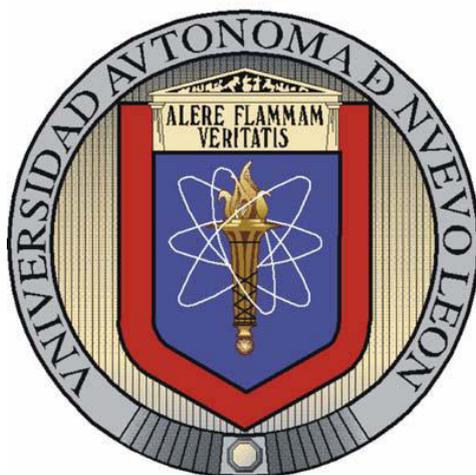


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



**CARACTERIZACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE *Lecanosticta acicola* (Thum.)
ANAMORFO DE *Mycosphaerella dearnessii* M.E. Barr. EN UN GRADIENTE
ALTITUDINAL EN NUEVO LEÓN, MÉXICO.**

**TESIS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAestrÍA EN CIENCIAS FORESTALES**

PRESENTA

BIOL. JACOB HIRAM VÁZQUEZ RÍOS.

LINARES, NUEVO LEÓN

JUNIO 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO

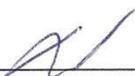


CARACTERIZACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE *Lecanosticta acicola* (Thum.)
ANAMORFO DE *Mycosphaerella dearnessii* M.E. Barr. EN UN GRADIENTE
ALTITUDINAL EN NUEVO LEÓN, MÉXICO.

TESIS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS FORESTALES

PRESENTA
BIOL. JACOB HIRAM VÁZQUEZ RÍOS.

Comité de tesis:


Dr. José Guadalupe Marmolejo Monciváis

Director


Dr. César Cantú Ayala

Secretario

Linares, Nuevo León


Dr. Andrés Eduardo Estrada Castellón

Vocal

Junio 2014

II

III

Agradecimientos

Especialmente quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por apoyarme para realizar mis estudios de maestría a través de su programa de becas.

Al Dr. José Marmolejo, por todo su apoyo, paciencia y dedicación para la realización de este trabajo.

Al Dr. César Cantú por todo su apoyo y comentarios acertados para dar lo mejor en todo el trabajo.

Al Dr. Eduardo Estrada por su invaluable apoyo y comentarios de aliento para seguir adelante.

A Cecy por su apoyo en el laboratorio y a todo el personal de la Facultad de Ciencias Forestales.

Muchas Gracias por su apoyo al Dr. Roberto Mercado, Dra. Susana Favela y Dr. Dino Ulises.

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo y gran esfuerzo a las personas más especiales que he conocido.

A mi abuela Hortencia, por siempre ser parte de mí y construir con todas tus buenas acciones los mejores recuerdos, que siempre tengo presentes.

A mi madre Bertha Ríos Cantú por siempre apoyarme y enseñarme a ser responsable y terminar lo que he empezado y no dejarme vencer ante las adversidades. Gracias por ser mi mamá. Te quiero mucho!

A mi tía Blanca Eugenia Ríos Cantú gracias por ser siempre mi amiga, por creer en mí y darme ánimo cuando lo necesito. Te quiero mucho!

A Job Favela por todo tu apoyo y tus buenos consejos.

A Liliana, Jennifer, Mary, Viri, Kenny, Ruby y Sonia Vázquez porque siempre las tengo presentes, aunque no nos veamos muy seguido.

A mis amigos de toda la vida que siempre los he considerado mis hermanos: Marco, Toño, Betty, Erie, Humberto, Marcela, Dafne, Samantha, “Kadete”, Hulda, Heberto, Gloria, Misrain, Alexis y Karla. A los amigos que hice en Linares; en especial a Gisela y Jaime, y a mis compañeros de Maestría, Pamela, Hernaldo, Carla e Indira, por hacerme más agradable la estancia, y quienes también ya forman parte de mi familia.

Muchas gracias a todos, por siempre escucharme y ser como son; los aprecio mucho.

INDICE
Contenido Página

RESUMEN.....	V1
ABSTRACT.....	V1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Taxonomía.....	2
2.2 Biología de <i>Mycosphaerella dearnessii</i>.....	3
2.3 Importancia de la enfermedad.....	5
2.4 Control de la enfermedad.....	6
2.5 Detección e identificación del patógeno.....	7
2.6 Medios de dispersión.....	8
3. OBJETIVOS.....	9
4. HIPÓTESIS.....	9
5. JUSTIFICACIÓN.....	9
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
6.1 Descripción de los sitios de muestreo.....	10
6.2 Descripción de las muestras.....	14
6.3 Sitios de muestreo.....	14
6.4 Aislamiento.....	16
6.5 Identificación.....	16
6.6 Pruebas estadísticas.....	19
7. RESULTADOS.....	20
8. DISCUSIONES.....	30
9. CONCLUSIONES.....	33
10. LITERATURA CITADA.....	35

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Posición geográfica de los sitios de muestreo.....	15
Tabla 2. Número de aislamientos obtenidos de <i>L. acicola</i> en los diferentes hospederos y localidades.....	20
Tabla 3. Confirmación molecular por PCR.....	21
Tabla 4. Análisis de Varianza para la longitud y grosor de espora.....	21
Tabla 5. Subgrupos homogéneos del procedimiento Anova para longitud.....	22
Tabla 6. Subgrupos homogéneos del procedimiento Anova para grosor.....	23
Tabla 7. Rangos de septos, color y ornamentación.....	23
Tabla 8. Prueba Kruskal Wallis.....	24
Figura 1. Dendrográma de longitud y grosor según la altura.....	25
Figura 2. Dendrográma de septos, color y ornamentación.....	26
Figura 3. Dendrográma de longitud y grosor septos, color y ornamentación.....	27
Figura 4. Relación del grosor de espora y el gradiente altitudinal.....	28
Figura 5. Relación de la longitud de espora y el gradiente altitudinal.....	29

RESUMEN

Este estudio se realizó para caracterizar morfológicamente y genéticamente al hongo *Lecanosticta acicola* anamorfo de *Mycosphaerella dearnessii* en un gradiente altitudinal en Nuevo León, México, así también para diferenciarlo de *Lecanosticta gloeospora* y *Lecanosticta longispora*, dos especies del mismo género también presentes en Nuevo León. Para ello se realizaron muestreos en los municipios de Galeana, Iturbide, Monterrey y Cadereyta los cuales presentan diferentes altitudes. Las especies de pino que se estudiaron fueron *Pinus cembroides*, *P. ponderosa* var. *stormiae*, *P. gregii*, *P. culminicola* var. *culminicola*, *P. strobiformis*, *P. hartwegii*, *P. pseudostrobus*, *P. halepensis* y *P. eldarica*. Los resultados obtenidos se analizaron con pruebas estadísticas utilizando pruebas Cluster Analysis, ANOVA y pruebas Discriminante realizadas con el programa SPSS. Se realizaron pruebas moleculares (PCR) para identificar al patógeno de interés. Se encontraron diferencias significativas en la morfología del grosor y longitud de esporas de *L. acicola* según el gradiente altitudinal.

ABSTRACT.

A research study was performed to characterize morphologically and genetically the *Mycosphaerella dearnessii*, along the latitudinal gradient (*Monterrey, NL, Mexico*). This fungus is the causal agent of the brown spot needle blight of pines in Nuevo Leon, Mexico. The same study was used to compare *M. dearnessii* with *Lecanosticta gloeospora* and *L. longispora*, which are also present in Nuevo Leon. Samples of this fungus were taken in the municipalities of Galeana, Iturbide, Monterrey and Cadereyta which are located at different altitudes over the sea level. The pine species that were studied were *P. cembroides*, *P. ponderosa* var. *stormiae*, *P. gregii*, *P. culminicola* var. *culminicola*, *P. strobiformis*, *P. hartwegii*, *P. pseudostrobus*, *P. halepensis*, and *P. eldarica*. Results were analyzed using SPSS. Tests were conducted molecular (PCR) to identify the pathogen. Significant differences were found in the morphology of thickness and length of spores of *L. acicola* according to the altitudinal gradient.

INTRODUCCIÓN

El género *Lecanosticta* es importante desde el punto de vista de la patología forestal, *Lecanosticta acicola* (Thum.) H. Sydow, es anamorfo de *Mycosphaerella dearnessii* (M.E. Barr), agente causal de una enfermedad ampliamente distribuida por el mundo en diversas especies de pino (Gibson, 1978). Además, es una de las enfermedades más importantes que afecta al follaje y los pinos de Norteamérica (Gibson, 1978). Esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en América Central, América del Norte, Asia, Sur de África y en Europa (EPPO 2005). En Nuevo León, México hay 11 especies de pinos y varias categorías infraespecíficas, entre ellas *Pinus culminicola* var. *culminicola* (Andresen & Beaman), en la que se describió una nueva especie de *Lecanosticta*.

La forma característica de la enfermedad empieza en las hojas rodeadas por márgenes amarillos la cual empieza con manchas cloróticas que posteriormente cambian a color café, las hojas enfermas comienzan a morir desde el ápice hacia la base. Las manchas amarillas visibles están presentes en el área entre los tejidos muertos y los tejidos verdes. En hojas muertas, el hongo se desarrolla formando acérvulos de color verde oliváceo (EPPO 2005).

A pesar de que se han hecho investigaciones sobre los hongos desde los inicios de la colonia en el siglo XVI en México el conocimiento es todavía muy incipiente, debido a la gran diversidad micológica que presenta el país. Dado que se han realizado muy pocos trabajos sobre hongos asociados con estas especies de pinos, el presente proyecto pretende contribuir al conocimiento de los problemas fitopatológicos de este género de árboles de importante uso forestal en Nuevo León, México y el mundo.

ANTECEDENTES

Se estima que en el mundo existen aproximadamente 1.5 millones de hongos, de los cuales se conoce sólo el 4.6% (Hawksworth 1991; Hawksworth, 2001). Específicamente, en México se consideran 200,000 especies, de las cuales sólo se conoce el 3.5% (Guzmán, 1998), aunque es difícil determinar un número preciso. Por lo anterior es de gran importancia realizar estudios sobre biodiversidad en este grupo.

Las funciones ecológicas de los hongos en los ecosistemas son variadas: actúan como descomponedores de materia orgánica contribuyendo a la formación de suelo; forman asociaciones simbióticas con las plantas, produciendo líquenes y micorrizas; pueden ser parásitos tanto de plantas como de animales; algunas especies son comestibles y además muchas especies tienen relevancia en las evaluaciones sobre los cambios atmosféricos en relación con la contaminación (Christensen, 1989). Las interacciones que ocurren entre plantas, animales y microorganismos son dinámicas y sustancialmente influenciadas por los procesos del ecosistema (Copely, 2000).

La utilidad de los hongos en la vida cotidiana del hombre es un área de la ciencia que está en desarrollo, la producción de enzimas, antibióticos, agentes antitumorales, hormonas, proteínas, ácidos orgánicos, son algunos ejemplos de la utilidad de los hongos. (Cooke, 1977; Wainwright, 1992).

Taxonomía

Reino: Fungi

División/*Phylum*: Ascomycota

Orden: Dothideales Lindau

Familia: Mycosphaerellaceae Lindau

Género: *Lecanosticta* Syd

Especie: *Lecanosticta acicola* (Thum.)

Reino: Fungi

Phyllum: Deuteromycota

Clase: Coelomycetes

Orden: Melanconiales

Familia: Melancolinaceae

Género: *Mycosphaerella dearnessii* Barr. (Ascomycota, Dothidiomycetes, Mycosphaerellaceae) Fase sexual.

Biología de *Mycosphaerella dearnessii*

El centro de origen de *Mycosphaerella dearnessii* parece ser América Central, donde tiene un amplio rango de hospederos y se presenta en una amplia variedad de hábitats, incluyendo costas, valles secos y los bosques de gran altitud (Evans 1984). Cada cambio de hábitat parece implicar una variación significativa en la morfología de hongos, sobre todo en la pigmentación conidial, ornamentación y tamaño, pero no se sabe si estas formas no son más que morfotipos o ecotipos que implican formas genéticamente adaptadas (Evans 1984).

M. dearnessii causa una enfermedad en las agujas de muchas especies del género *Pinus*. Ha sido conocido en el sur de Estados Unidos desde el siglo XVIII (Hedgecock 1929), donde es particularmente dañina para *P. palustris*(Mill.) Gard. Dict., conocido como pino de hoja larga. Desde entonces, el hongo se ha extendido hacia el norte y el oeste de los Estados a medio y centro-norte-Estados Unidos (Phelps, *et al.* 1978), Manitoba y Nueva York (Patton, 1997).

El hongo produce tanto conidios como ascosporas, las cuales pueden causar la infección. Los conidios son liberados en una masa pegajosa en condiciones favorables y se dispersan por el salpicado de la lluvia. Las ascosporas son liberadas en seco y puede ser dispersado por largas distancias por el viento (Patton y Spear, 1978). En climas cálidos y húmedos, como el sur de Estados Unidos, los dos tipos de esporas se producen. En climas más fríos, sólo se producen conidios. Las esporas germinan y penetran a través de los estomas (Patton y Spear, 1978). La exposición de las plántulas a

alta humedad, antes y después de la inoculación se acorta el período de incubación y aumenta en gran medida el grado de infección. La infección se produce en un amplio intervalo de temperaturas, pero la infección máxima se produce en virtud de un régimen de unos 30°C en el día y 21°C en la noche (Kais, 1975).

En el norte de E.U.A. la precipitación y la temperatura son los factores críticos para la dispersión de las esporas y la infección, que se producen de junio a septiembre (Skilling y Nicholls, 1974). Las esporas son liberadas sólo durante el tiempo lluvioso y nunca a temperaturas bajas (cerca de 2°C); el periodo de infección mayor es de finales de junio a principios de julio.

La humedad en la superficie de la aguja es necesaria para la germinación de esporas; se producen conidios y la penetración se realiza a través de los estomas. El período de incubación es variable dependiendo del tipo de huésped y edad: de 1-2 meses en las agujas jóvenes a 4-7 meses de edad follaje. A finales de agosto los acérvulos se empiezan a desarrollarse y madurar, aunque los conidios son liberados en septiembre, la infección está restringida, probablemente debido a la resistencia aguja. El ciclo de la enfermedad renueva el verano siguiente, cuando los cuerpos fructíferos de hibernación liberan los conidios debido a la temperatura y aumento de las precipitaciones. Sin embargo, en los climas más cálidos, menos estacionales, como en América Central, los conidios permanecen en la aguja durante muchos meses y es significativo que los conidios en áreas de tierras bajas tropicales son mucho más robustos (grande, de paredes gruesas, fuertemente pigmentada y ornamentada) que aquellos que se encuentran en localidades de alta montaña, como bosques de niebla (Evans, 1984). No está claro si esta variación está determinada genéticamente o ambientalmente. Los acérvulos se desarrollan y maduran en las nuevas agujas por lo que constituyen una fuente importante de supervivencia inter-estacional.

El hongo se limita a las agujas y las esporas que produce *L. acicola* dan lugar a una infección en éstas, principalmente en la primavera, aunque también en toda la temporada cuando las condiciones de humedad son propicias (Yang *et al.* 2002). Las infecciones dan lugar a manchas de color amarillo y marrón, y el crecimiento de hongos finalmente mata a la mayoría de los tejidos de la aguja. Dos toxinas producidas por el hongo se cree que están implicados en la patogénesis (Yang *et al.* 2002). Las agujas que se infectan en el otoño tienden a morir en la primavera y se echan a mediados de

verano. Las infecciones graves provocan la caída de la agujas lo que resulta en finas copas de los árboles y un crecimiento reducido (Patton, 1997). Los aislados de la zona norte y sur de los Estados Unidos aparentemente son fisiológicamente diferentes, pero hay poca diferencia entre los aislados del sur de Estados Unidos y China (Patton, 1997). No hay informes, sin embargo, que indiquen la ocurrencia de cepas de que difieran en virulencia. Pero sí hay grandes diferencias en la susceptibilidad inter e intraespecífica a la enfermedad entre los *Pinus* spp. (Phelps *et al* 1978).

Los conidios del hongo son subhialinos a verde oliva y de pared gruesa oscura. Tienen uno a cinco septos, un ápice redondeado y base truncada, y en su forma se extiende de fusiforme a cilíndrico y a recto a curvado. Su tamaño varía de 3-5× 21-44 µm, la superficie conidial va de verrugosa a espinosas.

Las colonias en medio del agar del extracto de malta del 3% (MEA) presentan un color verde oliváceo a grisáceo hasta casi negras, de forma compacta y que producen un mucilago donde están contenidos los conidios. El estado teleomórfico de este hongo corresponde a *Mycosphaerella dearnessii* el cual no se ha observado en cultivo.

Importancia de la enfermedad

M. dearnessii es causante de una enfermedad en el follaje, sobre todo de *P. palustris* en el sudeste de Estados Unidos, causando severos problemas de crecimiento para las plantas y los árboles jóvenes (Gibson, 1979). *Mycosphaerella dearnessii* y *Mycosphaerella pini* (E. Rostrup) son el principal factor limitante para el establecimiento de esta especie en toda su área de distribución natural. Skilling y Nicholls (1974) informan que se propaga y aumenta el daño a las plantaciones de árboles de navidad *Pinus. sylvestris* (L.) en el norte de Estados Unidos. (Wisconsin, Minnesota), por lo que los árboles afectados son invendibles. Dado que el valor de mercado de este cultivo en 1974 fue puesto en 70 millones de dólares, las pérdidas económicas pueden ser considerables.

La mancha marrón reduce el crecimiento anual total de pinos del sur por más de 16 millones de pies cúbicos (0.453 millones de metros cúbicos) de madera (Phelps *et al.*, 1978).

En Centroamérica, el patógeno es endémico y omnipresente en los bosques de pinos nativos *P. caribaea* Morelet, *P. oocarpa* Schiede ex Schltdl., *P. maximinoi* H.E. Moore, *P. patula* Schltdl. & Cham, desde el nivel del mar hasta el bosque nublado (2000 msnm), pero nunca se asocia con un deterioro grave en las agujas de los pinos (Evans, 1984). Gibson (1979), en la evidencia de su difusión y distribución en los E.U.A., considera a *M. dearnessii* ser altamente adaptable a nuevos huéspedes y por lo tanto una amenaza importante fuera de Norteamérica. Esto fue corroborado por el hallazgo de *P. radiata* severamente dañado en el altiplano de Colombia (Gibson, 1980).

El impacto que la enfermedad produce no solo es económico, la defoliación en el medio forestal no es significativa, excepto en el caso de los pinos de hoja larga, donde una severa defoliación de los árboles jóvenes puede afectar a la regeneración natural de esta especie. El daño subletal podría ser un factor importante en el decaimiento de los árboles forestales. Una de las consecuencias ambientales asociadas podría ser el aumento del uso de pesticidas para controlar la enfermedad (Phelps *et al.*, 1978).

Control de la enfermedad

El control es posible por la quema controlada de destruir el material infectado en el suelo. Se han recomendado las aplicaciones de fungicidas clorotalonil y de la mezcla de Bordeaux a viveros y plantaciones jóvenes, de manera crítica cuando las agujas de reciente aparición son la mitad de su longitud total (Skilling y Nicholls, 1974). Cuando los niveles de inóculo son altos, una segunda pulverización de 3-4 semanas más tarde se aconseja y cuatro a siete tratamientos durante un período de 6 meses durante el apogeo de la temporada de crecimiento en los Estados Unidos de América (Mayo a Octubre) es necesario para el control a corto plazo en los viveros (Kais, 1975). Un buen control también se ha observado con benomilo y maneb; Kais *et al.* (1986) usaron un tratamiento de 5% de raíz de benomil antes de la siembra.

En las plantaciones de árboles de Navidad múltiples aplicaciones de fungicidas pueden limitar la infección. La especie *Pinus sylvestris* de aguja larga (colinas de Austria, Alemania) son más resistentes que las de aguja (Patton, 1997). Los fungicidas también pueden ser utilizados en plantas de hoja larga alrededor de la casa, en

plantaciones de paisaje, y en pequeños campos y otros lugares donde la quema es indeseable o imposible (Phelps *et al.*, 1978).

En las plantaciones jóvenes y rodales naturales de pino de hoja larga, la quema controlada mata el hongo sin dañar a la planta. Una quema controlada destruirá las agujas infectadas y elimina la fuente de inóculo durante varios años. El tiempo de las quemas prescritas es muy importante debe ser sólo cuando la enfermedad de la mancha marrón se ha desarrollado hasta un grado perjudicial. Cuando la mayoría de las plántulas tienen un tercio de su follaje muerto a finales de noviembre o diciembre, una quema prescrita en enero del año siguiente o febrero es aconsejable. El fuego es poco costoso y eficaz, por lo que es ampliamente utilizado en todo el cinturón de pino de hoja larga (Phelps *et al.*, 1978).

Un número de técnicas de cultivo se han desarrollado para ayudar a reducir la incidencia de mancha marrón en las plantaciones de pinos de aguja larga y el método de cortas de regeneración también proporciona protección contra la enfermedad (Phelps *et al.*, 1978).

Detección e identificación del patógeno

Las lesiones en la aguja son comúnmente de color amarillo a marrón claro con un borde oscuro, en forma circular o rectangular. Ocasionalmente, la lesión es más de una cinta de color amarillo-resina, y con una pequeña mancha marrón en un lado. (Patton, 1997). Finalmente, la mayoría de los tejidos de la aguja muere y deja caer la aguja. Los árboles muestran la aguja dorada y coronas de adelgazamiento. Los árboles que han sufrido repetidos ataques pueden presentar sólo las agujas del año en curso. Los conidios son exudados en una masa pegajosa de estromas negro que aparece en las agujas en unas semanas después de las lesiones (Patton, 1997).

Los conidios del anamorfo (*Lecanosticta acicola*) se forman en acérvulos dentro de estromas negro en las agujas. Los conidios son cilíndricos, curvados, de color verde oliva a marrón, y tienen uno a cuatro septos. Las ascas se forman en pseudotecios. Las ascosporas son hialinas, oblongas a cuneadas, desigual bicelular (Patton, 1997).

Medios de dispersión

Los conidios de *M. dearnessii* se extienden por distancias cortas por las salpicaduras de agua. Las ascosporas se pueden propagar por el viento a largas distancias. El hongo también puede ser transportado largas distancias por el movimiento de los registros con agujas infectadas alojadas en grietas de la corteza, un montón de semillas que contienen pequeños fragmentos de agujas infectadas y plantas de vivero infectadas por el hongo.

Evans (1984) estudió este género en pino de América Central e incluyó algunos pinos de México. El mismo autor describió una nueva especie de *Lecanosticta*, (*Lecanosticta gloeospora* H.C. Evans en *Pinus pseudostrobus* Lindl. en el estado de Nuevo León.

Los anamorfos proporcionan mejores caracteres para separar y distinguir las especies. Los acérvulos entre *Lecanosticta* y *Dothistroma* varían de forma según el clima y el hospedero de forma entre acérvulos. Lo más significativo y contundente para distinguir *M. dearnessii* de *M. pini* es la naturaleza de la espora pared del conidio.

En los conidios de *M. dearnessii* (*Lecanosticta*) hay gránulos de melanina integrados en su pared exterior. Bajo el microscopio, las esporas son pigmentas, de pared gruesa con una superficie verrugosa. Lo mejor vista se obtiene usando óptica de contraste de interferencia diferencial a una magnificación más $\times 400$.

Por el contrario, los conidios de *M. pini* (*Dothistroma*) son hialinas, de pared delgada y lisa. Sin embargo, los conidios de *M. dearnessii* no difieren claramente en tamaño de las de los *M. pini*. Los hongos también se pueden distinguir por sus características en cultivo. El MEA, colonias de *M. pini* son de crecimiento lento, café-negro, y pueden producir una baba blancuzca conidial. (EPPO 2005). En el caso de *Lecanosticta* también es de crecimiento lento, de color verde oliva a verde negro de apariencia espesa. *M. dearnessii* en los mismos medios de cultivo crece significativamente más grande y de color verde-negro colonias con un limo de conidios de color verde oliva. *M. gibsonii* (H. Evans) es la de más rápido crecimiento de estas especies y colonias de micelio de color gris en formas de lana (EPPO 2005).

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la variación morfológica del hongo *L. acicola* en las diferentes especies de Pinos a lo largo de un gradiente altitudinal.

OBJETIVOS PARTICULARES

Realizar mediante pruebas moleculares un diagnóstico confirmatorio del hongo *L. acicola* en ocho especies de *Pinus* en cuatro municipios del estado de Nuevo León.

Analizar el grado de incidencia de *L. acicola* con relación a las ocho especies de *Pinus* y la elevación en cuatro municipios de Nuevo León

HIPÓTESIS

Existen diferencias morfológicas de *L. acicola* según el gradiente altitudinal y las especies de pino que parasita en cuatro municipios de Nuevo León.

JUSTIFICACIÓN

El género *Lecanosticta* es un hongo de importancia desde el punto de vista de patología forestal, dado que *Lecanosticta acicola*, anamórfo de *Mycosphaerella dearnessii* Barr, ocasiona un tizón foliar severo en varias especies de pinos a nivel mundial. Además, es un hongo ampliamente distribuido en el estado de Nuevo León que afecta a varias especies de coníferas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron ocho salidas al campo donde se recolectaron 49 muestras para su posterior aislamiento del hongo *Lecanosticta acicola* en ocho especies de pinos. El trabajo de campo se realizó en los meses de marzo a noviembre del 2010 y se realizaron colectas en los municipios de Iturbide, Galeana, Monterrey y Cadereyta, Nuevo León, México. (Imagen 1)

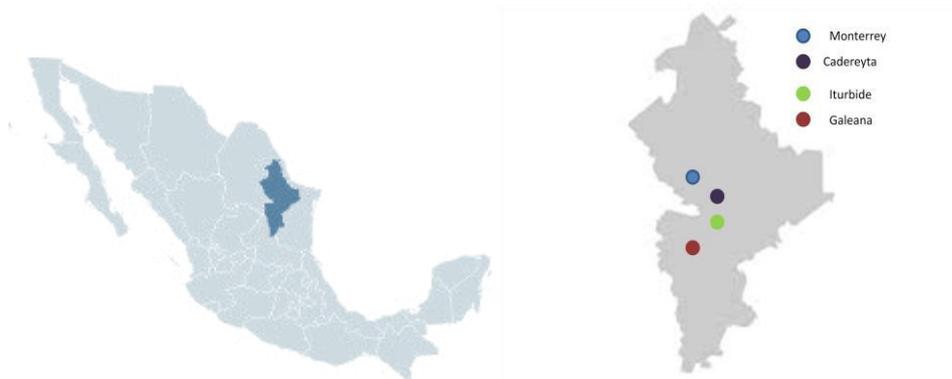


Imagen 1. Localización del área de muestreo en el estado de Nuevo León.

A) Descripción de los sitios de muestreo:

Iturbide

a) Clima.

El clima de la región de acuerdo a la clasificación de Köppen (1931) y con la modificación de García en 1964 es Bs1'' (x') (e), seco con lluvias en verano. La precipitación media anual es de 620 mm. y se presenta bimodalmente durante el verano (Návar *et al.*, 1994). Las dos temporadas de mayor precipitación ocurren en junio y septiembre. La evapotranspiración potencial anual de la región es de 795 mm (Návar *et al.*, 1994).

La temperatura media anual es de 18° C, aunque durante el periodo más cálido (junio-agosto) la temperatura máxima mensual puede alcanzar los 35° C. el periodo más frío, con temperaturas mínimas mensuales de hasta -10° C se presenta en los meses de diciembre y enero.

b) Vegetación

El área de estudio presenta un bosque natural de pino - encino. Synnott y Marroquín (1987) reportan 11 especies de encinos mencionando además, que en algunos suelos profundos se encuentran poblaciones de pino (*Pinus pseudostrabus*). Las pendientes con exposición sur tienen un microclima más cálido y presentan una vegetación de arbustos donde generalmente predomina la familia Leguminosae, además se encuentran algunas especies de agaves como lechuguilla y maguey (Wouter y Gommert, 1986).

Galeana

a) Clima

Para el Cerro del Potosí, con base en datos extrapolados a partir de las estaciones de 18 de Marzo (2020 m.s.n.m) y ejido El Potosí (1890 m.s.n.) ubicadas en el declive oriental y occidental de la sierra, respectivamente, se calcularon las temperaturas medias para la zona, aplicando los valores de gradientes térmicos calculados por Muller (1939) para diferentes niveles altitudinales y exposiciones de la Sierra Madre Oriental. El clima de la zona es de tipo E(T)H(e), frío y extremo de acuerdo a la clasificación de Koppen, modificada por García. Muller (1937) con base en sus observaciones de la vegetación, caracterizó al clima de la parte alta como frío semiárido, mencionando que aunque la precipitación es tan alta como en las zonas adyacentes, la humedad es poco efectiva debido a la alta evaporación.

b) Vegetación

La vegetación por debajo de los 3500 m.s.n.m. se encuentra en grave estado de deterioro debido a incendios y la tala desmesurada, excepto en cañadas y sitios escarpados. A menos de 1700 m.s.n.m., en los alrededores del cerro El Potosí, se presentan matorrales xerófilos y bosque abierto de *Pinus ponderosa* var. *stormia*) y/o *P. cembroides* Zucc). En términos generales se presentan comunidades más altas y densas en el flanco oriental y norte del cerro El Potosí, debido a la influencia de los vientos alisios. Las principales comunidades vegetales del declive oriental son: matorral de *Berberis trifoliata* Hartw ex Lindl., *Juniperus erythrocarpa* Cory, *Condalia* sp. Cav y *Rhus trilobata* Nutt. , entre los 2000 y 2070 m de altitud. De los 2070 a los 2180

m.s.n.m. predomina un bosque abierto de *Pinus ponderosa* var. *stormia* y *P. cembroides*, que es substituido por bosques de *Quercus* hasta los 2300 m.s.n.m.; de los 2300 a los 2600 m.s.n.m. prevalecen matorrales secundarios de *Quercus-Cercocarpus* con individuos aislados de *Pseudotsuga*. *Pinus hartwegii* Lindl. predomina entre los 2850 y 2930 m. De los 2930 a los 3000 m ocurre un matorral denso de *Quercus greggii* con individuos de *P. hartwegii* y *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco. Más arriba predomina *P. hartwegii*, que es substituido por cañadas de *Abies vejarii* Martínez hasta los 3470 m. El bosque de *P. hartwegii* alcanza la cima del cerro por el lado norte, pero en el declive oriental es substituido a partir de los 3450 m. por matorral de *Pinus culminicola* (García y González, 1991).

Monterrey

a) Clima

Según la clasificación climática de Köppen, modificada por García (1964), el clima de Monterrey es semiárido cálido. La precipitación media anual es de alrededor de 600 mm repartida principalmente en los meses de verano, siendo septiembre el mes más lluvioso del año. La temperatura media es de 23 °C. Hay un importante contraste entre las estaciones: en verano los días son calurosos con noches templadas (34/22 °C), en invierno las tardes son agradables y las noches son frías (21/ 9 °C). Durante la estación invernal, la temperatura presenta cambios pronunciados debido a la latitud, que hace que las masas de aire frío no se mantengan estables; esto hace que las temperaturas máximas aumenten de alrededor de 7 °C a más de 30 °C en cuestión de días (García, 1964).

b) Vegetación

En Monterrey existen los bosques de pino. La distribución de estos bosques puede ocurrir en lugares templados y húmedos, con el factor térmico decreciente a medida que se asciende en altitud; se ubica a partir de 900 y 1,000 msnm. Se trata de una comunidad con árboles hasta 22 m de alto están asociados comúnmente con algunas especies de encinos (*Quercus* spp.) y madroño (*Arbutus xalapensis* Kunth). En las zonas húmedas se puede encontrar Bosque de Pino-Encino (Alanís *et al.* 2011)

Matorral Submontano. Es una formación arbustiva y subarbórea muy rica en formas de vida. El vigor, talla y distribución de las especies dominantes y codominantes dependen de la disponibilidad de agua en el suelo y subsuelo. Las formas biológicas dominantes son arbustos o árboles de 4 a 6 metros de alto, con hojas pequeñas, caducifolias y subespinosas. Se ubican en los taludes inferiores de las montañas de hecho forman un extenso umbral que separa los elementos del matorral desértico de las planicies y los bosques de encino y encino-pino existentes en los taludes superiores de a Sierra Madre Oriental. Aunque tiene variantes morfológicas y ecológicas, en términos generales en este matorral las especies más representativas son barreta *Helietta parvifolia* (A.Gray ex Hemsl.) Benth., anacahuita (*Cordia boissier* A. DC.), frijolillo (*Calia secundiflora* (Ortega) Yakovlev.), falso olivo (*Gochnatia hypoleuca* A.Gray), corvagallina (*Neopringlea integrifolia* S. Watson), hoja dorada (*Decatropis bicolor* Radlk.) , escobilla (*Fraxinus greggii* A.Gray), tenaza (*Havardia pallens* Britton & Rose.), cenizo (*Leucophyllum frutescens* I.M.Johnst.), chaparro prieto (*Acacia rigidula* Benth.), guajillo (*Acacia berlandieri* Benth), huizache (*Acacia farnesiana* Wall.), hierba del potro (*Caesalpinia mexicana* A. Gray), mezquite (*Prosopis glandulosa* Torr), chapote manzano (*Diospyros palmeri* Eastw.) y chapote prieto (*Diospyros texana* Scheele). En algunas áreas con hábitats protegidos con abundante humedad y suelos profundos, podemos encontrar agrupaciones pequeñas de encino molino (*Quercus virginiana* Mill). (Alanís *et al.* 2011)

Cadereyta

a) Clima

Su tipo de clima es seco estepario, con temperatura media anual de 22 °C. En días de verano alcanza los 44 °C y en invierno desciende hasta los -5 °C. Las lluvias son más abundantes principalmente en el sur y sureste, registrándose con mayor sucesión de agosto a enero; por lo general de febrero a mayo son ligeras lloviznas y raras veces aguaceros torrenciales; la precipitación pluvial media anual es de 601 a 800 milímetros. Los vientos que predominan son del este al noreste en marzo y abril, del sur y sureste en julio y agosto y del norte de septiembre a febrero (INAFED,2010)

Vegetación

Cerca de ríos y arroyos se componen por álamo de río (*Platanus rzedowskii* Nixon & J.M.Poole), álamo temblón (*Populus tremuloides* Michx.), sauce (*Salix nigra* Marshall), carrizo (*Arundo donax* L.), culantrillo de pozo (*Adiantum capillus-veneris* L.), lobelia acuática (*Lobelia cardinalis* L.), olmo (*Ulmus crassifolia* Nutt.) y sabino (*Taxodium mucronatum* Ten.), encontrándose abundantes especies herbáceas acuáticas o semiacuáticas, enredaderas y especies epifitas como es el paixtle (*Tillandsia usneoides* L.). La vegetación es algo parecida a la del municipio de Monterrey característica del matorral submontano (Alanís *et al.* 2011).

Estos bosques crecen principalmente en las orillas de los ríos, así como en riberas planas y amplias con drenaje superficial. (Alanís *et al.*, 2011)

Descripción de las muestras.

Se tomaron muestras de hojas de las especies de pinos consideradas y que presentaron los síntomas de la enfermedad del tizón café en las agujas de pinos. La identificación se realizó con base en las características morfológicas de *L. acicola* en las agujas de pino que se manifiesta con la aparición de color amarillo, que más tarde se convierten en marrón en el centro, en contraste con el borde amarillento. Las especies de pino que se consideraron para este proyecto fueron *Pinus cembroides*, *P. ponderosa* var *stormiae* P., *P. gregii*, *P. culminicola* var *culminicola*, *P. strobiformis*, *P. hartwegii*, *P. pseudostrobus*, *P. halepensis* y *P. eldarica*. Estas especies fueron seleccionadas debido a su importancia forestal y ornamental.

Sitios de Muestreo.

Los datos del muestreo se describen en la tabla posterior donde se presentan las coordenadas, altitud y fecha en que fueron tomadas las muestras. El gradiente altitudinal de las localidades donde se recolectaron las muestras fluctuó desde los 343 msnm hasta los 3,720 msnm (Tabla 1).

TABLA 1. Posición geográfica de los sitios de muestro

Coordenadas	Altitud	Fecha
24° 45' 30'' N, 99° 59' 55'' O	1,667 m	03/04/2010
24° 30' 25'' N, 99° 59' 25'' O	2,453 m	03/04/2010
24° 30' 26'' N, 99° 59' 25'' O	2,450 m	03/04/2010
24° 30' 27'' N, 99° 59' 26'' O	2,453 m	03/04/2010
24° 30' 30'' N, 99° 59' 24'' O	2,468 m	03/04/2010
24° 30' 30'' N, 99° 59' 24'' O	2,468	03/04/2010
24° 31' 45'' N, 100° 00' 12'' O	2,334 m	03/04/2010
24° 39' 25'' N, 100° 01' 54'' O	1,911 m	03/04/2010
24° 36' 44'' N, 100° 00' 11'' O	2,097	03/04/2010
24° 53' 18'' N, 100° 11' 13'' O	2,097	17/04/2010
24° 53' 17'' N, 100° 11' 13'' O	2,096 m	17/04/2010
24° 53' 19'' N, 100° 11' 12'' O	2,093 m	17/04/2010
24° 53' 14'' N, 100° 11' 12'' O	2,103 m	17/04/2010
24° 53' 13'' N, 100° 11' 13'' O	2,104 m	17/04/2010
24° 53' 13'' N, 100° 11' 13'' O	2,101 m	17/04/2010
24° 30' 29'' N, 99° 59' 26'' O	2,466 m	17/04/2010
24° 30' 29'' N, 99° 59' 26'' O	2,466 m	17/04/2010
24° 30' 27'' N, 99° 59' 26'' O	2,464 m	17/04/2010
24° 30' 31'' N, 99° 59' 27'' O	2,475 m	17/04/2010
24° 30' 33'' N, 99° 59' 27'' O	2,480 m	17/04/2010
24° 30' 35'' N, 99° 59' 25'' O	2,489 m	17/04/2010
24° 37' 09'' N, 100° 00' 20'' O	2,050 m	17/04/2010
24° 37' 09'' N, 100° 00' 20'' O	2,050 m	17/04/2010
24 42' 27'' N, 99 51' 42'' O	1,634 m	08/05/2010
24 42' 34'' N, 99 51' 42'' O	1,633 m	08/05/2010
24 42' 34'' N, 99 51' 50'' O	1,609 m	08/05/2010
24 42' 30'' N, 99 51' 42'' O	1,628 m	08/05/2010
24 53' 18'' N, 100 13' 35'' O	3,117 m	22/05/2010
24 53' 21'' N, 100 13' 40'' O	3,092 m	22/05/2010
24 53' 19'' N, 100 13' 39'' O	3,100 m	22/05/2010
24 53' 16'' N, 100 13' 32'' O	3,120 m	22/05/2010
24 53' 16'' N, 100 13' 32'' O	3,116 m	22/05/2010
24 53' 15'' N, 100 13' 31'' O	3,120 m	22/05/2010
24 52' 40'' N, 100 13' 08'' O	3,211 m	22/05/2010
24 52' 36'' N, 100 13' 18'' O	3,259 m	22/05/2010
24 52' 45'' N, 100 13' 14'' O	3,255 m	22/05/2010
25 27' 14'' N, 99 59' 48'' O	343 m	03/08/2010
25 27' 16'' N, 99 59' 52'' O	349 m	03/08/2010
25 27' 16'' N, 99 59' 52'' O	349 m	03/08/2010
24 42' 31'' N, 99 51' 47'' O	1,610 m	13/08/2010
24 42' 26'' N, 99 51' 42'' O	1,634m	13/08/2010
24 42' 43'' N, 99 51' 51'' O	1,609 m	13/08/2010
24 53' 17'' N, 100 13' 14'' O	2,994 m	01/09/2010
24 52' 20'' N, 100 13' 56'' O	3,720 m	01/09/2010
24 52' 20'' N, 100 13' 55'' O	3,717 m	01/09/2010
24 52' 22'' N, 100 13' 54'' O	3,710 m	01/09/2010

24 53'19'' N, 100 13'37'' O

3,100 m

01/09/2010

Las acículas sospechosas de estar infectadas por el patógeno de interés para este estudio (*Lecanosticta acicola*) fueron tomadas en campo en las coordenadas mencionadas anteriormente para su posterior transportación al laboratorio para ser examinadas y poder tomar inóculo para realizar los aislamientos que fueron transportados en bolsas de papel, se escogió bolsas de papel porque son ideales para la transportación de este material debido a que no facilitan la humedad. En el laboratorio las muestras se examinaron utilizando un microscopio estereoscópico con aumento de hasta 40x y un microscopio óptico. El hongo causante de la enfermedad fue identificado por medio de caracteres morfológicos y se realizaron aislamientos para los cultivos puros en extracto malta agar.

Aislamiento

Las muestras fueron tomadas de las acículas afectadas con tejido muerto color marrón, manchas, bandas (partes muertas con manchas negras en el estroma). Después se esterilizó la superficie, las agujas se cortaron en segmentos de 4-6 mm. Se tomó inóculo y se colocaron sobre medio de extracto de malta agar en cajas Petri. Después de un período de incubación de 1-5 semanas a temperatura 20°C. Se hicieron las observaciones Se realizaron mediciones cada 24 horas para observar el crecimiento del diámetro de la colonia.

Debido al lento crecimiento en los cultivos de este hongo en particular y la presencia de hongos endófitos en acículas de pino, los aislamientos no siempre tienen éxito. Otros hongos o bacterias presentes en las agujas pueden crecer rápidamente en el medio de cultivo y dificultar la visibilidad o el crecimiento de cualquier colonia posible del patógeno.

Identificación

La confirmación final sólo puede obtenerse a través identificación microscópica de la etapa conidial o bien por medio de pruebas moleculares.

a) Identificación por medio de microscopía

En este trabajo se realizó primero la confirmación o identificación por medio de microscopía cuando los conidios típicos producen una masa viscosa de esporas de color verde oliva principalmente así como también un verde oscuro casi negro en el medio de cultivo después de 5 días en la incubadora.

Los conidios de *Lecanosticta acicola* son subhialinos de un color marrón oliva, espinulosos a verrugosas con viscosas masas de esporas, directamente a fusiforme curva, a cilíndrica, 1-5 septos y de un tamaño de $31 - (64) \times (1) - 3,4 - (6) \mu\text{m}$, con un ápice redondeado y base truncada, las esporas fueron descritas con sus características morfológicas de diagnóstico. La mejor vista se obtiene usando óptica de contraste de interferencia diferencial en una magnificación mayor que $\times 400$. Las descripciones y fotomicrografías se hicieron a partir de preparaciones montadas en agua destilada con ácido láctico siguiendo los procedimientos rutinarios de aislamiento de hongos patógenos (Evans, 1984)

La comparación con especies similares debido a que los síntomas macroscópicos y características morfológicas pueden fácilmente ser confundidos con la enfermedad de la niebla roja en la aguja banda (*Mycosphaerella pini*, Anamorfo: *Dothistroma septospora* Dorogin.), Especialmente al inicio de la enfermedad e incluso después, (Evans, 1984; Pehl y Wulf, 2001). Los teleomorfos de estas especies son muy similares morfológicamente, y pueden ser fácilmente confundidos debido a que casi no se distinguen. Se comparó la morfología de las colectas de *L. acicola* obtenidas en las diferentes especies hospederas. Se comparó con cultivos de *L. gloespora* y *L. longispora* obtenidos en campo y también de cepas depositadas en el cepario del laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias Forestales de la U.A.N.L.

b) Identificación molecular

Para las pruebas moleculares se realizó por medio de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa por sus siglas en inglés "Polymerase Chain Reaction"). Siguiendo las técnicas rutinarias de estudio. Se enviaron muestras a la Universidad de Viena, donde fueron efectuadas las pruebas moleculares.

La identificación por métodos de biología molecular Pehl *et al.* (2004) han utilizado una técnica basada en PCR-RFLP ITS (Reacción en Cadena de Polimerasa

Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción Espaciador Transcrito Interno. Por sus siglas en inglés; “Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism Internal Transcribed Spacer”) para diferenciar *M. pini* de *M. dearnessii* y otros hongos frecuentes en Europa en las agujas de pino. El rDNA (Ácido desoxirribonucleico recombinante) es obtenido a partir de 0.5-1 mg de micelio liofilizado de los hongos cultivados en medios de cultivo líquidos o directamente a partir de 1 ó 2 segmentos de agujas infectadas (longitud de 1-3 mm, 1.5-3 mg) que muestran frutos inmaduros de los organismos en el estroma. Los segmentos de agujas o micelios frescos son homogenizados utilizando un mortero de vidrio micro (25-100 µ L, Roth) y tampón de extracción de la Qiagen DNeasy Plant Kit Mini. El rDNA se aísla utilizando el Qiagen DNeasy Plant Mini Kit siguiendo las instrucciones del fabricante. Debido a la pequeña cantidad de material de prueba, las cantidades enumeradas en el protocolo (Por ejemplo, tampones, RNasa) se reduce a 1/4 de la prescrita. La concentración de ADNr se determina fluorimétricamente utilizando flurescent tinte Hoe 33258 y un Quant Dyna 200 fluorímetro (por ejemplo, Pharmacia).

El programa de PCR consiste en una desnaturalización inicial de 150 s en 94°C, 35 ciclos con desnaturalización a 94 ° C 60 s ° C, 60 s recocido a 55 °C y la extensión 120 s en 72°C, y una última extensión de 5 min a 70 ° C. Después de la finalización de la PCR, muestras alícuotas se separaron por electroforesis utilizando un 2%

La PCR se realizó empleando 50 µ L de volumen de reacción y un termociclador Biometra Tpersonal 48. La mezcla de reacción contiene 3 unidades de Taq polimerasa de ADN (por ejemplo, Stratagene), 5 µL Tampón de reacción 10x (por ejemplo, Stratagene), 0,5 mm MgCl₂, 0,1 mm dNTPs (por ejemplo Boeringer Mannheim), 0,6 µm adelante ITS-4 cebador 5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' y 0,6 µm SU-5 revertir primer 5-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3 'según White *et al.* (1990) y 2 ng de molde de rDNA.

Pruebas Estadísticas

Los resultados se contrastaron con pruebas estadísticas utilizando para ello el programa estadístico SPSS y MVSP, se realizaron pruebas de ANOVA, Kruskal Wallis y Análisis Cluster.

El análisis de la varianza (ANOVA, Analysis of variance, por sus siglas en inglés) es una colección de modelos estadísticos y sus procedimientos asociados, en el cual la varianza está particionada en ciertos componentes debidos a diferentes variables explicativas.

El análisis discriminante es una técnica estadística multivariante cuya finalidad es describir (si existen) las diferencias entre grupos de objetos sobre los que se observan variables (variables discriminantes). Más concretamente, se comparan y describen las medias de las variables clasificadoras a través de los grupos.

En caso de que estas diferencias existan, intentará explicar en qué sentido se dan y proporcionar procedimientos de asignación sistemática de nuevas observaciones con grupo desconocido a uno de los grupos analizados, utilizando para ello sus valores en las variables clasificadoras.

El Análisis Cluster, conocido como Análisis de Conglomerados, es una técnica estadística multivariante que busca agrupar variables tratando de lograr la máxima homogeneidad en cada grupo y la mayor diferencia entre los grupos.

RESULTADOS

La mayoría de las incidencias fueron encontradas en *Pinus cembroides* en el Municipio de Galeana con 17 de las 49 incidencias.. El menor número de incidencia fue para *P. pseudostrobus* y *P. strobiformis* reportándose solamente dos incidencias para cada uno. El número de incidencias encontradas para cada especie se enlistan en la Tabla 2

A pesar de la identificación de *L. acicola* por medio de PCR en las muestras de *P. cembroides*, confirmando así la presencia del patógeno, en lo aislamientos de las muestras de *P. cembroides* no tuvieron crecimiento en los medios de cultivos.

De estas 49 muestras, a 16 de ellas se les realizó estudio para identificación molecular por medio de PCR, confirmando la mayoría de las incidencias por *L. acicola* y los resultados se muestran en la Tabla 3.

En algunos casos no fue posible el aislamiento o el crecimiento del patógeno en los medios de cultivo, posiblemente debido a varios factores, como por ejemplo la competencia de otros microorganismos en el medio de cultivo lo cual limita el crecimiento del hongo. Otro factor determinante es que las colonias de *L. acicola* son de lento crecimiento, en comparación con las bacterias que tienen un crecimiento exponencial, desplazando al patógeno de interés.

TABLA 2. Número de aislamientos obtenidos de *L. acicola* en los diferentes hospederos y localidades

Hospedero	No. de Aislamientos (%)			
	Iturbide	Galeana	Cadereyta	Total
<i>Pinus cembroides</i>		17		17 (34.69)
<i>Pinus arizonica</i>		6		6 (12.24)
<i>Pinus culminicola</i>		6		6 (12.24)
<i>Pinus halepensis</i>	6			6 (12.24)
<i>Pinus eldarica</i>			5	5 (10.20)
<i>Pinus hartwegii</i>		5		5 (10.20)
<i>Pinus pseudostrobus</i>	1	1		2 (04.08)
<i>Pinus strobiformis</i>		2		2 (04.08)

Tabla 3. Confirmación molecular por PCR.

Hospedero	Muestra	Municipio	Altura (m)	Parásito
<i>Pinus cembroides</i>	26	Galeana	2,466	<i>Mycosphaerella pini</i>
<i>P. cembroides</i>	28	Galeana	2,480	<i>Mycosphaerella pini</i>
<i>P. cembroides</i>	25	Galeana	2,466	<i>Mycosphaerella dearnessii</i>
<i>P. cembroides</i>	25-2	Galeana	2,466	<i>Mycosphaerella dearnessii</i>
<i>P. cembroides</i>	25-3	Galeana	2,466	<i>Mycosphaerella dearnessii</i>
<i>P. cembroides</i>	27	Galeana	2,464	<i>Mycosphaerella dearnessii</i>
<i>P. arizonica</i>	21	Galeana	2,097	<i>Mycosphaerella dearnessii</i>
<i>P. arizonica</i>	24	Galeana	2,101	<i>Mycosphaerella dearnessii</i>
<i>P. halepensis</i>	32	Iturbide	1,634	<i>Mycosphaerella dearnessii</i>
<i>P. halapensis</i>	34	Iturbide	1,633	<i>Mycosphaerella dearnessii</i>
<i>P. halepensis</i>	34-1	Iturbide	1,609	<i>Mycosphaerella dearnessii</i>
<i>P. halepensis</i>	35	Iturbide	1,628	<i>Mycosphaerella dearnessii</i>
<i>P. halepensis</i>	53	Iturbide	1,600	<i>Mycosphaerella dearnessii</i>
<i>P. halepensis</i>	54	Iturbide	1,600	<i>Mycosphaerella dearnessii</i>
<i>P. pseudostrobus</i>	52	Iturbide	1,630	<i>Lecanosticta gloespora</i>
<i>P. pseudostrobus</i>	55	Iturbide	1,610	<i>Mycosphaerella dearnessii</i>

El análisis estadístico (ANOVA) indica que existe una diferencia significativa según la altitud y la longitud de la espora. Para el grosor se indica que hay una alta diferencia significativa según la altitud. Tabla 4.

Tabla 4. Análisis de Varianza para la longitud y el grosor de espora.

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Medidas cuadráticas	F	Sig.
Longitud	Inter-grupos	388.612	5	77.722	4.191	.002
	Intra-grupos	2114.381	114	18.547		
	Total	2502.992	119			
Grosor	Inter-grupos	171.071	5	34.214	20.629	.000
	Intra-grupos	189.079	114	1.659		
	Total	360.150	119			

La Tabla 5 y 6 muestran las pruebas PostHoc para grupos homogéneos para la longitud y el grosor con las siguientes altitudes 1609 m. (1), 1628 m. (2), 1633 m. (3), 1634 m. (4), 2097 m. (5) y 2101m. (6). En Tabla 5 se analizó la longitud de las esporas y existe una clasificación de los grupo basado en el grado de parecido existente. Así, en el subgrupo 1, están incluidos 4 grupos correspondientes a las altitudes 4, 1, 5 y 6, cuyas

medias no difieren significativamente y en el subgrupo 2 están las alturas 1, 5, 6, 3 y 2 en este grupo no hay diferencia significativa entre las medias, pero a la vez difiere del grupo 1.

En la Tabla 6 se analizó el grosor de las esporas y se puede observar que hay 4 subgrupos que difieren entre sí, el primer subgrupo están las alturas 2, 4 y 1 y se muestra que no hay diferencia significativa entre las medias. Para el subgrupo 2 están las alturas 4, 1 y 3 y para el subgrupo 3 están las alturas 3 y 6 y se muestra que no hay diferencia significativa en el subgrupo 2 y 3 según sus medias. Para el subgrupo 4 están las alturas 5 y 6 y muestran que no existe diferencia significativa entre las medias de esas dos alturas.

Tabla 5. Subgrupos homogéneos del procedimiento Anova para longitud.

Pruebas Post Hoc
Subgrupos homogéneos

Longitud

Tukey HSD^a

Altura	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4	20	19.8450	
1	20	23.6425	23.6425
5	20	23.7650	23.7650
6	20	23.7650	23.7650
3	20		24.1325
2	20		25.8475
Sig.		.053	.588

a. Como tamaño muestral se utiliza la media armónica de los tamaños de cada grupo= 20.000.

Tabla 6. Subgrupos homogéneos del procedimiento Anova para grosor.

Grosor

Tukey HSD^a

Altur a	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
2	20	3.43			
4	20	3.92	3.92		
1	20	4.17	4.17		
3	20		5.02	5.02	
6	20			6.13	6.13
5	20				6.74
Sig.		.467	.082	.082	.662

a. Como tamaño muestral se utiliza la media armónica de los tamaños de cada grupo = 20.000.

Las Tablas 7 y 8 muestran mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis los valores discontinuos que son los septos, el color y la ornamentación.

La Tabla 7 muestra los rangos de los septos, color y ornamentación, se analizaron 120 esporas y se puede apreciar las medias de los rangos para cada altura.

La Tabla 8 muestra los valores de la Chi-cuadrada e indica que no existe una diferencia significativa para los septos, color y ornamentación según el grado de altitud.

Tabla 7. Rangos de septos, color y ornamentación

Prueba Kruskal-Wallis

Rangos

	Altura	N	Medias de Rangos
Septos	1	20	57.00
	2	20	63.13
	3	20	60.00
	4	20	62.75
	5	20	60.00
	6	20	60.13
	Total	120	

Color	1	20	59.00
	2	20	65.00
	3	20	59.00
	4	20	62.00
	5	20	59.00
	6	20	59.00
	Total	120	
Ornamentación	1	20	57.15
	2	20	66.08
	3	20	51.50
	4	20	59.98
	5	20	57.60
	6	20	70.70
	Total	120	

Tabla 8. Prueba de Kruskal Wallis
Prueba estadística Kruskal Wallis

	Septos	Color	Ornamentación
Chi-cuadrada	2.489	7.120	10.135
df	5	5	5
Sig asintót	.778	.212	.071

b. Variable: Altura

La Figura 1 muestra el dendrograma resultante que utiliza una vinculación media entre grupos las variables de la longitud y el grosor de espora según el gradiente altitudinal. El grosor de la espora está altamente relacionado con la altitud y en menor medida la longitud de espora con la altura.

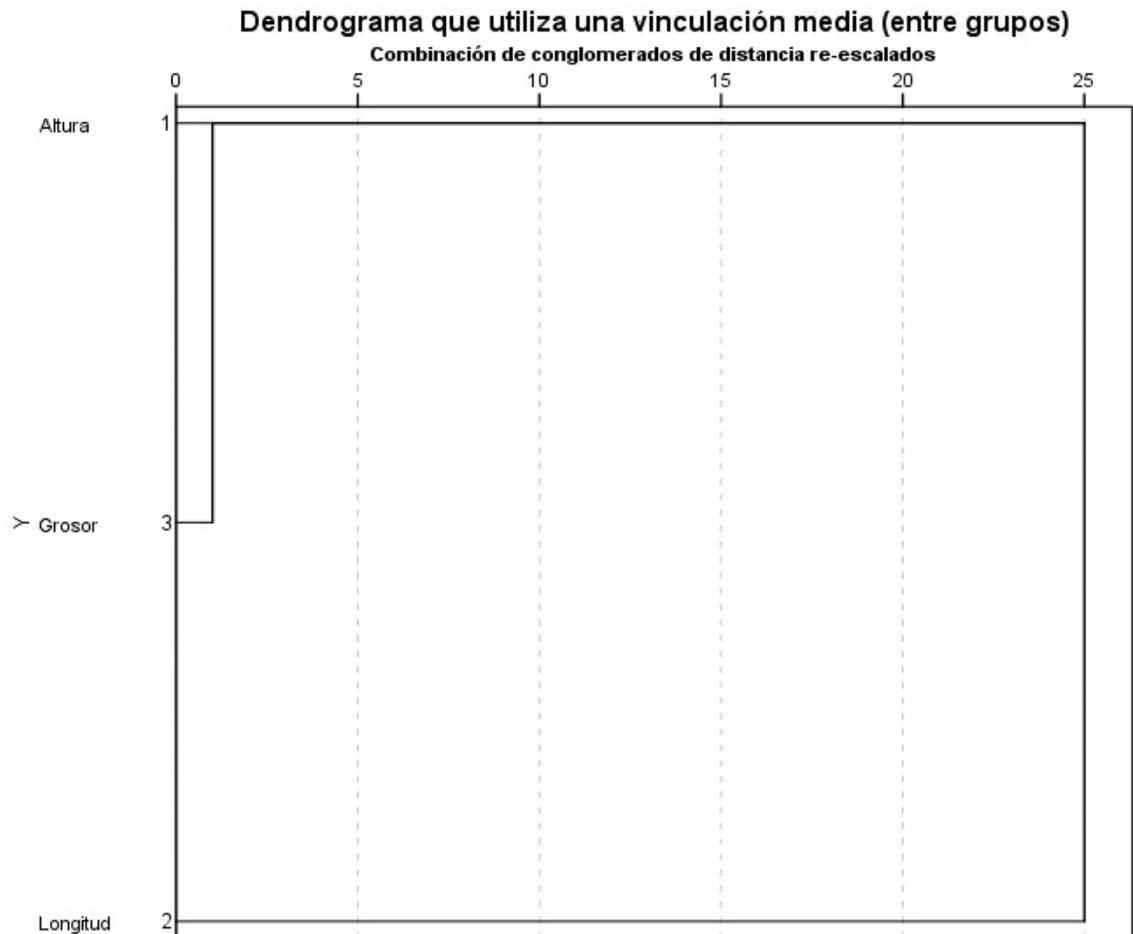


Figura 1. Dendrograma de longitud y grosor según la altura.

En la Figura 2 se observa el dendrograma resultante que utiliza vinculación media entre la ornamentación, septos y color de espora según la altitud. El color y la ornamentación están mayormente relacionados, en cuanto a la característica de los septos es la menos relacionada con los demás grupos.

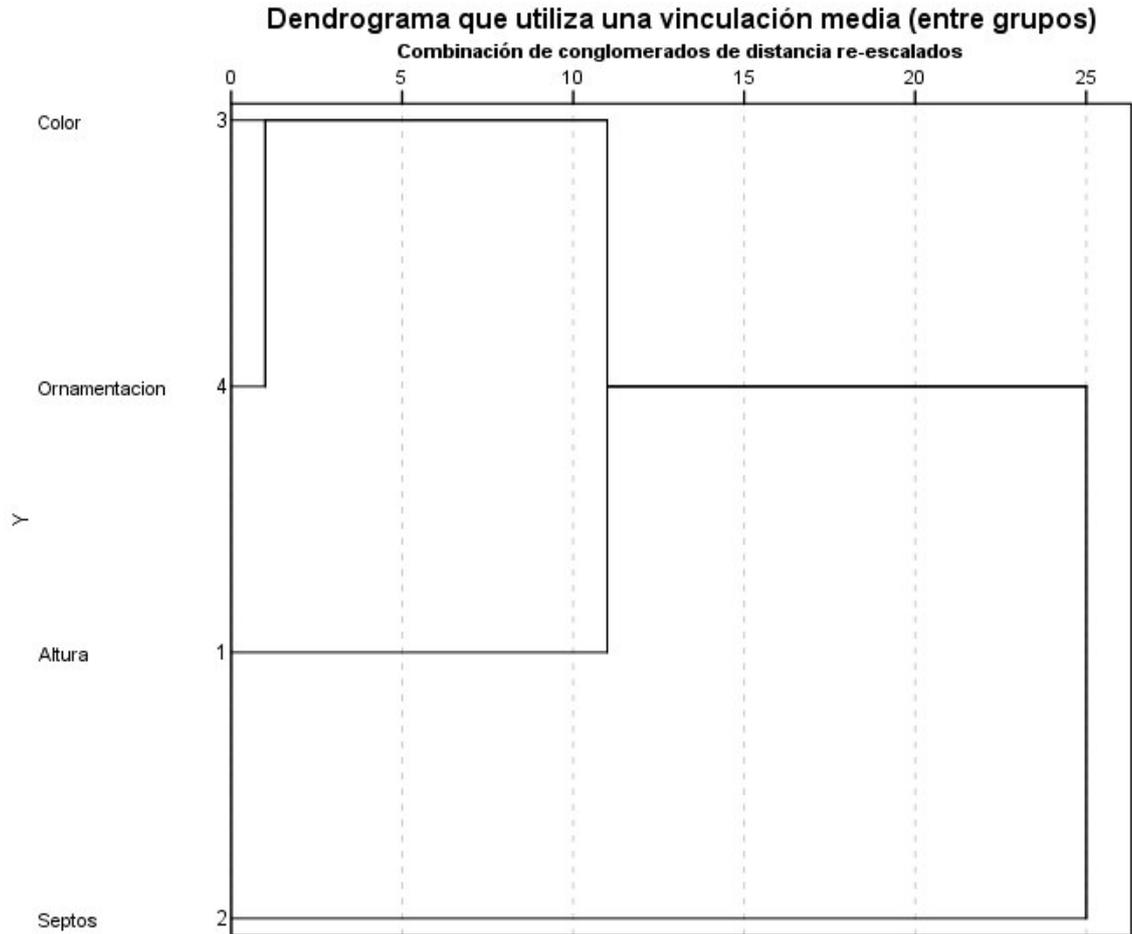


Figura 2. Dendrograma para septos, color y ornamentación.

En la Figura 3 se encuentra el dendrograma que utiliza vinculación media entre los grupos de altura, longitud, grosor, color, ornamentación y septos. La altura y el grosor están altamente relacionados, tienen un mayor grado de similitud como se había mencionado anteriormente en la Figura 1, en menor medida la ornamentación. En otro grupo con menor similitud está la longitud de espora con los septos y la característica con menor grado de similitud entre estos grupos es el color.

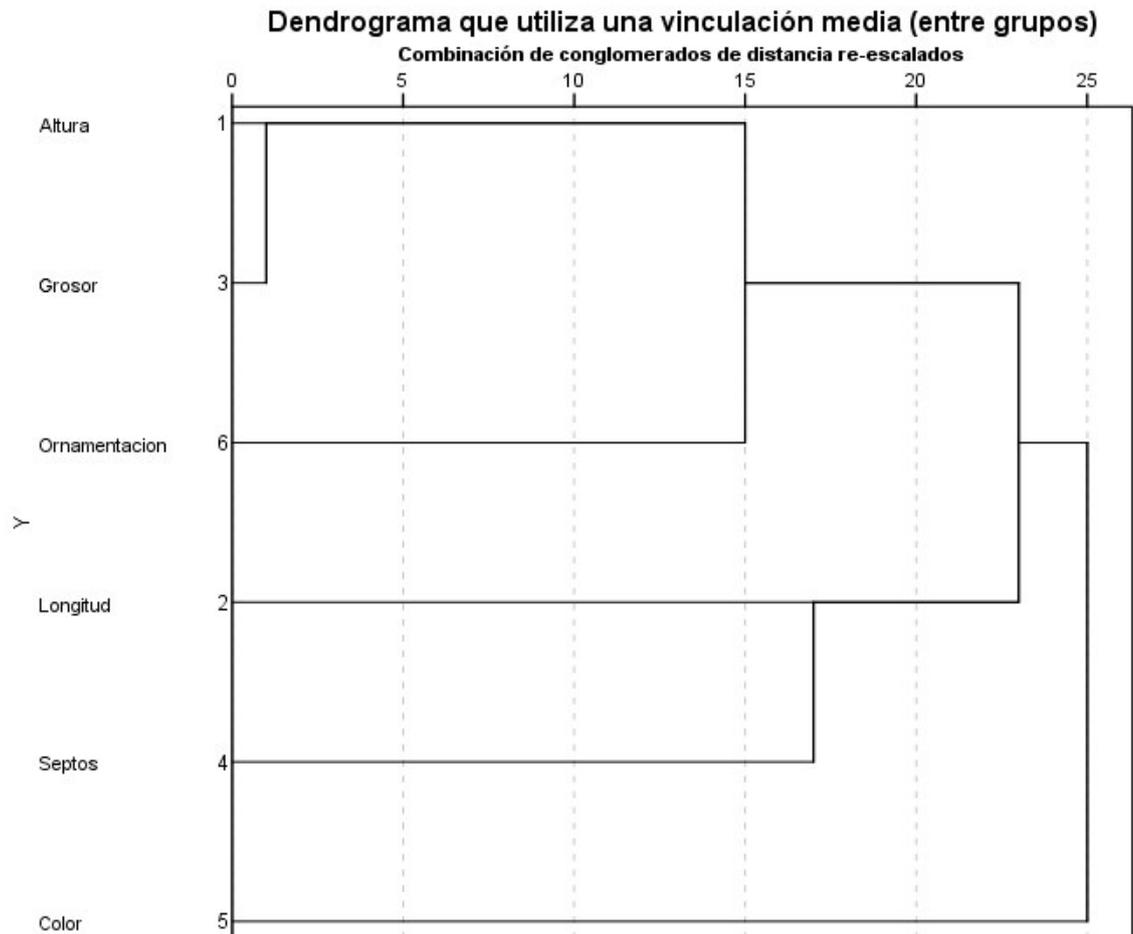


Figura 3. Dendrograma para longitud, grosor, color, ornamentación y septos.

En la Figura 4 podemos observar que existen dos grupos. Las esporas a una altitud de 2097 m. y 2101 m. son el primer grupo con un grado alto de similitud y el segundo grupo está conformado por las esporas de las altitudes de 1628 m. y 1634 m. que son las que cuentan con mayor grado de similitud en cuanto a grosor de la espora y 1633 m. y 1609 m. en el mismo grupo, pero con un grado menor de similitud.

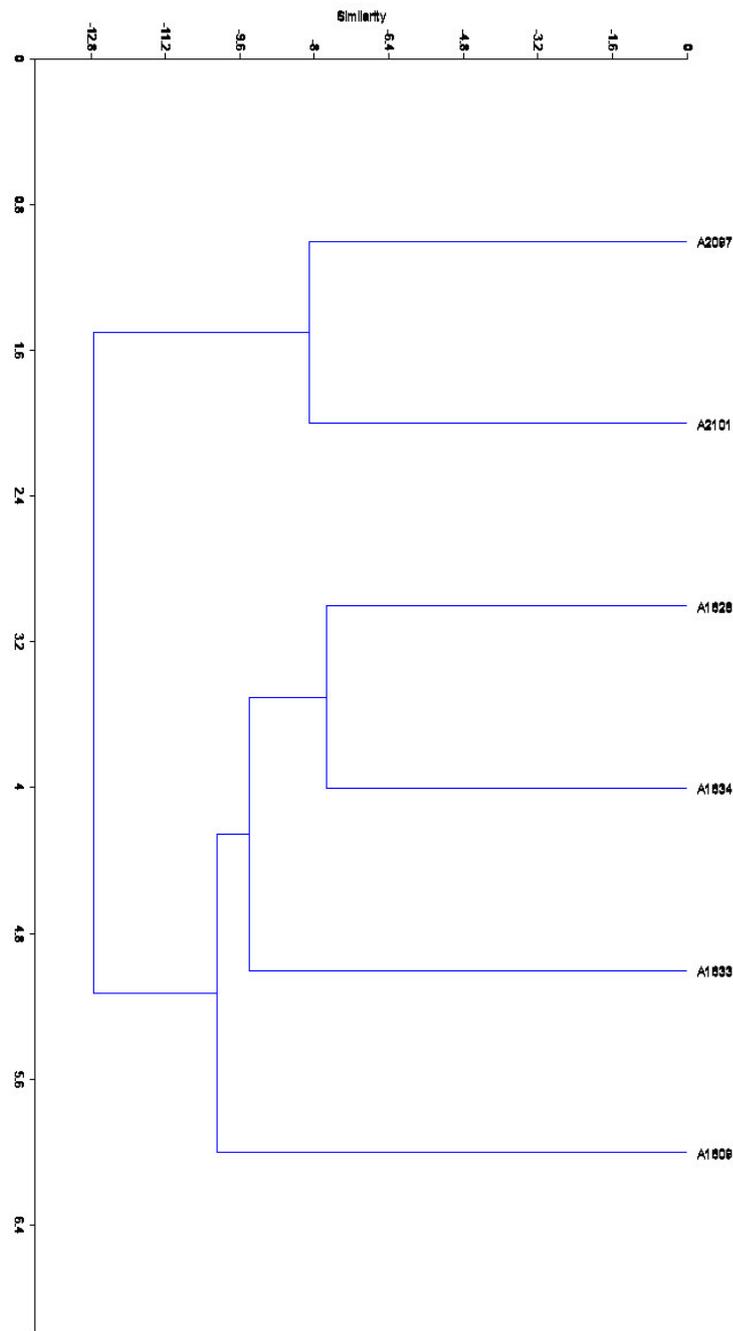


Figura 4. Relación del grosor de espora y el gradiente altitudinal.

En la Figura 5 se puede observar dos grupos. El primer grupo son las esporas de las altitudes 2097 m. y 2101 m. con un alto grado de similitud en la longitud de espora y con menos grado de similitud las esporas de la altitud 1628 m.. El segundo grupo está conformado por las esporas de las altitudes 1633 m. y 1609 m. con un grado mayor de similitud que las esporas con la altitud de 1634 m.

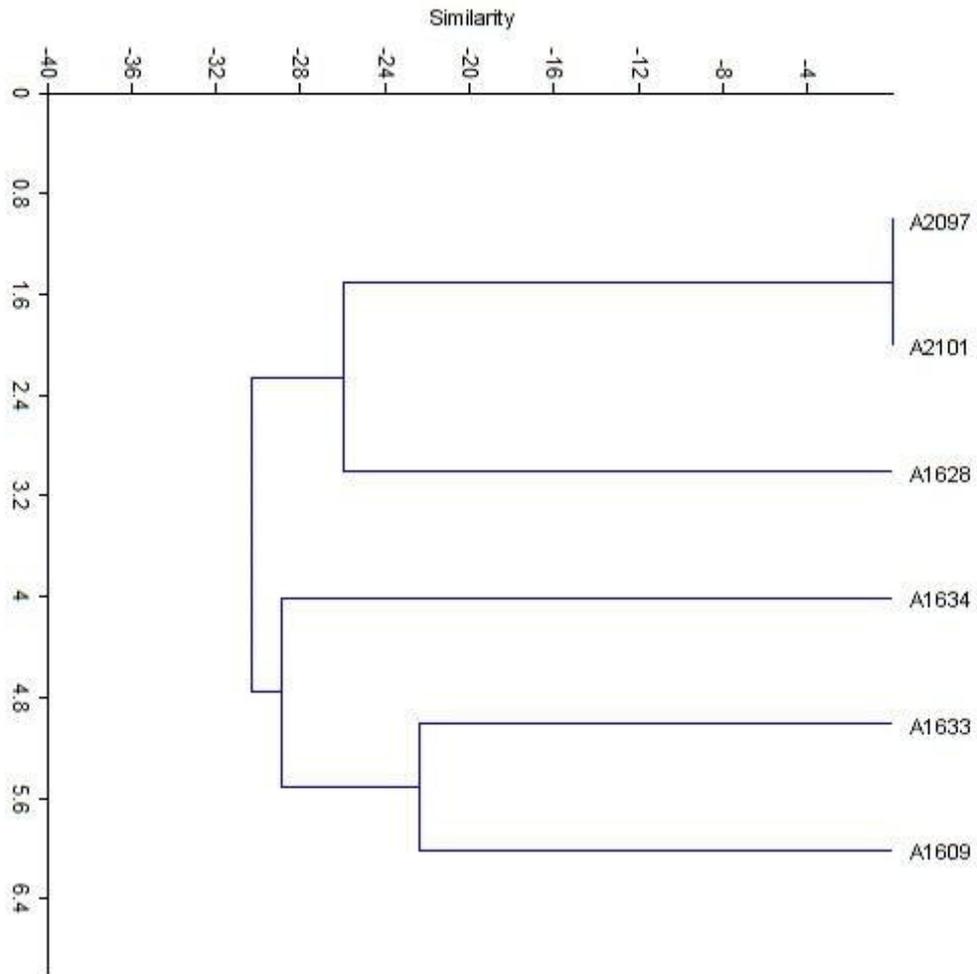


Figura 5 . Relación de la longitud de espora y el gradiente altitudinal.

Discusiones

Las enfermedades del tizón café y la banda roja en aguja del pino son enfermedades graves que afectan a las coníferas. La primera enfermedad es causada por la *Mycosphaerella dearnessii* mientras que el segundo es causada por dos especies, deuteromiceto *Dothistroma septosporum* (Dorog.) M. Morelet (teleomorfo *M. pini* Rostr.) y *D. pini* (teleomorfo desconocido).

M. dearnessii se puede identificar fácilmente por observación microscópica de las conidiosporas típicas de la etapa de anamorfo, (es decir, *Lecanosticta acicola*), que se producen en los conidios desarrollados en las agujas infectadas (Barnes *et al* 2004 y EPPO 2008). Las dos especies, *D. pini* y *D. septosporum*, se dividieron recientemente por Barnes *et al.* con base en morfología y el análisis de las secuencias de los tres genes nucleares. *D. pini* y *D. septosporum* debido a la dificultad en que distinguen por la morfología de sus conidiosporas, y la identificación de las dos especies se basa sólo en la observación de las características microscópicas la cual puede llegar a ser casi imposible (Barnes, 2004)

Las dificultades en la identificación de patógenos pueden surgir cuando la conidiomas que se observan en el tejido huésped no producen conidios maduros e incluso después de la incubación en una cámara húmeda, que es un método recomendado (EPPO, 2008). Además, el aislamiento de *L. acicola*, *D. pini*, y *D. septosporum* para la identificación también es a menudo difícil y consume mucho tiempo, debido a que estos hongos crecen muy lentamente y

son fácilmente fuera de competencia por hongos endófitos saprobios o de rápido crecimiento (EPPO, 2008; Evans, 1994), con lo cual en este estudio se presentaron las mismas situaciones en la identificación debido a lo parecido en la morfología de los patógenos y del estado inmaduro de los conidios, además de las dificultades debido al lento crecimiento en los cultivos y la competencia de otros hongos endófitos presentes en las acículas los cuales mostraron un rápido crecimiento, dificultando la identificación así como el crecimiento del patógeno de interés en los cultivos.

L. acicola, *D. pini* y *D. septosporum* aparecen como hongos en cuarentena de la Unión Europea (Anónimo, 2000), y se sometieron a pruebas específicas para los controles fitosanitarios. Los resultados fiables de tal monitoreo dependen de la aplicación rápida,

específica, y herramientas de detección sensibles. La disponibilidad de la base molecular como herramientas de detección podría ayudar mucho a resolver el problema de identificación de estos tres agentes patógenos en su huésped. Debido a *L. acicola*, *D. pini* y *D. septosporum* tienen árboles hospederos similares y pueden presentar síntomas similares, una herramienta molecular que permita la detección simultánea de los tres patógenos haría posible para acelerar el proceso de análisis y proporcionaría datos más completos sobre la distribución real de estos patógenos en diferentes partes del mundo. En México y en otros países en proceso de desarrollo la aplicación de pruebas moleculares en el campo forestal presenta ciertos inconvenientes debido a los precios elevados de éstas pruebas, por lo que pudiera llegar a no ser tan factible la aplicación de dichas herramientas para la detección oportuna.

Estudios anteriores han demostrado que las secuencias de la β -tubulina 2 (β -tub2) y el factor de elongación de la traducción (EF1- α) los genes pueden estar adecuado para diferenciar *L. acicola*, *D. septosporum*, y *D. pini* (Barnes 2004) debido a que muestran interespecífica significativa intrónica polimorfismo.

En el norte de EE.UU., la precipitación y la temperatura son los factores críticos para la dispersión de las esporas y la infección, que se producen de junio a septiembre (Skilling y Nicholls, 1974). Las esporas son liberadas sólo durante el tiempo lluvioso y nunca a temperaturas bajas (cerca de 2°C); el periodo de infección mayor es de finales de junio a principios de julio. Además del gradiente altitudinal, la precipitación en los cuatro municipios donde se realizó el muestro varía. En Iturbide La precipitación media anual es de 620 mm y se presenta bimodalmente durante el verano (Návar *et al.*, 1994). Las dos temporadas de mayor precipitación ocurren en junio y septiembre. La evapotranspiración potencial anual de la región es de 795 mm (Návar *et al.*, 1994). La temperatura media anual es de 18° C, aunque durante el periodo más cálido (junio-agosto) la temperatura máxima mensual puede alcanzar los 35° C. el periodo más frío, con temperaturas mínimas mensuales de hasta -10° C se presenta en los meses de diciembre y enero. En Galeana el clima que presenta la región es templado subhúmedo con lluvias en verano. La precipitación promedio es de 600 – 800 mm. La máxima temperatura media anual se ubica entre los 12 °C a 18 °C. La máxima incidencia de lluvias ocurre durante el mes de Septiembre. La temperatura mínima se registra en el mes de Enero siendo de 7 °C. (B.P.P., 1985). En Monterrey el clima es semiárido

cálido. La precipitación media anual es de alrededor de 600 mm repartida principalmente en los meses de verano, siendo Septiembre el mes más lluvioso del año. La temperatura media es de 23 °C. En Cadereyta el tipo de clima es seco estepario, con temperatura media anual de 22 °C. En días de verano alcanza los 44 °C y en invierno desciende hasta los -5 °C. Las lluvias son más abundantes principalmente en el sur y sureste, registrándose con mayor sucesión de agosto a enero; por lo general de febrero a mayo son ligeras lloviznas y raras veces aguaceros torrenciales; la precipitación pluvial media anual es de 601 a 800 milímetros. Estos factores de temperatura y precipitación son determinantes para la propagación e incidencia. Galena siendo el municipio con mayor cantidad de lluvia por año influyen para la incidencia del hongo en las coníferas.

CONCLUSIONES

Se lograron caracterizar 49 muestras de *Lecanosticta acicola* en diferentes hospederos de los municipios de Iturbide, Galeana, Monterrey y Cadereyta. Las especies de coníferas donde se encontró el patógeno con el mayor número de incidencias en *P. cembroides* con 17 incidencias todas en el municipio de Galeana, posteriormente *P. ponderosa var sotrmiae*, al igual que *P. culminicola var culminicola*, con seis incidencias con todas las incidencias en el municipio de Galeana, posteriormente con el mismo número de incidencias, pero en el municipio de Iturbide *P. halepensis*. En Cadereyta solamente se reportó *P. eldarica* que mostró cinco incidencias. Se reportó cinco incidencias de *P. hartwegii* en el municipio de Galeana. Las especies con menor número de incidencias fueron *P. pseudostrobus* y *P. strobiformis* ambas especies con tan solo dos incidencias, de éstas incidencias en *P. pseudostrobus* una fue en el municipio de Galeana y otra en el municipio de Iturbide. En el caso de *P. strobiformis* las dos incidencias fueron encontradas en el municipio de Galeana.

Las condiciones climatológicas como la humedad, la precipitación y el viento favorecen la dispersión y la incidencia de *L. acicola* por lo tanto son factores determinantes para el desarrollo del hongo. Galeana fue el municipio donde se presentó mayor incidencia del hongo con 17 incidencias que representa el 34% de la muestra, debido a que es el que presenta mayor precipitación anual y condiciones de temperatura favorables para el desarrollo de *L. acicola*. En contraste con Galeana donde el clima es semiárido donde solo se encontraron cinco muestras correspondientes al 10% de las muestras y en Monterrey no se presentó ninguna incidencia del hongo debido tal vez a que el clima es semiárido cálido por lo tanto existe mayor dificultad para la propagación del hongo, ya que las condiciones no son óptimas para el desarrollo del hongo.

Se demostró que existe una diferenciación morfológica según el grado de altitud mostrando diferencias en el tamaño de longitud y grosor de espora, el grosor de espora mostró una mayor diferencia significativa según la altitud, en cuanto a la longitud de espora existe también diferencia significativa según la altitud, pero en menor grado que el grosor. En cuanto a la los septos y el color no se mostró una diferencia significativa. En cuanto a la ornamentación existe una variación según la altitud. Mostraron mayor

grado de similitud las esporas con mayor altitud 2097 m. y 2101m. y mayor relación el grupo de esporas con la altitud 1628 m. y 1634 m.

Las pruebas moleculares son una herramienta altamente eficaz debido a que no da lugar a equivocaciones de identificación, debido a que es una prueba altamente sensible y específica para cada especie que sea analizada. Es recomendable el uso de PCR para una identificación precisa.

Literatura Citada

- Anónimo. 2000. Council Directive 2000/29/EC of 8 May 2000 on protective measures against the introduction into the Community of organisms harmful to plants or plant products and against their spread within the Community. O.J.L 169, 10.7.2000:1.
- Barnes, I., Crous, P. W., Wingfield, B. D., and Wingfield, M. J. 2004. Multigene phylogenies reveal that red band needle blight of *Pinus* is caused by two distinct species of *Dothistroma*, *D. Septosporum* and *D. Pini*. *Stud. Mycol.* 50:551-565.
- Christensen, C. M. 1989. A view of fungal ecology. *Mycologia.* (81): 1-19.
- Cooke, R. C. 1997. *Fungi, man and his environment*. Longman, London. 144pp
- Copely, J. 2000. Ecology goes underground. *Nature.* 406: 452-45.
- EPPO. 2008. *Mycosphaerella dearnessii* and *Mycosphaerella pini*. *EPPO Bull.* 38:349-362.
- EPPO. 2005: EPPO Standards. Diagnostic PM 7/46. OEPP/EPPO. EPPO Bulletin, 35: 271-273.
- Evans, H.C. 1984. The genus *Mycosphaerella* and its anamorphs *Cercoseptoria*, *Dothistroma* and *Lecanosticta* on pines. Commonwealth Mycological Institute, Mycological Paper No. 153. 102 pp.
- García, A. y S. González. 1991. Flora y vegetación de la cima del cerro Potosí, Nuevo León, México. *Acta Botánica Mexicana* 13:53-74.
- García, Enriqueta. 1964. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). México: Offset Larios, S.A.
- García M., G.E. 2003. Efecto del incremento en la concentración de CO₂ atmosférico sobre los anillos de crecimiento de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.), en Nuevo León, México. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Nuevo León. Linares, N.L. 53 p.
- Glaforo J. Alanis Flores, Marco A. Alvarado Vázquez, Liliana Ramírez Freire, Carlos G. Velasco Macías y Rahim Foroughbakhch Pournavab. 2011. Flora endémica de Nuevo León, México y Estados colindantes. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*.
- Gibson, I.A.S. 1972 *Dothistroma* blight of *Pinus radiata*. *Annual Review of Phytopathology* 10, 51-72.

- Gibson, I.A.S. 1974 Impact and control of dothistroma blight of pines. *European Journal of Forest Pathology* 4, 89-100.
- Gibson, I.A.S. 1978. Some stem and foliage diseases of importance to exotic pine plantations of the tropics and the south ; *Plagas y Enfermedades de Pinos en el Trópico*, Medellín (Colombia), 3 Sep 1978 / FAO, Rome (Italy); International Union of Forestry Research Organizations, Munich (Germany, F.R.) , Nov 1978.
- Gibson, I.A.S., 1978. Diseases of Forest Trees Widely Planted as Exotics in the Tropics and Southern Hemisphere. Part II. The Genus Pinus. C.M.I., Kew
- Gibson, I.A.S. 1979. Diseases of forest trees widely planted as exotics in the tropics and southern hemisphere. Part II. The genus Pinus. Commonwealth Forestry Institute and Commonwealth Mycological Institute, Oxford and Kew, UK.
- Gibson, I.A.S. 1980. Two pine needle fungi new to Colombia. *Tropical Pest Management* 26: 38-40.
- Gilmour, J.W. (1981) The effect of season on infection of *Pinus radiata* by *Dothistroma pini*. *European Journal of Forest Pathology* 11, 265-269.
- Guzmán, G. 1998. Inventorying the fungi of México. *Biod. And Conser.* 7: 369-384.
- Hawksworth, D. L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Research* 95: 641-655.
- Hanwksworth, D. L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 Mmillion species estimate revisited. *Mycol. Res.* 105: 1422-1432.
- Hedgecock, G.G. 1929. *Septoria acicola* and the brown-spot disease of pine needles. *Phytopathology* 19: 993-999.
- INAFED Instituto para el Federalismo y el Desarrollo Municipal .2010. SEGOB Secretaría de Gobernación . *Enciclopedia de Los Municipios y Delegaciones de México*, Estado de Nuevo León.
- Muller, C.H. 1937. Plants as indicators of climate in northeast Mexico, *Amer Midl. Natur* 18:986-1000.
- Muller, C.H. 1939. Relations of the vegetation and climatic types in Nuevo Leon, Mexico. *Amer Midl Natur.* 21: 687-729.
- Návar Ch. J. J., Cavazos T., Domínguez C. P. A. 1995. Las precipitaciones Mensuales con tres probabilidades estimadas para la distribución Gamma y su regionalización en el Estado de Nuevo León. En revisión En el boletín científico de la FCF, UANL.
- Ivory, M.H. 1987. Diseases and disorders of pine in the tropics. Oxford, UK. Oxford Forestry Institute. Overseas Research Publication No. 31. 92 pp.

- Kais, A.G. 1975. . Environmental factors affecting brown-spot infection on longleaf pine. *Phytopathology* 65: 1389-1392.
- Patton, R.F.; Spear, R.N. 1978. Scanning electron microscopy of infection of Scotch pine needles by *Scirrhia acicola*. *Phytopathology* 68: 1700-1704.
- Patton, R.F. 1997. Brown spot needle blight. Page 57 In Hansen, E. M.; Lewis, K. J., editors. *Compendium of conifer diseases*. St. Paul, MN: American Phytopathological Society Press. 101 pp.
- Pehl L & Wulf A. 2001 [*Mycosphaerella* needle blights of pine – symptoms,biology and differential diagnosis.] *Nachrichtenblatt des deutschenpflanzenschutzdienstes* 53, 217–222.
- Pehl, L., Burgermeister, W., Wulf, A. 2004 [*Mycosphaerella* needle blights of pine - identification by ITS-RFLP patterns]. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 56: 239-244.
- Phelps, W.R.; Kais, A.G.; Nicholls, T.H. 1978. Brown-Spot Needle Blight of Pines. *Forest Insect & Disease Leaflet* 44. Saint Paul, MN: USDA Forest Service, State and Private Forestry, Forest Health Protection. 8 p.
- Porta, N. La; Capretti, P. 2000. *Mycosphaerella dearnessii*, a needle-cast pathogen on mountain pine (*Pinus mugo*) in Italy. *Plant Disease* 84: 922.
- Skilling, D.D.; Nicholls; T.H. 1974. Brown spot needle disease—biology and control in Scotch pine plantations. *USDA Forest Service, Research Paper NC-109*. 19 pp.
- Skilling, D.D.; Nicholls, T.H. (1974) Brown spot needle disease - biology and control in Scotch pine plantations. *USDA Forest Science Research Paper No. 109*, 19 pp.
- Snyder, E.B.; Derr, H.J. 1972. Breeding longleaf pines for resistance to brown spot needle blight. *Phytopathology* 62: 325-329.
- Wainwright, M. (1992). *An introduction to fungal biotechnology*. Wiley & Sons, New York. 202 pp.
- Wouter, L. H., Gommet, M. 1986. Un plan de futuras actividades para el Bosque – Escuela de la UANL en consideración actual en Iturbide, N. L. 140 p.
- . Yang, B.; Ye, J.R., Bao, H.; Liu, J.K.; Dong, Z.J. 2002. Studies of the phytotoxic Activities of LA-I and LA-II produced by the brown spot needle blight fungus (*Lecanosticta acicola*). *Scientia Silvae Sinicae* 38: 84-88.
- .