.33 ± 09.66e	192	2.31 ± 0.25d	-05
T4	Control	29.00 ± 01.73bc	0	1.32 ± 0.09bc	0
T5	Químico	28.33 ± 04.04bc	-37	1.16 ± 0.11ac	-44
T6	Nutritivo	32.33 ± 11.18c	-26	1.18 ± 0.24ac	-27
T7	Nutritivo + Mezcla de biológico 1 y 2	29.33 ± 02.51bc	-32	1.16 ± 0.31ac	-48
T8	Bacterias que estimulan el crecimiento	20.33 ± 04.16ac	-31	0.45 ± 0.35ab	-77
T9	Bacterias que estimulan el crecimiento + Nutritivo	49.66 ± 07.02d	20	2.22 ± 0.68d	66
T10	Ácido salicílico + Mezcla de biológico 1 y 2	14.66 ± 03.51ab	-51	0.50 ± 0.37ab	-66
T11	Ácido salicílico	26.00 ± 03.00ac	-34	1.15 ± 0.24ac	-61
T12	Ácido salicílico + mezcla de biológico 1 y 2 + Nutritivo	30.33 ± 01.69bc	-32	0.69 ± 0.10ab	-77

Medias con distinta letra en el sentido de la columna son diferentes estadísticamente (Tukey  $p \leq 0.05$ ).

Se encontró que, en el parámetro de altura (Cuadro 13), la mezcla de los tratamientos biológicos 1 y 2 (T3) presentaron un crecimiento de  $69.33 \pm 09.66$  cm por árbol que corresponde al incremento del 192% respecto al control, sugiriendo que la inoculación de la mezcla bacteriana disminuyó la presencia de la enfermedad fúngica y con ello estimuló el crecimiento de los árboles; el segundo mejor tratamiento fue la aplicación de bacterias promotoras de crecimiento y nutrientes (T9) con  $49.66 \pm 07.02$  cm de crecimiento por árbol (20% respecto al control). El tratamiento con menor promoción de altura fue el biológico 2 (T2) con un -65% respecto al control, seguido del tratamiento correspondiente a la inoculación de ácido salicílico + mezcla de biológico 1 y 2 (T10) con un incremento de  $11.33 \pm 01.33$  cm y  $14.66 \pm 03.51$  cm respectivamente, cuya finalidad no es la promoción del crecimiento sino el control de la enfermedad fúngica.

Se observó que el tratamiento con bacterias que estimulan el crecimiento adicionado de solución nutritiva (T9) presentó el mayor incremento en el diámetro de tallo con  $2.22 \pm 0.68$  cm que representan un incremento del 66% respecto al control, seguido de los tratamientos de biológico 1 (6% respecto al control) y la mezcla de biológicos (-5% respecto al control),

presentando valores de  $1.80 \pm 0.19$  cm y  $2.31 \pm 0.25$  cm respectivamente (Tabla 11). Los tratamientos que menos incremento de diámetro tuvieron son biológico 2 (T2) con  $0.34 \pm 0.18$  cm (-80% respecto al control) y ácido salicílico + mezcla de biológicos + nutritivo con un incremento promedio de  $0.69 \pm 0.10$  cm por árbol (-77% respecto al control). La presencia de la mezcla de biológico 1 y 2 (T3) como uno de los principales tratamientos en los que se promovió el crecimiento de los árboles de pino es prueba de la efectividad como controlador biológico de la enfermedad fúngica en la zona de *Pinus patula* de regeneración natural al mejorar su sanidad y desarrollo. También el tratamiento de bacterias que estimulan el crecimiento + nutritivo (T9) fue de los principales promotores de crecimiento, pudiendo disminuir la presencia de la enfermedad manteniendo los árboles con una mejor sanidad debido a la satisfacción de sus necesidades nutricionales. Las bacterias estimuladoras de crecimiento son un grupo de cepas que pueden incentivar el crecimiento de las plantas, protegerlas de enfermedades, y aumentar su rendimiento (Bhattacharyya & Jha, 2012). Se pueden utilizar para facilitar el crecimiento de una gran variedad de plantas, especialmente en condiciones de estrés, y se han constituido como una alternativa al uso intensivo de fertilizantes y productos fitosanitarios químicos, los cuales además de constituir un problema medioambiental por su acumulación en suelos y aguas, han conllevado una elevación de los costes de producción de muchos alimentos y otros derivados de la agricultura (Franco-Correa, 2009).



**Figura 20.** Ramas de *Pinus patula* de regeneración natural con diferentes tratamientos.

**Cuadro 14.** Evaluación de la severidad e incidencia de la enfermedad en acículas de *Pinus patula* de regeneración natural.

Tratamiento	Severidad (%)	Incidencia (Lesiones por acícula)
Biológico 1 (Cepas PIR-D, P3S-B, P5S-A)	1.94	2.75±0.95c
Biológico 2 (Cepas AM6, AM12, CA48)	4.33	4.37±0.47c
Mezcla de biológico 1 y 2	2.72	3.94±0.79c
Control	5.27	8.62±0.49a
Químico	2.94	7.16±0.38a
Nutritivo	5.61	5.02±1.52ab
Nutritivo + mezcla de biológico 1 y 2	2.61	8.35±1.75a
Biofertilizante	3.16	4.37±0.17ab
Biofertilizante + nutritivo	4.33	8.77±1.07a
Ácido salicílico + mezcla de biológico 1 y 2	4.88	6.52±0.07ab
Ácido salicílico	1.97	3.61±0.89ab
Ácido salicílico + mezcla de biológico 1 y 2 + nutritivo	4.11	5.26±0.94ab

Medias con distinta letra en el sentido de la columna son diferentes estadísticamente (Tukey  $p \leq 0.05$ )

El tratamiento denominado Biológico 1 (Cepas PIR-D, P3S-B, P5S-A) es el que presentó menor severidad e incidencia de la enfermedad (Cuadro 14). Este tratamiento está conformado por la combinación de tres bacterias del género *Serratia* sp. Además, este tratamiento fue estadísticamente igual ( $p \leq 0.05$ ) al tratamiento Biológico 2 (cepas AM6, AM12 y CA48) y a la combinación de ambos tratamientos (Mezcla de biológico 1 y 2). Los

resultados coinciden con lo obtenido en los ensayos bajo condiciones de cámara húmeda dónde fueron los que más contribuyeron a la sanidad de las acículas de *Pinus patula* infectadas por hongos. El tratamiento con solución nutritiva presentó 5.61% en el parámetro de severidad superando al tratamiento control y 5.0 lesiones por acícula de incidencia. Ambos parámetros sugieren una promoción de la enfermedad fúngica debida a la aplicación de nutrientes y al evidente incremento en la afectación de las plantas de pino. El tratamiento control mostró la mayor incidencia (8.6 lesiones por acícula) y el segundo valor más grande de severidad (5.27%) (Cuadro 14). Los resultados mostraron la eficiencia para el control biológico contra hongos por parte de las cepas de origen forestal (*Serratia* sp.), lo que sugiere su efectividad debido al origen de las bacterias y a la facilidad en la adaptación al entorno propio del bosque de pino en comparación con las bacterias agrícolas. La aplicación del tratamiento nutritivo estimula la propagación de la enfermedad fúngica, lo que indica que las deficiencias nutricionales encontradas en el suelo no fueron satisfechas adecuadamente con la inoculación foliar. La aplicación de ácido salicílico indujo la respuesta sistémica en los árboles mejorando su salud, este mecanismo de defensa ha sido propuesto por varios autores (Blodgett *et al.* 2007), permitiendo un control de la enfermedad fúngica sin necesidad de la aplicación de agentes biológicos, químicos o nutritivos.

### 10.3.2 Aplicación de control biológico en campo en *Pinus patula* de 15 años.



**Figura 21.** Inoculación de *Pinus patula* de 15 años.

Se realizaron dos evaluaciones de la severidad de la enfermedad y de la presencia de lesiones por acícula en los diferentes tratamientos, una a los ocho y otra a los doce meses de la primera aplicación en los *Pinus patula* de 15 años (Figura 21, Cuadro 15).

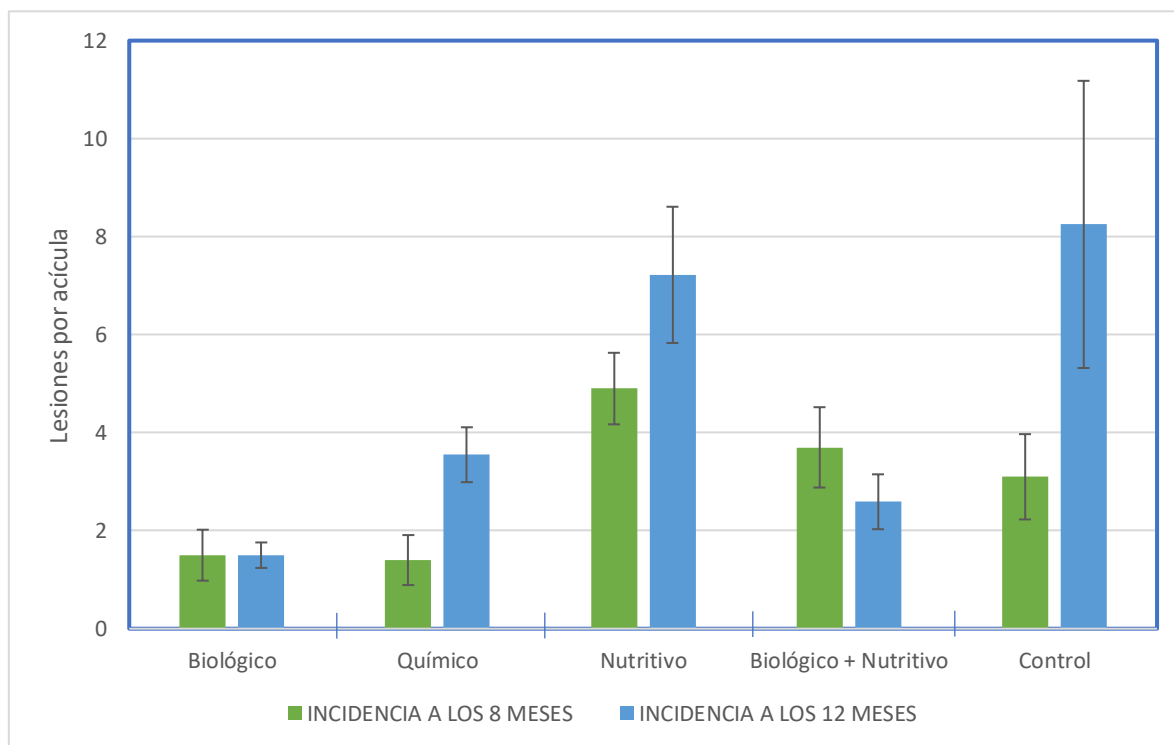
**Cuadro 15.** Control de la enfermedad fúngica de *Pinus patula* de 15 años a los 8 y 12 meses de la primera aplicación

Clave	Tratamiento	Incidencia(A)* Lesiones por acícula	Severidad(A) (%)	Incidencia(B)* Lesiones por acícula	Severidad(B) (%)	Longitud de acículas (cm)
T1	Biológico	1.50 ± 0.52 a	1.11	1.50 ± 0.26 a	1.30	22.98 ± 1.62 b
T2	Químico	1.40 ± 0.51 a	0.88	3.55 ± 0.56 b	3.80	22.13 ± 1.71 b
T3	Nutritivo	4.90 ± 0.73 b	6.94	7.22 ± 1.39 c	7.10	22.37 ± 3.16 b
T4	Biológico + Nutritivo	3.70 ± 0.82 c	3.77	2.59 ± 1.56 ab	1.66	18.78 ± 2.15 a
T5	Control	3.10 ± 0.87 c	12.22	8.25 ± 2.93 c	9.40	20.37 ± 1.68 ab

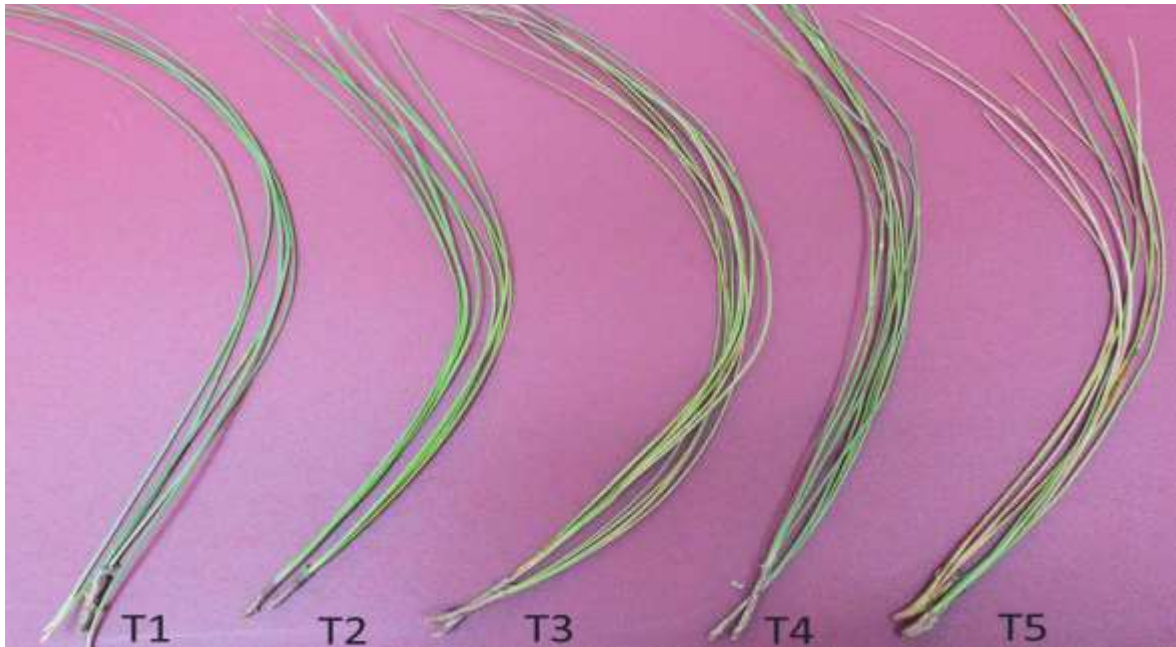
Media con distinta letra en el sentido de la columna son diferentes estadísticamente (Tukey  $p \leq 0.05$ ).

En la evaluación del tratamiento a los ocho meses posteriores a la aplicación para el control fúngico aplicado a *Pinus patula* de 15 años promedio, el más efectivo fue el químico, el cual presentó el menor número de lesiones por acícula ( $1.4 \pm 0.51$ ), seguido por el

tratamiento biológico ( $1.5 \pm 0.52$  lesiones por acícula), siendo estadísticamente igual con un valor de  $p \leq 0.05$ . El tratamiento con mayor número de lesiones por acícula es el nutritivo con un valor de  $4.9 \pm 0.73$  lesiones por acícula y 6.94 % de severidad. El control presento  $3.1 \pm 0.82$  lesiones por acícula y un 12.22% de severidad, siendo el tratamiento más afectado por la enfermedad fúngica (Cuadro 15). La aplicación de nutrientes mostró un incremento en el número de lesiones por acícula, lo que sugiere una estimulación de la enfermedad debido a los componentes de la solución nutritiva. Los resultados indican la eficiencia del control biológico a partir del uso de bacterias en condiciones forestales como alternativa al combate químico (Figura 22).



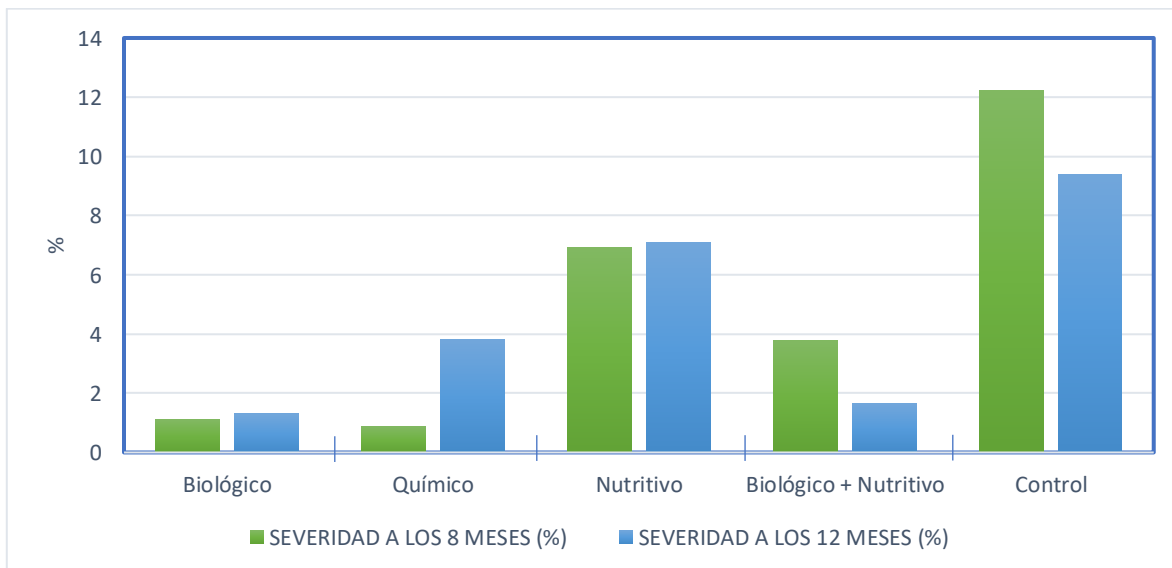
**Figura 22.** Lesiones por acícula en pinos de 15 años a los 8 y 12 meses.



**Figura 23.** Acículas de *Pinus patula* con diferentes tratamientos.

Abreviatura: T1: biológico, T2: químico, T3: nutritivo, T4: biológico+nutritivo, T5: control.

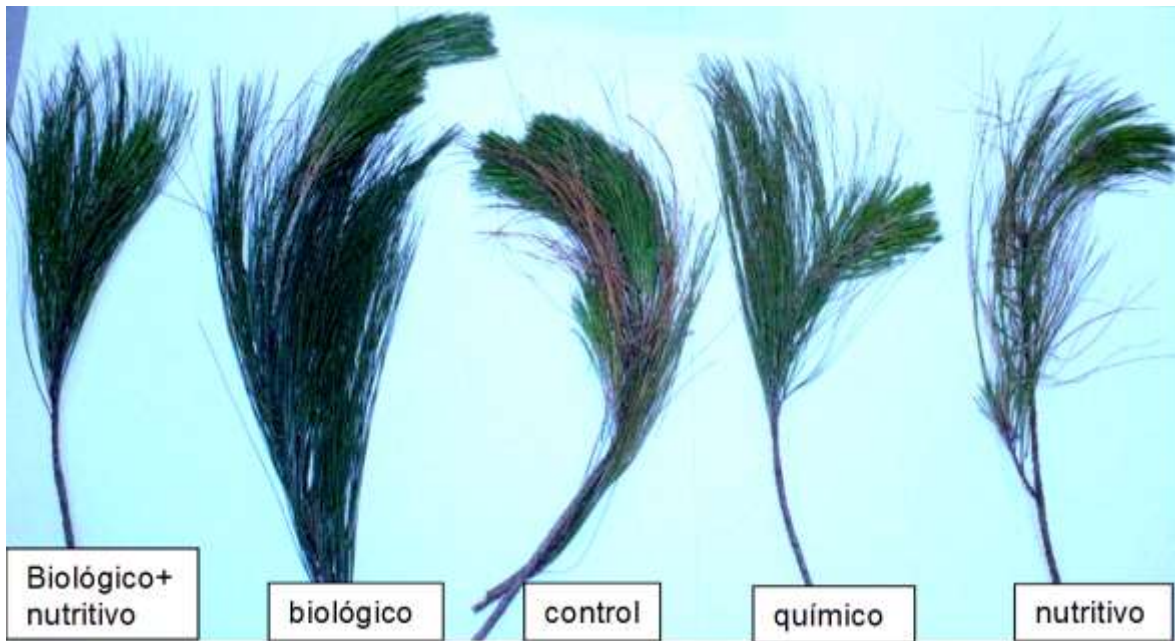
La segunda evaluación se realizó a los doce meses de la primera aplicación. Se evaluó los parámetros de severidad e incidencia (Cuadro 15). El tratamiento más efectivo para el control fúngico aplicado a *Pinus patula* de 15 años fue el Biológico, presentó el menor porcentaje de severidad (1.30%) e incidencia ( $1.50 \pm 0.26$  lesiones por acícula), seguido por el tratamiento Biológico + Nutritivo que tuvo 1.66 % de severidad y  $2.59 \pm 1.56$  lesiones por acícula.



**Figura 24.** Severidad de la enfermedad en *Pinus patula* de 15 años.

El tratamiento con mayor severidad y número de lesiones por acícula es el control con un valor de 9.40% y  $8.25 \pm 2.93$  respectivamente. El tratamiento nutritivo presentó un valor de 7.10% de severidad y  $7.22 \pm 1.39$  de incidencia, siendo el segundo tratamiento más afectado por la enfermedad fúngica mostrando valores cercanos al control, sugiriendo una estimulación de la enfermedad debido a los componentes de la solución nutritiva (Figura 24).

Se observó que la severidad e incidencia de la enfermedad incrementó a los 12 meses de la primera aplicación. Esta última evaluación se realizó en la temporada de secas (octubre a mayo), cuando los pinos se exponen mayormente a las plagas y enfermedades debido a que se crean mejores condiciones de propagación de los agentes causales de la caída foliar del pino. Las plantas que experimentan estrés por sequía son con frecuencia más susceptibles a los patógenos, la privación de agua es quizás la fuente más importante de estrés para los árboles. Las condiciones de sequía afectan a los árboles directamente, al inducir deterioro de las relaciones hídricas e, indirectamente, al hacer que los árboles sean más susceptibles a ataques bióticos (Desprez-Loustau *et al.*, 2006, Sturrock *et al.*, 2011). Se pronostica que el cambio climático aumente la presión sobre muchas comunidades vegetales, incluidos los árboles en ecosistemas leñosos naturales, bosques gestionados y agricultura (Sturrock *et al.*, 2011). Por ejemplo, el impacto potencial de la *Botryosphaeria dothidea*, especie patógena presente como un endófito en numerosas plantas en diversas partes del mundo, podrían agravarse debido al cambio climático (Desprez-Loustau *et al.*, 2006).



**Figura 25.** Ramas de *Pinus patula* de 15 años con diferentes tratamientos.

Se valoró el parámetro de longitud acicular en los tratamientos aplicados a *Pinus patula* de 15 metros de altura a los 12 meses, la aplicación bacteriana generó una mayor longitud (22.98 cm) y coloración verde oscuro en las acículas (Figura 25), sugiriendo que la disminución de la enfermedad con el tratamiento bacteriano estimula el crecimiento acicular además de la sanidad.

## 11. Conclusiones

- La enfermedad fúngica presente en la zona forestal de Tetela de Ocampo, Puebla es debida a la presencia de diferentes hongos. Se aislaron un total de 42 diferentes

taxones fúngicos que habitaban acículas procedentes de *Pinus patula* de la zona forestal de Tetela de Ocampo, Puebla. Se encontró más de una especie de hongo en las acículas.

- Los hongos más frecuentes asociados a *Pinus patula* en el bosque son: *Alternaria alternata*, *Myrmaecium rubricosum*, *Curvularia lunata*, *Lophodermium* sp., *Annulohypoxyton stygium*, *Curvularia spicifera*, *Curvularia trifolii*, *Daldinia* sp., *Diplodia sapinea*, *Curvularia pseudobrachyspora*, *Daldinia eschscholtzii*, *Botryosphaeria dothidea*.
- Se seleccionaron seis bacterias con capacidad antifúngica pertenecientes a la colección del Laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas-ICUAP. Estas bacterias fueron caracterizadas genéticamente, obteniendo las especies: *Serratia proteamaculans*, *Burkholderia gladioli*, *Serratia grimesii*, *Stenotrophomonas* sp., *Serratia* sp., *Burkholderia* sp.
- Los ensayos *in vitro* demostraron la capacidad de control biológico de las bacterias a los hongos patógenos. Se encontró que las bacterias seleccionadas presentaron una capacidad antagónica contra los 10 hongos más frecuentes en la zona forestal. 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. Se observó que la cepa AM6 (*Burkholderia* sp.) limitó el crecimiento fúngico de 9 de los 10 hongos seleccionados, por lo que se consideró como la bacteria más eficiente en los ensayos de antagonismo.
- Las cepas CA48 (*Stenotrophomonas* sp.), PIR-D (*Serratia proteamaculans*) y la mezcla del género *Serratia* sp. (PIR-D, P3S-B Y P5S-A) fueron las que más contribuyeron a la sanidad de las acículas de *Pinus patula*, demostrando su efectividad antagónica bajo condiciones de cámara húmeda contra los hongos *Annulohypoxyton stygium* (Cepa M1MtPpA-PDAR5) y *Daldinia eschscholtzii* (Cepa M4<sub>1</sub>MtPpA-PDAR5).

- Los tratamientos *in situ* son prueba de la eficiencia del biocontrol bacteriano en condiciones ambientales. Los resultados en pinos pequeños mostraron la eficiencia para el control biológico contra hongos por parte de las cepas de origen forestal (*Serratia* sp.), lo que sugiere su efectividad debido al origen de las bacterias y a la facilidad en la adaptación al entorno propio del bosque de pino en comparación con las bacterias agrícolas.
- Los resultados en *Pinus patula* de 15 años indican la eficiencia del control biológico a partir del uso de bacterias en condiciones forestales como alternativa al combate químico. El tratamiento más efectivo para el control fúngico fue el Biológico, ya que presentó el menor porcentaje de severidad e incidencia (lesiones por acícula). Además, la aplicación bacteriana generó una mayor longitud y coloración verde oscura en las acículas, sugiriendo que la disminución de la enfermedad con el tratamiento bacteriano estimula el crecimiento acicular además de la sanidad.
- Se propone la aplicación de agentes bacterianos como alternativa al tratamiento químico, basándose en los resultados *in vitro* e *in situ*, los cuales muestran que con la aplicación de agentes de biocontrol se puede alcanzar una eficacia similar a la obtenida con productos químicos, posicionándolos como una alternativa de manejo integrado de enfermedades, con los consecuentes beneficios ambientales.
- La aportación de la propuesta de biocontrol a las ciencias ambientales es brindar una alternativa al combate químico de los hongos presentes en la zona forestal, regulando su densidad poblacional con agentes biológicos propios del sector forestal y con ello, procurar la conservación de la biomasa del bosque de pino, así como los beneficios ecosistémicos, paisajísticos, sociales, recreativos y económicos que nos proporciona, sin afectar el equilibrio del ecosistema.

## 12. Perspectivas

Continuar con la investigación ayudará a enriquecer el conocimiento acerca del uso de organismos antagónicos en sistemas forestales, área muy poco explorada a nivel mundial. También se propone la búsqueda y el empleo de más bacterias originarias del sector forestal como biocontroladores y el estudio del impacto que ocasionen en el ecosistema, así como los beneficios sociales y económicos que pudieran generar. También se propone como una importante vía para desarrollar una nueva industria de carácter tecnológico que proporcione soluciones eficaces a las enfermedades manteniendo un equilibrio ecosistémico.

### **13. Bibliografía**

Adelaide University. (2017). Micology online. Descriptions of *hyphomycetes*, *curvularia* sp. <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/hyphomycetes/curvularia/>

- Alemán, B.I., Sánchez C., J.A., Sealey, M., Otoniel R., J., López C., C. (2003). Empleo de una cepa de *Burkholderia cepacia* en el control de la mancha azul en la madera de pino caribe (*Pinus caribaea*). *Ciencia*. 11(1): 39-46.
- Alvarado, R. D. (2005). Enfermedades y agentes abióticos en árboles en México; conceptos, diagnosis y manejo. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Edo. de Méx., México. 275 p.
- Amponsah, N.T., Jones, E.E., Ridgway, H.J. and Jaspers, M.V. (2009) Rainwater dispersal of *Botryosphaeria conidia* from infected grapevines. *N. Z. Plant Protect.* 62, 228–233.
- Andrushina V.A., Druzhinina A.V., Yaderets V.V., Stitsenko, T.S., Voishvillo N.E. (2011). Hidroxilación de esteroides por el micelio de *Curvularia lunata* en presencia de metil- $\beta$ -ciclodextrina. *Appl Biochem Microbiol.* 47: 42-48.
- Arriola P., V. J., Gijón H., A. R., Pérez M., R., Reséndiz M. J. F. (2015). Determinación, distribución y control del agente causal denominado Caída Foliar del Pino en Puebla. Informe Final. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Comisión Nacional Forestal. Ciudad de México. 54 p.
- Bhattacharyya P.; Jha D. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microb Biot*, 28:1327–1350.
- Barón L., F. J. (2006). Diferencias que representa una variable numérica entre dos grupos. En: *Apuntes de Bioestadística*. Universidad del Medio Ambiente. México. 28-37.
- Belén, M., Errasti, A., Villacide, J. (2011). Patagonia y su asociación con plagas entomológicas Manejo Integrado de Plagas Forestales. Ediciones Insituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. 14.
- Benítez D., H., Neyra G., L. (1997). “La biodiversidad de México y su potencial económico”; *Economía Ambiental: Lecciones de América Latina*; INE; México.
- Blodgett, J. T., Stanosz, G. R. (1998). Monoterpene and phenolic compound concentrations in water-stressed red pine inoculated with *Sphaeropsis sapinea*. *Phytopathology* 88:245-251.
- Blodgett, J. T., Eyles, A., Bonello, P. (2007). Organ-dependent induction of systemic resistance and systemic susceptibility in *Pinus nigra* inoculated with *Sphaeropsis sapinea* and *Diplodia scrobiculata*. *Tree Physiol.* 27:511-517.
- Bostock, R.M., Pye, M.F., Roubtsova, T.V. (2014) Exploiting the nexus in abiotic and biotic stress perception and response. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 517–549.
- Carrera-Nieva, A.; López-Ríos, G. F. (2007). Manejo y evaluación de ectomicorrizas en especies forestales. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente.* 10. 93–98.

- Cha, J., Heo, B., Ahn, J. S., Gang, G., Park, C. G., Kwak, Y. S. Morphological and Molecular Characteristics of the Oak Tree Canker Pathogen, *Annulohyphoxylon truncatum*. The Korean Society of Mycology Mycobiology 40(1) : 79-81 (2012)
- Cibrián T., D., Alvarado R., D., García D., S. E. (2007). Enfermedades forestales en México/Forest diseases in México. Universidad Autónoma Chapingo; CONAFOR-SEMARNAT, México; Forest Service USDA, EUA; NRCAN Forest Service, Canadá y Comisión Forestal de América del Norte, COFAN, FAO. Chapingo, México.
- Comisión Nacional Forestal. (2015). Enfermedad de caída Foliar de los pinos. Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales. CONAFOR. Desplegable. Zapopan, Jalisco, México.
- Comisión Nacional Forestal. (2016). Forestal, S. N. de I. Estadísticas del Medio Ambiente - CONAFOR.
- Comisión Nacional Forestal. (2003). Estudio de tendencias y perspectivas del sector forestal en América Latina al año 2020. Informe Nacional, México. CONAFOR.12.
- Comisión Nacional Forestal. (2004). Revista mexicana de ciencias forestales. CONAFOR. 109.
- Comisión Nacional para el uso de la Biodiversidad. (2000). “La diversidad biológica en México: Estudio de País.”
- Cordón C., P. R. (2009). Caracterización fitosanitaria de las plantaciones del Programa de Incentivos Forestales (PINFOR) en los Departamentos de Alta Verapaz y el Petén, Guatemala. Tesis de Maestría. Programa de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados. Montecillo. Texcoco, Edo. de Méx., México. 57 p.
- Corzo-Delgado E., Gómez-Mateos J. (2006). *Stenotrophomonas maltophilia*, un patógeno nosocomial de importancia creciente. Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario de Valme. Sevilla. España. ELSEVIER. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Vol. 24. Número 1.
- Crissman, C. (2002). Los Plaguicidas. Impactos en producción, salud y medio ambiente en Carchi, Ecuador. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Abya-Yala. 197.
- Dalmarcia de Sousa, C. M., Talita, F. S., Pereira, Danival, J. S., Aloísio, F. C. J., Mateus, S. D., Ronice, A. V., Evelynne, U. L., Gil, R. S. (2017). Essential oil of *Cymbopogon citratus* on the control of the *Curvularia* leaf spot disease on maize. Medicines. 4, 62.
- de Los Santos-Villalobos, S., Barrera-Galicia, G.C., Miranda-Salcedo, M.A., Peña-Cabriales, J.J. (2012). *Burkholderia cepacia* XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides*. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-IPN, Unidad Irapuato, 36500, Irapuato, Guanajuato, Mexico.

- Deepu, A., Dongmei, L., Richard, C., Stephen M., P. (2013). Identificación de *Curvularia lunata* por reacción en cadena de la polimerasa en un caso de endoftalmitis fúngica. Departamento de Patología y Medicina de Laboratorio, Medstar-Georgetown University Hospital, Washington, EE. UU.
- Desprez-Loustau, M.L., Marçais, B., Nageleisen, L.M., Piou, D., Vannini, A. (2006) Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. 597–612.
- Dhar Purkayastha, G., Mangar, P., Saha, A., Saha, D. (2018). Evaluation of the biocontrol efficacy of a *Serratia marcescens* strain indigenous to tea rhizosphere for the management of root rot disease in tea. Department of Biotechnology, University of North Bengal, Siliguri, West Bengal, India.
- Domínguez-Hernández, Huerta-Ortega, F. Barrios-Díaz, B., Posadas-García, M. A. (2012) Análisis dasométrico y propuesta de ordenamiento agroforestal del bosque en Tetela de Ocampo, Puebla. Programa de Ingeniería Agroforestal. Facultad de Ingeniería Agrohidráulica. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Dunne Dunne, Jer J. Crowley, Yvan Mo&nne-Loccoz, David N. Dowling, Frans J. de Bruijn, Fergal O’Gara. (1997). Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. Department of Microbiology, U n ive rsity College Cork, Cork, Ireland.
- Dvorak, W.S., Donahue, J.K. (1992). Camcore cooperative research review 19801992. North Carolina. North Carolina State University. USA. 93.
- Dvorak, W. S., Hodge, G. R., Kietzka, J. E., Malan, F., Osorio, L. F., Stanger, T. K. (2000). *Pinus patula*. In: Conservation & Testing of Subtropical & Subtropical Forest Tree Species by the CAMCORE Cooperative College of Natural Resources, NCSU. Raleigh. 149-173.
- Escobar S., R.A. Aspectos biológicos del *Pinus patula*. Medellín. (1967). Universidad Nacional de Colombia. 42.
- Euzéby, J.P. (1997). List of prokariotic names with standing in nomenclature.
- Ezziyyani, M., Pérez, S.C., Requena, M.E., Rubio, L., Candela, M.E. (2004). Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. Anales de Biología. 6978.
- Fraenza, L. B., Druetta, S. del V., Aguada, L., Zalazar, V., Farfalli, L. (2015). Onicomiosis por *Curvularia lunata* var. *aeria*: presentación de un caso clínico Hospital Nacional de Clínicas, Ciudad de Córdoba, Argentina.
- Franco-Correa, M. (2009). Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. Rv. peru. Biol. 16 (2): 239-242.

- Franklin, J.F., Spies, T.A., Van Pelt, R., Carey, A.B., Thornburgh, D.A., Berq, D.R., Lindenmayer, D.B., Harmon, M.E., Keeton, W.S., Shaw, D.C., Bible, K., Chen, J. (2002). Disturbances and structural development of natural forest ecosystems with silvicultural implications, using Douglas-fir forest as an example. *For. Ecol. Manage.* 399-423.
- French, D. W. 1988. *Forest and Shade Tree Pathology*. University of Minnesota. Department of Plant Pathology. St. Paul, MN, USA. 271 p.
- Gadow, K. V., Hui, G. (1999). *Modelling forest development*. Kluwer Academic Publishers. 213.
- García Serna I. (2011). *Diplodia pinea* (Desm.) Kickx y *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell, principales hongos de chancro de las masas forestales de *Pinus radiata* D. Don del País Vasco. Tesis doctoral. Universidad del país vasco. España.
- Garbisu, C., Becerril, J.M., Epelde, L., Akorta, I. (2007). Bioindicadores de la calidad del suelo: herramienta metodológica para evaluación de la eficacia de un proceso fitorremediador. *Ecosistemas*. 16 (2), 44-49.
- Gillespie A., J. R. (1992) *Pinus patula* Schiede and Deppe. *Patula pine*. Southern Forest Experiment Station, Forest Service, USDA. SO-ITF-SM-54. New Orleans, L.A. 5.
- González S., M. L. 2004. Caracterización del complejo de patógenos causales del tizón de la acícula del pino en la Finca Saquichai, Cobán, Alta Verapaz. Facultad de Agronomía. Universidad de San Carlos. Guatemala, Guatemala. 42 p.
- Gould, M., Louise, M., Nelson, W., Russell, K. (2008). Biocontrol of *Fusarium sambucinum*, dry rot of potato, by *Serratia plymuthica* 5–6. *Biocontrol Science and Technology*, 18:10,1005-1016, DOI: 10.1080/09583150802478189
- Grijpma, I.P. (2008). *Manuales para la educación agropecuaria. Producción forestal*. SEP. Trillas. México. 108.
- Guo, L.D., Huang, G.R., Wang, Y. (2008). Seasonal and tissue age influences on endophytic fungi of *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in the Dongling Mountains, Beijing. *J. Integr. Plant Biol.* (8), 997–1003.
- Hajek, A. E. (2004) *Natural enemies: an introduction to biological control*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 378.
- Hansen, E.H., Albertsen, L., Schäfer, T., Johansen, C., Frisvad, J.C., Molin, S., Gram, L. (2003). *Curvularia* haloperoxidasa: actividad antimicrobiana y posible aplicación como desinfectante de superficie. *Appl Environ Microbiol.* 69: 4611-4617.

- Huzefa A., Raja, Andrew N. Miller, Cedric J. Pearce, Nicholas H. Oberlies. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. Department of Chemistry and Biochemistry, University of North Carolina at Greensboro. United States.
- Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. (2012). Medio Físico - Puebla. Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México. INAFED.
- Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. (2014). Regiones naturales y biogeografía de México. INAFED.
- Kimmins, J.P. (1997). Forest ecology: A foundation for sustainable management. Prentice Hall, New Jersey. 596.
- Koo, H.M., Lee, S.H., Jung, I.M., Chun, S.C. (2003) Un hongo transmitido por la semilla *Bipolaris spicifera* detectado a partir de semillas de gramíneas importadas. Plant Pathol J. 19: 133-137.
- Lambeth, C. (1989). Incidencia de la mancha azul en las plantaciones de especies comerciales. Efecto del tiempo de almacenamiento y del descortezamiento. Cali. Informe de investigación No. 122. 10.
- Lin, S.H., Huang, C.H., Deng, Z.Y., Yan, M.X., Huang, W.H., Wei, J.J., Qin, Z.Q. (2012). Primer informe de enfermedad de manchas foliares en la caña de azúcar causada por *Bipolaris spicifera* en China. Aust Plant Dis Notes. 7: 51-53.
- Martín, C. A. (2015). Programa Ingeniería Agroforestal. Universidad Nacional Abierta y a Distancia– UNAD. Escuela De Ciencias Agrícolas, Pecuarias Y Del Medio Ambiente. ECAPMA. 1–65.
- Messiha, N.A., van Diepeningen, A.D., Farag, N.S., Abdallah, S.A., Janse, J.D., van Bruggen, A.H. (2007). *Stenotrophomonas maltophilia*: a new potential biocontrol agent of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of potato brown rot. Revista Europea de Fitopatología, Volumen 118, Número 3 , pp 211-225.
- Michailides, T.J. (1991) Pathogenicity, distribution, sources of inoculum, and infection courts of *Botryosphaeria dothidea* on Pistachio. Phytopathology, 81, 566–573.
- Minter, D. W. 2015. Fungi of Ukraine, Rhytismatales. CABI Bioscience, Bakeham Lane, Egham, Surrey. UK. <http://www.cybertruffle.org.uk/papers/rhytukra/index.htm#abs>
- Mittermeier, R., Goettsch, C. (1992). La importancia de la diversidad biológica de México, en J. Sarukhán y R. Dirzo. México ante los retos de la biodiversidad. CONABIO. México. 63-73.

- Monroy, R. C., (1995) *Pinus patula* Schl. et Cham., en México. Folleto técnico No.29 SAGAR/CIRGOC-INIFAP. México. 349.
- Morales R., R. (2007). Evaluación de la patogenicidad de *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & Sutton colectado en material de *Pinus radiata* D. Don, en Valdivia y la Costa de Arauco. Valdivia.
- Nicolás, H. C. (2011). Ventajas y desventajas de los insecticidas químicos y naturales. Universidad veracruzana. Facultad de ciencias químicas.74.
- Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Publicado en el DOF el 23 de Abril de 2003.
- Ochoa, V., Hinojosa, B., Gómez-Muñoz, B., García-Ruiz, R. (2007). Actividades enzimáticas como indicadores de calidad del suelo en agroecosistemas ecológicos. Programa de Doctorado/Master “Análisis y gestión de ecosistemas”. Departamento de Biología Animal, Vegetal y Ecología. Universidad de Jaén.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2018). El estado de los bosques del mundo - Las vías forestales hacia el desarrollo sostenible. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2015). Estudio de tendencias y perspectivas del sector forestal en América Latina al año 2020, Informe Nacional México. Juan Manuel Torres Rojo.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2012). El estado de los bosques del mundo. Roma. Licencia: SBN 978-92-5-307292-7
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2005). “Primera revisión del programa estratégico forestal 2025 y del programa nacional forestal 2001 - 2006”. (FAO). 15-32.
- Onofre-Lemus, J., Hernández-Lucas, I., Girard, L., Caballero-Mellado, J. (2009). ACC (1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate) Deaminase Activity, a Widespread Trait in *Burkholderia* Species, and Its Growth-Promoting Effect on Tomato Plants Appl. Environ. Microbiol.
- Ospina, M., Hernández, R., Rincón, E., Sánchez, F.,Urrego, J.,Rodas, C.,Ramírez, C., Riaño, N. (2009). El *Pino pátula*. Guías silviculturales. Blanecolor S.A.S. 93.
- Pavlic, D., Slippers, B., Coutinho, T.A., Wingfield, M.J. (2007) *Botryosphaeriaceae* occurring on native *Syzygium cordatum* in South Africa and their potential threat to *Eucalyptus*. Plant Pathol. 56, 624–636.

- Parent, G. Guía de reforestación. (1989). Corporación de defensa de la meseta de Bucaramanga. Agencia canadiense para el desarrollo internacional. 214.
- Pérez, W. (2007). ¿Qué es un fungicida? División de manejo integrado de cultivos. Hoja divulgativa No. 5. Perú. 3–6.
- Pérez, C.A., Wingfield, M.J., Slippers, B., Altier, N.A. and Blanchette, R.A. (2010) Endophytic and canker-associated *Botryosphaeriaceae* occurring on nonnative Eucalyptus and native Myrtaceae trees in Uruguay. *Fungal Divers.* 41, 53–69.
- Piontelli, E., Giusiano, G., Casanova, D. (2005). Comunidad estacional de microhongos en la litera de coníferas del n.e. argentino: énfasis en taxa de potencial interés médico. Univ. De Valparaíso, Escuela de Medicina, Cátedra de Micología, Casilla 92 V Valparaíso, Chile.
- Piontelli, E. (2011). Manual de Microhongos filamentosos comunes I. 1: 261-80.
- Pontelli, E. (2015). Especies oportunistas de importancia clínica de los géneros *Bipolaris Shoemaker* y *Curvularia Boedijn*: su caracterización bajo los nuevos criterios taxonómicos.
- Ponton, J., Moragues, M.D., Gené, J., Guarro, J., Quindós, G. (2002). Hongos y actinomicetos alérgicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, Bilbao.
- Porta-Casanellas, J., López-Acevedo M., Roquero De Laburu C. (2003). Edafología para la agricultura y el medio ambiente, Tercera edición; Impreso en España, Ediciones Mundiprensa, pp.929.
- Punithalingam, E., Waterson, J. M. (1970). *Diplodia pinea*. CMI. Descriptions of Plant Pathogenic Fungi and Bacteria 273:1-2.
- Qiu, Y., Savocchia, S., Steel, C.C. and Ash, G.J. (2008) *Botryosphaeria dothidea* associated with grapevine trunk disease in south-eastern Australia. *Australas. Plant Pathol.* 37, 482–484.
- Ragazzi, A., Moricca, S., Dellavalle, I. (1999) Water stress and the development of cankers by *Diplodia mutila* on *Quercus robur*. *J. Phytopathol.* 147, 425–428.
- Ramírez de G., M.R. (1991). Crecimiento del *Pinus patula Schlecht et Cham.*, en Colombia. Valdivia : Universidad Austral de Chile. Facultad de ciencias forestales. Trabajo de grado. 202.
- Ramírez M., M.A. (2009). Diversidad de insectos palo (Insecta Phasmatodea) de Colombia. Medellín. Universidad Nacional de Colombia. Trabajo de grado: Magíster en Ciencias – Entomología. 25.

- Reignoux, S., Green, S., Ennos, R. (2014). Molecular identification and relative abundance of cryptic *Lophodermium* species in natural populations of Scots pine, *Pinus sylvestris* L. *Fungal Biology* 118, 835-845.
- Riera, N., Handique, U., Zhang, Y., Dewdney, M., Wang N. (2017). Characterization of Antimicrobial-Producing Beneficial Bacteria Isolated from Huanglongbing Escape Citrus Trees. Citrus Research and Education Center, Department of Microbiology and Cell Science, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Lake Alfred, FL, United States.
- Riley, M. B., Williamson, M.R., Maloy O. (2002) Plant diseases diagnosis. The plant Health Instructor. DOI:10.1094/OHI-I-2002-1021-01. 18.
- Rodríguez, M., Guillén, S., Uva, V., Segura, R., Laprade, S., Sandoval, J. (2010). Aspectos a considerar sobre el control biológico. Proyecto demostrativo con implementación de buenas prácticas agrícolas. Hoja divulgativa No. 2.
- Romero, G., Olivera V., D. R. (2015). *Trichoderma harzianum* como agente de control biológico. Departamento de protección vegetal. Curso de protección forestal. Universidad de la República. Uruguay. 59.
- Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, 827-837.
- Rousk J., Brookes P.C., Baath E., (2009). Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbón mineralization. *App. Environ. Microbiol.* Vol 75. 1589-1596.
- Salles, J.F., Samyn, E., Vandamme, P., Van Veen, J., Van Elsas, J.D. (2006) Changes in agricultural management drive the diversity of *Burkholderia* species isolated from soil on PCAT médium. *Soil Biol. Biochem.* 661-673
- Sakalidis, M.L., Hardy, S.J., Burgess, T.I. (2011) Endophytes as potential pathogens of the baobab species *Adansonia gregorii*: a focus on the *Botryosphaeriaceae*. *Fungal Ecol.* 4, 1–14.
- Sakalidis, M.L., Ray, J.D., Lanoiselet, V., Hardy, G.E.S.J. and Burgess, T.I. (2011) Pathogenic *Botryosphaeriaceae* associated with *Mangifera indica* in the Kimberley Region of Western Australia. *Eur. J. Plant Pathol.* 130, 379–391.
- Sánchez-González, A. (2008). Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. *Madera Y Bosques*, 14(1), 107–120.
- Sánchez G., V., Bustamante, E., Shattock, R. (1998). Selección de antagonistas para el control biológico de *Phytophthora infestans* en tomate. Manejo integrado de plagas. Costa rica. 25-34.

- Sanz-Ross, A., Muller, M., San Martin, R., Diez, J. (2015). Fungal endophytic communities on twigs of fast and slow growing Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in northern Spain. España. 14.
- Shigo, A.L., 1982. Tree decay. Proceedings of Korea-USA Joint Seminar on Forest Diseases and Insect Pests, Seoul, Korea, 1982, pp.188–203.
- Shinichi, K., Soto, A., Campos, R., Ramos H., Gómez S., L. de B. (2007). Caldo Bordelés. Guía técnica 5. PROPA-Oriente. El salvador. 4.
- Sivanesan A. (1987). Especies graminícolas de *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* y sus teleomorfos. Mycol Pap. 158: 1-261.
- Smith, H., Wingfield, M. J., Coutinho, T. A. (2002). The role of latent *Sphaeropsis sapinea* infections in post-hail associated dieback of *Pinus patula*. Forest Ecol. Manag. 164:177-184.
- Solano E., O.E. (1987) Identificación y control de los hongos causantes de la mancha azul en madera de *Pino pátula* en Antioquia. Boletín técnico informativo sobre tecnología de maderas 17-29.
- Stadler, M., Læssøe, T., Fournier, J., Decock, C., Schmieschek, B., Tichy, Hans-Volker, Peršoh, D. (2014). A polyphasic taxonomy of *Daldinia* (*Xylariaceae*). *Helmholtz Centre for Infection Research, Dept. Microbial Drugs, Inhoffenstrasse 7, D-38124 Braunschweig, Germany*.
- Stanosz, G.R., Smith, D.R., Guthmiller, M.A., and Stanosz, J.C. (1997). Persistence of *Sphaeropsis sapinea* on or in asymptomatic shoots of red and jack pines. Mycologia 89:525-530.
- Stanosz, G.R., Smith, D.R. and Albers, J.S. (2005) Surveys for asymptomatic persistence of *Sphaeropsis sapinea* on or in stems of red pine seedlings from seven Great Lakes region nurseries. For. Pathol. 35, 233–244.
- Sturrock, R. N., Frankel, S. J., Brown, A. V., Hennon, P. E., Kliejunas, J. T., Lewis, K. J., Worrall, J. J., Woods, A. J. (2011). Climate change and forest diseases. Plant Pathology (2011) 60, 133–149
- Swart, W.J., Wingfield, M.J. (1991) Biology and control of *Sphaeropsis sapinea* on *Pinus* species in South Africa. Plant Dis. 75, 761–766.

- Tang, W., Ding, Z., Zhou, Z.Q., Wang, Y.Z., Guo, L.Y. (2012) Phylogenetic and pathogenic analyses show that the causal agent of apple ring rot in China is *Botryosphaeria dothidea*. Plant Dis. 96, 486–496.
- UDU (Universidad de la República Uruguay). (2015) Facultad de agronomía. Deficiencias de Nutrientes. 10.
- United States Department of Agriculture. (2012). Forest Services. Agriculture Handbook No. 680.
- Van Schijndel, J.W., Vollenbroek, E.G., Wever, R. (1993). La cloroperoxidasa del hongo *Curvularia inaequalis*: una nueva enzima de vanadio. Biochim Biophys Acta. 1161: 249-256.
- Vela, G. L. (1980) Contribución a la ecología de *Pinus patula* Schl. et Cham. Publicación especial No. 19. INIF/SARH. México. 109.
- Velázquez, A., Mas, J. F., Díaz-Gallegos, J. R., Mayorga-Saucedo, R. Alcántara, P.C., Castro, R., Fernández, T., Bocco, G., Ezcurra, E., Palacio, J. L. (2002). Patrones y tasas de cambio de uso del suelo en México Gaceta Ecológica, núm. 62. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Distrito Federal, México. 21-37.
- Velázquez, M. A., Ángeles, P., Llanderal, O., Román, J., Reyes, H. (2004). Monografía de *Pinus patula*. CONAFOR/Colegio de Postgraduados. México. 124.
- Vida, C., Cazorla, F.M., de Vicente, A. (2017). Characterization of biocontrol bacterial strains isolated from a suppressiveness-induced soil after amendment with composted almond shells. Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”- Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), 29071 Málaga, Spain.
- Wagner, B., Rivera, M., Mondino, P., Montealegre, A. (2014). Control Biológico de Enfermedades de Plantas en América Latina y el Caribe.
- Wormald, P. J. (1975). *Pinus patula*. Tropical Forestry Paper No. 7. Tropical Forestry Institute. Commonwealth Forestry Institute. Oxford, England. 172 p.
- Zaheer, A., Mirza, B. S., Mclean, J. E., Yasmin, S., Mahmud S. T., Malik, K. A., Mirza, M. S. (2016). Association of plant growth-promoting *Serratia* spp. with the root nodules of chickpea. National Institute for Biotechnology and Genetic Engineering (NIBGE), Faisalabad, Pakistan.
- Zhang, Z., Yuen, G. (1999). Biological Control of *Bipolaris sorokiniana* on Tall Fescue by *Stenotrophomonas maltophilia* Strain C3. Department of Plant Pathology, University of Nebraska. The American Phytopathological Society.

Zhang, Z.X., Deng, D.F., Qi, W.J., Fan, S.S., Cao, Y., Huang, J.G. and Liu, Z.Y. (2013) *Botryosphaeria dothidea*, the causal agent of a new canker disease of Tatarian dogwood (*Cornus alba*) in China. Australas. Plant Pathol. 42, 113–119.