



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

TESIS

**IDENTIFICACIÓN DE HONGOS OPHIOSTOMATOIDES CAUSANTES DEL
MANCHADO DE LA MADERA DE LOS ENCINOS (*Quercus potosina*) DE LA
SIERRA FRÍA DE AGUASCALIENTES A PARTIR DE LAS GALERÍAS DE
*Megapurpuricenus magnificus***

PRESENTA

Diana Laura Luévano Rodríguez

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS AGRONÓMICAS

TUTORES

Dr. Onésimo Moreno Rico

Dr. Guillermo Sánchez Martínez

COMITÉ TUTORAL

Dr. José Guadalupe Marmolejo Monsivais

Dr. José de Jesús Luna Ruiz

Aguascalientes, Ags, Junio de 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

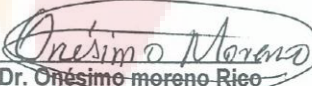
M. EN C. GABRIEL ERNESTO PALLAS GUZMÁN
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PRESENTE.

Por este conducto tengo a bien informarle que **DIANA LAURA LUÉVANO RODRÍGUEZ** estudiante de la Maestría en Ciencias Agronómicas y Veterinarias ha cumplido de manera satisfactoria el proceso de redacción, revisión y correcciones de su tesis titulada "**Identificación de hongos ophiostomatoides causantes del manchado de la madera de los encinos (*Quercus potosina*) de la Sierra Fría de Aguascalientes a partir de las galerías de *Megapurpuricenus magnificus*.**

Por lo anterior, no tengo inconveniente en otorgar mi **VOTO APROBATORIO** para la impresión del documento y continuar con el proceso de titulación y programación del examen de grado.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags. a 06 de junio de 2016


Dr. Onésimo moreno Rico
Cotutor



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M. EN C. GABRIEL ERNESTO PALLAS GUZMÁN
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PRESENTE.

Por este conducto tengo a bien informarle que **DIANA LAURA LUÉVANO RODRÍGUEZ** estudiante de la Maestría en Ciencias Agronómicas y Veterinarias ha cumplido de manera satisfactoria el proceso de redacción, revisión y correcciones de su tesis titulada "**Identificación de hongos ophiostomatoideos causantes del manchado de la madera de los encinos (*Quercus potosina*) de la Sierra Fría de Aguascalientes a partir de las galerías de *Megapurpuricenus magnificus*.**

Por lo anterior, no tengo inconveniente en otorgar mi **VOTO APROBATORIO** para la impresión del documento y continuar con el proceso de titulación y programación del examen de grado.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags. a 06 de junio de 2016

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Guillermo Sánchez Martínez'.

Dr. Guillermo Sánchez Martínez
Cotutor



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

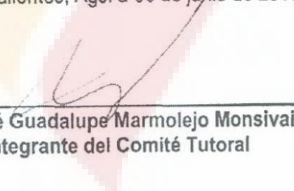
M. EN C. GABRIEL ERNESTO PALLAS GUZMÁN
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
P R E S E N T E.

Por este conducto tengo a bien informarte que **DIANA LAURA LUÉVANO RODRÍGUEZ** estudiante de la Maestría en Ciencias Agronómicas y Veterinarias ha cumplido de manera satisfactoria el proceso de redacción, revisión y correcciones de su tesis titulada "**Identificación de hongos ophiostomatoides causantes del manchado de la madera de los encinos (*Quercus potosina*) de la Sierra Fría de Aguascalientes a partir de las galerías de *Megapurpuricenus magnificus*.**

Por lo anterior, no tengo inconveniente en otorgar mi **VOTO APROBATORIO** para la impresión del documento y continuar con el proceso de titulación y programación del examen de grado.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags. a 06 de junio de 2016


Dr. José Guadalupe Marmolejo Monsivals
Integrante del Comité Tutorial



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M. EN C. GABRIEL ERNESTO PALLAS GUZMÁN
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PRESENTE.

Por este conducto tengo a bien informarle que **DIANA LAURA LUÉVANO RODRÍGUEZ** estudiante de la Maestría en Ciencias Agronómicas y Veterinarias ha cumplido de manera satisfactoria el proceso de redacción, revisión y correcciones de su tesis titulada "**Identificación de hongos ophiostomatoides causantes del manchado de la madera de los encinos (*Quercus potosina*) de la Sierra Fría de Aguascalientes a partir de las galerías de *Megapurpuricenus magnificus*.**

Por lo anterior, no tengo inconveniente en otorgar mi **VOTO APROBATORIO** para la impresión del documento y continuar con el proceso de titulación y programación del examen de grado.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags. a 06 de junio de 2016

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'José de Jesús Luna Ruiz'.

Dr. José de Jesús Luna Ruiz
Integrante del Comité Tutorial

OFICIO NO. CCA-D-111500-138-16

DRA. GUADALUPE RUÍZ CUÉLLAR
DIRECTORA GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
PRESENTE.

Por medio del presente me permito comunicarle a usted que la tesis titulada "IDENTIFICACIÓN DE HONGOS OPHIOSTOMATOIDES CAUSANTES DEL MANCHADO DE LA MADERA DE LOS ENCINOS (*QUERCUS POTOSINA*) DE LA SIERRA FRÍA DE AGUASCALIENTES A PARTIR DE LAS GALERÍAS DE *MEGAPURPURICENUS MAGNIFICUS*", de la alumna **DIANA LAURA LUÉVANO RODRÍGUEZ**, egresada de la Maestría en Ciencias Agronómicas y Veterinarias, respeta las normas y lineamientos establecidos institucionalmente para su elaboración y su autor cuenta con el voto aprobatorio de su tutor y comité tutorial.

Sin más por el momento aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
Jesús María, Ags., 08 de Junio del 2016.
"Se Lumen Proferre"

M. en C. GABRIEL ERNESTO PALLÁS GUZMÁN
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

c.c.p. Jefa del Departamento del Control Escolar
c.c.p. Sección de Certificados y Títulos
c.c.p. Secretario Técnico
c.c.p. Estudiante
c.c.p. Archivo

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada le doy las gracias al Dr. Onésimo Moreno Rico por permitirme trabajar con él y depositarme su confianza para la realización de este proyecto.

A todas las personas que participaron e hicieron posible este proyecto, muchas gracias por su apoyo y enseñanza: Dr. Guillermo Sánchez Martínez, Dr. José Guadalupe Marmolejo Monsivais, Dr. José de Jesús Luna Ruíz y al Dr. José Luis Hernández Mendoza por permitirme trabajar en el Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional.

A quienes participaron en la fase de investigación y experimento:

Todos los que integran el Departamento de Microbiología del Centro de Ciencias Básicas, al Dr. Arturo Valdivia Flores por permitirme trabajar en el Laboratorio de Investigación del Departamento de Clínica Veterinaria, sin olvidar a la Maestra Ericka Rangel y a la Dra. María Carolina de Luna López por su apoyo. Y un agradecimiento especial al Dr. Alberto Margarito García Mungía por su gran apoyo.

Mil gracias al CONACYT por la beca otorgada; sin olvidar también que el proyecto fue apoyado con recursos de CONAFOR-CONACYT-2012-C01-175591 a cargo del Dr. Guillermo Sánchez Martínez y el proyecto UAA PIB15-6 a cargo del Dr. Onésimo Moreno Rico.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	3
1. INTRODUCCIÓN	7
2. MARCO TEÓRICO	9
2.1 ENCINOS (<i>Quercus</i>)	9
2.1.1 Distribución geográfica de los encinos.....	9
2.1.2 Descripción.....	10
2.1.3 Los encinos en México.....	11
2.1.4 Usos	12
2.1.5 Amenazas y Enfermedades.....	13
2.2 CERAMBÍCIDOS BARRENADORES	14
2.2.1 <i>Megapurpuricenus magnificus</i> LECONTE (COLEÓPTERA: CERAMBYCIDAE).....	14
2.2.2 Síntomas en los árboles	15
2.3 MANCHADO DE LA MADERA	16
2.4 HONGOS OPHIOSTOMATOIDES.....	19
2.4.1 Asociación hongos-insectos	22
2.4.2 Marchitamiento vascular	23
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. OBJETIVOS	26
4.1. OBJETIVO GENERAL	26
4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO (S):	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1 Área de estudio.....	26
5.2 Selección de las muestras de madera	27
5.3 Aislamiento de los hongos	28
5.3.1 A partir del tejido de encino manchado.....	28
5.4 Identificación de los hongos.....	29
5.4.1 Identificación morfológica a partir de las galerías en madera de encino	29
5.4.2 Identificación morfológica a partir de los aislados.....	29
5.4.3 Identificación mediante análisis genéticos	29

5.5 Microscopía electrónica de barrido (MEB) de insectos hembra adultos	33
6. RESULTADOS	34
6.1 Aislamiento a partir del tejido de encino manchado	34
6.2 Identificación morfológica a partir de las galerías en madera de encino	36
6.2.1 <i>Ophiostoma pluriannulatum</i> Syd & P. Syd	36
6.2.2 <i>Pesotum</i> sp. (Syn. <i>Graphium</i>) Crane and Schok	37
6.2.3 <i>Ceratocystis</i> sp. Ellis y Halst	38
6.3 Identificación morfológica a partir de los aislados	39
6.4 Identificación mediante análisis genéticos	41
6.4.1 Visualización del DNA por electroforesis	41
6.4.2 Amplificación del espaciador transcribible interno (ITS)	42
6.4.3 Identificación a nivel de género y especie	42
6.5 Microscopía electrónica de barrido de los insectos adultos	44
7. DISCUSION	47
8. CONCLUSIONES	51
9. GLOSARIO	52
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regiones fisiográficas donde se encuentran encinos 10

Figura 2. Hojas de los encinos 11

Figura 3. *M. magnificus*. Hembra, macho y larva..... 15

Figura 4. Síntomas en *Q. potosina*..... 16

Figura 5. Trozas de *Quercus potosina* 17

Figura 6. Ascomata representativos del orden Ophiostomatales 21

Figura 7. Peritecios de un hongo ophiostomatoide..... 21

Figura 8. Géneros de anamorfos del orden Ophiostomatales 22

Figura 9. Sierra Fría, Aguascalientes 27

Figura 10. Daños producidos por la larva de *M. mganificus* 28

Figura 11. Cámara de electroforesis Bio-Rad..... 31

Figura 12. Espacio transcribible interno (ITS) y programa Kodak 32

Figura 13. Aislados de *Quercus potosina* manchada..... 35

Figura 14. *O. pluriannulatum* 37

Figura 15. *Pesotum* sp..... 38

Figura 16. *Ceratocystis* sp. y fase asexual *Chalara* sp 39

Figura 17. *O. pluriannulatum* en EMA. y observación de *Sporothrix* sp..... 41

Figura 18. Visualización del ADN de los hongos aislados..... 42

Figura 19. Visualización de productos de PCR 42

Figura 20. Selección de la secuencia 43

Figura 21. Comparación de la secuencia con el NCBI 43

Figura 22. *M. magnificus*. Ascosporas sobre las antenas..... 44

Figura 23. *M. magnificus*. Ascosporas encontradas sobre la cabeza 45

Figura 24. *M. magnificus*. Ascosporas encontradas sobre el élitro..... 45

Figura 25. *M. magnificus*. Masa de micelio en la pata y ovipositor 46

RESUMEN

Los encinos son considerados uno de los grupos taxonómicos vegetales de mayor importancia económica en el hemisferio norte. Una de las principales limitantes para su comercialización es el manchado azul de la madera, patología causada por hongos del orden Ophiostomatales y que se han asociado con artrópodos que actúan principalmente como vectores. En México, se desconocen a los hongos que causan el manchado de la madera en encinos. También se carece de información sobre la interacción entre dichos hongos y el insecto barrenador *Megapurpuricenus magnificus*. Por lo tanto, el objetivo del estudio fue identificar a los hongos ophiostomatoides que causan el manchado de la madera de los encinos de la Sierra Fría en Aguascalientes y analizar su relación con las galerías del barrenador *Megapurpuricenus magnificus*. Para la identificación de los hongos que manchan la madera se colectaron tallos de *Quercus potosina* con galerías producidas por *M. magnificus* y madera manchada por hongos ophiostomatoides, las muestras fueron revisadas por microscopía estereoscópica y compuesta para localizar y estudiar las estructuras fúngicas. Mediante el uso de claves taxonómicas se identificó a los hongos *Ophiostoma pluriannulatum*, *Ceratocystis* sp., *Chalara* sp. y *Pesotum* sp. Mediante técnicas convencionales, a partir de pequeños trozos de madera manchada, se realizó el aislamiento de 8 cepas de hongos que fueron identificados como *Sporothrix* sp. Uno de estos aislados, a los 6 meses de desarrollo *in vitro*, formó el teleomorfo de *O. pluriannulatum*. También, se realizó la identificación molecular de los aislados, sin embargo, no se obtuvieron resultados satisfactorios debido a una contaminación con *Clonostachys rosea*. Para corroborar la interacción con el insecto *M. magnificus*, se capturó una hembra adulta y se observó bajo el Microscopio Electrónico de Barrido encontrándose esporas de *Ophiostoma pluriannulatum* sobre todo en los ojos, antenas, ovipositor y élitros del insecto. Por lo tanto, se tiene más evidencia de que existe una interacción de los hongos que manchan la madera con el insecto barrenador *M. magnificus*.

Palabras clave: *Quercus potosina*, *Megapurpuricenus magnificus*, *Ophiostoma pluriannulatum*, *Ceratocystis* sp., *Chalara* sp., *Pesotum* sp., *Sporothrix* sp., manchado azul de la madera.

ABSTRACT

Oak trees are considered one of the most important groups of taxonomic plants in the northern hemisphere. One of the principal limits to their commercial exploitation is blue stain fungus, a pathology caused by fungi of the *Ophiostomatales* groups that have been associated with arthropods that act as vectors. In Mexico it is unknown whether the fungi (that stains the wood of the oak trees) interacts with the wood boring insect *Megapurpuricenus magnificus*. The general objective of this study is to identify the *Ophiostomatales* fungus that causes the blue stain affect in the oaks of the Sierra Fria of Aguascalientes associated with the bore holes of *Megapurpuricenus magnificus*. To identify the fungi, stems were collected of *Quercus potosina* from bore holes produced by *M. magnificus* and lesions suggestive of *Ophiostomatoid* fungi. The findings were reviewed by composed stereomicroscopy to localize the fungal structure and through the use of taxonomic keys *Ophiostoma pluriannulatum*, *Ceratocystis* sp. and *Pesotum* sp. were identified. Subsequently fungi were isolated from small pieces of wood to give a total of 8 isolates that when viewed under the compound optical microscope *Sporothrix* sp. was identified. The molecular identification of isolates was also performed however satisfactory results were not obtained. This was probably due to contamination with *Clonostachys rosea*. To corroborate the interaction with the insect *M. magnificus*, an adult female was captured and observed under a Scanning Electrode Microscope. Spores of *Ophiostoma pluriannulatum* were found especially in the eyes, antennae, ovipositor and elytra of the insect. Therefore we have more evidence that there is an interaction of the blue stain fungus and the wood borer insect *M. magnificus*.

Key words: *Quercus potosina*, *Megapurpuricenus magnificus*, *Ophiostoma pluriannulatum*, *Ceratocystis* sp., *Chalara* sp., *Pesotum* sp., *Sporothrix* sp., blue stain of the wood.

1. INTRODUCCIÓN

El encino (*Quercus*) presenta una gran variedad en México, ya que cuenta con la presencia de entre 135 y 150 especies, de las 450 registradas a nivel mundial, considerándose a 86 de éstas bajo la categoría de endémicas. Dentro de la variabilidad botánica de México, el encino es un componente notable en diversos ecosistemas templados y tropicales del país. Los encinos forman parte importante de las masas arboladas de las regiones montañosas y, más aún, presenta la mayor distribución de plantas leñosas en el mundo (Nixon, 1998; Zavala, 1998).

Los encinos se desarrollan en toda una gama de condiciones climáticas y de suelo, aunque pueden estar mejor adaptados a ciertas condiciones específicas que prevalecen en determinadas elevaciones, según la especie. Pueden coexistir con otros tipo de vegetación o formando bosques dominados por una o varias especies de encino. Prosperan en terrenos moderadamente fértiles y húmedos, pero algunas especies se adaptan a terrenos pobres, aunque siempre en lugares montañosos. Son árboles cuya longevidad se puede estimar en siglos, pues se calcula que su término medio de vida oscila entre los 150 y 200 años, sin embargo, hay reportes de ejemplares históricos que sobrepasan los 1,500 años (Nixon, 1998; Zavala, 1998).

A nivel internacional el comercio y tráfico de madera es un problema que se expande a gran velocidad propiciando la desaparición de grandes zonas boscosas, aunado al aumento de la tala descontrolada originada por la venta legal e ilegal de madera, otra problemática a considerar es que dicha actividad aumenta la posibilidad de introducir diversos patógenos y agentes causantes de plagas para las especies locales (Revilla, 2013).

Revilla (2013), menciona que los hongos ascomicetos del orden de los *Microascales* y *Ophiostomatales* son los responsables de la aparición del manchado de la madera y que son transportados principalmente por insectos descortezadores.

La identificación de los hongos ophiostomatoides debe ser confirmada por medio de técnicas moleculares, a través de una comparación de secuencias de ADN de especies ya conocidas, debido a la dificultad en la identificación morfológica (Massoumi et al., 2006).

En México, Marmolejo (1989), identificó a *Ophiostoma conicolum* en *P. cembroides* y asociado al insecto *Conophthorus cembroides*. Recientemente, Moreno et al. (2014), identificaron diferentes especies de hongos Ophiostomatoides tales como *Ophiostoma* sp., *Ophiostoma pulvinisporum*, *O. pluriannulatum*, *Ceratocystiopsis fasciata* y *Leptographium* sp. en *Pinus teocote* y *P. leophylla*, asociados al insecto descortezador *Dendroctonus mexicanus*.

El presente proyecto tuvo como objetivo identificar a los hongos Ophiostomatoides que causan el manchado de la madera de los encinos de la Sierra Fría en Aguascalientes y analizar su relación con las galerías del barrenador *Megapurpuricenus magnificus*. Este trabajo se realizó en el occidente del estado de Aguascalientes, entre los 22° 05'' y 22° 15'' de latitud norte y los 102° 32'' y 102° 38'' de longitud oeste. Esta área se encuentra dentro de la provincia fisiográfica Sierra Madre Occidental. La zona de estudio incluye las áreas ocupadas por encinos en el estado de Aguascalientes y se localizan, principalmente, en la Sierra Fría, municipio de San José de Gracia, que se extiende hasta el estado de Zacatecas, formando bosques en asociación con *Pinus* sp., *Juniperus* sp. y escasamente con *Cupressus* sp. (Apéndice A).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ENCINOS (*Quercus*)

2.1.1 Distribución geográfica de los encinos

En los ecosistemas templados de montaña las especies de *Pinus* y *Quercus* dominan considerablemente en las comunidades de plantas leñosas. El género *Quercus* presenta la distribución más amplia a nivel mundial, desde Colombia hasta el sur de Canadá, incluyendo Cuba (Nixon, 1998 y Valencia, 2004). Se han reconocido dos centros de diversidad, el primero localizado en el sureste de Asia, el cual alberga poco más de 120 especies (Govaerts y Frodin, 1998), y el segundo localizado en México, principalmente en las regiones montañosas, donde comparte con comunidades de coníferas (Valencia, 2004) (Figura 1). A nivel local los encinos representan un elemento importante de la reducida región montañosa del estado de Aguascalientes. Al respecto De la Cerda (1999), reportó 17 especies en esta entidad, mientras que Zavala (1989), reportó 16.

El número de especies que se pueden encontrar dentro del territorio mexicano no se conoce con exactitud y el número reportado varía según el autor. El dato más reciente es el reportado por Govaerts y Frodin (1998), quienes indican que el número de especies de encinos en México es de aproximadamente 251. Adicionalmente, Valencia (2004), señala que dentro del territorio podemos encontrar del 32.2-40.2% de las especies del género a nivel mundial, lo cual significa que una tercera parte de la diversidad de este género se localiza en México.

Dentro del territorio mexicano la ubicación geográfica de las especies es muy variada, pero la mayor riqueza de especies se encuentra en la región central del país, teniendo aproximadamente del 66 al 59% del total. Además, un estudio detallado sobre la diversidad de este género en México reveló que la distribución varía con respecto a las especies de encino blanco y rojo, mientras que el rojo se encuentra en zonas húmedas del sur y sureste; las especies de encino blanco son más abundantes en regiones secas en el norte del país (Zavala, 1998).

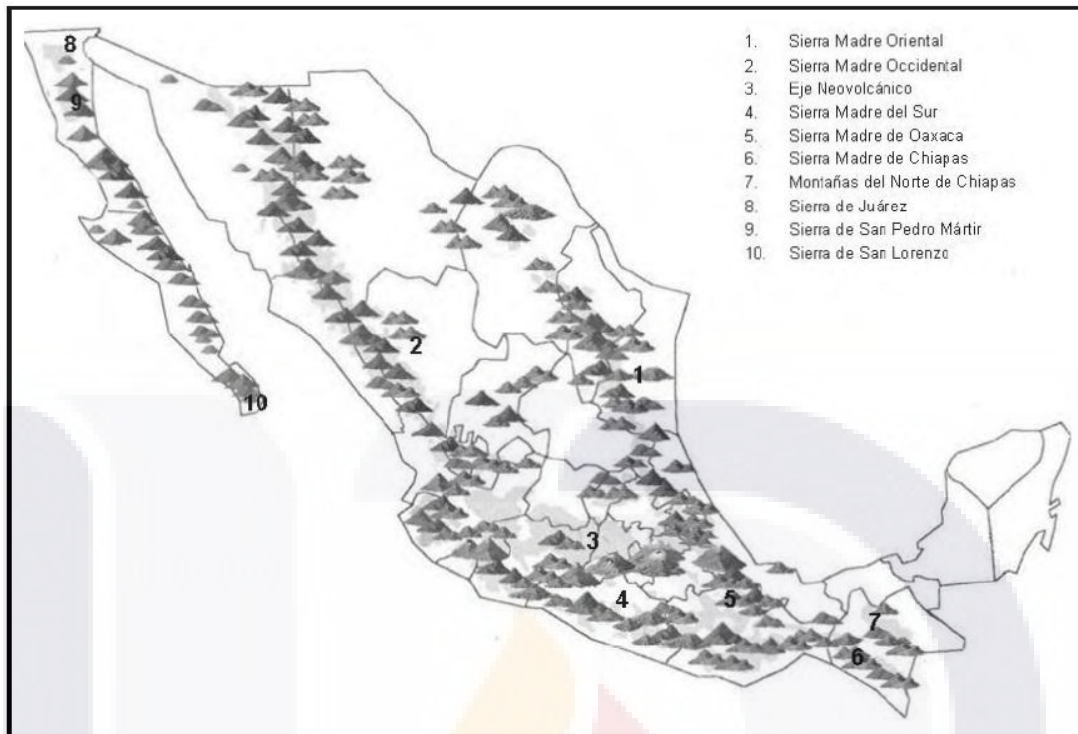


Figura 1. Regiones fisiográficas donde se encuentran encinos (tomado de Pérez y Dávalos, 2008)

Pérez Olvera et al. (2006), realizaron la comparación anatómica entre encinos rojos y blancos. Los encinos blancos presentan maderas más duras y más pesadas que las rojas, debido a que sus fibras son más largas y sus paredes gruesas, en concordancia, Sánchez-Martínez et al. (2014), describen que los encinos blancos a los cuales pertenece *Quercus potosina* presentan alta resistencia mecánica.

2.1.2 Descripción

Nombre común: Encino.

Nombre científico: *Quercus*

De acuerdo con Arizaga et al. (2009), los encinos se caracterizan morfológicamente ya que presentan tallos leñosos, hojas coriáceas o duras y su fruto son las bellotas. Llegan a medir entre los 3 y 40 m, sin embargo, como arbustos llegan a medir a no más de 60 cm. Algunos encinos tienen hojas perenes, que son remplazadas gradualmente, otros, son

caducifolios, perdiendo todas sus hojas en temporada de sequía. El tipo de ápice de la hoja, la textura, el tamaño, el borde y el número de nervaduras, son características importantes ya que son empleadas en la taxonomía para la identificación de la especie (Figura 2). Los encinos son hermafroditas debido a la presencia de flores masculinas y femeninas que suelen permanecer hasta un mes en el árbol. Son de larga vida dado que su desarrollo es lento, frecuentemente crecen en bosques templados, no obstante también, pueden encontrarse en matorrales, pastizales y de forma entreverada en algunas selvas secas.

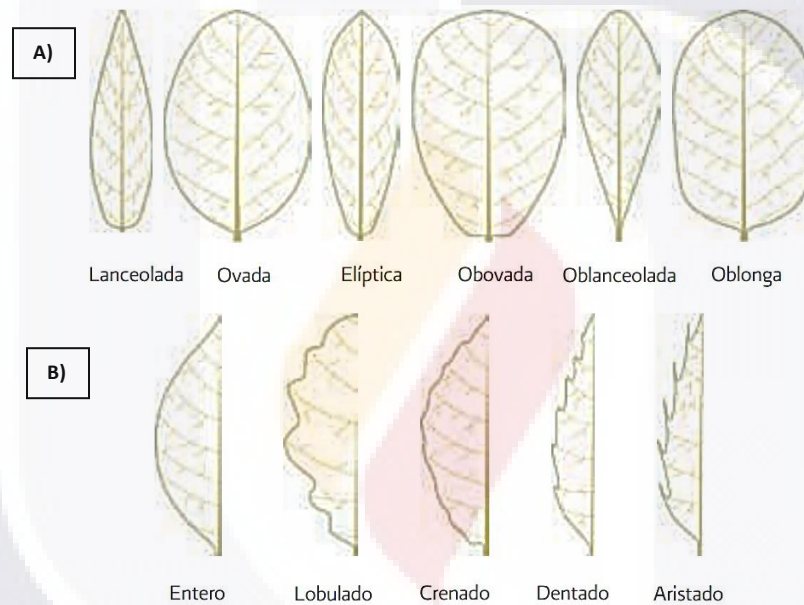


Figura 2. Hojas de los encinos. A) Formas y B) Márgenes de las hojas (Tomado de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/603/aspectos.pdf>)

2.1.3 Los encinos en México

El 68% de los encinos del continente americano se encuentran en México, con aproximadamente 161 especies, de las cuales, 109 son endémicas del país. Aproximadamente el 5.5% de la superficie total del país es abarcado por macizos montañosos, conformados principalmente por los bosques de encinos, esto a una altitud que va de los 1200 a 2800 metros sobre el nivel del mar, cabe señalar que la mayor diversidad de especies es encontrada en este intervalo altitudinal, pero es posible encontrar

especies desde los 200 hasta los 3500 metros de altitud. Los estados con mayor riqueza son Nuevo León, Veracruz y Oaxaca, mientras que, Quintana Roo es el único estado que no cuenta con encinos de manera natural (Arizaga et al., 2009).

2.1.4 Usos

En diferentes partes de la República Mexicana se le han encontrado diversos usos al *Quercus*, entre los que destacan el uso medicinal, alimenticio, artesanal, forraje, taninos, colorantes, etc., además, también poseen un gran valor dentro de la cultura mexicana, debido a sus usos actuales y potenciales (FAO, 1999; Luna et al., 2003). Esto hace a los encinos uno de los grupos taxonómicos con mayor importancia económica en Norteamérica (Valencia, 2004).

Los encinos son usados para tratar problemas dentales al masticar pedazos de corteza. Así mismo, se le atribuyen propiedades antidiarreicas y astringentes al consumir las hojas, además, los amentos de algunas especies son empleados contra el vértigo y la epilepsia (De la Paz et al., 2000; Luna et al., 2003).

A nivel mundial, la madera de los encinos es considerada de alta calidad y en México ocupa el segundo lugar de aprovechamiento. Debido, principalmente, a sus propiedades físicas, mecánicas y anatómicas los encinos son un recurso muy adecuado para la elaboración de productos y herramientas derivados de la madera (De la Paz et al., 2000; Luna et al., 2003).

García de la Cruz et al. (2014), mencionan que la madera de encino es usada para la construcción y como materia prima para artesanías en el estado de Veracruz.

Se ha reportado que los frutos de los encinos (bellotas), se utilizan en algunos estados de la República como alimento para el ganado, principalmente, el porcino (García de la Cruz et al., 2014). Son proveedores de servicios ambientales ya que son productores de oxígeno, captan el dióxido de carbono, filtran el ruido, regulan la temperatura atmosférica y son hospederos naturales de una gran variedad de seres vivos. La evolución biológica y

conservación de los encinos afecta de manera directa a todos los demás seres vivos que en ellos habitan (Arizaga et al., 2009).

2.1.5 Amenazas y Enfermedades

Martínez (1981), y González-Espinosa et al. (2012), mencionan que la principal amenaza hacia las zonas boscosas donde habitan muchas especies de encinos es el cambio de uso del suelo para actividades agrícolas, ganaderas o urbanas, reduciendo estos ecosistemas a pequeños fragmentos. Además, de las actividades antropogénicas, los encinares también se han visto disminuidos debido a causas naturales como la temperatura, el clima, la sequía, (Challenger, 1998).

Los agentes fitopatógenos representan un serio problema a nivel mundial, debido a la afectación que producen en los encinares (Sosa-Ramírez et al., 2011). Ejemplo de ello tenemos que, de acuerdo a la Sociedad Internacional de Arboricultura Hispana (ISA), una de las enfermedades más destructivas del encino, en los Estados Unidos, es el marchitamiento causada por el hongo *Ceratocystis fagacearum*, el cual debilita el sistema conductor del agua. Así mismo, *Phytophthora cinnamomi*, reportado en México, produjo en el 2001 una extensa muerte de bosques en los estados de Colima, Jalisco y Guerrero (Alvarado et al., 2007). Por otro lado, un estudio realizado por Alvarado et al. (2007), encontraron que el patógeno *P. cinnamomi*, debido a su incidencia, fue considerado como uno de los principales factores en la muerte de encinos particularmente en el estado de Colima y Jalisco, además, que *Hypoxylon antropunctatum* tiene una mayor incidencia en Nayarit y Aguascalientes. También, concluyeron que factores ambientales eran causantes de estrés y muerte en algunos casos.

A nivel local Moreno et al. (2010), realizaron un estudio en la Sierra Fría de Aguascalientes para determinar las principales enfermedades en encinos encontrándose como principales causantes de cancrrosis a *Phellinus robustus*, *Phellinus gilvus* y *Phellinus everhartii*. Encontraron a *Ganoderma lucidum* en arboles jóvenes y maduros, asimismo, a *Biscognauxia atopunctata* e *Hypoxylon thouarsianum* como hongos oportunistas y de baja patogenicidad. Una problemática importante relacionada con este género es que

desde hace tiempo y especialmente en los últimos años el número de encinares ha disminuido drásticamente, reportándose como un problema de etiología compleja asociada a diversas causas que deterioran al árbol.

2.2 CERAMBÍCIDOS BARRENADORES

2.2.1 *Megapurpuricenus magnificus* LECONTE (COLEÓPTERA: CERAMBYCIDAE)

Respecto a la familia Cerambycidae, Noguera (2014) reporta que existen alrededor de 35000 especies descritas en el mundo actualmente. Sin embargo, sólo se conocen 5000 especies barrenadoras de plantas. Estos coleópteros poseen una longitud promedio que va de los 3 hasta más de 120 mm, se caracterizan por tener un cuerpo alargado y cilíndrico con antenas sumamente largas. Su ciclo de vida lo llevan principalmente como larva ya que como adultos solo viven pocos días que aprovechan para dispersarse y reproducirse. En su estado de larva barrenan la madera, produciendo daños en bosques y árboles frutales (Noguera y Chemsak, 1996).

Poco se ha estudiado con respecto al ataque de cerambícidos en encinos vivos. En un estudio realizado en Nuevo León por Cibrián et al. (1995), reportaron a *Tylcus harwegii* (White) alimentándose de ramas de *Quercus* sp. Terrón (1991), en el estado de Durango, reportó tres especies de cerambícidos tanto en árboles muertos como en descomposición. Por otro lado, Sánchez-Martínez et al. (2010), reportaron al insecto barrenador *Megapurpuricenus magnificus* (anteriormente *Crioprosopus magnificus*) (Figura 3 A, B y C), afectando a encinos vivos (*Quercus* sp.), en la Sierra Fría de Aguascalientes siendo un nuevo registro geográfico para la especie ya que sólo había sido reportado de manera general en el estado de Arizona EE.UU. y en Sonora, México (Hovore, 1983). Se ha observado que a partir de las galerías formadas por *M. magnificus* se desarrolla manchado de la madera misma que puede abarcar tanto la albura como el duramen, lo cual es motivo de este trabajo.

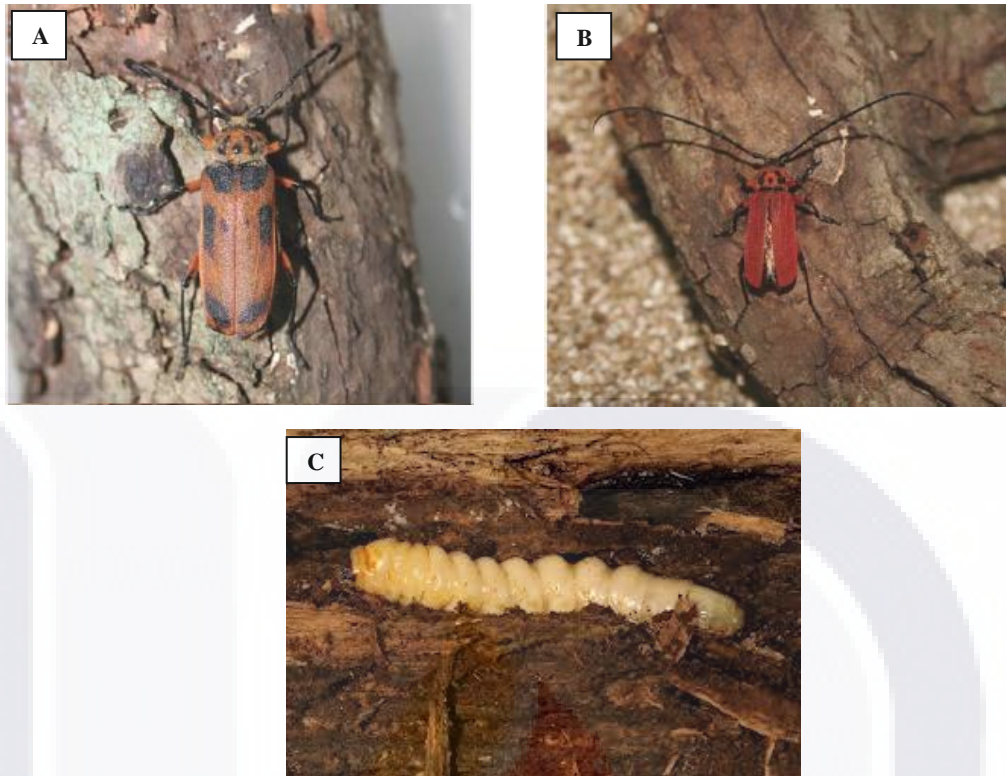


Figura 3. *M. magnificus*. A) Adulto hembra, B) Adulto macho y C) Larva (de Sánchez-Martínez et al., 2008, con autorización)

2.2.2 Síntomas en los arboles

Los árboles atacados por este insecto presentan sobre el fuste o corteza orificios ovalados, los cuales son los sitios de entrada que la larva produce (Figura 4 A). A partir de estos orificios puede apreciarse que se forman manchas oscuras debido a que la larva expulsa una masa de aserrín digerida y húmeda que cae al suelo. En la base del árbol se puede apreciar montones de aserrín, que en ocasiones son difíciles de apreciar por la presencia de hojarasca (Figura 4 B). Estos montones de aserrín son indicativo del estadio en el que se encuentra el desarrollo de la larva (Sánchez-Martínez et al., 2014).

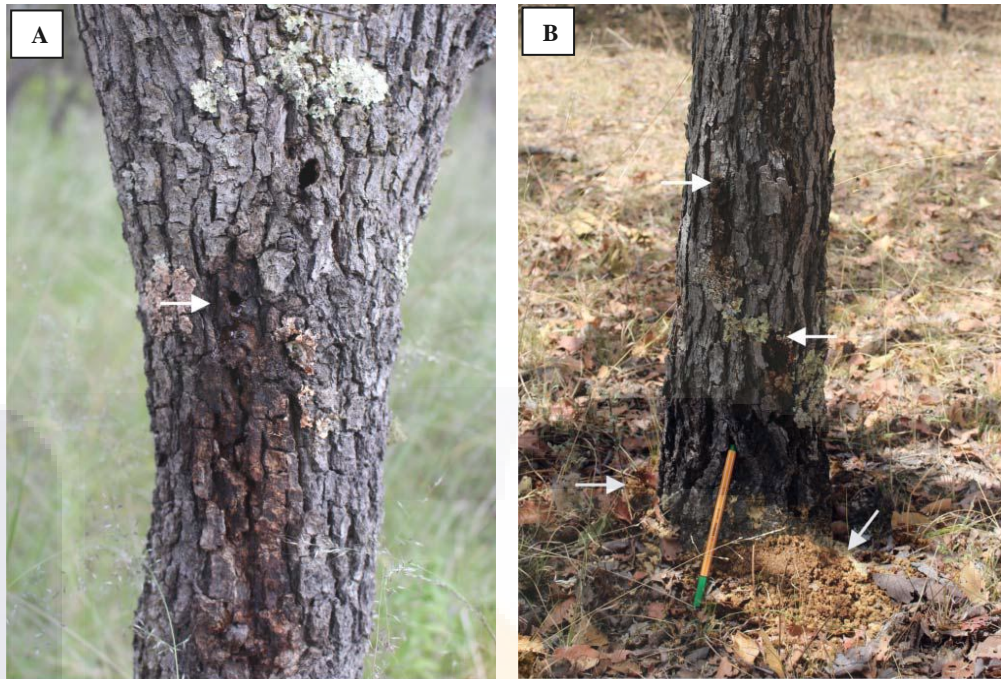


Figura 4. Síntomas, en *Q. potosina*, causados por larvas de *M. magnificus*. A) Manchas oscuras y escurrimientos de aserrín proveniente del orificio, B) Montón de aserrín en la base del árbol, orificios y manchas a lo largo del fuste indicados por las flechas (de Sánchez-Martínez et al., 2014, con autorización)

A consecuencia del ataque de estas larvas los árboles presentan muerte descendente, defoliación y ramas muertas en las copas. Los árboles o ramas pueden romperse y caer por factores abióticos y por la actividad pecuaria. Para conocer detalles sobre la descripción de esta especie, su ciclo de vida, proceso de ataque, las especies hospederas y su distribución geográfica se puede consultar el trabajo realizado por Sánchez-Martínez et al. (2014).

2.3 MANCHADO DE LA MADERA

El manchado de la madera puede tener diferentes orígenes bióticos, la causa más frecuente es el manchado ocasionado por hongos, ya que, alrededor de 100 a 250 especies, pertenecientes a los ascomicetos y deuteromicetos, pueden ser la causa de la misma, principalmente los relacionados con insectos descortezadores de pináceas (Williams, 2005; Schmidt, 2006). El manchado de la madera ocurre de forma radial, en la albura, tomando diferentes tonalidades desde el azul hasta el negro (Figura 5). Baldini y Pancel

(2000), mencionan, que trozas de madera llegan a ser colonizadas por los hongos del manchado después de cortado el árbol, sin embargo, el manchado también puede presentarse en árboles en pie y como ejemplo citan a la mancha mariposa de la Tepa (Tepa butterfly stain).

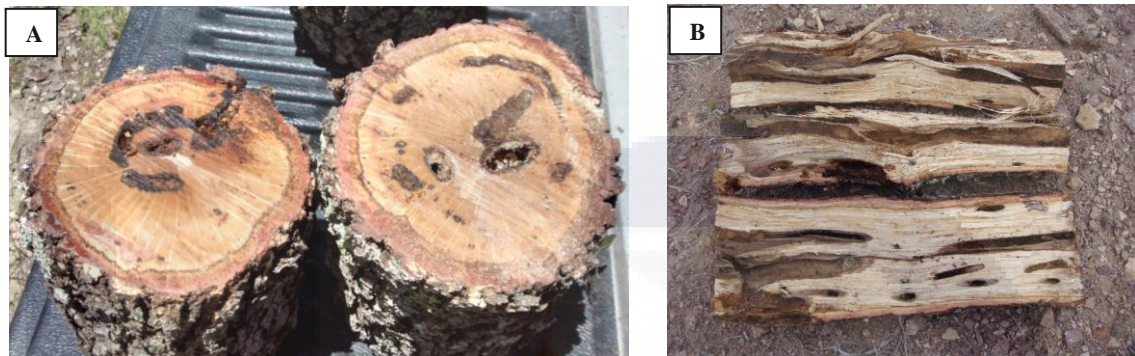


Figura 5. Trozas de *Quercus potosina* que muestran los daños de *M. magnificus* con manchado de la madera A) Corte horizontal y B) Corte longitudinal (Fotografías propias)

Las hifas de estos hongos penetran en la madera por medio de las secciones transversales o radiales en las fisuras de la corteza y pasan a través de los rayos medulares. Los nutrientes del parénquima son tomados por los hongos. Una vez colonizadas las células de los rayos, por medio de presión mecánica, las hifas penetran en las traqueidas longitudinales a través de las puntuaciones y allí se desarrollan (Schmidt, 2006). Ballard y Walsh (1984), describieron algo similar en cuanto a la penetración y crecimiento de hongos del manchado, donde observaron que las hifas se limitan inicialmente en los rayos de la albura y que posteriormente pasan a los rayos medulares. Con el tiempo penetran en las traqueidas por medio de unas estructuras llamadas apresorios y ya estando ahí, crecen de manera longitudinal. Aunado a esta invasión, mencionan que el estrés hídrico llega a causar la muerte de los árboles, estudio que realizaron sobre madera de pino atacado por escarabajos descortezadores. En relación con la mortalidad de los árboles, esta habilidad de los hongos de invadir la albura se considera como la característica más importante, inclusive más importante que la habilidad que tienen de producir lesiones necróticas en la corteza interna (Yamaoka, 2004).

Las propiedades físicas, mecánicas y de resistencia de la madera no se ven afectadas por los hongos del manchado azul, sin embargo, producen una coloración inaceptable en madera de alta calidad que tiene como consecuencia importantes pérdidas por ventas a un menor precio. Esto quiere decir que, además de que pueden matar a los árboles, el problema que causan estos hongos también puede ser cosmético. Por otro lado, cuando se aplican tintes o barnices hay problemas de que no quede bien este trabajo debido a que la permeabilidad de la madera no es pareja (Schmidt, 2006).

En cuanto al manchado en madera de encinos Przybyl (2006), realizó un estudio acerca de los hongos y minerales contenidos en el duramen decolorado en árboles de *Quercus robur* clasificando la decoloración del duramen dependiendo de la intensidad en dos grupos: manchado café y manchado oscuro. Los resultados que obtuvo en cuanto al aislamiento de los hongos en el duramen de manchado café fue de un total de 31 especies destacando a *Chalara* sp., *Ophiostoma quercus* (Münch) H. et P. Sydow y *Sporothrix* sp. que son pertenecientes al grupo de los Ophiostomatales. En cuanto a los resultados en el duramen de manchado oscuro se obtuvo un total de 22 especies destacando nuevamente a *Chalara* sp. y *Ophiostoma quercus* (Münch) H. et P. Sydow.

Por otro lado, Belhoucine et al. (2011), realizaron un estudio acerca de la microbiota asociada a *Platypus cylindrus* (Coleptera: Curculionidae, *Platypodidae*) en los encinos del noreste de Argelia, África. A partir de 270 muestras tomadas de 3 recursos: galerías (30), micangios y contenido intestinal de insectos tanto macho como hembra, así como del contenido intestinal de larvas maduras (60 de cada uno), obtuvieron como resultado la presencia de 42 especies de hongos ambrosiales, de las cuales 17 son nuevas en esta asociación. La micetofagia de estos escarabajos es muy rica y consistente, especialmente de Ophiostomatales. También fueron aislados otros grupos de hongos que jugaron diferentes roles: entomopatogénicos, antagonistas, saprófitos pero especialmente los patogénicos para el árbol huésped. Este grupo consiste en muchas especies, además su diseminación por insectos aunada a la inoculación en los árboles puede tener consecuencias fatales por la aceleración del ciclo de declinamiento de los árboles afectados.

Es necesario entender la biología de las especies de hongos involucradas, así como el posible papel del descortezador o barrenador como vector durante el proceso de infección, para un control efectivo de la mancha azul (Zhou, 2002). Las especies del género *Ophiostoma* son los hongos habitualmente asociados a los descortezadores que tienen importancia económica, puesto que causan la mancha azul de la madera y/o la mortalidad en coníferas (Zhou, 2002; Lim et al., 2004).

2.4 HONGOS OPHIOSTOMATOIDES

De acuerdo con Agrios (2005), y Romero (1996), los hongos son organismos que tienen células con núcleo (eucariontes), sin clorofila, con cuerpo generalmente filamentososo, que se reproduce sexual y asexualmente mediante esporas, que pueden vivir como parásitos o saprófitos y que requieren de otros seres vivos para obtener su alimento. Sus células poseen una pared gruesa de un compuesto llamado quitina, el cual les provee rigidez y resistencia. La mayoría son pluricelulares y sus cuerpos están constituidos por filamentos tubulares microscópicos, denominados hifas, que se ramifican y entrecruzan. Un conjunto de hifas se conoce como micelio. La mayoría se alimentan de material orgánico, otros son parásitos y algunos son depredadores. Durante la reproducción sexual o asexual, los hongos producen esporas que permiten su dispersión hacia nuevos lugares o les ayudan a sobrevivir en condiciones adversas, como deshidratación o congelación.

Zhou (2002), y Romon et al. (2007), señalan que los hongos ophiostomatoides actualmente están agrupados en géneros con morfología similar, incluyendo *Ophiostoma*, *Ceratocystis*, *Ceratocystiopsis*, *Gondwanamyces*, y *Cornuvesica*. A pesar de ser morfológicamente similares, estos géneros son relativamente distantes filogenéticamente. Los anamorfos asociados con estos géneros son: *Pesotum*, *Leptographium*, *Sporothrix*, *Thielaviopsis*, *Hyalorhinocladiella*, *Knoxdaviesia*, y *Xenochalara*. Estos géneros representan dos grandes grupos filogenéticamente no relacionados, uno con *Ophiostoma* perteneciente al orden Ophiostomatales y el otro con *Ceratocystis* del orden Microascales. La mayoría de los ascomicetos, incluido el género *Ophiostoma*, se caracterizan por tener un ciclo de vida que incluye dos estados reproductivos: el sexual (teleomorfo), y el asexual (anamorfo). En el estado sexual las ascosporas se producen en ascas que están

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

contenidas dentro de un cuerpo fructífero, llamado peritecio (Figura 6). En la forma asexual, el micelio haploide vegetativo produce uno o dos tipos de conidióforos portando esporas asexuales (conidios), que germinan para producir micelio haploide (Lim et al., 2004). Los hongos ophiostomatoides son agrupados colectivamente como ascomicetos con peritecio de cuello largo, asca evanescente y ascosporas hialinas que carecen de poros o ranuras, además de que todas estas especies parecen ser dispersadas por artrópodos (Zhou, 2002).

El género *Ceratocystis* se diferencia de otros hongos ophiostomatoides por su peritecio oscuro y de forma globosa en la base, su anamorfo *Thielaviopsis* (= *Chalara*) típicos, así como la susceptibilidad a la cicloheximida, que es un antibiótico que impide la síntesis de proteínas en la mayoría de los eucariotas (Harrington, 1981; Loppnau y Breuil, 2003). A diferencia de *Ceratocystis* el género *Ophiostoma* y sus anamorfos *Pesotum* (= *Graphium*), *Leptographium*, *Sporothrix* y *Hyalorhinocladiella*, si resisten a la cicloheximida ya que sus paredes están recubiertas por celulosa, quitina y ramnosa; siendo este un criterio de identificación cuando se siembran en medios de cultivo artificiales que contienen dicho antibiótico. En cambio, *Ceratocystiopsis* se distingue por que sus ascosporas son falcadas, es decir, tienen forma de huso alargado (Jakobs, 1999; Jakobs y Wingfield, 2001).

La mayor parte de los hongos ophiostomatoides producen sus ascosporas en una gotita de líquido pegajoso en la punta del ostiolo del cuello del peritecio (Figura 7), que parece ayudar a que las esporas se adhieran a la superficie del vector. Los hongos ophiostomatoides producen una gran variedad de anamorfos (Figura 8), a menudo incluso dentro de la misma especie (Wingfield et al., 1993).

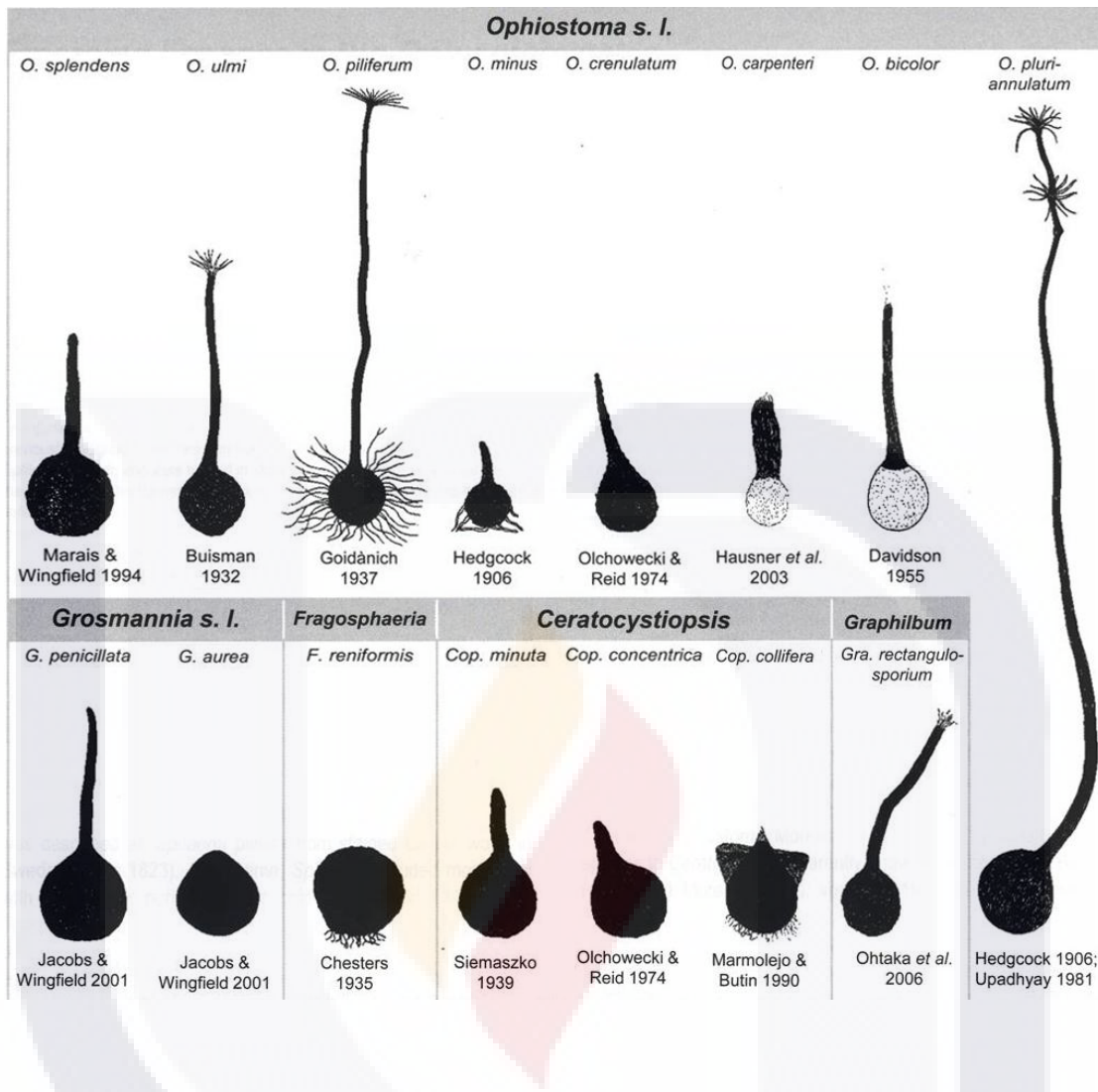


Figura 6. Ascomata representativos del orden Ophiostomatales (Tomado de Seifert et al., 2013)

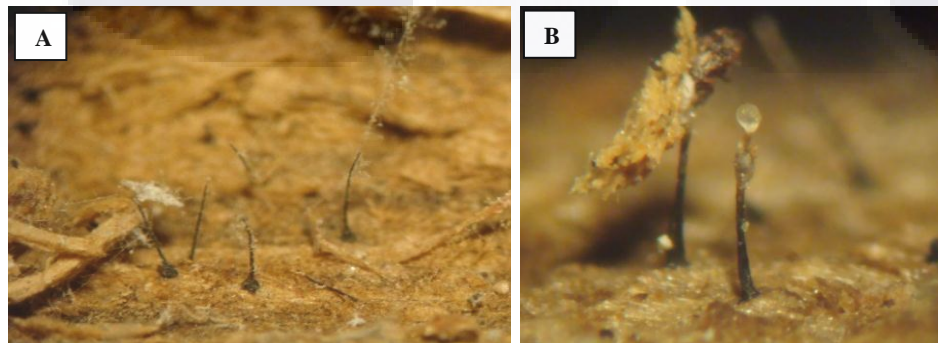


Figura 7. Peritecios de un hongo ophiostomatoide. A) Ascosporas acumuladas en el ápice del cuello del peritecio, B) Detalle de dos peritecios. (Fotografías propias)

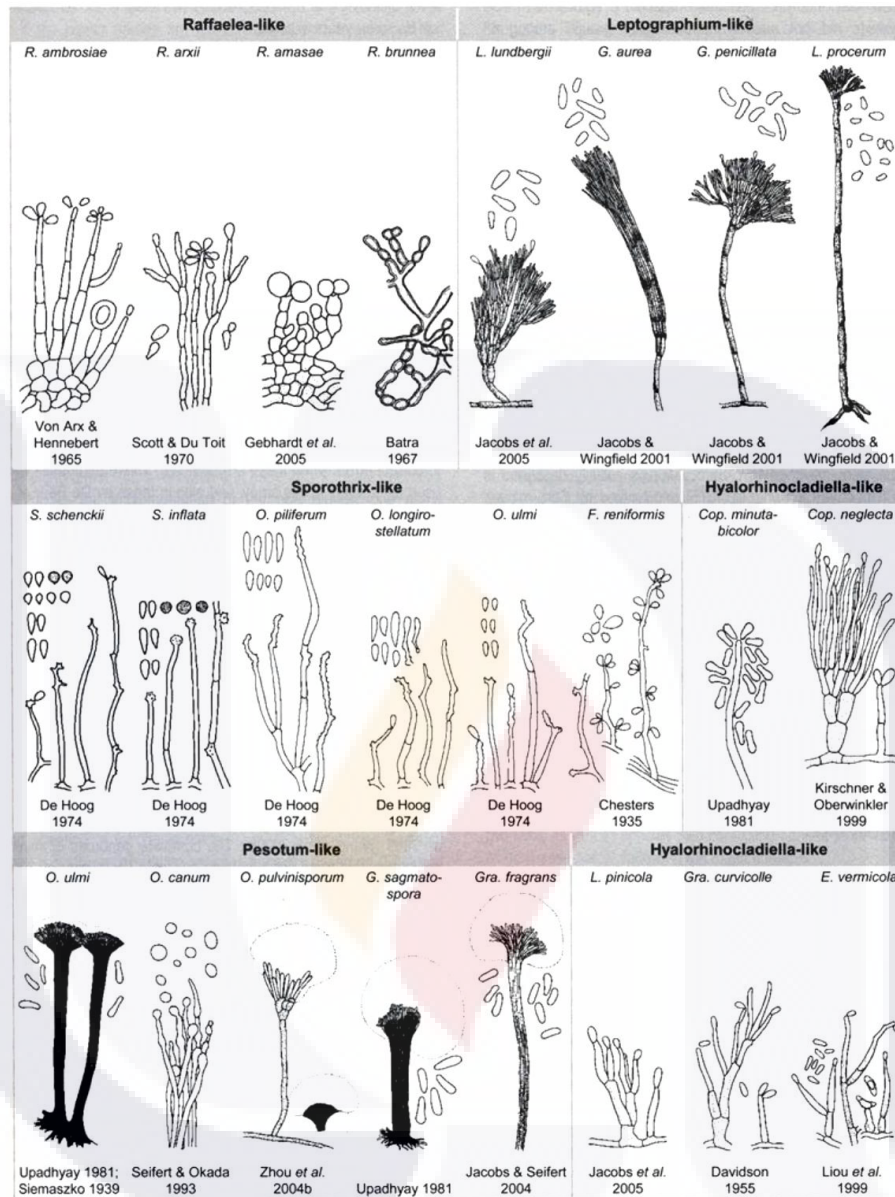


Figura 8. Géneros de anomorfos del orden Ophiostomatales (Tomado de Seifert et al., 2013)

2.4.1 Asociación hongos-insectos

Los insectos de la corteza comúnmente forman asociaciones con hongos, especialmente aquellos que pertenecen al filo Ascomycota; en estas asociaciones puede existir una relación de comensalismo, antagonismo, ya sea obligado o facultativo (Pérez-Vera, 2009).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Sin embargo, Repe y Jurc (2010), señalan que este tipo de asociaciones son mutualistas, es decir, ambos organismos se benefician ya que el hongo constituye una fuente de alimento para el insecto, un beneficio adicional, podría ser que los hongos que crecen en la albura reducen el contenido de humedad de los árboles a un nivel adecuado para el desarrollo de la cría del escarabajo, no obstante, que los hongos son beneficiados al ser dispersados hacia nuevos hospederos.

Existen adaptaciones tanto por parte de estos hongos como de los insectos para transportar y ser transportados, los hongos ophiostomatoides producen masas de conidios, que se desarrollan en las galerías y cámaras de pupación de los escarabajos y que se adhieren fácilmente sobre el cuerpo de los insectos. Por otro lado, algunos insectos desarrollaron estructuras especializadas llamadas micangias en donde transportan las esporas de estos hongos (Ruiz y Lanfranco, 2008). En otro sentido, Repe y Jurc (2010), describen a las micangias como estructuras asociadas con glándulas y células secretorias que son usadas para el almacenamiento, transporte y transmisión de hongos. Estas micangias llegan a estar localizadas en ciertas partes del cuerpo como la mandíbula, élitros y tórax (Jaramillo et al., 2011).

2.4.2 Marchitamiento vascular

La enfermedad vascular ocurre en todo el mundo, llegando a afectar tanto a árboles anuales como perennes. Agrios (2005), cita que la mayoría de los síntomas causados por patógenos de la enfermedad vascular se desarrolla en una dirección acropétalo, es decir, de abajo hacia arriba. Como principal síntoma se presenta la epinastía, seguido por flacidez, clorosis, pardeamiento vascular y necrosis en las nervaduras terminales.

El sistema vascular de árboles vivos se ve afectado, lo que lleva a la interrupción del transporte de agua y como consecuencia, en casos muy severos, la muerte del árbol. Al comienzo de la infección los hongos se desarrollan en los vasos del xilema, pero cuando los tejidos del huésped se necrosan llegan también, a ser colonizados (Yadeta y Thomma, 2013). *Ceratocystis* es considerado como uno de los hongos más importantes que causan enfermedades vasculares en una gran variedad de plantas herbáceas. Las enfermedades más sobresalientes y que reciben una mayor atención son la marchitez en encinos y la

enfermedad del olmo holandés causada por *Ophiostoma ulmi* y *O. novo-ulmi*, que son diseminadas, principalmente, por escarabajos (Snyder y Nash, 1981).

Martín (2006), comparó características anatómicas de *Ulmus minor* Mill., relacionadas con la resistencia a *Ophiostoma novo-ulmi*, encontrando que existen variaciones anatómicas significativas a la susceptibilidad de este hongo. Concluyó que un menor diámetro medio de los vasos, una menor conductancia hidráulica y una menor proporción de vasos de grandes dimensiones en la madera se asocian con mayores niveles de resistencia. Por otro lado, Martín et al. (2008), demostraron, que el carvacrol y el ácido salicílico sugieren una actividad antifúngica, *in vitro*, contra *O. novo-ulmi* observándose una disminución en los síntomas foliares en *Ulmus minor* tratados con estos compuestos.

3. JUSTIFICACIÓN

La Sierra Fría de Aguascalientes declarada como área natural protegida por el Gobierno del Estado en 1994 está constituida en su mayoría, por bosques de clima templado y de montaña, en el que habitan los encinos, formando complejos con otras especies de árboles. Cabe resaltar la importancia de los servicios ecosistémicos que los encinos aportan, Sosa et al. (2014), señalan que estas especies intervienen en el ciclo hídrico regulando así la temperatura climática, pero sobre todo, recargan de manera constante los mantos acuíferos de la entidad de Aguascalientes. Desde el punto de vista económico los encinos son aprovechados como combustibles (carbón vegetal, leña, etc.), no sólo en el estado de Aguascalientes sino, también, en Guanajuato, Jalisco y Querétaro (Sánchez-Martínez et al., 2014).

El declinamiento de los encinos ha sido considerado un problema importante a nivel mundial, debido a que, factores multivariados son los responsables de demeritar la salud del arbolado, haciéndolos susceptibles a organismos patógenos y oportunistas (Romo et al., 2007).

No obstante que los hongos son la causa más importante de enfermedades en las plantas (Gibson y Salinas, 1985; Manion, 1991), los insectos también causan daños considerables

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

a los encinos, tales como la barrenación de ramas, fustes y raíces. Es importante conocer los hongos Ophiostomatoideos que se encuentran en los encinos de la Sierra Fría de Aguascalientes ya que son los causantes de la marchitez vascular, enfermedad en la que los vasos xilémicos y otros órganos afectados, son obstruidos por el micelio, las esporas o bien los polisacáridos que produce el hongo. Esta obstrucción se incrementa aún más por los geles y gomas que forman por la acumulación y oxidación de los productos de degradación de las células vegetales atacadas por las enzimas del hongo. Dando como resultado la poca o nula absorción de nutrientes a la planta produciéndose así, la muerte de los árboles (Agrios, 2005).

Los insectos barrenadores de encinos son factores que en conjunto con los hongos ophiostomatoideos contribuyen a la declinación de la salud de los árboles, ya que, además de producir un daño mecánico, actúan como vectores de estos hongos hacia nuevos hospederos. Además de causar bloqueo vascular y muerte de los árboles, como efecto secundario estos hongos producen el manchado de la madera lo que demerita su valor comercial. Cabe señalar que la Sierra Fría, además, de ser un área natural protegida, es una zona en donde se llevan a cabo programas de recreación, tales como la caza y pesca legal, el senderismo, camping, entre otros, por esta razón es importante priorizar la seguridad de las personas que ahí trabajan y de las personas que visitan, debido a la constante amenaza de que los árboles debilitados o moribundos puedan caer. Por lo anterior, el presente estudio pretende proporcionar los conocimientos necesarios que permitan la correcta identificación y diagnóstico de los agentes fitopatógenos causantes del manchado de la madera en los encinos así como las características y consecuencias ecológicas provenientes de la interacción directa entre lo anteriormente mencionado y el insecto *Megapurpuricenus magnificus*, siendo considerados como dos de los principales agentes en la actual disminución poblacional de encinos en la Sierra Fría de Aguascalientes.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar a los hongos ophiostomatoides que causan el manchado de la madera de los encinos de la Sierra Fría en Aguascalientes y analizar su relación con las galerías del barrenador *Megapurpuricenus magnificus*.

4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO (S):

- 1.- Aislar a los hongos que se encuentran en la madera de encino manchada en la periferia de las galerías de *Megapurpuricenus magnificus*.
- 2.- Identificar los hongos de la madera de encino mediante claves artificiales (estudios morfométricos) y análisis de ADN.
- 3.- Verificar por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), la presencia de estructuras de hongos en insectos hembra adultos de *Megapurpuricenus magnificus*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Área de estudio

El presente estudio se realizó en la parte occidental del estado de Aguascalientes, entre los 22° 05" y 22° 15" de latitud norte y los 102° 32" y 102° 38" de longitud oeste. Esta área se encuentra dentro de la provincia fisiográfica Sierra Madre Occidental. La zona de estudio incluye las áreas ocupadas por encino en el estado de Aguascalientes, y se localizan principalmente en la Sierra Fría, que se extiende hasta el estado de Zacatecas, formando bosques en asociación con *Pinus* sp., *Juniperus* sp. y escasamente con *Cupressus* sp. (Figura 9).

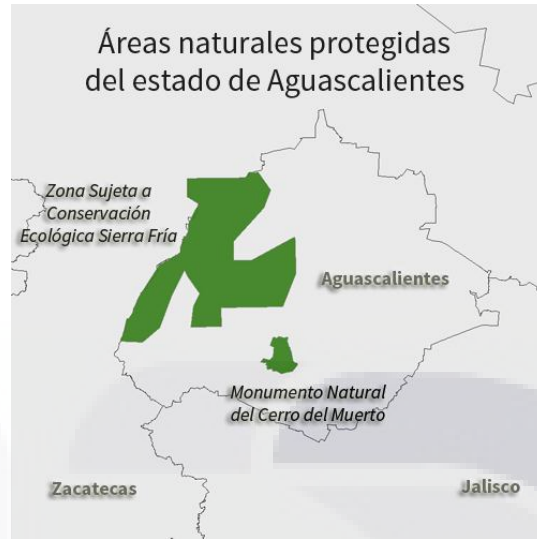


Figura 9. Sierra Fria, Aguascalientes. Fuente Gobierno del Estado de Aguascalientes

5.2 Selección de las muestras de madera

Se seleccionaron muestras (30 cm de longitud) de tallos de *Quercus potosina* que presentaban, a simple vista sobre el fuste, orificios de alimentación y manchas de las que sobresalía una masa de aserrín húmedo producidas por la larva de *M. magnificus* (Figura 10 A y B). Las muestras fueron cortadas longitudinalmente, con un corta trozas (Figura 10 C), para exponer las galerías y manchado de la madera. Estas fueron fotografiadas para tener un registro de los daños (Figura 10 D). Las trozas fueron transportadas al laboratorio del departamento de Microbiología, Centro de Ciencias Básicas, de la Universidad Autónoma de Aguascalientes para su revisión.



Figura 10. A y B) Orificio de alimentación producido por la larva de *M. magnificus*, C) Sección de las muestras con un cortatrozas, D) Exposición de los daños sobre las muestras

5.3 Aislamiento de los hongos

5.3.1 A partir del tejido de encino manchado

Con un bisturí se cortaron secciones de tejido (4 x 4 mm), del límite de avance de las manchas, los cuales fueron desinfectados en una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 1 o 2 minutos. Posteriormente, en condiciones asépticas, se enjuagaron dos veces en agua destilada estéril, se secaron en papel estéril (sanitas) y se sembraron en extracto de malta agar (Agar 20.0 g, Dextrosa 10.0 g, Extracto de levadura 3.0 g, Extracto de malta 3.0 g, Peptona 5.0 g por cada litro de agua destilada. Apéndice B), al que se le añadieron los antibióticos estreptomomicina, cloranfenicol o cicloheximida a una concentración de 500 mg/l. Las cajas sembradas fueron incubadas a 22 °C por 7-21 días en condiciones de

obscuridad. Transcurrido ese lapso de tiempo, los hongos fueron purificados mediante punta de hifa dejándose en incubación a 22 °C durante 7-21 días (Agrios, 2005; Wingfield et al., 1993).

5.4 Identificación de los hongos

5.4.1 Identificación morfológica a partir de las galerías en madera de encino

Se procesaron las trozas de un total de 25 árboles de *Q. potosina*, obtenidos de diferentes sitios de la Sierra Fría de Aguascalientes, con galerías de *M. magnificus*. Con el auxilio de un microscopio estereoscópico se observó, dentro de las galerías, la presencia de estructuras fúngicas a las que se les tomaron fotografías. Además, se realizaron preparaciones semipermanentes, colocándolas entre porta y cubreobjetos con azul de algodón y lactofenol. Posteriormente, se midieron con una reglilla micrométrica colocada en el ocular de un microscopio compuesto Carl Zeiss y con el programa Leica Qwin Pro V.2.8. A partir de las estructuras observadas se procedió a identificarlos utilizando la bibliografía especializada (Barnet y Hunter, 1999; Cibrián et al., 2007; Hunt, 1956; Jacobs y Wingfield, 2001; Upadhyay, 1981; Wingfield et al., 1993; Zhou, 2002; Zhou et al., 2004; Zipfel et al., 2006).

5.4.2 Identificación morfológica a partir de los aislados

Una vez obtenidos los aislados se observaron sus características macro y microscópicas, para ello, se tomó con una aguja de insulina estéril una pequeña porción del micelio y se colocó entre porta y cubreobjetos con azul de algodón y lactofenol, para eliminar las burbujas y aclarar el tejido se calentó con ayuda de un mechero de Bunsen, posteriormente, se procedió a observar las preparaciones bajo el microscopio óptico compuesto. A partir de las estructuras observadas se procedió a identificarlos utilizando la bibliografía especializada como en la sección 5.4.1.

5.4.3 Identificación mediante análisis genéticos

La identificación molecular se llevó a cabo en el mes de mayo del 2015 en el Centro de Biotecnología Genómica del IPN en Reynosa, Tamaulipas y que incluyó la extracción,

amplificación, purificación y secuenciación del ADN. Para obtener micelio para la identificación molecular se transfirió inóculo de micelio de los cultivos puros a nuevas cajas de petri y en tubos con medio líquido de EM (Extracto de Malta) y EMA (Extracto de Malta Agar) al 2% y se incubaron a 22 °C hasta que cubrieron por completo la caja de petri o los tubos con el medio líquido.

5.4.3.1 Extracción de ADN

En la extracción del ADN genómico se siguió el método de Cloroformo Octanol (24:1) de Reader y Broadar (1985) modificado, donde los tubos con la biomasa se colocaron en nitrógeno líquido por 20 min, después se maceró y homogenizó la muestra. Se agregaron 500 µl de buffer de extracción (Tris-HCL 200 mM, pH 8.5, NaCl 200 mM, EDTA 25 mM y SDS 0.5%), se homogenizaron la muestras y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Enseguida se agregaron 500 µl de cloroformo octanol (24:1) y se agitó por 5 min. Se centrifugó a 13000 rpm/30 min, la fase acuosa es pasada a un nuevo tubo al que se le agregan 400 µl de cloroformo octanol (24:1). Se repitió la fase de centrifugación y separación del sobrenadante, hasta obtener una muestra lo más limpia posible. Se agregó 4 µl de RNAsa (20 mg/ml) y se incubó en un termomixer a 37 °C por 30 min. Para precipitar el ADN se añadieron 500 µl de isopropanol, se mezcló e incubó a -20 °C por 30 min. Posteriormente, se centrifugó a 13000 rpm/5 min y se desechó el sobrenadante, para lavar la pastilla de ADN se agregó Etanol al 70%, se volvió a centrifugar y desechar el sobrenadante, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en agua libre de nucleasas. Se almacenó a -20 °C hasta su uso.

5.4.3.2 Visualización del DNA por electroforesis

El ADN se procede a visualizarlo en un gel de agarosa al 1% (Apéndice B), adicionando 2.0 µL sybr green y 5 µL de cada muestra, el gel se corre en una cámara de electroforesis horizontal (Bio- Rad) a 100 volts por 45 min (Figura 11). Se visualiza el gel en el trasiluminador de luz ultravioleta, captando la imagen del gel en el programa Kodak digital Science™ 1D (Narváez et al., 2010).

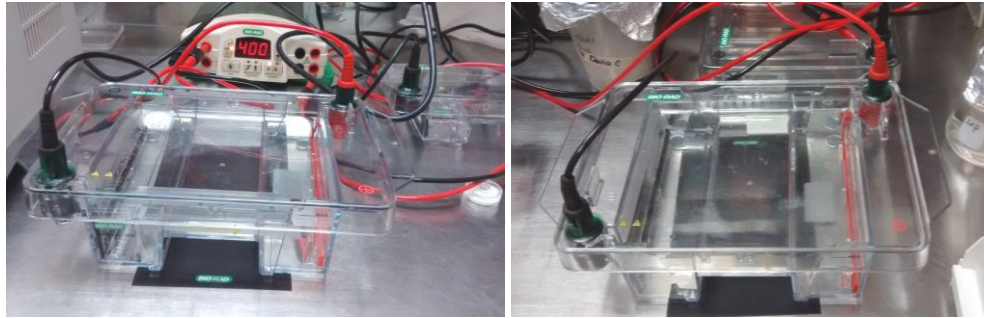


Figura 11. Cámara de electroforesis Bio-Rad

5.4.2.3 Amplificación del espaciador transcribible interno (ITS)

La amplificación del espaciador ITS (espaciador transcribible interno) del ADNr de los hongos, consistió en realizar las reacciones de PCR en un volumen final de 50 μL , utilizando 1.5 μL del DNA genómico, 5 μL de Buffer 10X (concentración final a 1X. Apéndice B), 1.5 μL de cloruro de magnesio de 50 mM (final 3 mM), 1 μL de dNTPs 10 mM (0.2 mM), 1 μL de cada uno de los primers. Los primers utilizados fueron ITS 1 Forward (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') y ITS 4 Reverse (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (Figura 12 A), 5 μM (final 0.1 μM) y 0.4 μL de la enzima Taq DNA polimerasa 5 U/ μL (Apéndice B) y completando el volumen a 50 μL con agua milliQ estéril (White et al., 1990). El programa que se utilizó consistió de 1 ciclo de 3 min a 94 $^{\circ}\text{C}$ y 35 ciclos de 1 min a 94 $^{\circ}\text{C}$, 1min a 53 $^{\circ}\text{C}$ y 1 min a 72 $^{\circ}\text{C}$. Finalmente se dio un paso de extensión final de 1 min a 72 $^{\circ}\text{C}$, manteniéndose a 4 $^{\circ}\text{C}$. Para obtener finalmente un producto de 600pb. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un equipo Veriti 96 well Thermal Cycler de Applied Biosystems $^{\circ}$. Se procedió a visualizarlo en un gel de agarosa al 1%, adicionando 0.1 μL sybr gold y 0.4 μL de orange se depositaron 5 μL de cada muestra en el gel y se corrió en una cámara de electroforesis horizontal (Bio-Rad) a 80 volts por 1 h. Se visualizó el gel en el tras-iluminador de luz ultravioleta, captando la imagen del gel en el programa Kodak digital ScienceTM 1D (Figura 12 B) (adaptado de Allende et al., 2013).

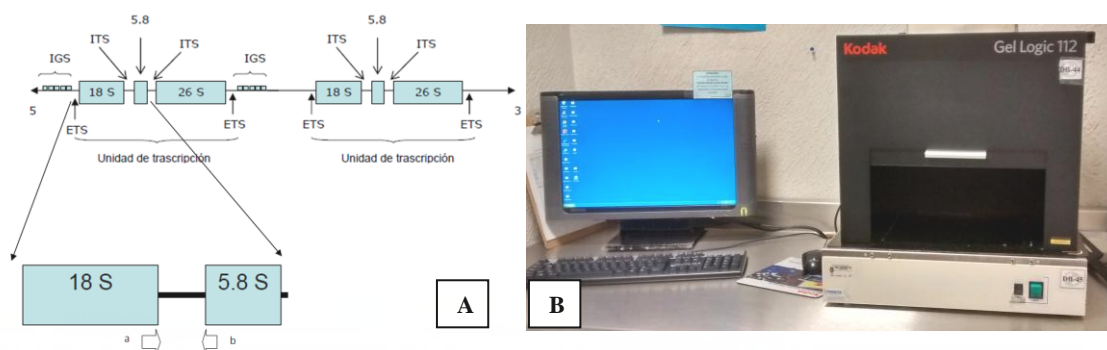


Figura 12. A) Espacio transcribible interno (ITS), B) Programa Kodak digital Science TM 1D

5.4.2.4. Purificación del producto amplificado

El fragmento amplificado se purificó directamente desde la mezcla de reacción utilizando el estuche de purificación ‘Wizard® Plus DNA Purification System’ Promega ®; Madison, WI, EUA. Básicamente, la purificación y amplificación consistió en adicionar 25 µL de ‘Membrane Binding Solution (MBS)’ a 25 µL de la mezcla de PCR que luego se homogenizó por inversión durante 1 min. La mezcla se transfirió a la mini columna donde reposó por 1 min para, posteriormente, centrifugar a 14000 rpm por 1 min. Después, el líquido centrifugado se desechó y la columna se conservó luego agregar 700 µL de ‘Membrane Wash Solution (MWS)’ y así centrifugar a 14000 rpm por 1 min. El líquido se desechó y se adicionó 500 µL de MWS y, nuevamente, se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. La mini columna se transfirió a un tubo nuevo de 2 mL y se centrifugó por 1 min a 14000 rpm. Finalmente, se agregó 40 µL de agua libre de DNasa y se dejó reposar por 2 min para finalmente centrifugar por 1 min a 14000 rpm.

5.4.2.5 Preparación de muestras para la reacción de secuenciación

Para determinar la secuencia nucleotídica se sigue el protocolo descrito en BigDye® XTerminator™ Purification Kit, haciendo uso del espaciador ITS1 e ITS4, enseguida se purificó con la solución SAM ®, del mismo kit comercial. La secuenciación se realizó por electroforesis capilar con un secuenciador automático ABI PRISM 310 (Genetic Analyzer PE Applied Biosystems), en la unidad de Secuenciación del Centro de Biotecnología Genómica del IPN. La secuencia de nucleótidos obtenida se comparó con una búsqueda de

secuencias homólogas usando el algoritmo BLASTX (Altschul et al., 1990), en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information www.ncbi.nlm.nih.gov).

5.4.2.6 Secuenciación del espaciador ITS1 e ITS4

La reacción de secuenciación se realizó en ambas direcciones usando el método de Sanger en un sistema de secuenciación cíclico utilizando en la reacción dideoxinucleótidos fluorocromados del estuche comercial 'Big Dye™ X Terminator Cycle Sequencing Kit' (Applied Biosystems). El procedimiento consistió en tomar 10 µL de la reacción de secuenciación al que se adicionaron 45 µL de solución SAM. Después, se agitó vigorosamente hasta observar una mezcla homogénea; luego, al mismo tubo se añadieron 10 µL de solución Xterminador y, posteriormente, el tubo se agitó fuertemente a 25 °C y 1400 rpm por 30 min. Finalmente, la muestra se centrifugó por 2 min a 12000 rpm. Y el sobrenadante se separó. Las condiciones de reacción de amplificación del espaciador ITS1 consistió de tres segmentos, el primer segmento constó de un ciclo a 96 °C a durante 1 min; el segundo constó de 96 °C por 10 seg, 50 °C durante 5 seg y 60 °C por 1 min durante 25 ciclos; el tercero estuvo conformado por un ciclo de 2 min a 60 °C. Las reacciones fueron finalmente entonces separadas por capilaridad en un secuenciador de DNA automático modelo ABI 3130 (Applied Biosystems) (Sanger et al., 1977).

5.4.2.7 Identificación a nivel de género y especie

Las secuencias que se obtuvieron fueron analizadas con el software CLC Sequence Viewer 7.6 ®, con las secuencias de referencia depositadas en la base de datos del NCBI, se determinó a qué especie de hongo pertenece cada una de las muestras. Usando como criterio el porcentaje de homología entre las secuencias obtenidas de los aislados y las secuencias de referencia del NCBI.

5.5 Microscopía electrónica de barrido (MEB) de insectos hembra adultos

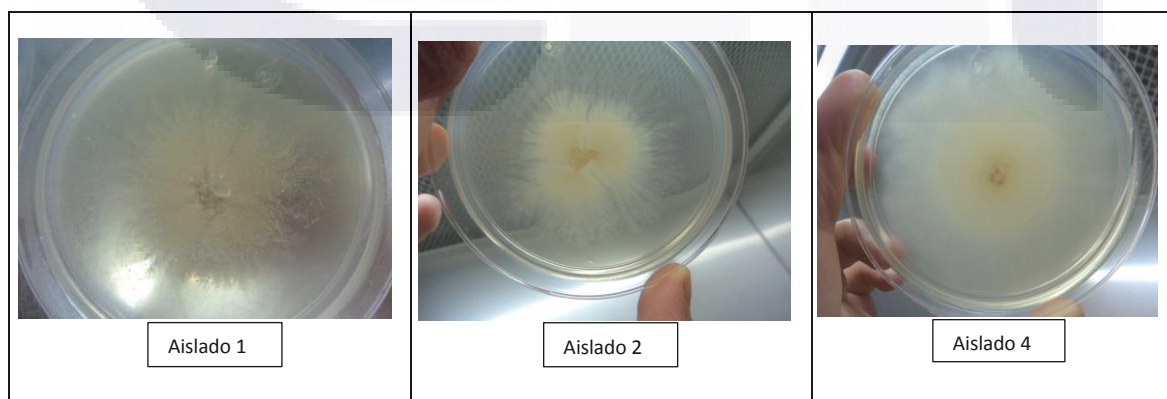
Con la finalidad de observar micelio o esporas de los hongos transportados por insectos hembra adultos de *M. magnificus*, estos fueron colectados en la Sierra Fría durante el mes de junio del 2014, haciendo uso de jaulas de emergencia que consisten en mallas

mosquiteras de 1.0 a 1.5 m, colocadas alrededor de los troncos infestados, teniendo como guía el orificio de alimentación. Secciones del insecto (élitros, patas, ovipositor y cabeza) se fijaron en glutaraldehído al 3% con pH 7.2 durante 24 h. Las muestras se lavaron tres veces con el amortiguador de fosfatos por un minuto. Después, cada muestra se deshidrató en una serie de soluciones graduales de etanol (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%); las últimas tres soluciones dos veces por 15 min en cada una. Las muestras se secaron a punto crítico con CO en una secadora Sandri- 2 780A® (TOUSIMIS Research Corporation, Rockville, EUA), se colocaron sobre un portamuestras usando una cinta doble adhesiva de cobre (o carbón) y se recubrieron con oro durante 4 min. en una ionizadora JFC-1100® (JEOL LTD, Tokio, Japón). Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido JSM-35C® (JEOL LTD, Tokio, Japón), en el laboratorio de Microscopia Electrónica del Departamento de Biología, Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (Dykstra y Reuss, 2003).

6. RESULTADOS

6.1 Aislamiento a partir del tejido de encino manchado

Se tuvieron un total de 11 aislados, 3 de ellos fueron contaminación, (Figura 13), a partir del límite de avance de la lesión en 25 trozas de *Quercus potosina*, 8 de ellas presentaron un micelio blanquecino y de apariencia lustrosa, la apariencia de las hifas en el borde es de forma de abanico como si se ramificaran.



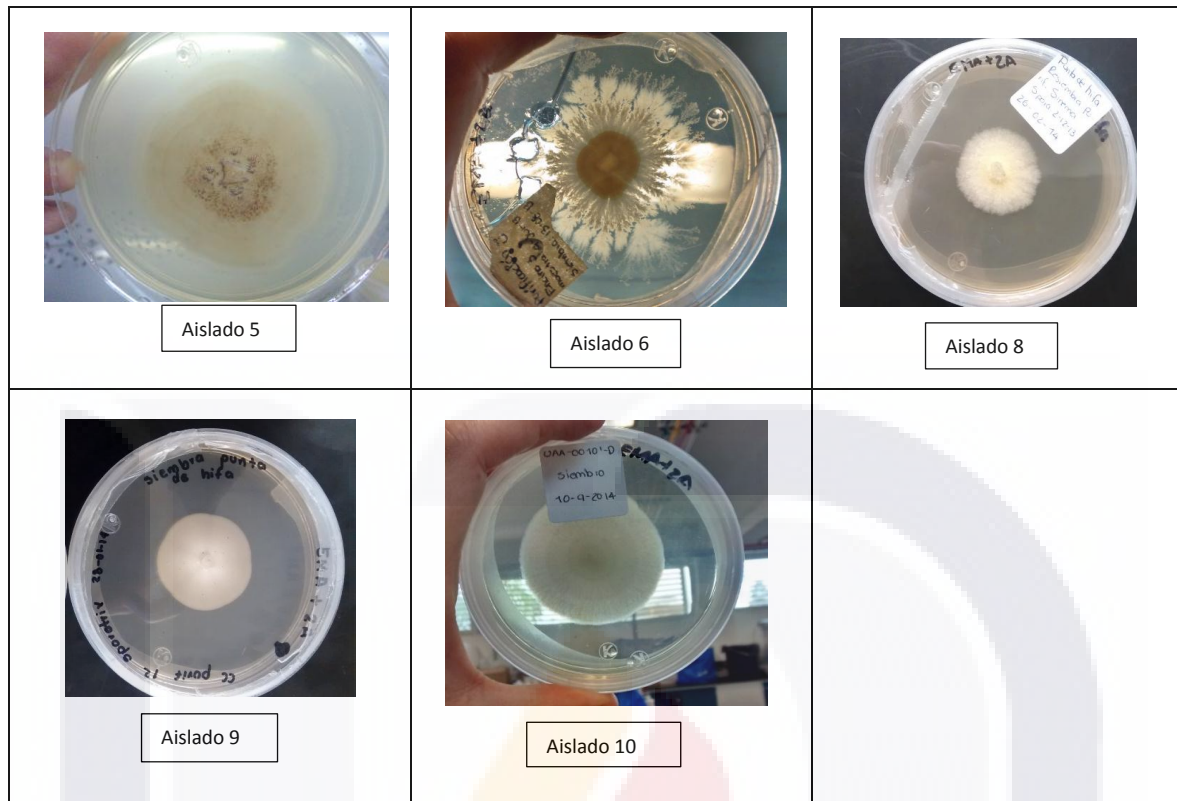


Figura 13. Aislados obtenidos a partir de 25 trozas de *Quercus potosina* manchada

Características morfológicas de las colonias

Aislados 1, 2, 4 y 6. En el centro de la siembra se observa un aspecto brillante blanquecino, a medida que se aleja, se aprecia que en el borde las hifas se bifurcan teniendo un crecimiento a través del medio de cultivo. Poseen bordes irregulares a excepción del aislado 4; cuando se observan los cultivos a contra luz se aprecia la formación de anillos concéntricos. Las características anteriormente descritas se observaron a las 4 semanas después de la siembra a temperatura de 22 °C.

Aislado 5. En el punto donde se sembró puede observarse una coloración blanquecina de apariencia brillosa y en donde también se observa la presencia de puntuaciones oscuras pertenecientes a estructuras fúngicas, el micelio es blanco con borde regular y a contra luz puede apreciarse anillos concéntricos tenues, el crecimiento de este aislado fue lento ya que para poder visualizar las puntuaciones oscuras transcurrieron 5 semanas desde su siembra a una temperatura de 22 °C.

Aislados 8, 9 y 10. Colonias de color blanco, con bordes regulares y con un micelio de apariencia polvosa, a excepción del aislado 9, teniendo una apariencia brillante-lustrosa. El aislado 10 presenta a contra luz anillos concéntricos. Las características fueron descritas a las 4 semanas de la siembra a 22 °C.

6.2 Identificación morfológica a partir de las galerías en madera de encino

6.2.1 *Ophiostoma pluriannulatum* Syd & P. Syd

De acuerdo a la observación directa de las muestras de madera con el microscopio estereoscópico y con la preparación de laminillas semipermanentes con azul de algodón y lactofenol, se observaron peritecios solitarios, parcialmente inmersos en el sustrato, de color marrón oscuro a negro con una base globosa o circular con dimensiones promedio que van de los 110.6 μ de largo y 102.9 μ de ancho; presentaron un cuello largo torcido (Figura 14 A y B), con dimensiones promedio que van de los 345.7 μ de largo por 28 μ de ancho, la región ostiolar está compuesta por hifas divergentes, hialinas y lisas, en algunos casos se observó en el ápice del cuello una masa mucilaginosa de esporas (Figura 14 C). El cuello puede desarrollarse por una extensión percurrente a través de la región ostiolar formando anillos con hifas divergentes. Conforme pasa el tiempo el medio de cultivo tiende a tornarse de un color más oscura siendo indicativo de la aparición de peritecios. Bajo la observación al microscopio óptico las ascosporas son unicelulares, hialinas, con una forma oval o reniforme (alantoide) con dimensiones promedio de 3.8 x 1.4 μ (Figura 14 D). Las características anteriormente señaladas concuerdan con las descritas por Cibrián et al., 2007; Upadhyay, 1981; Wingfield et al., 1993; Zipfel et al., 2006, para el hongo *Ophiostoma pluriannulatum* Syd & P. Syd.

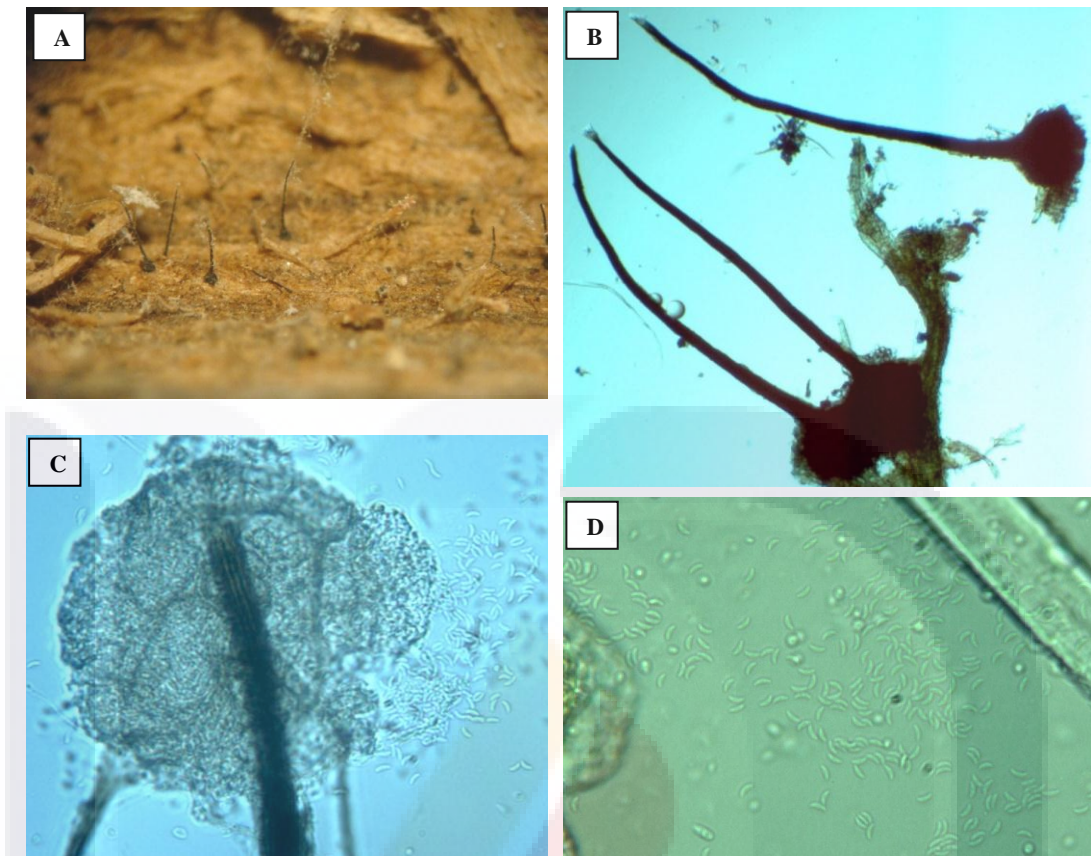


Figura 14. *O. pluriannulatum*. A) Peritecios observados sobre las galerías, B) Peritecios observados bajo el microscopio óptico a 4X, C) Masa mucilaginosa de esporas en el ápice del cuello de un peritecio 40X, D) Masa de esporas a 40X

6.2.2 *Pesotum* sp. (Syn. *Graphium*) Crane and Schok

Otras estructuras fúngicas encontradas en el interior de las galerías de la madera de encino fueron sinemas solitarios (Figura 15 A y B), inmersos parcialmente en el sustrato de color café oscuro a negro con una longitud promedio de 602.6 μ y que en el ápice se acumula una masa de conidios (esporas) de 6.55 μ de largo por 2.6 μ de ancho (Figura 15 C y D). Los conidios son holoblásticos, hialinos, de una sola célula, elipsoides u ovoides. Las características anteriormente mencionadas concuerdan, con las descritas por diferentes autores, con el género *Pesotum* sp. (Syn. *Graphium*) Crane y Schok, siendo uno de los anamorfos del género *Ophiostoma* sp. (Barnett y Hunter, 1998; Upadhyay, 1981; Seifert, 1993).

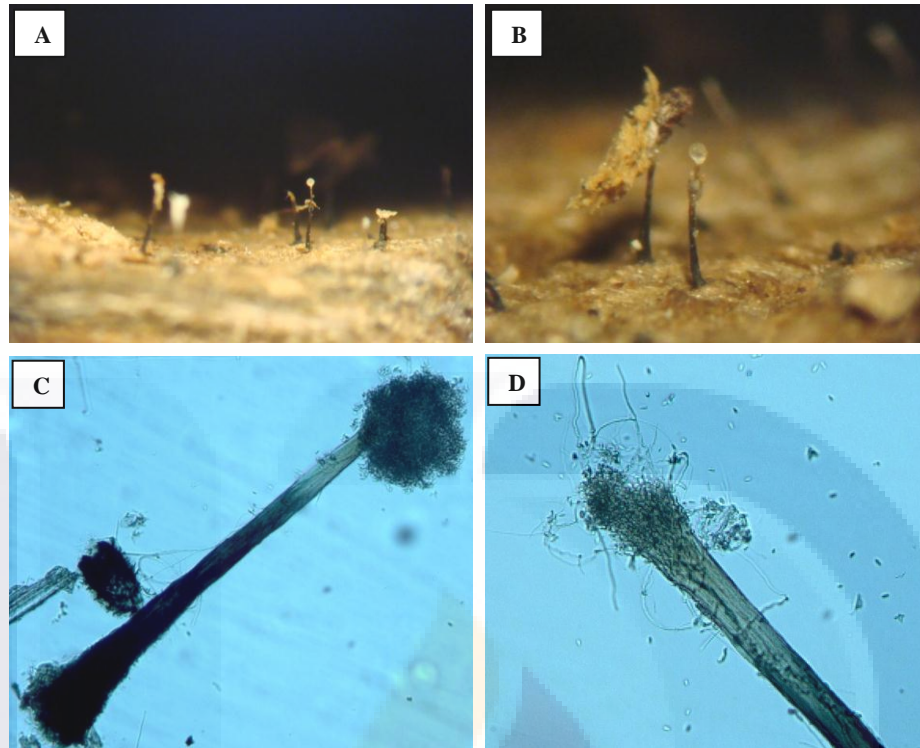


Figura 15. *Pesotum* sp. A) Conjunto de sinemas, observados con microscopio estereoscópico, encontrados en el interior de las galerías de *Q. potosina*, B) Acercamiento de un sinema sobre la madera de encino, obsérvese el ápice con una gota mucilaginosa donde se encuentran las esporas, C) Sinema completo y D) Ápice del mismo observado con el microscopio compuesto (10X)

6.2.3 *Ceratocystis* sp. Ellis y Halst

Este género se caracteriza por presentar un ascocarpo globoso a subgloboso o en forma de matraz y es de color café oscuro a negro. Los peritecios crecen en forma solitaria o agregada en forma superficial o inmersa en el sustrato, tienen un diámetro aproximado de 120 μ y un largo cuello de aproximadamente 300 a 400 μ (Figura 16 A). Las ascosporas son cilíndricas con extremos obtusos, no son curvos, pueden presentar formas de almohada o de sombrero contenidas en una matriz gelatinosa en la punta del ostiolo del cuello (Figura 16 C). Como fase asexual o anomorfa tiene a *Charala* sp. (Syn *Thielaviopsis*) cuya característica morfológica es que posee conidióforos típicamente oscuros pero puede ser hialino bajo ciertas condiciones de cultivo, es unicelular o puede ser septado en la porción basal, la célula apical (fiálide), a veces se estrecha ligeramente

hacia arriba y la producción de conidios es de forma endógena; los conidios (fialosporas) son hialinos, cilíndricos de longitud variable, a menudo se disponen en forma de cadena, puede ser parásita o saprófita (Figura 16 B y D). Las características anteriormente mencionadas concuerdan, con las descritas por diferentes autores, con el género *Ceratocystis* sp. en su estado sexual y de *Chalara* (Syn. *Thielaviopsis*) en su estado asexual (Barnett y Hunter, 1998; Upadhyay, 1981; Seifert, 1993).

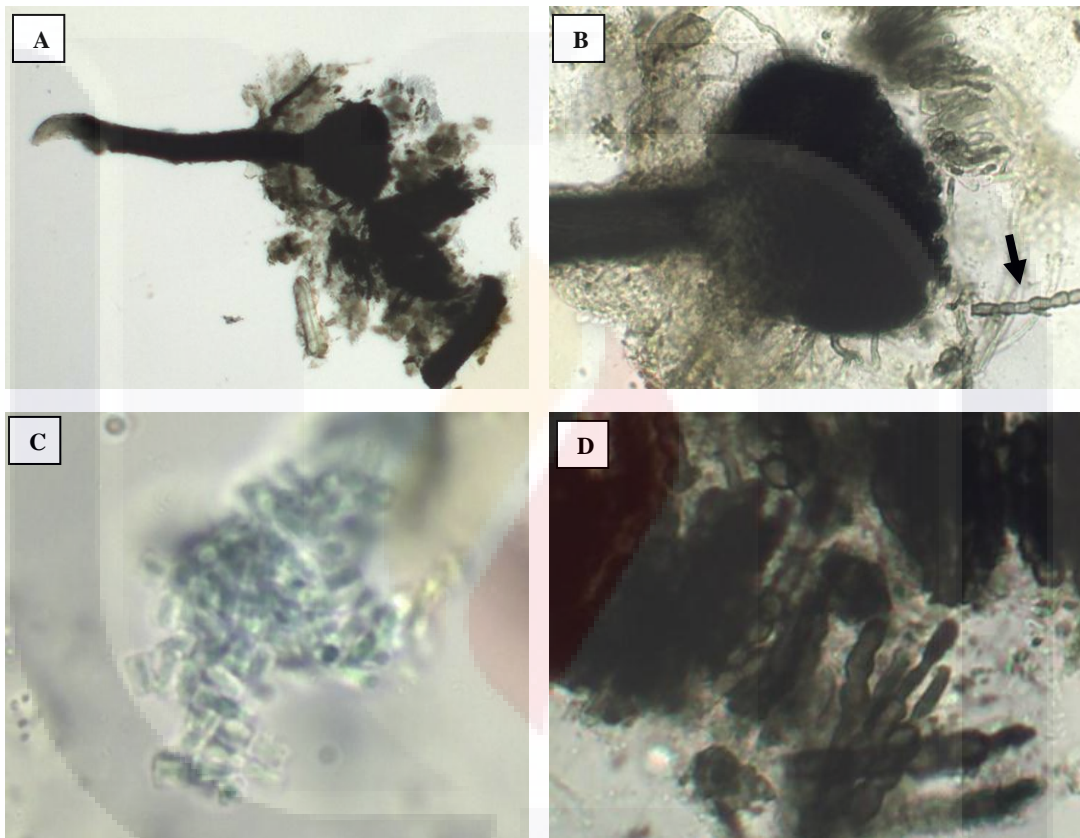


Figura 16. *Ceratocystis* sp. A) Peritecio observado a 10X, B) Base del peritecio y *Chalara* sp. (flecha), C) Ascospora en forma de almohada observada a 100X y D) Fase asexual *Chalara* sp. observada a 10X

6.3 Identificación morfológica a partir de los aislados

De los 11 aislados obtenidos se observó que en 8 de ellos (aislados 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9 y 10), se desarrollaron colonias de color blanquecinas que al principio de su desarrollo son algodonosas pero a medida que van creciendo se tornan lustrosas, hay crecimiento de micelio aéreo y bajo el sustrato. La característica principal de la mayoría de estos aislados

es que las hifas se bifurcan en el borde tomando una apariencia de abanico. Los aislados restantes (3,7 y 11), resultaron ser contaminantes razón por la cual se desecharon. En particular en el aislado numero 5 (Figura 17 A), se observan anillos concéntricos y en el centro se observa la formación de puntuaciones negras que al ser observados bajo el microscopio óptico corresponden a peritecios (Figura 17 B y C), con las mismas características descritas anteriormente para *Ophiostoma pluriannulatum*. Con respecto a la observación microscópica del micelio blanquecino en el anverso y hialino al reverso se encontraron conidióforos simples unicelulares o septados, hialinos y que forman un grupo de conidios en el ápice. Los conidios son hialinos, unicelulares, globosos a ovoides, formados en dentículos cortos y prominentes en una célula esporogénica o directamente desde las hifas; de acuerdo a la descripción por diferentes autores (Barnett y Hunter, 1998; Upadhyay, 1981; Seifert, 1993) estas características pertenecen a uno de los anamorfos del género *Ophiostoma* sp. conocido como *Sporothrix* sp. (Figura 17 D y E), obteniéndose de esta forma el ciclo completo, es decir la fase sexual o teleomorfa *Ophiostoma pluriannulatum* y su fase asexual o anomorfa *Sporothrix* sp.

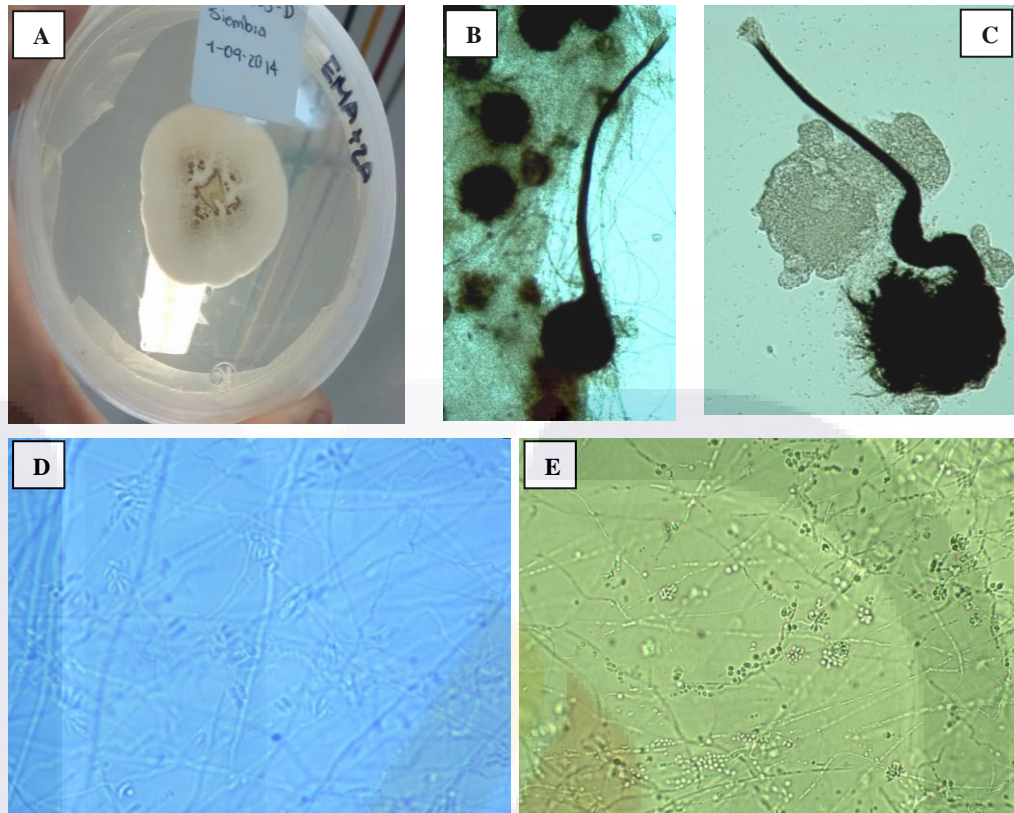


Figura 17. *O. pluriannulatum* desarrollado en EMA. A) Aislado número 5, B) y C) Peritecios observados con el microscopio óptico a 10X provenientes del aislado 5, D) y E) Observación a 40X de *Sporothrix* sp.

6.4 Identificación mediante análisis genéticos

6.4.1 Visualización del DNA por electroforesis

De acuerdo al total de biomasa obtenida, la cantidad de ADN será diferente en cada uno de los aislados, sin embargo, en la figura 18 puede observarse una cantidad considerable de ADN con la cual se puede proceder para su análisis.

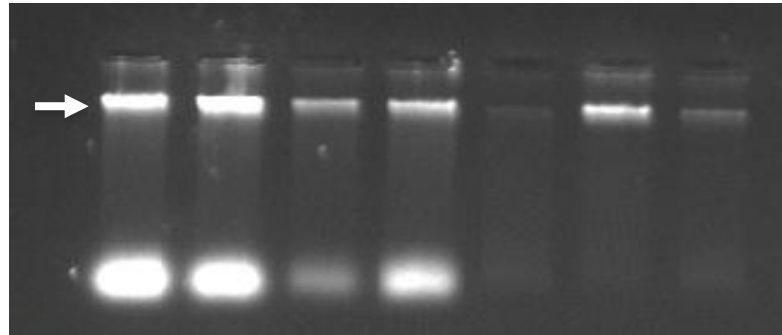


Figura 18. Visualización del ADN de los hongos aislados (flecha)

6.4.2 Amplificación del espaciador transcribible interno (ITS)

En la Figura 19 se muestran los resultados obtenidos con la amplificación del fragmento ITS1 – ITS4 del DNAr donde se observa la amplificación del fragmento deseado de 600 pares de bases (pb).



Figura 19. Visualización de productos de PCR en el gel de agarosa al 0.8%, donde se observan las bandas de amplificación del fragmento deseado

6.4.3 Identificación a nivel de género y especie

Después de haber secuenciado cada una de las muestras se obtuvieron secuencias específicas, las cuales se seleccionaron (Figura 20) y se compararon con las ya existentes en el NCBI (Figura 21).

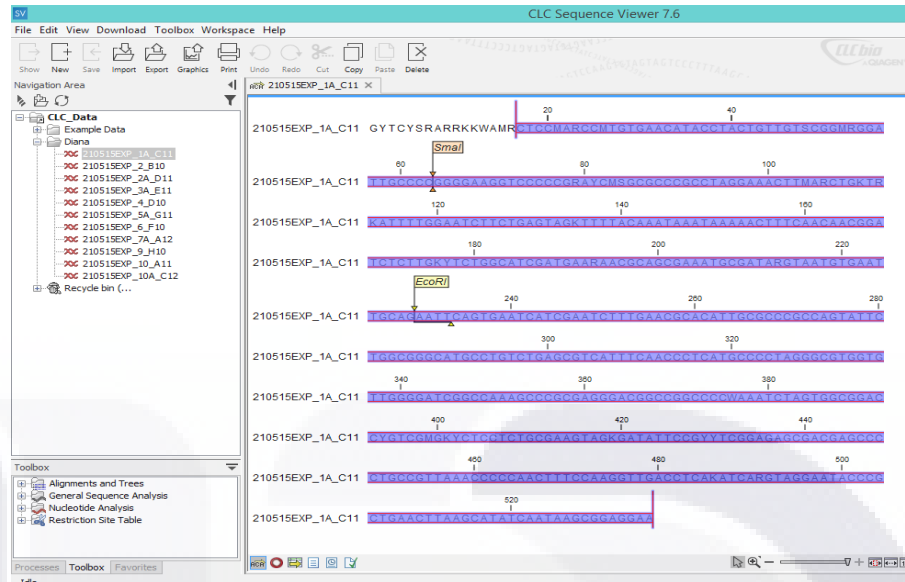


Figura 20. Selección de la secuencia

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Clonostachys rosea strain QLF68 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal	793	793	100%	0.0	94%	FJ025201.1
Fungal sp. QLF36 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed sp	793	793	100%	0.0	94%	FJ025163.1
Nectria sp. ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	793	793	100%	0.0	94%	FJ025156.1
Bionectria ochroleuca strain P295_D3_10 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and	793	793	100%	0.0	94%	JF311931.1
Bionectria ochroleuca genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, isolate: X1	793	793	100%	0.0	94%	AB470910.1
Bionectria ochroleuca genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, isolate: XJ31	793	793	100%	0.0	94%	AB470909.1
Bionectria ochroleuca isolate DB-5B 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inter	793	793	100%	0.0	94%	FJ426388.1
Clonostachys rosea strain Cr0814M 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intertr	787	787	100%	0.0	94%	KP670432.1
Clonostachys rosea isolate 103-1F internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, com	787	787	100%	0.0	94%	KP900740.1
Fungal sp. F294_NC 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribe	787	787	100%	0.0	94%	KP177441.1
Clonostachys sp. G435 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribe	787	787	100%	0.0	94%	KP006356.1
Clonostachys sp. G133 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribe	787	787	100%	0.0	94%	KP006355.1

Figura 21. Comparación de la secuencia con el NCBI

Después de analizar estos resultados y considerando un 94% de homología el análisis molecular indicó que las secuencias amplificadas corresponden a *Clonostachys rosea*, siendo un hongo saprófito micoparásito perteneciente al filo Ascomycota (Familia: Bionectriaceae) teniendo como teleomorfo a *Bionectria ochroleuca* (Schw.) Schroers y Samuels (Yu y Sutton, 1998; Sutton et al., 1997, 2002), *Clonostachys rosea* posee como principal característica la formación de conidióforos de dos tipos: el primero en formación es el verticilado con fiálides largas y divergentes, los conidióforos secundarios son los

penicilizados de aspecto bi o terverticilizados, con ramas y fiálides adpresas o convergentes de menor tamaño que las verticilidades, las conidias son hialinas y pueden presentar un lado aplanado, son ligeramente curvas y lisas que llegan a formar una masa viscosa sobre los conidióforos (Schroers et al., 1999; Piontelli y Giusiano, 2003). Sin embargo, ninguna de estas estructuras fueron observadas en nuestros aislados. Al parecer la contaminación con *C. rosea* fue evidente cuando la secuencia amplificada mostró 94% de homología en la base de datos del NCBI.

6.5 Microscopía electrónica de barrido de los insectos adultos

En el cuerpo de la hembra de *M. magnificus*, se encontraron ascosporas similares, en forma y tamaño, a las descritas para *Ophiostoma pluriannulatum*. Estas esporas se encontraron sobre las antenas (Figura 22), la cabeza (Figura 23), los élitros (Figura 24), y sobre las patas y ovipositor se observó la presencia de una masa de micelio (Figura 25).

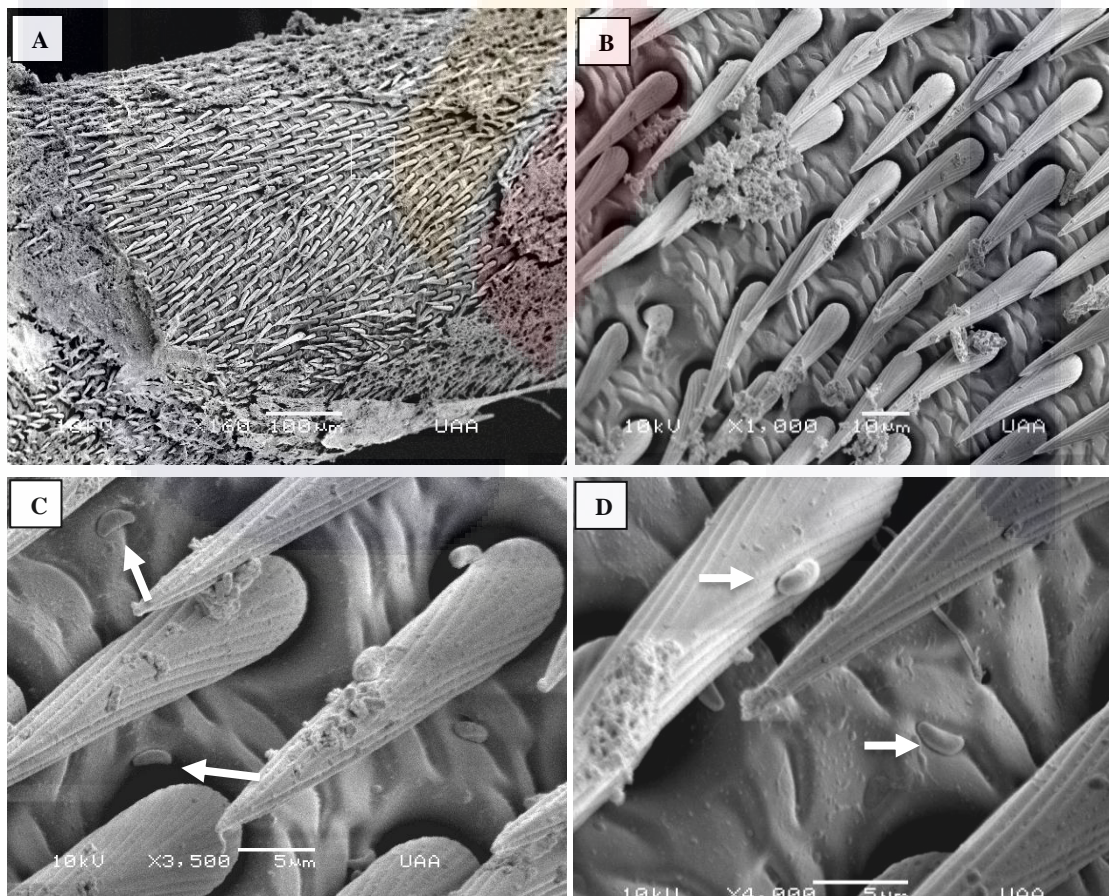


Figura 22. *M. magnificus*. A) y B) Antena, C) y D) Ascosporas sobre las antenas

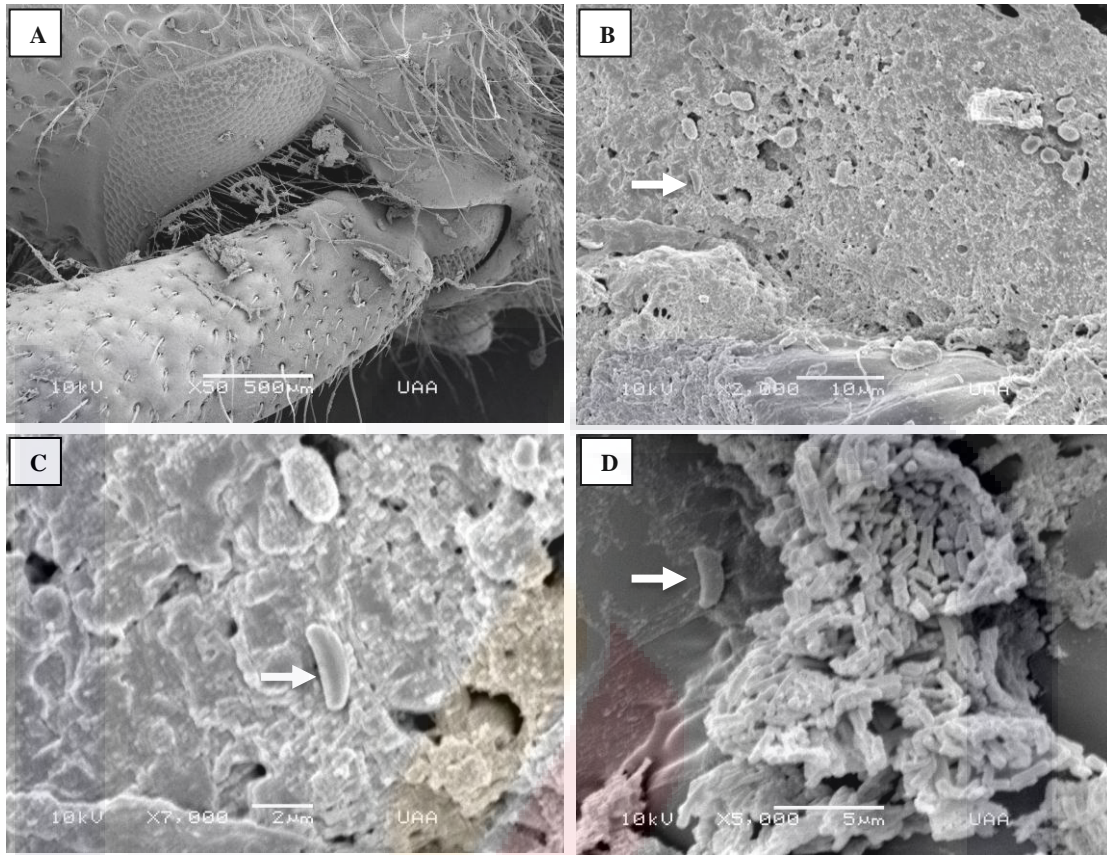


Figura 23. *M. magnificus*. A) Cabeza, B) Ascosporas encontradas sobre la cabeza, C) y D) Ascosporas observadas a un mayor aumento

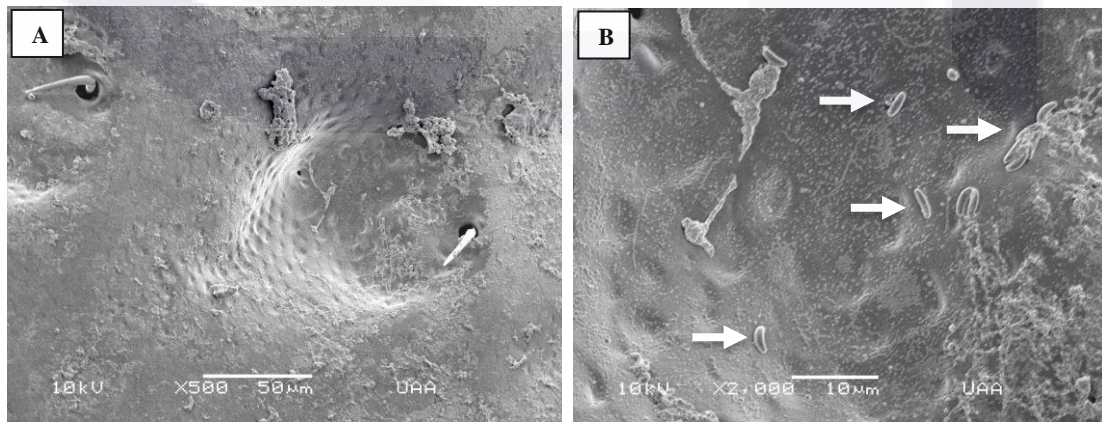


Figura 24. *M. magnificus*. A) Élitro del insecto, B) Ascosporas encontradas sobre el élitro del insecto

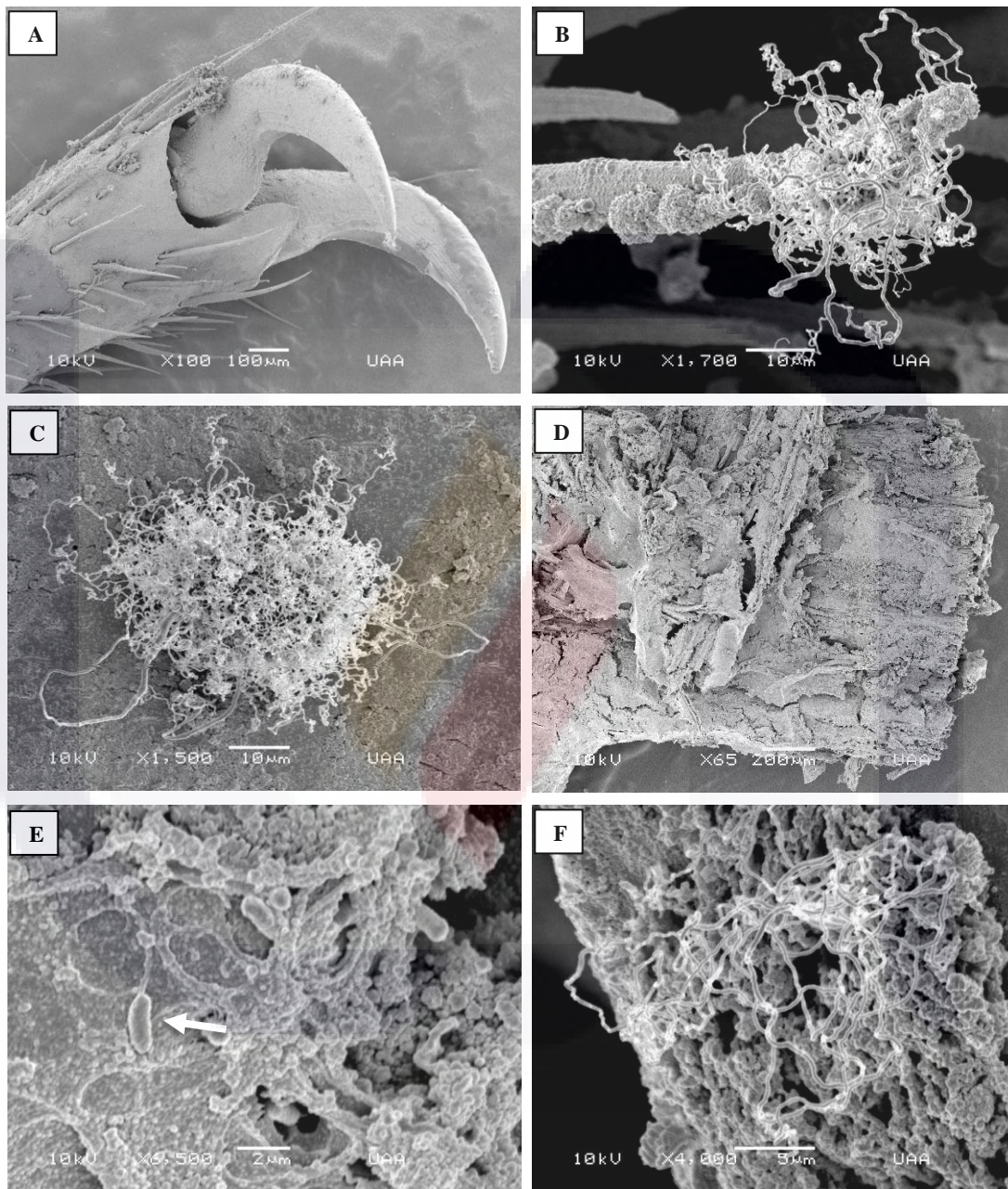


Figura 25. *M. magnificus*. A) Pata del insecto, B) y C) masa de micelio encontrada sobre la pata del insecto, D) Ovipositor del insecto, E) Ascospora encontrada sobre el ovipositor, F) Masa de micelio sobre el ovipositor

7. DISCUSION

Los hongos ophiostomatales son considerados como importantes patógenos en árboles y agentes que causan el manchado en la albura y duramen. Las especies de *Ophiostoma* sp. están comúnmente asociadas a escarabajos (Harrington, 1993). La mayoría del manchado de la madera en coníferas es causada por especies de *Ceratocystis sensu stricto* Ellis & Halst., *Ophiostoma* Syd. & P. Syd., *Ceratocystiopsis* H. P. Upadhyay & W. B. Kendr. y *Gondwanamyces* Marais & M. J. Wingf. junto con sus anomorfos (Upadhyay y Kendrick, 1975; Upadhyay, 1993; Upadhyay, 1981). Hedgcock (1906), describió por primera vez a *Ophiostoma pluriannulatum* proveniente de *Quercus borealis* en los Estados Unidos. En maderas duras, este hongo, es un agente del manchado de la misma y es asociado con un alta variedad de insectos en el Hemisferio Norte (Hedgcock, 1933; Hunt, 1956; Lagerber et al., 1927), incluido también México, donde ha sido encontrado tanto en *Quercus* como en *Pinus pseudostrobus* (Marmolejo y García-Ocañas, 1993). Este hongo fue identificado en Nueva Zelanda en *P. radiata* (Farrel et al., 1997), y asociado con tres pinos infestados con especies de escarabajos (Zhou et al., 2001). Este estudio representa el primer reporte de *O. pluriannulatum* causando manchado de la madera en *Quercus potosina* en la Sierra Fría de Aguascalientes, asociado con el barrenador *Megapurpuricenus magnificus*. Este hongo también fue reportado por Moreno et al. (2014), en *P. teocote* asociado al insecto descortezador *Dendroctonus mexicanus*. En este estudio, uno de los aislados, *in vitro*, de *Sporothrix* formó peritecios de *O. pluriannulatum*, en condiciones de laboratorio, cuatro meses después de sembrado, obteniéndose el ciclo de vida (anomorfo y teleomorfo) completo de esta especie. *Pesotum* sp. otra de las fases asexuales del género *Ophiostoma* sp. encontradas dentro de las galerías producidas por la larva de *M. magnificus*, no pudo ser aislada en medio de cultivo EMA. Al respecto, Pérez-Vera (2009), aisló a *Pesotum* sp. de *Pinus hartwegii*, señalando que, en EMA, este hongo tuvo un crecimiento de 80 mm, en 15 días, a una temperatura de ± 26 °C y en condiciones de laboratorio. Las colonias presentaron una coloración café-olivo a gris a los 70 días. El micelio fue de color café oscuro al observar el reverso de la caja de petri. El micelio inmerso fue de color café y el micelio aéreo fue hialino.

Por otro lado, dentro de las galerías también se identificó al hongo *Ceratocystis* sp. y a su anomorfo *Chalara* sp. (Syn. *Thielaviopsis*), tampoco pudo aislarse en el medio de cultivo, pero hay reportes que indican que este hongo forma un micelio blanquecino y que su principal característica es la producción de aromas dulces que utiliza para atraer insectos y ser fácilmente transportado a nuevos hospederos (Agrios, 2005). Una especie importante de *Ceratocystis* es *C. fagacearum* causante del marchitamiento vascular de *Quercus* sp. Estos hongos segregan una toxina que produce envenenamiento de las hojas y estimula, a las células del parénquima vascular a formar tilosas y formación de goma, que obstruyen los vasos conductores e impiden su funcionamiento. La toxicidad y la obstrucción, es la responsable de la marchitez y decoloración del follaje de los árboles enfermos. La propagación de la enfermedad se realiza mediante tres vías: la transmisión de las esporas por el contacto entre artrópodos y el árbol, la transmisión de la enfermedad a través de las raíces y la difusión de las esporas mediante factores abióticos (Kirisits, 2004).

Un estudio realizado por Gregory (1971), en el que inoculó plántulas de encino con *Ceratocystis fagacearum* 1 o 2 pulgadas por arriba de la línea del suelo, reveló que el patógeno era aislable cerca del sitio de inoculación. Conforme pasaba el tiempo el patógeno era aislado de más arriba en el tallo hasta que los síntomas de las hojas se volvieron visibles. Lo que este estudio indica es la rapidez con la que estos hongos pueden propagarse a través del hospedero y producir la enfermedad. Además, Krokene et al. (2010), demostraron que el hongo *Ceratocystis polonica* induce síntomas extensivos, causando el 83% de muerte, 82% del manchado de la madera y largas lesiones necróticas en el floema en árboles (*Picea abies*) con edades entre los 14 y 34 años de edad. Con estas investigaciones queda demostrado que estos hongos, por sí solos, son causantes del manchado de la madera, de la enfermedad vascular, y muerte de encinos.

A pesar de observar signos y síntomas de manchado y galerías producidas por *Megapurpuricenus magnificus* en los encinos de la Sierra Fría de Aguascalientes, y que además, se observaran estructuras típicas a las producidas por los Ophiostomatoides, los análisis genéticos arrojaron resultados completamente diferentes ya que *Clonostachys rosea* no es uno de los hongos que se pretendía encontrar. En varios estudios se ha reportado la identificación de hongos ophiostomatoides por análisis moleculares

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

utilizando los primer universales ITS (Internal Transcribed Spacer), utilizados en este estudio, pero también complementando el análisis utilizando el primer de la β -tubulina. Revilla (2013), menciona que el gen de la β -tubulina fue el mejor recurso que el ADNr, porque fue del que se obtuvieron las mejores secuencias para alinear en el BLAST, y donde se encontraron más especies de Ophiostomatales, lo que probablemente justifique que no se hayan identificado los hongos ophiostomatoides en este trabajo. Además, en la Guía Práctica sobre la técnica de PCR se aborda que la purificación de aislamientos es una etapa que reviste gran importancia para el proceso de identificación molecular, puesto que, las amplificaciones de los ácidos nucleicos y su posterior secuenciación, requieren de pureza del microorganismo (una sola identidad genética), y no una mezcla de él; esto puede ser determinado en las etapas finales de la identificación, siendo un factor de error para algunos tipos de muestras.

Recientemente Eya (2015), realizó un estudio de revisión taxonómica de la especie *Crioprosopus magnificus* (LeConte, 1875), misma que fue transferida a *Megapurpuricenus* designada como especie tipo. Además de sufrir la enfermedad vascular y el manchado de la albura, el daño causado por la larva de *M. magnificus* perjudica la estructura de la madera, por lo tanto, a pesar de haber lluvias el agua no llega a ser transportada hacia todo el árbol a consecuencia de los orificios de entrada, ya que a partir de ellos, el agua es expulsada hacia afuera, provocando el transporte insuficiente de nutrientes y finalmente la muerte de los árboles (Sánchez-Martínez et al. 2014). Con esto se demuestra que el ataque de estos insectos causa el declinamiento y muerte de los encinos en la Sierra Fría de Aguascalientes.

Como ya se había mencionado anteriormente algunos insectos de la corteza desarrollaron estructuras especializadas para el transporte de esporas de hongos ophiostomatoides hacia nuevos hospederos, conocidos como micangias, sin embargo, Ruiz y Lanfranco (2008), señalan que no es necesario que estos insectos tengan estas estructuras, debido a que las esporas de estos hongos son producidas en una masa mucilaginosa y pegajosa con lo que se adhieren fácilmente al exoesqueleto y así ser diseminadas. Además, no es estrictamente necesario que los insectos transporten las esporas, ya que también pueden ser diseminadas por acción del viento u otros agentes. En este trabajo se observó la acumulación de

ascosporas, similares en forma y tamaño a las de *O. pluriannulatum*, en una depresión, posible micangia (Figura 24 A y B), en los élitros de la hembra.

Para el control de *Megapurpuricenus magnificus*, en su estado larval, Sánchez-Martínez et al. (2014), sugieren el uso de Lambda Cyhalotrina al 5% de ingrediente activo, o bien, puede utilizarse Imidacloprid, suspensión al 30%, siendo inyectados directamente en los orificios de alimentación. Además, también mencionan que en estudios posteriores pueda ser factible utilizar control biológico utilizando diferentes cepas de hongos Entomopatógenos o bien nematodos.

Repe y Jurc (2010), citan posibles soluciones para mitigar a los hongos ophiostomatoides, por ejemplo, desarrollar árboles que tanto fenotípicamente como genéticamente sean resistentes a la enfermedad. Sin embargo, la resistencia cambia cuando se trata de un árbol joven o un árbol adulto, además, el hongo puede desarrollar una mayor patogenicidad y así, seguir atacando al hospedero. Otra posible solución es el uso de fungicidas, pero solamente es implementado cuando el daño es significativo, por ejemplo en la enfermedad del olmo Holandés.

El uso de cepas albinas de especies de *Ophiostoma* sp. ha sido sugerido como una estrategia potencial de control biológico contra aquellas especies de hongos que producen el manchado de la madera. Como ejemplo tenemos que Behrendt et al. (1995), realizaron un estudio en donde enfrentaron una cepa albina de *Ophiostoma piliferum*, comercialmente conocida como Cartapip-97 contra hongos que manchan la madera. La inhibición fue favorable cuando Cartapip-97 era inoculada en la madera 2 y 4 semanas antes de enfrentarlo contra los hongos de la mancha azul. Este estudio lo realizaron tanto en madera cortada como en campo en pinos rojos (*Pinus resinosa* Aiton).

Se deben de considerar precauciones apropiadas y un control estricto cuando se importan plantas hacia otras partes, ya que esto puede desarrollar un riesgo en el desarrollo de nuevos patógenos de ophiostomatoides hacia las especies locales, por lo que requerimientos de cuarentena, son recomendados (Repe y Jurc, 2010).

La acción conjunta de los hongos y del insecto barrenador acelera el declinamiento y muerte de los encinos en la Sierra Fría de Aguascalientes. Mediante Microscopía Electrónica de Barrido se demostró la interacción que existe entre los hongos ophiostomatoides y el insecto barrenador *Megapurpuricenus magnificus*. Este trabajo de investigación es el primer estudio realizado en el que se observaron ascosporas de *O. pluriannulatum* en el cuerpo de hembras adultas de *M. magnificus*.

8. CONCLUSIONES

En el presente estudio, en el interior de las galerías formadas por *M. magnificus*, se localizaron e identificaron, mediante claves taxonómicas, a los hongos ophiostomatoides: *Ophiostoma pluriannulatum*, *Ceratocystis* sp. (y su anomorfo *Chalara* sp.) y *Pesotum* sp.

A partir de la madera de encino manchada, se realizó el aislamiento de 8 cepas de *Sporothrix* sp. Uno de estos aislados formó, *in vitro*, peritecios de *O. pluriannulatum*. Esto es, se obtuvo el ciclo de vida (anomorfo y teleomorfo) completo de esta especie de hongo ophiostomatoide.

El análisis molecular de 8 aislados de *Sporothrix* sp. no permitió identificar molecularmente las especies involucradas debido a la contaminación involuntaria con *Clonostachys rosea* durante el proceso de manejo y análisis molecular de los aislamientos.

Con el MEB se observaron ascosporas, similares en forma y tamaño, a las de *O. pluriannulatum*, en los ojos, antenas y élitros de la hembra adulta del barrenador de los encinos *M. magnificus*.

Este es el primer trabajo en el que se reporta la relación que hay entre hongos ophiostomatoides con el insecto barrenador de los encinos (*Q. potosina*) *M. magnificus* en la Sierra Fría de Aguascalientes, en México y el mundo.

9. GLOSARIO

Ácido nucleico. Sustancia ácida constituida por una pentosa, fósforo y bases púricas o pirimídicas. Los ácidos nucleicos determinan los caracteres genéticos de los organismos.

Acropétalo. Desarrollo desde la base hasta el ápice.

ADN (Ácido desoxirribonucleico). Es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos y es responsable de su transmisión hereditaria.

ADN polimerasa. Son enzimas (celulares o virales) que intervienen en el proceso de replicación del ADN. Llevan a cabo la síntesis de la nueva cadena de ADN emparejando los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) con los desoxirribonucleótidos complementarios correspondientes del ADN molde.

ADN ribosómico (ADNr). Es una secuencia de ADN contenida en los

cromosomas del nucléolo que codifica ARN ribosómico. Estas secuencias regulan la transcripción e iniciación de la amplificación y contienen segmentos espaciadores transcribibles y no transcribibles.

Adpreso, a. Aplicado contra la superficie, hoja adpresa es la aplicada al tallo, pelo adpreso es el que no se separa de la superficie del tallo u hoja de donde nace. **Agar.** Sustancia de consistencia gelatinosa que se obtiene de las algas marinas y que se utiliza para preparar medios de cultivo nutritivos, en los que se estudia y cultiva a los microorganismos.

Agarosa. Polisacárido natural extraído de las paredes celulares de ciertas algas rojas también conocidas como agarofitas. Su estructura química le confiere la capacidad de formar geles muy fuertes incluso a bajas concentraciones.

Ahusado o ahusada. Que tiene forma de huso.

Aislado. Una sola espora o cultivo y los cultivos que se derivan de ellos. Se utiliza también para indicar las colecciones de un patógeno obtenidas a diferentes tiempos.

Albura. Capa blanda, blanquecina, que se halla inmediatamente debajo de la corteza en los tallos leñosos o troncos de los vegetales dicotiledóneos.

Amentos. Racimo de florecillas masculinas o femeninas, colgante típico en algunas familias de plantas monoclamídea, tales como las fagáceas y las betuláceas.

Amplificación genética. Aumento en el número de copias de un fragmento de ADN particular.

Anomorfo. Fase del ciclo de vida de un hongo en la que no se produce esporas sexuales. La fase anamórfica.

Antagonista. Comprende cualquier organismo que interfiere en la supervivencia o desarrollo de los patógenos.

Antibiótico. Compuesto químico producido por un microorganismo y que inhibe o mata a otros microorganismos.

Apresorios. Estructura adhesiva, achatada, a partir de la cual se origina una hifa afilada que rompe la cutícula de una célula epidérmica del huésped por

punción permitiendo la penetración del micelio para establecer la infección de un hongo parásito de plantas superiores.

Árbol. Planta de tronco leñoso, grueso y elevado que se ramifica a cierta altura del suelo formando la copa.

Artrópodo. Invertebrados con simetría bilateral, el cuerpo segmentado y recubierto por un tegumento duro (exoesqueleto) y las patas articuladas.

Asca. Célula en forma de saco de una hifa que pasa por meiosis y que contiene a las ascosporas (por lo común, ocho).

Ascocarpo o ascomata. Cuerpo fructífero de los ascomicetos que porta o contiene ascas.

Ascomicetos. Grupo de hongos que producen sus esporas sexuales, o ascosporas, dentro de ascas.

Ascospora. Espora que se produce sexualmente en una asca.

Aseptado. Micelio que no presenta tabiques, septos, que lo dividan en células.

Azul de lactofenol. Reactivo que sirve para teñir las partes vivas de las células fúngicas.

Barrenador. Insecto del grupo de los barrenillos, de mayor tamaño, que horada los troncos de los árboles y de algunas

plantas, alimentándose de su savia y de los hongos que se crían en las galerías.

Biomasa. Cantidad total de materia viva presente en una comunidad o ecosistema.

Buffer. Sistema formado por un ácido débil y su base conjugada (o viceversa), que se opone a las grandes variaciones del pH en una disolución acuosa.

Caducifolio. Árboles o arbustos que pierden su follaje durante una parte del año, la cual coincide con la estación más fría (invierno).

Cancro. Lesión necrótica y con frecuencia profunda que se produce en el tallo, ramas o ramitas de una planta.

Carvacrol. Es un fenol monoterpenoide que se encuentra en aceites esenciales como los de orégano y tomillo. Inhibe el crecimiento de diversas cepas de bacterias.

Celulosa. Sustancia sólida, blanca, amorfa, inodora y sin sabor, e insoluble en agua, alcohol y éter, que constituye la membrana celular de muchos hongos y vegetales.

Cepa. Progenie de un solo aislamiento en un cultivo puro; aislado; grupo de aislados similares, una raza. En los virus de las plantas, es un grupo de aislados

virales que comparten e común la mayoría de sus antígenos.

Cerambícido. Insecto coleóptero del suborden *Polyphaga*, que casi en todas las especies, los adultos se caracterizan por poseer largas antenas, mayores a la mitad de la longitud de su cuerpo, que se insertan en unas prominencias frontales; a menudo con colores brillantes.

Ciclo de vida. La fase o etapas sucesivas del crecimiento y desarrollo de un organismo que se lleva a cabo entre la aparición y reaparición de la misma etapa de su desarrollo (por ejemplo, la espora).

Clorosis. Enfermedad de las plantas, debida a la falta de ciertas sales, que produce la pérdida del color verde.

Coleóptero. Orden de insectos con la boca de tipo masticador y un par de élitros (alas rígidas y duras) que protegen las alas finas y flexibles que sirven para volar.

Comensalismo. Asociación biológica externa entre dos especies para beneficio alimenticio de una de ellas o de ambas, sin causarse perjuicio entre ellas.

Conidio. Espora asexual de un hongo formada en el extremo de un conidióforo.

Conidióforo. Hifa especializada sobre la cual se forman uno o más conidios.

Conidiógeno. Célula fúngica apical, monocariótica, de la que se originan conidios en los ascomicetos.

Coriáceo. Que tiene aspecto y el tacto semejantes a los del cuero.

Corteza. Parte exterior del tallo, la raíz y las ramas de los árboles, arbustos y plantas leñosas, formada por varias capas de fibra vegetal dura.

Cuerpo Fructífero. Estructura compleja de los hongos que contiene esporas.

Cultivo. Crecimiento artificial de microorganismos o tejidos vegetales en un medio nutritivo preparado; colonia de microorganismos o células vegetales mantenidos artificialmente en dicho medio nutritivo.

Declinamiento. Pérdida de las funciones fisiológicas normales y que en casos severos produce la muerte de los organismos que la padecen.

Dentículo. Órgano o parte de él con forma de diente pequeño.

Descortezador. Insectos que atacan a árboles vivos, hacen sus galerías debajo de la corteza y se alimentan de floema.

Desinfestante. Agente que destruye o inactiva a los patógenos del ambiente o de la superficie de una planta u órgano, antes de que ocurra la infección.

Deuteromicetos. Hongos imperfectos que comprenden más de 15000 especies diferentes que se clasifican juntas porque no se conoce en ellas la fase sexual de reproducción.

DNA complementario. (DNAc) DNA sintetizado por la transcriptasa inversa a partir de un molde de RNA.

dNTP's. Se usan en la replicación del ADN y contienen tres fosfatos unidos al grupo hidroxilo 5' de la desoxirribosa y dependiendo de la base nitrogenada serán dATP, dTTP, dCTP o dGTP. La reacción fundamental es la transferencia de un grupo fosfato en la que el grupo 3'OH actúa como nucleófilo en el extremo 3' de la cadena que está en crecimiento.

Duramen. Parte central, más seca y compacta, del tronco y de las ramas gruesas de un árbol.

EDTA. Agente secuestrante de iones metálicos, formando compuestos muy estables llamados quelatos.

Electroforesis. Técnica para la separación de las moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico a través de una matriz porosa, la cual finalmente las separa en tamaños moleculares y carga eléctrica, dependiendo de la técnica que se use.

Élitros. Alas anteriores, modificadas por endurecimiento (esclerotización), de ciertos órdenes de insectos como los coleópteros y los heterópteros. Se denominan hemiélitros cuando el endurecimiento no es total sino parcial.

Elongado. Alargado.

Encino. Nombre de diversas variedades de árboles fagáceos, de tronco grande y ramificado.

Endógeno (a). Que se forma o engendra en el interior de algo, como la célula que se forma en el interior de otra.

Enfermedad. Cualquier mal funcionamiento de las células y tejidos del hospedante, que resulta de la irritación continua por un agente patogénico o factor ambiental y que lleva al desarrollo de síntomas.

Entomopatógenos. Enfermedades de los insectos causada por bacterias, hongos, virus, protozoos y nematodos.

Epinastía. Curvatura de los tallos debido a respuestas diferenciales en el crecimiento.

Espora. Unidad reproductiva de los hongos que consta de una o varias células; es análoga a la semilla de las plantas verdes.

Esterilización. Eliminación de los patógenos y otros organismos vivos del

suelo, recipientes, etc., mediante calor o sustancias químicas.

Etiología. Estudio sobre las causas de las cosas.

Evanescente. Que se desvanece, que no dura, que desaparece pronto. Sutil, delicado, tenue.

Exoesqueleto. Tejido orgánico duro y rígido que recubre exteriormente el cuerpo de los artrópodos y otros invertebrados.

Factores abióticos. Son los distintos componentes que determinan el espacio físico en el cual habitan los seres vivos; entre los más importantes podemos encontrar el agua, la temperatura, la luz, el pH, el suelo, la humedad, el oxígeno y los nutrientes.

Falcado o falcada. Que tiene una curvatura semejante a la de la hoz.

Fenotipo. Apariencia externa visible de un organismo.

Fiálide. Células conidiógenas que producen un conidio blástico, producido básicamente a través de una abertura sin que la célula cambie en longitud.

Fialospora. Espora producida por una fiálide.

Filogenética (filogenia). Implica el nacimiento, origen o procedencia, es la

determinación de la historia evolutiva de los organismos.

Fitopatógeno. Término que se aplica a los microorganismos que producen enfermedades en las plantas.

Flacidez. Pérdida de la rigidez ya sea en hojas o en toda la planta.

Floema. Tejido conductor de nutrientes que está constituido por tubos cribosos, células acompañantes, parénquima floemático y fibras.

Fuste. Madera del árbol sin considerar la corteza.

Galería. Camino largo y estrecho, en el que excavan ciertos animales.

y no están dentro del fruto.

Goma. Sustancias de polisacáridos complejos formados por las células, como respuesta a las heridas o infecciones.

Hialino. Incoloro, transparente.

Hifa. Filamento microscópico pluricelular del micobionte. Ramificación simple de un micelio.

Hifa divergente. Aparecen de forma paralela o subparalela.

Hifa ostiolar. Son las hifas que se encuentran en la parte apical del ostiolo de un cuerpo fructífero (peritecio).

Holoblástico. Cuando todas las capas de la pared de la célula conidiógena intervienen en la formación de la pared del conidio.

Hongo. Reino al que pertenecen los organismos sin clorofila, provistos de talo, generalmente filamentoso y ramificado, mediante el cual absorben los principios orgánicos nutritivos del medio, de tamaño variado y reproducción preferentemente asexual. Viven parásitos o sobre materias orgánicas en descomposición o parásitas de vegetales o animales.

Hongo de la ambrosía. Hace referencia a ciertos hongos que son cultivados en las galerías de algunos coleópteros escolítidos y de los cuales se alimentan.

Hongo imperfecto. Hongo del que no se sabe que produzca esporas sexuales.

Hongo oportunista. Microorganismo que habita en el ambiente como saprófito pero capaz de causar enfermedad en organismos con factores predisponentes.

Hospedante o Huésped. Planta que es invadida por un parásito y de la cual éste obtiene sus nutrientes.

In vitro. En cultivo, fuera del hospedante.

Inocular. Mecanismo por el que se pone en contacto un patógeno con una planta hospedante o con un órgano de ésta.

Inóculo. Patógeno o partes de él que causan infección; partes de los patógenos que entran en contacto con el hospedante.

ITS (Internal transcribed spacer). Regiones no codificantes que separan los componentes individuales de las unidades de ADN ribosómico. Estas regiones muestran mucho mayor polimorfismo de secuencia que las propias regiones génicas y, por lo tanto, al igual que los espaciadores intergénicos, son útiles como fuente de marcadores genéticos para el locus del ADN ribosómico.

Larva. Son las fases juveniles de los animales con desarrollo indirecto (con metamorfosis) y que tienen una anatomía, fisiología y ecología diferente del adulto.

Lesión. Daño sufrido por una planta debido al ataque de un animal o de un agente físico o químico.

Macroscópico. Que puede observarse sin ayuda de un lente de aumento o un microscopio.

Manchado azul. Coloración de la albura producida por la presencia de ciertos grupos de hongos, generalmente ascomicetos.

Marchitez. Pérdida de rigidez y caída de los órganos de la planta que por lo general se debe a la falta de agua en su estructura.

Medio de cultivo. Medio nutritivo preparado en el que se cultivan microorganismos o células vegetales.

Micangias. Estructuras especiales en el cuerpo de un animal que están adaptadas para el transporte de hongos (usualmente en forma de esporas).

Micelio. Hifa o masa de hifas que constituyen el soma de un hongo.

Micetofagia. Empleo de un hongo como alimento, ya sea consumiéndolo directamente, como lo hacen muchos animales, o convirtiéndolo en parasitado, como sucede con las micorrizas de algunas especies de plantas superiores. Sinónimo de micofagia.

Microbiota. Comunidad de microorganismos vivos que pueden residir en cualquier parte.

Microscópico. Muy pequeño; que puede observarse solo mediante el microscopio.

Muerte descendente. Muerte progresiva de retoños, ramas y raíces que por lo

general se inicia en la parte superior de la planta.

Mutualismo. Asociación de dos o más organismos de especies diferentes que supone beneficio para ambos.

Necrosis. Enfermedad de las plantas caracterizado por la muerte prematura de las células de un tejido u órgano.

Oportunista. Microorganismo normalmente no patógeno y que sólo produce una infección cuando las defensas del huésped están disminuidas.

Ostiolo. Abertura en forma de poro de los peritecios y picnidios a través de la cual las esporas salen del cuerpo fructífero.

Ovipositor u ovipositor. Órgano usado por las hembras de muchos insectos para depositar huevos. Consiste de apéndices o gonopodios de los segmentos 8 y 9 del abdomen. Son apéndices con la función de transmitir el huevo, preparar un lugar para éste y ubicarlo en la forma apropiada.

Parásito. Organismo que vive sobre o en otro organismo vivo (hospedante) y del cual obtiene sus nutrientes.

Parénquima. Tejido vegetal esponjoso de las células vivas que rellena los intersticios dejados por los vasos y que pueden tener funciones diversas según su ubicación, como reservar sustancias, fotosintetizar o rellenar.

Patogenicidad. Capacidad que tiene un patógeno para producir enfermedad.

Patógeno. Entidad que causa enfermedad.

PCR. La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica de laboratorio utilizada para amplificar secuencias de ADN. El método utiliza secuencias cortas de ADN llamados cebadores para seleccionar la parte del genoma a amplificar.

Perene. Árboles o arbustos que poseen hojas vivas a lo largo de todo el año.

Peritecio. Ascocarpo de los pirenomicetos en forma de botella o globular y que tiene una abertura o poro (ostiolo).

pH. Coeficiente que indica el grado de acidez o basicidad de una solución acuosa.

Plaga. Colonia de organismos que ataca y destruye los cultivos y las plantas.

Primer o iniciador. Es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de

partida para la replicación del ADN. Contiene un grupo 3' hidroxilo libre que forma pares de bases complementarios a una hebra molde y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde.

Puntuaciones o punteadura. Sector de la pared celular vegetal secundaria no desarrollada, a través de las cuales se comunican las células entre sí.

Purificación de ADN. Consiste en precipitar el ADN para remover las sales añadidas en los procesos anteriores.

Quitina. Sustancia formada por glúcidos nitrogenados, de color blanco e insoluble en agua, que constituye el material principal del que está formado el revestimiento exterior del cuerpo de los artrópodos, así como de ciertos hongos.

Radios o rayos medulares. Son los que mueven la savia a las partes centrales del árbol, incluyendo la albura. Tejidos delgados cuyas células se desarrollan en dirección radial, o sea, perpendicular a los anillos de crecimiento, cuya función es almacenar y difundir las materias nutritivas que aporta la savia descendente.

Ramnosa. Es un monosacárido de seis carbonos y que puede encontrarse en

diversas sustancias biológicas como los polímeros de pectina, característicos de las paredes vegetales, y en la pared de ciertos microorganismos.

Reniforme (alantoide). Con forma similar a la del riñón.

Reproducción asexual. Cualquier forma de reproducción que no implique meiosis o la fusión de gametos.

RNasa (ribonucleasa). Son enzimas que cortan las secuencias de ARN para su posterior degradación. Son importantes, por ejemplo, cuando hacemos extracción de ADN, evitando la presencia de ARN en nuestras muestras.

Saprófito. Organismo que obtiene sus nutrientes a partir de la materia orgánica muerta.

SDS (Sodium dodecyl sulfate). Separa a las proteínas de acuerdo a movilidad electroforética.

Secuenciación de ADN. Conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos en un oligonucleótido de ADN.

Secuencias homólogas. Se refiere a la situación en la que las secuencias de dos o más proteínas o ácidos nucleicos son

similares entre sí debido a que presentan un mismo origen evolutivo.

Septo. Pared transversal de las hifas o esporas.

Signo. Patógeno o sus partes o productos que se observan sobre una planta hospedante.

Sinema o sinemata. Conidióforo sinematoso.

Sinematoso. Compuesto de muchos conidióforos derechos, comprimidos en columnas.

Síntoma. Reacciones o alteraciones internas y externas que sufre una planta como resultado de su enfermedad.

Sustrato. Material o sustancia en la que un microorganismo se alimenta y desarrolla. Es también una sustancia sobre la que actúa una enzima.

Sybr Green. Compuesto orgánico que se introduce en la estructura secundaria de la doble hélice del ADN incrementándose notablemente su tasa de emisión fluorescente.

Taxa o taxón. Grupo de organismos emparentados, que en una clasificación dada han sido agrupados, asignándole al grupo un nombre en latín, una descripción si es una especie, y un tipo.

Tejido. Conjunto de células de estructura similar que llevan a cabo una función especial.

Teleomorfo. Etapa sexual del ciclo de vida de un hongo. Etapa teleomórfica.

Tilosis. Crecimiento excesivo del protoplasto de una célula parenquimatosa en el interior de una traqueida o vaso xilemático adyacente.

Transiluminador. Equipo que usa en principio luz UV con diferentes longitudes de onda como recurso para observar, analizar y tomar fotografías de proteínas, aminoácidos, péptidos, ácidos nucleicos en geles de agarosa con colorantes como el bromuro de etidio.

Traqueidas. Células conductoras del xilema, por donde circula la savia bruta. Son unicelulares, muy alargadas y con numerosas punteaduras aeroladas y simples, por medio de las cuales se intercomunican.

Tris-HCL (tris (hidroximetil) aminometano). Se utiliza ampliamente en bioquímica y biología molecular en particular para preparar soluciones tampón.

Vascular. Término que se aplica a un tejido vegetal o a una zona que presenta tejidos conductores; se aplica también a

un patógeno que se desarrolla principalmente en los tejidos conductores de una planta.

Vaso. Elemento xilemático o conjunto de ellos cuya función es conducir agua y nutrientes minerales por toda la planta.

Vector. Organismo animal que trasmite un patógeno. En ingeniería genética, es sinónimo de vehículo de clonación

(molécula de DNA autoduplicable como un plásmido o virus que se utiliza para introducir un fragmento de DNA extraño en una célula hospedante).

Xilema. Tejidos vegetal constituido por traqueidas, vasos, células de parénquima y fibras; made

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, N. G. 2005. Plant Pathology. Fifth edition. Elsevier Academic Press. USA. 922 p.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Alvarado, R. D., Saavedra, R. L., A. Almaraz, S. A., Tlapal, B. B., Trejo, R. O., Davidson, J. M., Kliejunas, J. T., Oak, S., O'Brien, J. G., Orozco T. F. y Quiroz R. D. 2007. Agentes asociados y su papel en la declinación y muerte de encinos (*Quercus*, Fagaceae) en el centro-oeste de México. *Polibotánica* 23:1-21.
- Allende, M. R., Picos, M. P., Márquez, Z. I., Carrillo, F. J., García, E. R. y León, F. J. 2013. Identificación Morfológica y Molecular de *Penicillium oxalicum* causante de pudrición de tallos y frutos de tomate. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31 (1): 13-19.
- Appel, D. N; Cameron, R. S; Wilson, A. D y Johnson, J. D. 2001. Como identificar y manejar el marchitamiento del encino en Texas. USDA Forest Service. Sociedad Internacional de Arboricultura Hispana (ISA). www.isahispana.com/treecare/articles/oakwilt.aspx; última consulta: 2.II.2016.

- Arizaga, S., Martínez, C. J., Salcedo, C. M. y Bello, G. M. 2009. Manual de la Biodiversidad de encinos michoacanos. *Aspectos generales de los encinos*. Ed. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT): México. 12-21 p.
- Baldini, A. y Pancel, L. 2000. Agentes de daño en el bosque nativo. Editorial Universitaria, S.A. Santiago de Chile. 124-125 p.
- Ballard, R. G., Walsh, M. A. y Cole, W. E. 1984. The penetration and growth of blue-stain fungi in the sapwood of lodgepole pine attacked by mountain pine beetle. *Can. J. Bot.* 62: 1724-1729.
- Barnett, H.L. and Hunter, Barry B. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (4th Edition). The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota. 218 p.
- Belhoucine, L., Bouhraoua, R. T., Meijer, M., Houbraken, J., Harrak, M. J., Samson, R. A., Equihua-Martinez, A. y Pujade-Villar, J. 2011. Mycobiota associated with *Platypus cylindrus* (Coleoptera: Curculionidae, *Platypodidae*) in cork oak stands of North West Algeria, África. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 5 (25): 4411-4423.
- Behrendt, C. J., Blanchette, R. A., and Farrel, R. L. 1995. Biological control of blue-stain fungi in wood. *Phytopathology* 85: 92-97.
- Challenger, A. 1998. *Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México: pasado, presente y futuro*. Comisión Nacional para el Uso y Conocimiento de la Biodiversidad, Instituto de Biología de la UNAM y Agrupación Sierra Madre S.C., México. 847 p.
- Cibrián, T. D., Méndez, M. J. T., Campos, B. R., O. Yates III, H., & Flores, L. J. E. 1995. *Insectos Forestales de México / Forest Insects of Mexico*. México: UACH, SARH.

USDA. Nat. Resources Canada. CFAN-FAO. Publication No 6. Forestry Commission. 453p.

Cibrián, T. D., Alvarado, D. y García, D. S. E. 2007. Enfermedades forestales en México/Forest diseases in Mexico. Chapingo, Estado de México: UACH; Conafor-Semarnat, México; Forest Service USDA, EUA; NRCAN Forest Service, Canadá y Comisión Forestal de América del Norte, COFAN, FAO. 587 p.

De la Cerda, L. M., 1999. *Encinos de Aguascalientes*. 2a ed. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México. 88p.

De la Paz Pérez O. C., Dávalos S. R. y Guerrero C. E. 2000. Aprovechamiento de la madera de encino en México. *Maderas y Bosques* 6: 3-13.

Dykstra, M. J, and Reuss L. 2003. *Biological Electron Microscopy: Theory, Techniques and Troubleshooting*. Kluwer Academic/Plenum, 2003. New York. 534 p.

Espinosa, A. L. 2007. Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: Eguiarte, L. E., Souza, V. y Aguirre, X. (ed. *Ecología molecular*. INE, CONABIO y UNAM). 517-536.

Eya, B. K. 2015. Revision of the genus *Crioprosopus* Audinet-Serville, and description of three new genera of Trachyderini (Coleoptera: Cerambycidae: Cerambycinae). *3914* (4): 351-405.

Farrell, R. L., Hadar, E., Kay, S. J., Blanchette, R. A. y Harrington, T. C. 1997. Survey of sapstain organisms in New Zealand and albino anti-sapstain fungi. *In: Biology and prevention of Sapstain, a conference sponsored by the Department of Forest Products, Oregon State University, Delta Whistler Resort, Whistler, British Columbia, Canada: 57-62 p.*

Food and Agriculture Organization (FAO). 1999. Hacia una definición uniforme de los productos forestales no madereros. *Unasylva* 50: 63-66.

García-de la Cruz, Y., Becerra, J., Quintanar, P. A., Ramos, J. M. y Hernández, A. M. 2014. La bellota de *Quercus insignis* Martens & Galeotti, 1843, la más grande del mundo. *Cuadernos de Biodiversidad* 46: 1-8.

Gibson, I. y Salinas, R. Q. 1985. Notas sobre enfermedades forestales y su manejo. Boletín técnico No. 106. SARH. 1-16 p.

Gobierno del Estado de Aguascalientes. 1994. Periódico Oficial, Tomo LVII, Número. 5. 25 p.

González-Espinosa, M., Meave, J., Ramírez-Marcial, N., Toledo-Aceves, T., Lorea-Hernández, F. e Ibarra-Manríquez, G. 2012. Los bosques de niebla en México: conservación y restauración de su componente arbóreo. *Ecosistemas* 21 (1-2): 36-52.

Govaerts, R. y Frodin, D. G. 1998. World checklist and bibliography of Fagales (*Betulaceae*, *Corylaceae*, *Fagaceae* and *Tycodendraceae*). Royal Botanical Gardens, Kew. Inglaterra, 407 p.

Gregory, G. F. 1971. Correlation of Isolability of the Oak Wilt Pathogen with Leaf Wilt and Vascular Water Flow Resistance. *Phytopatology* 61:1003-1005.

Harrington, T. C. 1981. Cycloheximide sensitivity as a taxonomic character in *Ceratocystis*. *Mycologia*, 73 (6): 1123-1129.

Harrington, T. C. 1993. Diseases of conifers caused by *Ophiostoma* and *Leptographium*. In: M.J. Wingfield, K.A., Seifert, and Webber, J.F. (eds.), *Ceratocystis* and

Ophiostoma: Taxonomy, Ecology and Pathogenicity. APS press, St. Paul, MN. 161-172p.

Hedgcock, G. G. 1906. Studies upon some chromogenic fungi wich discolor wood. *Annual Report Missouri Botanical Grdens* 17:59-114.

Hedgcock, G. G. 1933. The prevention of wood-staining in basket veneers. *Journal of Forestry* 31: 416-420.

Hovore, F. T. 1983. Taxonomic and biological observations on southwestern Cerambycidae (Coleoptera). *Col. Bull.* 37: 379–387

Hunt, J. 1956. Taxonomy of the genus *Ceratocystis*. *Lloydia* 19:1-59.

Jakobs K. 1999. The genus *Leptographium*: A critical taxonomic analysis. PhD Thesis. Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI). Faculty of Biological and Agricultural Sciences. Pretoria, South Africa. 459 p.

Jacobs, K. y Wingfield, M. J. (Eds). 2001. *Leptographium* species tree pathogens, insect associates and agents of blue-stain. St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society Press. 207 pp.

Jaramillo, J., Ospina, C., Gil, Z., Montoya, E. y Benavides, P. 2011. Avances en la biología de *Corthylus zulmae* (Coleoptera: Curculionidae) en plantaciones de *Alnus acuminata* (Betulaceae). *Revista Colombiana de Entomología* 37 (1): 48-55.

Kirisits, T. 2004. Fungal associaes of European bark beetles with special emphasis on the ophiostomatoid fungi. In: Lieutier, F., Day, K.R., Battisti, A., Grégoire, J.C. and Evans, H.F. (eds). *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. The Netherlands, 181-235p.

- Krokene, B. P., Roux, J., Solheim, H. and Wingfield, M. J. 2010. Pathogenicity of *Ceratocystis resinifera* to Norway spruce. *For. Path.* 40 (2010): 458-464.
- Lagerberg, T., Lundberg, G. y Melin, E. 1927. Biological and practical researches into blueing in pine and spruce. *Svenska skogsvårdsföreningens Tidskrift* 25: 145-272.
- Lim, Y. W., Massoumi, A. S., Kim, J-J, Lee, S. y Breuil, C. 2004. Multigene phylogenies of *Ophiostoma clavigerum* and closely related species from bark beetle-attacked *Pinus* in North America. *FEMS Microbiology Letters* 237: 89-96.
- Loppnau, P. A., y Breuil, C. 2003. Species level identification of conifer associated *Ceratocystis sapstain* fungi by PCR-RFLP on a beta-tubulin gene fragment. *FEMS Microbiol Lett.* 222: 143-147.
- Luna, J. A. de L.; Montalvo, E. L. y Rendón, A. B., 2003. Los usos no leñosos de los encinos en México. *Bol. Soc. Bot. Méx.*, 72: 107-117.
- Manion, P.D. 1991. *Tree Disease Concepts*. Segunda edición. USA: Prentice Hall. 1-353pp.
- Marmolejo, M. J. M. 1989. *Forstpathologische untersuchungen zur pilzflora nordost-Mexikos*. Tesis doctoral. Gottingen: Universitat Gottingen.
- Marmolejo, J. G. y García-Ocañas, F. 1993. Contribuciones micológicas en homenaje al biólogo José Castillo Tovar por su labor en pro de la micología Mexicana. *Reporte Científico, No. Especial* 13: 155-170.
- Martín, G. J. 2006. Factores Anatómicos y Químicos del xilema de *Ulmus minor* Mill. Relacionados con la resistencia a *Ophiostoma novo-ulmi* Brasier. Tesis doctoral. Departamento de silvopascicultura, Universidad Politécnica de Madrid. 5 p.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Martín, G. J., Solla, A., Sánchez, L. y García, M. 2008. Carvacrol y ácido salicílico incrementan la resistencia de *Ulmus minor* frente a *Ophiostoma novo-ulmi*. Sociedad Española de Ciencias Forestales. 26: 103-108.

Martínez, M. 1981. Los encinos de México. 2a. ed. Anales del Instituto de Biología, Comisión Forestal del Estado de Michoacán, México. 358 p.

Massoumi, A. S., Kim, J-J, Breuil, C. 2006. A new *Leptographium* species associated with the northern spruce engraver, *Ips perturbatus*, in western Canada. *Mycologia* 98 (1): 149-160.

Moreno, R. O., Velásquez, V. R., Sánchez, M. G., Siqueiros. D. M.E., de la Cerda. L. M. y Díaz. M. R. 2010. Diagnóstico Fitopatológico de las principales enfermedades en diversas especies de encinos y su distribución en la Sierra Fría de Aguascalientes, México. *Revista Polibotánica*. Núm. 29: 165-189.

Moreno, R. O; Sánchez, M. G; Marmolejo, M. J. G; Pérez, H. K; Moreno, M. C. 2014. Diversidad de hongos Ophiostomatoides en pinos de la Sierra Fría de Aguascalientes, México, asociadas con *Dendroctonus mexicanus*. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: 1-8.

Narváez, Z. J., Larralde, C.C. y Rodríguez, L.I. 2010. Los ácidos nucleicos y su cuantificación. (Eds). Plaza y Valdés. Editorial. 41-44pp.

National Center for Biotechnology Information. www.ncbi.nlm.nih.gov. Última consulta: 25.V.2015.

Nixon, C.K., 1998. "El género *Quercus* en México". En: *Diversidad biológica de México orígenes y distribución*. UNAM. México D.F. 447-458 p.

- Noguera, F. A. y Chemsak, J. A. 1996. Cerambycidae (Coleoptera), pp. 381-409. In: J. E. Llorente-Bousquets, A. N. García-Aldrete & E. González-Soriano (Eds.). Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: Hacia una síntesis de su conocimiento. Instituto de Biología, UNAM, México, D. F. 381-409 p.
- Noguera, F. A. 2014. Biodiversidad de Cerambycidae (Coleoptera) en México. Revista Mexicana de Biodiversidad, Supl. 85: S290-S297.
- Pérez, O., Jiménez, S. y Romero, J. 2006. Anatomía de la madera de ocho especies de *Quercus* (Fagaceae) de Oaxaca, México. Madera y Bosques 12 (1): 6394.
- Pérez-Olvera, C. y Dávalos-Sotelo. 2008. Algunas características anatómicas de la madera de 24 especies de *Quercus* (encinos) de México. Madera y Bosques 14: 43-80.
- Pérez-Vera, O. A. 2009. Caracterización morfológica, molecular e histopatología de hongos ophiostomatoides asociados al pino de las alturas (*Pinus hatrwegii* Lindl). Tesis. Institución de enseñanza e investigación en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 4p.
- Pionteli, E. y Giusiano, G. 2003. Notas micológicas VI: Selección de microhongos asociados a material vegetal y queratina desde Argentina y Chile. Boletín Micológico 18: 89-99.
- Przybyl, K. 2006. Fungi and minerals occurring in heartwood discolorations in *Quercus robur* trees. Acta Societatis Botanicorum Poloniae. Vol. 76 (1): 55-60.
- Reader, R. U., Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Lett. Appl. Microbiol. 1: 17-20.

- Revilla, G. U. 2013. Hongos Ophiostomatoides asociados a *Dendroctonus mexicanus* en *Pinus leiophylla* var. *Leiophylla*. Tesis. División de Ciencias Forestales. Chapingo, Texcoco, Estado de México. 69p.
- Repe, A., Jurc, M. 2010. Ophiostomatoid fungi (Ascomycota: Ophiostomataceae) associated with bark beetles and their possible economic impact in forest and timber production. *Zbornik gozdarstva in lesarstva* 91: 3-12.
- Romero C. S. 1996. Hongos Fitopatógenos. Segunda Edición. Universidad Autónoma Chapingo, México. 347 p.
- Romo, B., Velásquez, R., Siqueiros, M., Sánchez, G., de la Cerda, M., Moreno, O., y Pérez Molphe, E. 2007. Organismos con efecto potencial en el declinamiento de encinos de la Sierra Fría, Aguascalientes, México. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. Número 39.
- Romón, P., Zhou, X., Iturrondobeitia, J., Wingfield, M. y Goldarazena, A. 2007. *Ophiostoma* species (Ascomycetes: Ophiostomatales) associated with bark beetles (Coleoptera: Scolytinae) colonizing *Pinus radiata* in northern Spain. *Can. J. Microbiol.* 53: 756-767.
- Ruiz, G. C. y Lanfranco, D. 2008. Los escarabajos de corteza en Chile: una revisión de la situación actual e implicancias en el comercio internacional. *Bosque* 29 (2): 109-114.
- Sánchez-Martínez, G.; Velázquez-Valle, R; Moreno-Rico, O; Romo-Díaz, B y Siqueiros-Delgado, M. (Eds.). 2008. Observaciones preliminares sobre la biología y distribución de un barrenador de encinos (Coleoptera: Cerambycidae) en la Sierra Fría, Aguascalientes. *Memoria del XIV Simposio Nacional de Parasitología Forestal*. Aguascalientes, México. 152-158 p.

- Sánchez-Martínez, G.; Moreno-Rico, O. y Siqueiros-Delgado, M. E. 2010. “*Crioprosopus magnificus* Leconte (Coleoptera: Cerambycidae) in Aguascalientes, Mexico: Biological Observations and Geographical Distribution”, Pabellón de Arteaga, Aguascalientes, México. *Coleopterists Bulletin* 64 (4): 319-328.
- Sánchez-Martínez, G.; Moreno-Rico, O.; Reséndiz-Martínez, J. F.; Arriola-Padilla, V. J. y González-Gaona, E. 2014. El barrenador de encinos: *Crioprosopus magnificus*: bases para su diagnóstico y control. Folleto Técnico No. 57. INIFAP, Ags. México. 14 p.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 74. No. 12. 5463-5467pp.
- Schmidt, O. 2006. *Wood and Tree Fungi. Biology, Damage, Protection, and Use*. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 329 p.
- Schroers, H., Samuels, G., Seifer, K. y Gams, W. 1999. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia* 91 (2): 365-385.
- Seifert, K. A., 1993. Sapstain of commercial lumber by species of *Ophiostoma* and *Ceratocystis*: Taxonomy, ecology and pathogenicity. St. Paul, Minnesota, APS Press: 141-153.
- Seifert, K. A., de Beer, Z. W. y Wingfield, M. J. (Eds). 2013. *Ophiostomatoid Fungi: Expanding Frontiers*. Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. CBS Biodiversity. 219-222 p.
- Snyder, W. y Nash, S. 1981. *Fungal wilt Diseases of plants*. Academic Press, inc. (London) LTD. 45 p.

- Sosa-Ramírez, J., O. Moreno-Rico, G. Sánchez-Martínez, M.E. Siqueiros-Delgado y V. Díaz-Núñez. 2011. Ecología y fitosanidad de los encinos (*Quercus spp.*) en la Sierra Fría, Aguascalientes, México. *Maderas y Bosques* 17 (3):49-63
- Sosa Ramírez, J., Breceda Solís, A., Jiménez Sierra, C., Íñiguez Dávalos, L., Ortega Rubio, A. 2014. Manejo del área natural protegida Sierra Fría, Aguascalientes: situación actual y desafíos. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 60: 71-77.
- Sutton, J. C., Li, D. W., Peng, G., Yu, H., Zhang, P. G. y Valdebenito-Sanhueza, R. M. 1997. *Gliocladium roseum*, a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Dis.* 81:316-328.
- Sutton, J. C., Liu, W., Huang, R. y Owen-Going, N. 2002. Ability of *Clonostachys rosea* to establish and suppress sporulation potential of *Botrytis cinerea* in deleafed stems of hydroponic greenhouse tomatoes. *Biocontrol Sci. Technol.* 12: 413-425.
- Terrón, R. A. 1991. Fauna de coleópteros Cerambycidae de la Reserva de la Biosfera “La Michilia”, Durango, México. *Folia Entomológica Mexicana* 81: 285-314.
- Upadhyay, H. P. y Kendrick, W.B. 1975. Prodrómus for a revision of *Ceratocystis* (Microascales, Ascomycetes) and its conidial states. *Mycologia* 67: 798-805.
- Upadhyay, H. P. 1981. A monograph of *Ceratocystis* and *Ceratocystiopsis*. Athens: University of Georgia Press. 176 p.
- Upadhyay, H. P. 1993. Classification of the Ophiostomatoid fungi. *In*: Wingfield, M.J., Seifert, K.A., Webber, J.F. (eds.), *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy,

ecology and pathogenicity. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota. 7-13p.

Valencia, A. S., 2004. "Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México". Bol. Soc. Bot., Méx. 75: 33-53.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M, Gelfand, D. Sninsky, J. and White, T. (eds). PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. San Diego, Academic Press Inc. 482 p.

Williams, G. R. 2005. Industrial Wood Protection. En W. Paulus (Ed), *Directory of Microbicides for the Protection of Materials*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 419-439 p.

Wingfield, M. J., Seifert, K. A. y Webber, J. F. (Eds). 1993. *Ceratocystis and Ophiostoma: Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity*. St. Paul, MN, USA: American Phytopathological Society Press. 7-13 p.

Yadeta, K. y Thomma, B. 2013. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in plant science. Plant-Microbe Interaction*. Volume 4. Article 97.

Yamaoka, Y., Masuya, H., Ohtaka, N., Goto, H., Kaneko, S. y Kuroda, Y. 2004. *Ophiostoma* species associated with bark beetles infesting three *Abies* species in Nikko, Japan. *J. For. Res.* 9: 67-74.

Yu, H. y Sutton, J. C. 1998. Effects of inoculum density, wetness duration, and temperatura on control of *Botrytis cinérea* by *Gliocladium roseum* in raspberry. *Canadian Journal of Plant Pathology* 20: 243-252.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Zavala, Ch. F. 1998. Observaciones sobre la distribución de encinos en México. Polibotánica 8: 47-64.

Zavala, Ch. F. 1989. Identificación de encinos de México. Universidad Autónoma Chapingo. México. 150 p

Zhou, X., de Beer, W. Z., Wingfield, B. D., Wingfield, M.J. 2001. Ophiostomatoid fungi associated with three pine-infesting bark beetles in South Africa. Sydowia 53: 290-300.

Zhou, X. 2002. *Taxonomy and biology of ophiostomatoid fungi associated with coniferinfesting bark beetles*. (PhD thesis). University of Pretoria, Pretoria, South Africa.

Zhou, X., de Beer, W. Z., Cibrian, D., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. 2004. Characterisation of *Ophiostoma* species associated with pine bark beetles from Mexico, including *O. pulvinisporum* sp. nov. *Mycological Research*, 108 (6): 690-698.

Zipfel D. R, Z. Wilhelm de Beer Z., Jacobs K., Wingfield D. B. and Michael J. Wingfield J. M. 2006. Multi-gene phylogenies define *Ceratocystiopsis* and *Grosmannia* distinct from *Ophiostoma*. *Studies in Mycology* 55: 75-97

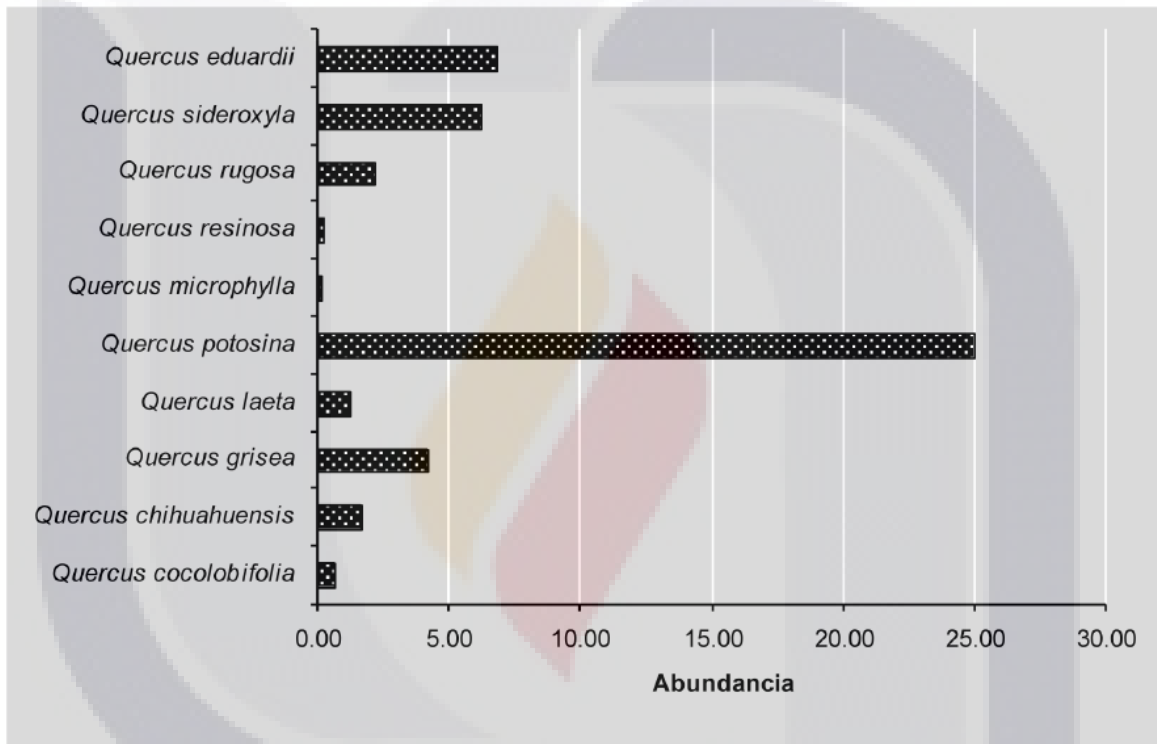
APÉNDICES

Apéndice A. Tabla. Especies de encinos y su frecuencia en la Sierra Fría, Aguascalientes y también se muestran las especies asociadas a cada especie de encino.

Espece	Núm. de sitios	Frecuencia*	Especies asociadas
<i>Quercus potosina</i> Trel.	37	61,6	<i>J. deppeana</i> , <i>Arctostaphylos pngens</i> , <i>Q. chihuahuensis</i> , <i>Pinus teocote</i>
<i>Q. eduardii</i> Trel.	20	33,3	<i>Q. sideroxyla</i> , <i>Q. rugosa</i> , <i>P. leiophyla</i> , <i>Q. chihuahuensis</i>
<i>Q. siderosyla</i> Humb. Et Bonpl.	14	23,3	<i>Q. rugosa</i> , <i>P. leiophyla</i> , <i>Q. chihuahuana</i> , <i>P. teocote</i>
<i>Q. grisea</i> Liemb.	11	18,3	<i>J. deppeana</i> , <i>Dodonaea viscosa</i> , <i>A. pungens</i>
<i>Q. rugosa</i> Née	7	11,6	<i>P. leiophyla</i> , <i>Q. chihuahuensis</i> , <i>Q. sideroxyla</i> , <i>J. deppeana</i>
<i>Q. chihuahuensis</i> Trel.	7	11,6	<i>Q. rugosa</i> , <i>Q. sideroxyla</i> , <i>P. teocote</i> , <i>P. leiophyla</i> , <i>Q. eduardii</i> , <i>J. deppeana</i>
<i>Q. laeta</i> Liemb.	5	8,3	<i>J. deppeana</i> , <i>P. teocote</i> , <i>A. pungens</i> , <i>P. leyophyla</i>
<i>Q. microphyla</i> Née	3	5,0	<i>Q. potosina</i> , <i>Q. sideroxyla</i> , <i>Q. rugosa</i> , <i>Q. chihuahuensis</i>
<i>Q. coccolobifolia</i> Trel.	2	3,3	<i>P. lumholtzii</i> , <i>J. deppeana</i> , <i>J. durangensis</i> , <i>P. leiophyla</i> , <i>P.</i>

			<i>durangensis</i>
<i>Q. resinosa</i> Liemb.	1	1,0	<i>Dodonaea viscosa, A. pungens, Q. grisea</i>

Frecuencia*=(No. de sitios) (100)/total de muestreos (Sosa-Ramírez, et al. 2011)



Abundancia de las especies de encinos identificadas en un polígono de 25 km² en el ANP-Sierra Fría, Aguascalientes. El eje de las X constituye el índice de abundancia, que oscila entre 0.1872 (*Q. microphylla*) y 25 (*Q. potosina*). El valor máximo del índice de abundancia podría ser 60 (Sosa-Ramírez et al. 2011).

Apéndice B. Preparación de Soluciones y medio de cultivo.

Buffer 10 mM Tris/ 1.0 mM EDTA a pH= 8.0. Se pesaron 1.2114 g de tris base y 0.2923 g de EDTA y se disolvieron en 900 ml de agua desionizada. A continuación se ajusto el pH a 8 con gotas de HCl. Cuando la solución tuvo el pH indicado se aforó a un litro con agua desionizada. Posteriormente se filtro a 0.45 µm.

Buffer 1x Tris-Acetato-EDTA (TAE). Se preparó una solución stock 50X, para esto se pesaron 242.28 g de tris base y se agregaron junto con 57.1 ml de ácido acético glacial a 100 ml de una solución 0.5 M EDTA (pH 8). La solución de trabajo se obtuvo diluyendo en agua desionizada el stock preparado a 1 X.

Gel de agarosa al 0.8%. Se pesaron 8 g de agarosa y se disolvieron en 200 ml de buffer TAE. Después se aforo a un litro, se calentó un poco y por último se dejó enfriar.

Buffer de carga. Para preparar buffer de carga 6x (solución de trabajo), se pesaron 2.5 mg de azul de bromofenol, 2.5 mg de xilene cyanol FF y 400 mg de sucrosa y se disolvieron en un mililitro de agua desionizada.

Lactofenol con azul de algodón. Para preparaciones en fresco y tinciones de mohos.

- Solución saturada de azul algodón (azul anilina soluble).....10ml
- Glicerol.....10ml
- Agua.....80ml

Mezclar esta solución con lactofenol a partes iguales.

Lactofenol. Para preparaciones microscópicas en fresco de mohos.

- Ácido láctico.....100ml
- Fenol.....100g
- Glicerol.....200ml
- Agua.....100ml

Extracto de Malta Agar. Se utiliza para la demostración, aislamiento y numeración de hongos y levaduras. A partir del extracto de malta y la harina de soya se observa que éstos favorecen el crecimiento de hongos y levaduras, al igual que a otras bacterias, sin embargo se le confiere selectividad al medio para que desarrollen los hongos y las levaduras, acidificando el medio con una polución de ácido tartárico al 10%, adicionando a cada litro de medio de cultivo, 14 ml del ácido.

- Agar.....20 g
- Dextrosa.....10 g
- Extracto de levadura.....3.0 g
- Extracto de malta.....3.0 g
- Peptona.....5.0 g
- Agua.....1 L

