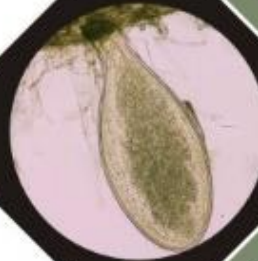




Colegio de  
Postgraduados

# Avances de Investigación 2015

## POSGRADO EN FITOSANIDAD



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

## POSGRADO EN FITOSANIDAD

Editores:

Erika Janet Zamora Macorra

Juan Manuel Vanegas Rico

Comité organizador

J. Refugio Lomeli Flores

Daniel Nieto Angel

Erika Janet Zamora Macorra

Juan Manuel Vanegas Rico

Sugerencia para citar este documento

Zamora-Macorra, E. J. y J. M Vanegas-Rico (Eds.) 2015. Avances de Investigación. Posgrado en Fitosanidad Colegio de Postgraduados. 19 y 20 de noviembre de 2015. Montecillo, Texcoco Edo. de México 338 pp

## CONTENIDO

PRESENTACIÓN.....	vii
BIOTECNOLOGÍA Y DETECCIÓN CON HERRAMIENTAS MOLECULARES.....	1
DISTRIBUCIÓN DE <i>Claviceps gigantea</i> (HYPOCREALES: CLAVICIPATACEAE) Y EVALUACIÓN IN VIVO EN CONEJOS EN INICIACIÓN .....	2
VARIABILIDAD BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE <i>Iris yellow spot virus</i> EN CULTIVOS DE CEBOLLA EN EL ESTADO DE MORELOS.....	7
AISLAMIENTOS DE <i>Iris yellow spot virus</i> EN CEBOLLA CULTIVADA EN MORELOS Y MICHOACÁN: HOSPEDEROS ALTERNANTES Y VECTORES .....	12
ACUMULACIÓN DE TRANSCRITOS DE LOS GENES <i>C4H</i> Y <i>COMT</i> , ACTIVIDAD ENZIMÁTICA, FENOLES SOLUBLES TOTALES Y LIGNINA TOTAL EN CHILE CM334 INFECTADO POR <i>Nacobbus aberrans</i> Y <i>Meloidogyne incognita</i> .....	17
DISEÑO DE PRIMERS PARA LA DETECCIÓN DEL GEN DE QUITINASAS IMPLICADO EN LAS RESPUESTAS DE DEFENSA EN PLÁNTULAS DE CHILE JALAPEÑO.....	23
DESARROLLO DE UNA POLISONDA PARA DETECTAR <i>mexican papita viroid</i> , <i>Pepino mosaico virus</i> Y <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> EN JITOMATE ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) .....	29
COMPATIBILIDAD SEXUAL Y VEGETATIVA ENTRE ESPECIES DEL CLADO <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Orden: Glomerellales, Familia: Glomerellaceae) Y SU RELACIÓN CON SU IDENTIFICACIÓN MOLECULAR .....	34
DETECCIÓN CARACTERIZACIÓN Y ETIOLOGÍA .....	40
CARACTERIZACIÓN DE LOS FACTORES QUE INFLUYEN EN LA EVALUACIÓN VISUAL DE ENFERMEDADES EN PLANTAS .....	41
DETECCIÓN AÉREA DEL INÓCULO PRIMARIO Y SECUNDARIO DE LA ROYA ASIÁTICA DE LA SOYA EN EL SUR DE TAMAULIPAS .....	47
VARIABILIDAD GENÉTICA DE <i>Xanthomonas fragariae</i> Y EVALUACIÓN DE SU SEVERIDAD EN GENOTIPOS DE FRESA .....	52
ETIOLOGÍA Y CONTROL DE LA PUDRICIÓN DEL COGOLLO DE LA PIÑA.....	57
ETIOLOGÍA, INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE MANCHAS EN HOJAS Y CÁLCICES DE JAMAICA ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) EN GUERRERO, MÉXICO .....	62
IDENTIFICACIÓN Y RESISTENCIA A ENFERMEDADES EN AVENA, CEBADA, MAIZ Y TRIGO.....	67
IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE RAZAS FISIOLÓGICAS DE <i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>avenae</i> EN VALLES ALTOS DE MÉXICO .....	68
GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A <i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> (Uredinales: Pucciniaceae) EN GENOTIPOS DE TRIGO HARINERO .....	74

ANÁLISIS GENÉTICO E IDENTIFICACIÓN DE REGIONES GENOMICAS (QTLs) QUE CONDICIONAN RESISTENCIA A ROYAS EN LA VARIEDAD DE TRIGO HARINERO HUITES F95 .....	80
FUENTES DE RESISTENCIA A LA ROÑA DE LA ESPIGA Y PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS EN LÍNEAS AVANZADAS DE CEBADA MALTERA.....	85
HERENCIA DE LA RESISTENCIA A <i>Sporisorium reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i> (USTILAGINALES: USTILAGINACEAE) EN MAÍZ .....	90
REDUCCIÓN DE ESTRÉS HÍDRICO EN MAÍZ MEDIADA POR BACTERIAS ENDOFÍTAS DE LA RAÍZ.....	95
GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A LA ROYA DEL TALLO EN CUATRO GENOTIPOS DE TRIGOS DUROS.....	100
RESISTENCIA Y MANEJO DE ENFERMEDADES .....	105
RESPUESTA BIOQUÍMICA DE VARIEDADES DE <i>Mangifera indica</i> (SAPINDALES, ANACARDIACEAE) A LA INFECCIÓN POR <i>Fusarium</i> spp (HYPOCREALES; NECTRIACEAE) .....	106
TOLERANCIA DE CULTIVARES DE MANGO ( <i>Mangifera indica</i> ) AMARILLO A <i>Oidium mangiferae</i> .....	112
RESISTENCIA DE VARIEDADES MEXICANAS DE ARROZ A <i>Pyricularia oryzae</i> .....	117
INCREMENTO DE FENOLES EN NOPAL VERDURA: <i>Salmonella</i> COMO INDUCTOR .....	123
EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE LA LINEA 35-3 DE CHILE ANCHO TIPO HUACLE ( <i>Capsicum annuum</i> ) CON DOS POBLACIONES DE <i>Nacobbus aberrans</i> .....	128
DESINFESTACIÓN DE SUELO EN INVERNADERO, PARA EL CONTROL DE <i>Nacobbus aberrans</i> (Nematoda: Pratylenchidae) MEDIANTE EL USO DE ENMIENDAS ORGÁNICAS Y REGULADORES BIOLÓGICOS .....	133
GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A LA PATA PRIETA ( <i>Phytophthora parasitica</i> ) EN JAMAICA ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> ).....	141
AVANCES EN EL ESTUDIO DE LA SECADERA DE PINO Y APLICACIÓN DE <i>Trichoderma harzianum</i> EN TRES SUSTRATOS.....	145
TAXONOMÍA, BIOLOGÍA Y CONTROL DE PLAGAS .....	150
CONTROL QUÍMICO DE <i>STRUTHANTHUS INTERRUPTUS</i> (SANTALALES-LORANTHACEAE) EN EL JARDÍN ALEXANDER PUSHKIN, DISTRITO FEDERAL .....	151
ESPECIES DE <i>Phyllophaga</i> (COLEOPTERA: MELOLONTHIDAE) EN LA ZONA DE ABASTO DEL INGENIO EMILIANO ZAPATA, MORELOS, MÉXICO .....	155
¿TIENE ALGÚN EFECTO SOBRE LA BIOLOGÍA REPRODUCTIVA ALIMENTAR CON CASEÍNA (PROTEÍNA) A ADULTOS DE <i>Catolaccus hunteri</i> (HYMENOPTERA: PTEROMALIDAE)?.....	161
ÁCAROS, DINÁMICA Y RELACIÓN CON FITOPATÓGENOS .....	166
ÁCAROS ERIÓFIDOS (ACARI: ERIOPHYOIDEA) ASOCIADOS A ÁRBOLES DE LA FAMILIA PINACEAE EN MÉXICO .....	167

DINÁMICA POBLACIONAL DE <i>Oligonychus punicae</i> y <i>Oligonychus perseae</i> (ACARI: TETRANYCHIDAE) EN DOS HUERTAS DE AGUACATE DEL MUNICIPIO DE URUAPAN, MICHOACÁN .....	172
ENEMIGOS NATURALES (ÁCARO-PATÓGENO Y DEPREDADORES) DE <i>Raoiella indica</i> EN MÉXICO .....	177
<i>Steneotarsonemus spinki</i> : DINÁMICA DE POBLACIONES, EVALUACIÓN DE DAÑOS EN CAMPO Y ENEMIGOS NATURALES EN LAS ZONAS PRODUCTORAS DE TABASCO Y VERACRUZ, MÉXICO.....	182
DIVERSIDAD GENÉTICA DEL GÉNERO <i>Brevipalpus</i> EN CUATRO ESPECIES DE CÍTRICOS .....	187
GAMA DE HOSPEDANTES Y DIAGNÓSTICO POR PCR DE LEPROSIS CITOPASMÁTICA DE LOS CÍTRICOS TRANSMITIDA POR ÁCAROS. ....	192
LEPROSIS NUCLEAR DE LOS CÍTRICOS: GAMA DE HOSPEDANTES Y TRANSMISIÓN POR ÁCAROS DEL GÉNERO <i>Brevipalpus</i> EN MÉXICO.....	197
<i>Diaphorina citri</i> Y ENFERMEDADES DE CÍTRICOS .....	203
INTERACCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS Y PARASITOIDES PARA EL CONTROL DEL PSÍLIDO ASIÁTICO DE LOS CÍTRICOS <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama (Hemiptera:Liviidae).....	204
COMPORTAMIENTO DE FORRAJEО DE <i>Tamarixia radiata</i> (HIMENOPTERA: EULIPHIDAE) SOBRE <i>Diaphorina citri</i> (HEMIPTERA: LIVIIDAE).....	209
SUPERVIVENCIA Y REPRODUCCIÓN DE <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama (HEMIPTERA: LIVIIDAE) EN PLANTAS DE NARANJA VALENCIA ( <i>Citrus sinensis</i> ) Y LIMÓN MEXICANO ( <i>Citrus aurantifolia</i> ) .....	214
DINAMICA DE LA CONCENTRACIÓN BACTERIANA DE <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> Y SU EFECTO EN LA EXPRESIÓN SINTOMÁTICA E HISTOLÓGICA EN CÍTRICOS .....	220
DISTRIBUCIÓN DE LA CARGA DE INÓCULO REGIONAL DE <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> EN <i>Diaphorina citri</i> EN TRES ESCENARIOS EPIDEMIOLÓGICOS .....	226
IMPLICACIÓN DEL MANEJO AGRONÓMICO Y CRONICIDAD EN EL IMPACTO PRODUCTIVO DEL HUANGLONGBING EN MICHOACÁN .....	233
EVALUACIÓN DE AISLAMIENTOS MODERADOS DE <i>Citrus tristeza virus</i> PARA SU USO EN UN PROGRAMA DE PROTECCIÓN CRUZADA EN MÉXICO .....	240
NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS, EXTRACTOS BOTÁNICOS E INSECTICIDAS .....	245
CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE NINFAS DE MOSCA PINTA (HEMIPTERA: CERCOPIDAE) EN EL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR. ....	246
DIVERSIDAD ESPECÍFICA DE <i>Metarhizium spp.</i> (Ascomycota: Hypocreales) Y SU RELACIÓN CON DIFERENTES HÁBITATS Y ETAPAS FENOLÓGICAS DEL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR .....	251
EVALUACIÓN DE VASOS PARA BIOENSAYO CON LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae) CON DOS INSECTICIDAS .....	256



REPELENCIA DE ADULTOS DE MOSCA BLANCA <i>Trialeurodes vaporariorum</i> (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE) CON EXTRACTOS CRUDOS Y ACEITE ESENCIAL DE CLAVO <i>Syzygium aromaticum</i> (MYRTACEAE) EN LABORATORIO .....	261
REPELENCIA DE EXTRACTOS VEGETALES CRUDOS A NINFAS DE <i>Meccus pallidipennis</i> (HEMIPTERA: REDUVIIDAE) EN PRUEBAS DE CONFINAMIENTO EN LABORATORIO	266
DISMINUCIÓN DE LA POBLACIÓN DEL PICUDO <i>Anthonomus eugenii</i> Cano Y PROTECCIÓN DE FRUTOS DE <i>Capsicum annum</i> L. CON HOMEOPATÍA .....	272
INSECTOS ASOCIADOS A PINOS, FRUTALES Y MAGUEY .....	277
EL GÉNERO <i>Pityophthorus</i> SPP. (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE: SCOLYTINAE) EN BOSQUES TEMPLADOS DE PINO EN JALISCO .....	278
PRESENCIA DE LOS ESTADOS DE DESARROLLO DE <i>Conotrachelus crataegi</i> CON RESPECTO A LA FENOLOGÍA DEL TEJOCOTE EN SAN ANDRES CALPAN, PUEBLA...	281
BARRENADORES DE LA SEMILLA DEL AGUACATE ( <i>Persea americana</i> Mill.) EN LA REGIÓN ESTE DEL ESTADO DE HIDALGO .....	285
BIOLOGÍA E IDENTIFICACIÓN DE CHICHARRITAS (HEMIPTERA: CICADELLIDAE) EN AGUACATE EN ESTADO DE MORELOS .....	288
HORMIGAS ASOCIADAS A ESCAMAS (HEMIPTERA: COCCOIDEA) EN FRUTALES DE GUERRERO .....	292
PROCEDIMIENTO PARA LA FIJACIÓN DEL COLOR EN EL GUSANO ROJO DE MAGUEY .....	297
DIETA ARTIFICIAL PARA EL GUSANO ROJO DEL MAGUEY .....	301
FORMICIDAE (INSECTA: HYMENOPTERA) DE LA RBEC “EL CIELO”, TAMAULIPAS, MÉXICO .....	305
ETOLOGÍA, INTERACCIONES Y ECOLOGÍA QUÍMICA .....	309
EVIDENCIA DE UNA FEROMONA DE AGREGACIÓN EN <i>Sphenophorus incurrens</i> GYLLENHAL (COLEOPTERA: DRYOPHTHORIDAE) .....	310
RESPUESTA OLFATIVA DEL PARASITOIDE <i>Tamarixia triozae</i> (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE) INFLUENCIADO POR SU ORIGEN DE CRÍA Y SU APRENDIZAJE ASOCIATIVO .....	314
CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS SENSILAS ANTENALES DE <i>Rhyssomatus nigerrimus</i> (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) .....	319
RESPUESTA CONDUCTUAL DE <i>Catolaccus huteri</i> (HYMENOPTERA: PTEROMALIDAE) A SEÑALES VISUALES FORMA Y COLOR .....	325
TOXICIDAD DE IMIDACLOPRID Y FLONICAMID SOBRE <i>Dicyphus hesperus</i> (HEMIPTERA: MIRIDAE) .....	329
INTERACCIÓN DE <i>Dicyphus hesperus</i> (HEMIPTERA: MIRIDAE) EN LA ACTIVIDAD DE <i>Tamarixia triozae</i> (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE) SOBRE EL PSÍLIDO DE LA PAPA.....	334

# **AVANCES DE INVESTIGACIÓN 2015**

## **POSGRADO EN FITOSANIDAD**

### PRESENTACIÓN

“Avances de investigación” es un esfuerzo académico del Posgrado en Fitosanidad del Colegio de Postgraduados, que tiene como objetivo que nuestros estudiantes den a conocer los trabajos de investigación que se desarrollan en los diferentes laboratorios que conforman nuestro posgrado. Este tipo de eventos tuvo su origen como una iniciativa dentro del Instituto de Fitosanidad (ahora Posgrado en Fitosanidad) en 1990, por lo que este año cumplimos 25 años de este importante evento. Aunque se vio interrumpida por más de una década, en 2013 se retoma la celebración anual ya que ha demostrado ser un entorno que permite que los académicos y estudiantes se enteren de las investigaciones que se desarrollan dentro de nuestro posgrado, y también permite que estos últimos se enfrenten a la defensa de su trabajo ante un grupo de colegas que dan críticas siempre con el afán de mejorar.

En este año se presentan 72 trabajos que cubren las diferentes áreas de trabajo de la fitosanitarias, agrupados en las dos líneas de investigación que nuestro posgrado tiene registradas ante el CONACyT: (a) Diagnóstico, Ecología y Manejo de Plagas y (b) Biotecnología, Inocuidad y Bioseguridad. Para su presentación los trabajos se catalogaron en 10 mesas de trabajo que abarcan temas tradicionales como el manejo integrado de plagas pero también temas de investigación de frontera.

El usuario de este documento tendrá acceso a los manuscritos dentro del archivo marcado como “índice” en este CD. Los trabajos fueron elaborados por nuestros estudiantes y contaron con el aval de dos de sus profesores con lo cual se garantiza que tienen la calidad científica requerida en un estudiante de posgrado.

# BIOTECNOLOGÍA Y DETECCIÓN CON HERRAMIENTAS MOLECULARES





## DISTRIBUCIÓN DE *Claviceps gigantea* (HYPOCREALES: CLAVICIPATACEAE) Y EVALUACIÓN IN VIVO EN CONEJOS EN INICIACIÓN

Alma R. **Solano Báez**<sup>1</sup>, Carlos **De León**<sup>1</sup>, Santos G. **Leyva Mir**<sup>2</sup>, Adriana **Delgado Alvarado**<sup>1</sup>,  
Marco A. **Hernández Bello**<sup>3</sup>, Juan M. **Cuca García**<sup>4\*</sup>

### INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Claviceps* son parásitos especializados de pastos, ciperáceas y gramíneas, que afectan inflorescencias, ya que los órganos reproductivos de los hospedantes son remplazados por un esclerocio (Pažoutova *et al.*, 2004). En México, *C. gigantea* es una especie considerada endémica de los valles altos (Fucikovsky y Moreno, 1976). Las pérdidas económicas en el cultivo de maíz ocasionadas por este hongo son muy severas, así como la disminución total de la calidad del grano (Warham *et al.*, 1999).

Se reporta que *C. gigantea* produce una mezcla de alcaloides como; festuclavina 65 %, D-dihydrolysergol- (I) 15 %, chanoclavina 7 %, pyroclavina 3 % (Aguirell, 1965). De forma más específica, se menciona que los alcaloides producidos por el hongo causan problemas en el sistema nervioso central, muscular, de vasos, hemorragias en el endocardio y pulmones. Márquez y Ávila (1973) comprobaron que en pollos en crecimiento, existe una disminución de su peso al incorporar esclerocios en su dieta. En la agricultura, los alcaloides del tipo ergot, se reportan con efectos antiherbívoros, que pueden manifestar efectos tóxicos en animales (Panaccione *et al.*, 2006).

Existen estudios sobre ergovalina, alcaloide de tipo ergot producido por un hongo endófito y *Festuca arundinacea*, pero no por miembros del género *Claviceps* spp. No obstante, la toxicología de la ergovalina manifiesta diferencias en comparación con los alcaloides producidos por *Claviceps* spp. (Korn *et al.*, 2014).

<sup>1</sup> Fitosanidad- Fitopatología, Colegio de Postgraduados, <sup>2</sup> Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. <sup>3</sup> Agricultural Research Service of United States Department of Agricultural. <sup>4</sup> Ganadería, Colegio de Postgraduados. Autor de correspondencia: [jmcuca@colpos.mx](mailto:jmcuca@colpos.mx)

A la fecha no hay información de la presencia de *C. gigantea* y pesar de existir algunos reportes acerca de los alcaloides producidos por el cornezuelo, los del tipo dihidroergolina, presentes en

esclerocios de *C. gigantea*, no han sido estudiados. Por tal motivo esta investigación tiene como propósito, caracterizar morfológica y molecularmente a *C. gigantea* procedente de diferentes zonas geográficas y su efecto *in vivo* en conejos en iniciación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Toma de muestras.** Con base en reportes de distribución de *C. gigantea*, se colectaron esclerocios en localidades del estado de México (Fucikovsky y Moreno, 1971). Con la finalidad de actualizar la información de distribución del fitopatógeno, se buscó la presencia del hongo, en localidades con condiciones climáticas similares a las zonas con reportes de este patógeno. Se colectaron muestras de material sospechoso, en el Estado de Puebla y se trasladaron al Laboratorio de Enfermedades de la Raíz del Colegio de Postgraduados para ser estudiadas.

**Caracterización de *Sphacelia* sp.** A partir del crecimiento obtenido de los esclerocios colocados en cámara húmeda, se obtuvieron conidios que fueron sembrados en medios de cultivo selectivos para elaborar cultivos monospóricos. Para su caracterización, se consideraron particularidades morfológicas del hongo previamente reportadas (Pazoutová *et al.*, 2004), y se evaluó la velocidad de crecimiento, abundancia de micelio y producción de conidios. La identificación molecular se realizó a partir de la extracción del ADN total de cultivos monospóricos con el kit DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN®). Los ácidos nucleicos se enviaron a MACROGEN para amplificar las regiones de ITS 4, así como su secuenciación.

**Actividad biológica de *C. gigantea* en conejos Nueva Zelanda.** A partir de un ensayo preliminar por cromatografía en capa fina de extractos, se detectó la presencia de alcaloides en esclerocios de *C. gigantea* (Wallwey y Li, 2012), procedentes del Estado de México. Este material fue utilizado para incorporarse en dietas experimentales para conejo.

**Elaboración de dietas experimentales para conejos.** Se inició con la molienda de esclerocios utilizando un molino de martillo con un tamiz de 2mm. Análisis bromatológico de esclerocios de *C. gigantea*. El material se procesó en el Laboratorio de Nutrición Animal del Postgrado de Ganadería del Colegio de Postgraduados. Las determinaciones se realizaron de acuerdo con los protocolos de la A.O.A.C, 1995. Adicionalmente, se envió una muestra de esclerocios molidos a

Evonik Industries AG Analytical Lab (certificado por la ISO 9001), para la elaboración de un aminograma.

**Elaboración de pellets.** Los ingredientes de la dieta en proporción de *C. gigantea*/ harina de alfalfa (0/100, 5/95, 15/85 y 25/75) se homogenizaron con una mezcladora industrial (Zhengqi, China), posteriormente se trasladaron al Centro de Enseñanza de Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAv), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en donde se utilizó una peletizadora (California Pellet Mill ® EE.UU), a 75 rpm. Los pellets recuperados se secaron a temperatura ambiente, para finalmente ser envasados.

**Manejo de conejos.** Se utilizó un total de 40 gazapos machos de 38 días del destete, los cuales se distribuyeron completamente azar en cuatro tratamientos de acuerdo a la relación de *C. gigantea*/ harina de alfalfa (0/100, 5/95, 15/85 y 25/75), con 10 conejos cada uno. Se registró el peso inicial de cada uno de ellos al inicio de la investigación. Simultáneamente, se ofreció la dieta previamente elaborada, y se evaluaron tres variables: Peso vivo, pesando los conejos semanalmente durante un periodo de 28 días; Consumo de alimento, que se obtuvo de la diferencia del peso de alimento ofrecido y el rechazado diariamente; Conversión alimenticia que se determinó por el consumo de alimento en relación con la ganancia de peso. Después de obtener los pesos para cada variable se tomaron muestras de sangre de cada conejo, para elaborar una bioquímica sanguínea, finalmente se les practicó la eutanasia.

**Análisis estadístico.** Se analizó utilizando un diseño experimental completamente al azar y para cada variable se hizo un análisis de varianza con el procedimiento MIXED con el programa estadístico SAS (1999).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La caracterización de *Sphacelia* sp. se continua trabajando para eliminar organismos micoparásitos como *Clonosthachys rosea* y *Trichoderma harzianum* (Ondrej *et al.*, 2010), y de ese modo realizar la descripción morfológica.

**Manejo de conejos y variables evaluadas.** El sistema digestivo de los conejos está diseñado para que estos puedan alimentarse con fuentes fibrosas razón por la cual la es alfalfa empleada

(Nieves *et al.*, 2009). Sin embargo, los esclerocios molidos presentaron valores similares a los de alfalfa en materia seca y mayor contenido de fibra, diferencias que se balancearon al elaborar las dietas experimentales.

Durante el periodo de adaptación a la dieta experimental hubo 7.5% de decesos de conejos que se consideran dentro del rango aceptable de mortandad en una engorda cotidiana (Palma y Hurtado, 2010). Los tratamientos arrojaron un efecto significativo ( $p < 0.05$ ). Se calculó la ganancia en peso de los conejos alimentados con dietas experimentales, durante 28 días. En el tratamiento testigo hubo un incremento en peso que, evidencia de que no fueron afectados, estos tuvieron un desarrollo normal y su crecimiento fue superior al resto. En contraste, los conejos del tratamiento 4 (25 % de esclerocios), mostraron disminución en el peso a partir de la semana 2; también se observó el rechazo al alimento, asumiendo una conversión alimenticia anormal. Panaccione *et al.* (2006) indican, que al alimentar conejos con pasto infectado con *C. purpurea*, una especie productora de alcaloides, estos rechazan el alimento, a diferencia de los que son alimentados con dieta sin alcaloides.

**Hemogramas.** Los análisis mostraron que no hubo diferencias significativas entre ningunos de los cuatro tratamientos. Verde y Gómez (1997) indican que para tener un diagnóstico más certero con respecto a una afección patológica, es importante considerar parámetros sanguíneos. Entre otros hallazgos, se observa la presencia de fibrinógeno en los conejos de los Tratamientos 2, 3 y 4.

**Necropsia.** Los conejos que estuvieron en contacto con dietas experimentales que incluían algún porcentaje de esclerocios, presentaron degeneración hidrópica, degeneración hepatocelular y nefritis interticial en riñón. Mientras tanto, Korn *et al.* (2014) indican que tras una dieta con alcaloides producidos por *Claviceps purpurea*, los conejos evaluados mostraron una degeneración hepatocelular.

Se debe continuar con la caracterización de *Sphacelia* sp. Por otro lado, el consumo de alimento con esclerocios de *C. gigantea*, por conejos recién destetados, provoca disminución de la ganancia de peso, degeneración hepatocelular y tubular multifocal, acompañada de necrosis ligera multifocal en riñón. Altas dosis de esclerocios molidos en el alimento producen intoxicación en el conejo y rechazo del mismo. Debido al alto valor alimenticio del tejido de reposo fúngico, se

sugiere realizar pruebas de dietas alimenticias experimentales, con la previa inactivación de los alcaloides presentes para la producción de alimentos balanceados.

### LITERATURA CITADA

- Agurell S., L. 1965. A new ergot alkaloid from mexican maize ergot. Acta. Pharm. Suec. 2: 231-238.
- A.O.A.C. 1995. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 16th ed. Association of Official Agricultural Chemists. Washington, D.C. USA.
- Fucikovsky L., and Moreno M. 1976. Distribution of *Claviceps gigantea* and its percent attack on two lines of corn in the state of México, México. Plant Dis. Rep. 55: 231-233.
- Korn A., K., M. Gross. E., E. Usleber , N. T. Köhler K., and G. Erhardt. 2014. Dietary ergot alkaloids as a possible cause of tail necrosis in rabbits. Mycotoxin Res. 30: 241-250.
- Márquez A., V., y E., Ávila. 1973. Toxicidad del hongo del maíz *Claviceps gigantea* en pollos en crecimiento. Técnica Pecuaria 1:69-71.
- Nieves D., O. Teran., M. Vivas., G. Arciniegas., C., Gonzalez. y Ly. J. 2009. Comportamiento productivo de conejos alimentados con dieta basadas en follajes tropicales. Revista Científica FCV-LUZ 19: 173-180.
- Ondrej M., C. Bohumir., and E. Ondrackova. 2010. Effect of the mycoflora of ergot (*Claviceps purpurea*) sclerotia on their viability. Plant Protec. Scient. 46:66-77.
- Palma O., R., y E. Hurtado A. 2010. Comportamiento productivo de conejos durante el periodo de crecimiento-engorde alimentados con frutos de mango (*Mangifera inidica*) en sustituto parcial del alimento balanceado comercial. IDESIA 28: 33-37.
- Panaccione D., G., J. Cipoletti R., A. Sedlock B., K. Blemings P., C. Schardl L., C. Machado., and G. Seidel E. 2006. Effects of ergot alkaloids on food preference and satiety in rabbits, as assessed with gene-knockout endophytes in perennial ryegrass (*Lolium perenne*). J. Agr. Food Chem. 54:4582-4587.
- Pazoutová S., Kolarík, M., and Kolínská R. 2004. Pleomorphic conidiation in *Claviceps*. Micological Res.108: 126-135.
- SAS Institute.1999. Statistical Analysis System Institute. The SAS system for window reléase 8.0 USA. pp. 558.
- Verde M., T. y Gómez J. 1997. Parámetros sanguíneos de interés clínico normales. Informe Técnico. Boletín de Cunicultura 38: 38-45.
- Wallwey C., and Li S. 2012. Production, detection, and purification of clavina-type ergot alkaloids. In. Fungal secondary metabolism: methods and protocols, methods in molecular biology. Springer Science, USA. 121 p.
- Warham E. J., Butler, L. D., and Sutton, B. C. 1999. Seed testing of Maize and Wheat: a Laboratory Guide. CIMMYT. México. 84 pp.



## VARIABILIDAD BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Iris yellow spot virus* EN CULTIVOS DE CEBOLLA EN EL ESTADO DE MORELOS

Katya **Ornelas Ocampo**<sup>1</sup>, Sergio **Aranda Ocampo**<sup>1</sup>, Sergio **Ramírez Rojas**<sup>2</sup>, Hernan **García Ruíz**<sup>3</sup> y Daniel L. **Ochoa Martínez**<sup>1\*</sup>

### INTRODUCCIÓN

El estado de Morelos ocupa el cuarto lugar en superficie sembrada de cebolla y tercero en producción a nivel nacional (SIAP, 2014). En los últimos años, en este cultivo se ha presentado la enfermedad conocida como “mancha amarilla” causada por el *Iris yellow spot virus* (IYSV) (género *Tospovirus*, familia *Bunyaviridae*) transmitida por *Thrips tabaci*. El genoma del género *Tospovirus* consiste de tres segmentos de RNA monocatenario de sentido negativo: grande (L), mediano (M) y chico (S) (Whitfield *et al.*, 2005). El segmento S codifica para los genes NSs y N, este último comúnmente utilizado para diferenciar tospovirus por su alto grado de divergencia a nivel de especie (Pappu *et al.*, 2000; Pappu *et al.*, 2006). Las plantas de cebolla afectadas por esta enfermedad muestran manchas de color pajizo blanco, cloróticas o necróticas, secas, alargadas o en forma de huso principalmente en la parte baja a media de las hojas; en algunos casos, una isla de tejido verde puede desarrollarse en el centro del área necrótica (Gent *et al.*, 2006). El principal impacto económico de la enfermedad está asociado con la reducción del tamaño del bulbo y, por tanto, la disminución en su rendimiento (Gent *et al.*, 2004). En los últimos dos años se han observado en el estado de Morelos dos tipos de síntomas en el cultivo de cebolla en los que se ha detectado al IYSV: a) manchas secas amarillas a blanquecinas con halo clorótico y forma alargada; y b) manchas de aspecto seco, blancas con o sin halo clorótico y alargadas, lo cual pudiera deberse a la presencia de dos variantes de este virus. Por lo anterior, la presente investigación tiene como objetivo determinar si existen dos variantes de IYSV en cultivos de cebolla en el estado de Morelos.

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Fitosanidad-Fitopatología.

<sup>2</sup>Campo Experimental Zacatepec, INIFAP.

<sup>3</sup>University of Nebraska-Lincoln, Nebraska Center for Virology.

\*Autor de correspondencia: [ldaniel@colpos.mx](mailto:ldaniel@colpos.mx)

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Muestreo en campo.** Durante el ciclo 2014-2015, se realizó un muestreo dirigido en cultivos de cebolla del estado de Morelos, colectando plantas completas con los diferentes síntomas asociados a IYSV. El material colectado fue clasificado de acuerdo con los síntomas observados para su análisis por separado en el laboratorio.

**Extracción de ácidos nucleicos, RT-PCR y secuenciación.** La extracción de ácidos nucleicos totales se realizó con el método de CTAB propuesto por Harris *et al.* (2002). El RNA fue cuantificado en un nanodrop para determinar su concentración y calidad. La síntesis de cDNA se realizó mediante la reacción de transcripción reversa (RT) usando 1 µg de RNA total. Cada muestra se analizó con los primers específicos IYSV-465c e IYSV-239f (Pappu *et al.*, 2008) e IYSV917L e IYSV56U (Robène-Soustrade *et al.*, 2006). Como control de la reacción de PCR se amplificó una región del gen ribosomal 18S (Zamboni *et al.*, 2008). La reacción de PCR se llevó a cabo con los primers IYSV917L e IYSV56U. El programa de PCR consistió en tres pasos, iniciando con 94°C 5 min, seguido de 40 ciclos a 94°C 15s, 45°C 30s y 72°C 30s, finalizando con 72°C 5 min. La visualización de los productos amplificados se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa y observado en un fotodocumentador. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con BLAST para su alineamiento con la base de datos del GenBank.

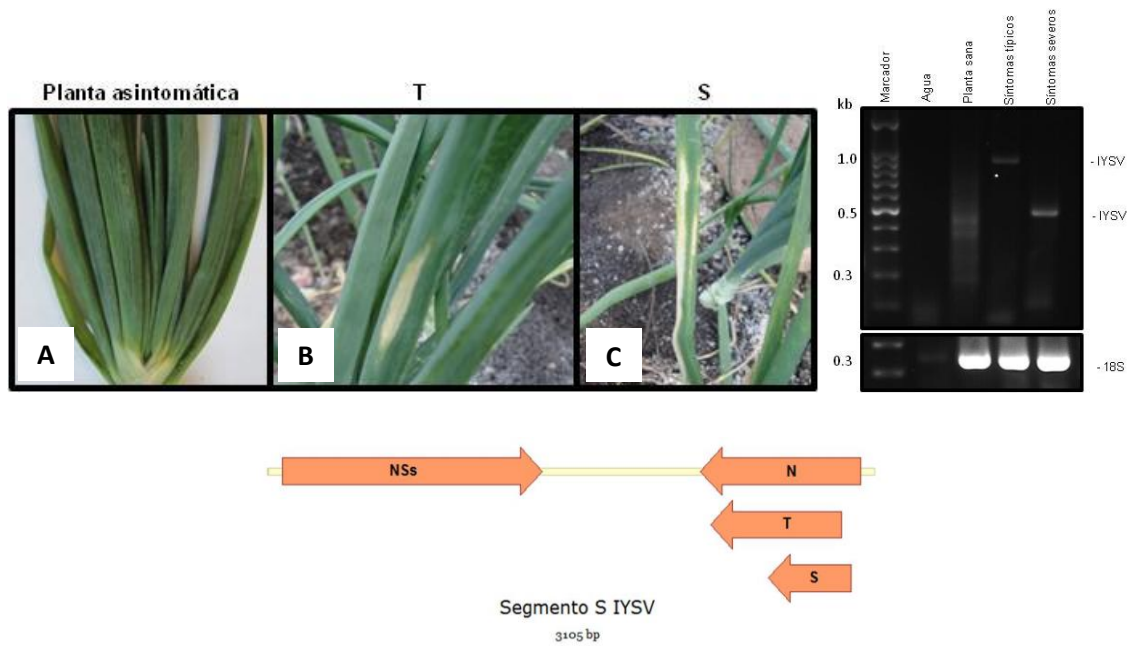
**Comparación de secuencias del gen N.** Con las secuencias de nucleótidos obtenidas se utilizó el programa Vector NTI para generar secuencias consenso de cada una de las muestras. Posteriormente, con el programa Mega 6 se realizó un alineamiento múltiple usando ClustalW. Todas las secuencias fueron alineadas y comparadas con la correspondiente al segmento S de IYSV depositada en el GenBank con número de acceso AF001387.

**Clonación y expresión transitoria de síntomas mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.** Primers específicos que amplifiquen el gen N de IYSV serán utilizados para la clonación, se agregarán como adaptadores los sitios de restricción para *BglIII* y *PmlI*, los cuales, permitirán su inserción en el vector pCambia1301. La construcción obtenida será introducida en *Escherichia coli* cepa DH5α y seleccionada con kanamicina 50 µg/mL; posteriormente, movilizada a *A. tumefaciens* cepa C58C1 y seleccionadas con kanamicina 50 µg/mL y rifampicina 25 µg/mL. Plantas de *Nicotiana benthamiana* de un mes de edad serán infiltradas con las construcciones y se registrará el período de incubación y los síntomas que se observen.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron cuatro muestreos en 14 localidades de los municipios de Ayala, Axochiapan, Jojutla, Xochitepec, Tlaquiltenango, Zacatepec y Puente de Ixtla, Morelos. Se colectaron en total 78 plantas, 42 fueron analizadas en el laboratorio y el resto se mantuvo en el invernadero. De las muestras analizadas, 26 fueron secuenciadas. Los síntomas de las plantas colectadas se dividieron en dos grupos: a) **típicos**: consistentes en manchas secas amarillas a blanquecinas con halo clorótico y forma alargada y b) **severos**: donde se observaron manchas de aspecto seco, blancas con o sin halo clorótico y alargadas generalmente, ocupando gran parte de la lámina foliar (Fig. 1A). En los resultados de la RT-PCR con los primers IYSV-465c-IYSV-239f e IYSV917L-IYSV56U se obtuvo una banda de 900 pb en plantas con síntomas típicos mientras que en el caso de plantas donde se tienen síntomas severos se obtuvo una banda 500 pb. En plantas asintomáticas no se observó amplificación alguna (Fig. 1B).

La comparación de la secuencia del gen N muestra la delección de un fragmento de aproximadamente 300 pb en el producto de RT-PCR obtenido de plantas con síntomas severos (Fig. 1C). Este resultado es interesante ya que sugiere que puede estar asociado con la diferencia en síntomas observados en campo. Para determinar lo anterior, por medio de la agroinfiltración se pretende tener la expresión transitoria del gen N de ambos segmentos y conocer si éstos se encuentran relacionados con la diferencia en expresión de síntomas. La movilización de un transgen con dicha técnica permite producir rápidamente de manera transitoria una proteína de interés provocando su acumulación y posible expresión de síntomas. El conocimiento de la naturaleza y prevalencia de posibles variantes de IYSV en el estado de Morelos ayudaría en mejorar las técnicas de detección, a evaluar materiales de cebolla para su mejoramiento y de germoplasma para identificar y seleccionar resistencia más duradera y efectiva en todas las regiones productoras (Bag *et al.*, 2012).



**Figura 1. Síntomas observados en campo y productos de RT-PCR. A Plantas con síntomas típicos y severos. B Productos de RT-PCR obtenidos en muestras con síntomas típicos (T) en los que se observa una banda de 900 pb y con síntomas severos (S) donde se obtiene una banda de 400 pb. C Mapa del segmento S de IYSV y comparación de secuencias de los productos de RT-PCR del gen N en plantas de cebolla que muestran síntomas típicos (T) y severos (S).**

### **Clonación y expresión transitoria de síntomas mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.**

Se encuentra en proceso de desarrollo.

### **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de maestría otorgada. Al Colegio de Postgraduados, Programa de Fitopatología por el proceso de formación profesional. Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Zacatepec por el apoyo técnico y profesional durante el recorrido de campo y colecta de cebolla en Morelos. A los productores de cebolla del estado de Morelos que aportaron plantas para el desarrollo de este proyecto.

### **LITERATURA CITADA**

- Bag S., Schwartz H. F. and Pappu H. R. 2012. Identification and characterization of biologically distinct isolates of *Iris yellow spot virus* (genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae*), a serious pathogen of onion. *European Journal of Plant Pathology* 134:97–104.
- Gent D. H., du Toit L. J., Fichtner S. F., Mohan S. K., Pappu H. R. and Schwartz H. F. 2006. *Iris yellow spot virus*: An Emerging Threat to Onion Bulb and Seed Production. *Plant Disease* 90: 1468-1480.
- Gent D. H., Schwartz H. F. and Khosla R. 2004. Distribution and Incidence of *Iris yellow spot virus* in Colorado and Its Relation to Onion Plant Population and Yield. *Plant Disease* 88: 446-452.

- Harris A., Gibbs A. J. and Gibbs M. J. 2002. *Nepovirus* and their diagnosis in plants—a novel polymerase chain reaction diagnostic test for Nepoviruses in nursery stock. Consultancy Report. Plant Biosecurity. Agriculture Fisheries and Forestry-Australia.
- Pappu H R., du Toit L. J., Schwartz H. F. and Mohan S. K. 2006. Sequence diversity of the nucleoprotein gene of *Iris yellow spot virus* (genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae*) isolates from the western region of the United States. *Archives of Virology* 151: 1015–1023.
- Pappu H. R., Rosales I. M. and Druffel K. L. 2008. Serological and molecular assays for rapid and sensitive detection of *Iris yellow spot virus* infection of bulb and seed onion crops. *Plant Disease* 92:588-594.
- Pappu S. S., Bhat A. I., Pappu H. R., Deom C. M. and Culbreath A. K. 2000. Phylogenetic studies of tospoviruses (Family: *Bunyaviridae*) based on intergenic region sequences of small and medium genomic RNAs. *Archives of Virology* 145: 1035–1045.
- Robène-Soustrade I., Hostachy B., Roux-Cuvelier M., Minatchy J., Hédont M., Pallas R., Couteau A., Cassam N. and Wuster G. 2006. First report of *Iris yellow spot virus* in onion bulb and seed production fields in Reunion Island. *Plant Pathology* 55:288.
- SIAP, 2014. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Consultado en: <http://www.siap.gob.mx/>
- Whitfield A. E., Ullman D. E. and German T. L. 2005. Tospovirus-Thrips Interactions. *Annual Review of Phytopathology* 43:459–89.
- Zamboni A., Pierantoni L. and De Franceschi P. 2008. Total RNA extraction from strawberry tree (*Arbutus unedo*) and several other woody plants. *iForest-Biogeosciences and Forestry* 1: 122-125.



## AISLAMIENTOS DE *Iris yellow spot virus* EN CEBOLLA CULTIVADA EN MORELOS Y MICHOACÁN: HOSPEDEROS ALTERNANTES Y VECTORES

Norma **Ávila Alistac**<sup>1</sup>, Daniel L. **Ochoa Martínez**<sup>1\*</sup>, Sergio **Ramírez Rojas**<sup>2</sup>, Ángel **Rebollar Alviter**<sup>3</sup>, Héctor **Lozoya Saldaña**<sup>4</sup> y Remigio A. **Guzmán Plazola**<sup>1</sup>

### INTRODUCCIÓN

La cebolla es una hortaliza de importancia económica para México y es afectada por varias enfermedades. Las ocasionadas por virus son de gran interés debido a la dificultad para su control. Brewster (2008) señala que el *Iris yellow spot virus* (IYSV) es uno de los virus más devastadores en plantas del género *Allium* con una amplia distribución geográfica y un gran rango de hospedantes (Smith *et al.* 2011; Ghotbi *et al.* 2005; Sampangi y Mohan 2007). El IYSV se transmite principalmente por *Thrips tabaci* y ocasiona la enfermedad conocida como mancha blanca en cebolla. Magos (2011), estudió los virus asociados a cebolla en el estado de Morelos y detectó cuatro por DAS-ELISA, entre ellos al IYSV.

Las interacciones hospedante-vector-virus son muy complejas. Rodríguez *et al.*, (2007) enfatizan la importancia de tener mayor conocimiento de estas relaciones para establecer mejores estrategias de control. Las interacciones virus-hospedante y/o virus-vector afectan al primero determinando su gama de hospedantes y/o frecuencia de transmisión (Syller 2012). A nivel mundial se han realizado estudios con hospedantes alternos, vectores y variantes del IYSV, pero en México hay poca información al respecto.

La presente investigación tiene como propósito conocer variantes del IYSV, hospederos alternantes y sus vectores en Morelos y Michoacán, México.

<sup>1</sup> Colegio de Postgraduados campus Montecillo. Especialidad Fitopatología. <sup>2</sup> INIFAP, Zacatepec, Morelos.

<sup>3</sup> CRUCO, Morelia, Michoacán.

<sup>4</sup> Universidad Autónoma de Chapingo (UACH), Texcoco, Edo. De México.

\*Autor de correspondencia: [ldaniel@colpos.mx](mailto:ldaniel@colpos.mx)

### MATERIALES Y MÉTODOS

**Área de estudio.** Los muestreos de plantas de cebolla con síntomas de *Iris yellow spot virus*, maleza circundante y trips se realizaron en Axochiapan, Puente de Ixtla y Emiliano Zapata del estado de Morelos y en los municipios de Tanhuato y Vista Hermosa, Michoacán.

**Detección de *Iris yellow spot virus* (IYSV).** Se realizó un recorrido en cinco parcelas por estado donde se colectaron cinco plantas completas por parcela. El muestreo fue dirigido a plantas con síntomas típicos de IYSV a las cuales se les extrajo RNA para realizar RT-PCR con primers específicos para este virus. Asimismo, las plantas de cada estado fueron trasplantadas por separado en vasos de unicel y mantenidas en invernadero.

**Colecta de arvenses.** Con la finalidad de conocer posibles hospederos alternantes del IYSV y/o sus trips vectores, se colectaron arvenses en presencia y ausencia del cultivo de cebolla en ambos estados. La colecta se hizo dentro y alrededor de la parcela tomando plantas con síntomas asociados a virosis así como plantas asintomáticas. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico, se cubrieron con papel periódico húmedo para disminuir su deshidratación y se etiquetaron para su traslado al laboratorio de Virus Fitopatógenos del Colegio de Postgraduados para su análisis.

Para conocer los virus asociados a estas plantas se utilizó DAS-ELISA formando una muestra compuesta consistente en hojas de la parte baja, media y alta de la planta. Cada muestra se analizó por duplicado y se utilizaron controles positivos y negativos de Agdia®. La reacción fue considerada positiva si el valor era tres veces mayor que la media del control negativo. Las muestras se analizaron con anticuerpos policlonales para los virus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Iris yellow spot virus* (IYSV), *Leek yellow stripe virus* (LYSV), *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) y *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV), los cuales se han reportado en el cultivo de cebolla. A las muestras positivas por ELISA, se les extrajo RNA para hacer RT-PCR con primers generales para tospovirus o potyvirus y/o específicos, según el caso.

**Colecta de trips en arvenses.** Las plantas traídas de campo fueron observadas cuidadosamente para conocer si tenían o no trips en estado inmaduro y adultos. Los trips encontrados se pasaron a ejotes dentro de tubos falcón y se taparon con una malla para incrementar su población e identificarlos mediante PCR con los primers LCO1490 y HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Detección de *Iris yellow spot virus* (IYSV).** A nivel de parcelas se observó 30% de incidencia de virosis en plantas de Morelos y 5% en Michoacán. Todas las plantas de cebolla

muestreadas tenían síntomas de IYSV. Del total de plantas de Morelos analizadas por RT-PCR, el 90% fue positiva para IYSV y 50% positivas en las de Michoacán.

**Colecta de arvenses.** Se observaron bajas poblaciones de arvenses dentro y fuera del cultivo. Se colectaron y analizaron 72 plantas de ambos estados. Las muestras analizadas para todos los virus fueron negativas. En las parcelas de Michoacán hubo menor número de arvenses que en Morelos. Por otro lado, en ausencia del cultivo se observó mayor número y diversidad de arvenses posiblemente asociado con la época de lluvia. En este caso se analizaron 93 muestras procedentes de Morelos, mismas que resultaron negativas para los virus en estudio excepto en el caso de altamisa (*Parthenium hysterophorus*) que fue positiva a LYSV (Cuadro 1). Las arvenses colectadas en el estado de Michoacán se encuentran en proceso de análisis.

**Cuadro 1. Arvenses asociadas al cultivo de la cebolla en el estado de Morelos analizadas por DAS-ELISA para *Iris yellow spot virus* (IYSV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) y *Leek yellow stripe virus* (LYSV).**

N. común	N. científico	IYSV	TSWV	OYDV	LYSV
Borreguilla	<i>Acalypha ostryifolia</i>	-*	-	-	-
Verdolaga	<i>Portulaca oleracea</i>	-	-	-	+
Falsa altamisa	<i>Parthenium hysterophorus</i>	-	-	-	-
Verdolaga de campo	<i>Kallstroemia rosei</i>	-	-	-	-
Quelite	<i>Amaranthus hybridus</i>	-	-	-	-
Mala mujer	<i>Solanum rostratum</i>	-	-	-	-
Escobilla	<i>Lepidium virginicum</i>	-	-	-	-
Alfombrilla	<i>Euphorbia indivisa</i>	-	-	-	-
Rabano-maleza	<i>Raphanus sativus</i>	-	-	-	-
Diente de León	<i>Taraxacum officinale</i>	-	-	-	-
Aceitilla	<i>Bidens pilosa</i>	-	-	-	-
Ojo de gallo	<i>Sanvitalia procumbens</i>	-	-	-	-
Campanitas	<i>Ipomoea purpurea</i>	-	-	-	-
Achual	<i>Tithonia tubaeformis</i>	-	-	-	-
Higuerilla	<i>Ricinus communis</i>	-	-	-	-
Chipil	<i>Crotolaria pumila</i>	-	-	-	-
Huizache	<i>Acacia farnesiana</i>	-	-	-	-

\* +: Muestra positiva; -: muestra negativa

La planta positiva para LYSV fue analizada por RT-PCR con primers generales para potyvirus resultó negativa. Dicho dato pudo deberse a la baja calidad de RNA al momento de hacer la extracción. Por otro lado, *P. oleracea* (familia Portulacaceae) contiene un mucílago, dificultando su extracción de RNA.

**Colecta de trips en arvenses.** Se observó mayor presencia de trips en arvenses en ausencia del cultivo. En altamisa (*Parthenium hysterophorus*), higuierilla (*Ricinus communis*) y borreguilla (*Acalypha ostryifolia*) se encontraron trips en estado inmaduro y adulto. Dichas plantas fueron muy frecuentes en todas las parcelas de Morelos, particularmente la higuierilla. Schwartz *et al.* (2014) reportaron a la higuierilla como hospedante de IYSV, pero en su estudio no encontraron trips en las plantas analizadas. Por otro lado, sólo en el acahual (*Tithonia tubaeformis*) se observaron trips en las inflorescencias en presencia del cultivo. En los últimos años ha cobrado mayor importancia conocer el rango de arvenses hospedantes de IYSV o de su vector (Schwartz *et al.* 2014). Los resultados obtenidos hasta este momento muestran que muchas de la maleza que se ha reportado en otros países como hospedantes del IYSV y/o sus trips vectores se encuentran en las localidades muestreadas. Se ha reportado la presencia de *T. tabaci* en *Lamium purpureum*, *Taraxacum officinale*, *Cardaria draba*, *Bromus tectorum*, *Senecio vulgaris*, *Silene alba* y *Datura stramonium* (Weilner y Bedlan 2013). Así como *Chenopodium album*, *Amaranthus retroflexus*, *Cichorium intybus*, *Arctium minus* y *Rumex crispus* (Smith *et al.* 2012).

A pesar de que muchas arvenses no se han reportado como hospedantes de IYSV sí lo son de su vector, por lo cual pueden ser reservorio para la infestación del cultivo de la cebolla en el siguiente ciclo y contribuir a la dispersión secundaria del virus. El conocimiento de estos hospedantes y su abundancia relativa en campo son base para un estudio epidemiológico que permita un mejor manejo del IYSV y su vector (Smith *et al.* 2011).

### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado.

Al Fideicomiso No. 167304 para la Investigación científica y desarrollo tecnológico del Colegio de Postgraduados.

### LITERATURA CITADA

- Brewster J., L. 2008. Onions and other vegetable alliums. 2nd edition. Crop Production science in horticulture. Wellesbourne, Warwick, UK. 432 p.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R. and Vrijenhoek R. 1994. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3(5):294-299.
- Ghotbi T., Shahraeen, N. & Winter, S., 2005. Special Report Occurrence of Tospoviruses in Ornamental and Weed Species in Markazi and Tehran Provinces in Iran. *Plant Disease*, 89, pp.425-429.

- Magos G., K. 2011. Trips y virus asociados a cebolla (*Allium cepa* L.), su efecto en el rendimiento en Atlacholoaya, Morelos. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 67 p.
- Rodrigues S. P., Lindsey G. and P. Fernandes M. B. 2007. Biotechnological approaches to the control of plant viruses. In Thangadurai D., Tang W. and Song S.Q. Plant stress and biotechnology. 1st edition. Oxford book company. Jaipur, India. pp. 126-138.
- Sampangi R.K. & Mohan, S.K., 2007. Identification of New Alternative Weed Hosts for *Iris yellow spot virus* in the Pacific Northwest. Diseases note, 91(12), pp.3-5.
- Schwartz A.H.F. et al., 2014. *Thrips tabaci* (Thysanoptera : Thripidae) and Iris yellow spot virus Associated with Onion Transplants, Onion Volunteers, and Weeds in Colorado. Southwestern Entomologist, 39, pp.691-704.
- Smith E. a. et al., 2012. Abundance of weed hosts as potential sources of onion and potato viruses in western New York. Crop Protection, 37, pp.91-96. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261219412000336> [Accessed February 20, 2014].
- Smith E. a. et al., 2011. Weed Hosts for Onion Thrips (Thysanoptera: Thripidae) and Their Potential Role in the Epidemiology of *Iris Yellow Spot Virus* in an Onion Ecosystem. Environmental Entomology, 40(2), pp.194-203. Available at: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=0046-225X&volume=40&issue=2&spage=194> [Accessed January 23, 2014].
- Syller J., 2012. Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in. Molecular plant pathology, 13(2), pp.204-216.
- Weilner S. & Bedlan, G., 2013. Detection of Iris yellow spot virus ( IYSV ) in selected *Allium* species and overwintering hosts in Austrian onion-producing areas Originalarbeit. Journal fur Kulturflanzen, 65(2).



ACUMULACIÓN DE TRANSCRITOS DE LOS GENES *C4H* Y *COMT*,  
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA, FENOLES SOLUBLES TOTALES Y  
LIGNINA TOTAL EN CHILE CM334 INFECTADO POR *Nacobbus aberrans*  
Y *Meloidogyne incognita*

Erika Lagunes Fortiz<sup>1</sup>, Reyna I. Rojas Martínez<sup>1</sup>, Juana Juárez Muñoz<sup>2</sup>, Benito Reyes Trejo<sup>3</sup>, Luis A. Sáenz Carbonell<sup>4</sup>, Emma Zavaleta Mejía<sup>1\*</sup>

## INTRODUCCIÓN

El chile CM-334, resistente al oomiceto *Phytophthora capsici*, al ser previamente infectado por el nematodo *Nacobbus aberrans*, se comporta como susceptible al oomiceto, fenómeno conocido como “rompimiento de la resistencia”, debido a cambios metabólicos y fisiológicos resultantes de la reprogramación de la expresión génica inducida por el nematodo en la raíz del hospedante (Zavaleta-Mejía, 2002; Godínez-Vidal *et al.*, 2008), provocando la alteración de algunas respuestas de defensa de las plantas generadas a través de las rutas metabólicas del ácido mevalónico y de fenilpropanoides como compuestos fenólicos y lignina (Vargas *et al.*, 1996; Godínez-Vidal *et al.*, 2008). La lignina, fortifica a las paredes celulares y constituye una barrera física potencial contra la infección por fitopatógenos (Bonawitz y Chapple, 2010). Los monómeros *p*-Hidroxifenil (H), el Guaiacil (G) y el Siringil (S), integran a la lignina y su disposición y abundancia pueden variar dependiendo el tipo de interacción planta-nematodo resultante (Bonawitz y Chapple. 2010). Las enzimas ácido cinámico 4-hidroxilasa (C4H) y ácido felúrico 5-hidroxilasa (F5H) son enzimas tempranas clave para la síntesis de monómeros de lignina (Meyer *et al.*, 1998), mientras que la metiltransferasa ácido caféico *O*-metiltransferasa (COMT), que utiliza 5-hidroxiciniferaldehído como sustrato, es esencial para la síntesis de unidades S (Atanassova *et al.*, 1995).

<sup>1</sup> Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, km 36.5 Carretera México-Texcoco, CP 56230. Texcoco, Estado de México, México.

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones Forestales, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. C.P. 43600. Rancho Universitario, Ex-Hda Aquetzalpa, Tulancingo, Hidalgo.

<sup>3</sup> Laboratorio de Productos Naturales, Área de Química, Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México- Texcoco Kilómetro 38.5 Chapingo, 56230 Chapingo, Estado de México.

<sup>4</sup> Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Calle 43 No. 130, Col. Chuburna de Hidalgo, C.P. 97200 Mérida, Yucatán.

\*Autor para correspondencia: [zavaleta@colpos.mx](mailto:zavaleta@colpos.mx)

Actualmente existe un debate, sobre el papel que desempeñan los monolignoles en la interacción planta-patógeno, algunas plantas acumulan selectivamente lignina S en respuesta al ataque de patógenos, por lo que dicho monómero parece estar particularmente involucrado en la defensa (Menden *et al.*, 2007, Skyba *et al.*, 2013), mientras que en otros casos su abundancia no limita la infección del hospedante (Wuyts *et al.*, 2006).

Por lo anterior fue de interés comparar la acumulación de los transcritos de genes *C4H* y *COMT* que influyen en la composición de lignina, la actividad de la enzima C4H, el contenido de fenoles y el contenido de lignina total presentes en las paredes de células de la raíz, en la interacción compatible Chile CM-334-*N. aberrans* y en la incompatible Chile CM-334-*M. incognita*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Plántulas de Chile CM-334 se inocularon con 1000 J2 de *M. incognita* (*Mi*) o *N. aberrans* (*Na*) por planta, colectando sus raíces a los 2, 7, 14 y 21 días después de la inoculación (ddi), el testigo consistió en plantas sin inocular. Se determinó el número de nematodos que ingresaron a la raíz, la acumulación de los transcritos de genes *C4H* y *COMT*, la actividad de la enzima C4H, el contenido de fenoles y el contenido de lignina total presentes en las paredes de células de la raíz. El DNA se obtuvo mediante retrotranscripción a partir de RNA. La cuantificación de los transcritos se realizó mediante PCR tiempo real, empleando iniciadores específicos para la detección de los genes *COMT*, *C4H*, y como gen endógeno de referencia *GAPDH* (gliceraldehído 3-P deshidrogenasa). El cálculo de la expresión relativa se realizó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001). La actividad enzimática C4H se determinó según Lamb y Rubery (1975) y se midió la absorbancia de las muestras a 310 nm en un espectrómetro Perkin Elmer Lambda Bio 10. La extracción de fenoles solubles totales se realizó siguiendo la metodología reportada por Gayoso *et al.*, (2004) y para su cuantificación se empleó el reactivo Folin-Ciocalteu de acuerdo al método reportado por Singleton and Rossi (1965), la cantidad de fenoles solubles totales se determinó midiendo la absorbancia de cada muestra (raíz de Chile CM334) en un espectrómetro a 760 nm. La cuantificación de lignina total a partir de paredes celulares (extraídas según Pomar *et al.*, 2002) se realizó por el método de bromuro de acetilo descrito por Iiyama y Wallis (1988) y se midió la absorbancia a 290 nm. Los datos presentados corresponden al promedio de dos experimentos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cantidad de individuos de *Na* que ingresaron a la raíz de chile CM334 fue mayor que la de individuos de *Mi*, a los 2 ddi se encontró la mayor cantidad de J2 de *Na* dentro de las raíces de chile (Figura 1a). Estos se observaron agrupados en grandes cantidades en la región de elongación, mientras que a los 14 y 21 ddi la cantidad de individuos dentro de la raíz disminuyó, estos se ubicaron a lo largo de la raíz de manera individual y presentaban la típica forma de “C” o de espiral cerca de la corteza radical, característica del estadio J3. La infección y desarrollo de *Na* en raíces de chile CM334 fue similar a la reportada por Godínez-Vidal (2010) y García-Espinoza (2011). En cambio, en plantas inoculadas con *Mi* se encontraron muy pocos nematodos en los tiempos evaluados (2, 5, 3 y 1 individuos por raíz a los 2, 7, 14 y 21 ddi, respectivamente), y presentaron características propias del estado J2 en todos los tiempos sin llegar a completar su ciclo, en congruencia con lo reportado por García-Espinoza (2011) y Pegard *et al.* (2005).

La acumulación relativa de los transcritos *C4H* (Figura 1b) en las raíces inoculadas con *Na* a los 7 y 14 ddi fue mayor que en plantas inoculadas con *Mi*, sin embargo, a los 2 y 21 se encontraron mayores niveles de expresión en las plantas inoculadas por *Mi*. La acumulación relativa de transcritos *COMT* (Fig. 1c), fue mayor en plantas inoculadas con *Na* en comparación con aquellas inoculadas con *Mi* en todos los tiempos evaluados aunque en diferente magnitud; siendo a los 21 ddi donde se obtuvieron los niveles más altos de transcritos *COMT* en raíces inoculadas con *Na*. La actividad enzimática *C4H* a los 2, 7 y 14 ddi fue mayor en raíces de plantas de chile CM334 inoculadas con *Na* en comparación con aquellas inoculadas con *Mi* y el testigo (Figura 1d), a los 21 ddi la actividad enzimática en aquellas raíces inoculadas con *Na* resultaron más bajas que las encontradas en raíces inoculadas con *Mi* y el testigo.

Se determinó el contenido de lignina total en paredes celulares de raíces de plantas de chile CM334 inoculadas con *Na* o *Mi*, (Figura 1f). Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en todos los periodos de muestreo es posible observar que el contenido de lignina total fue mayor en las paredes celulares de raíces inoculadas con *Na*, en comparación con aquellas inoculadas con *Mi* y las plantas testigo.

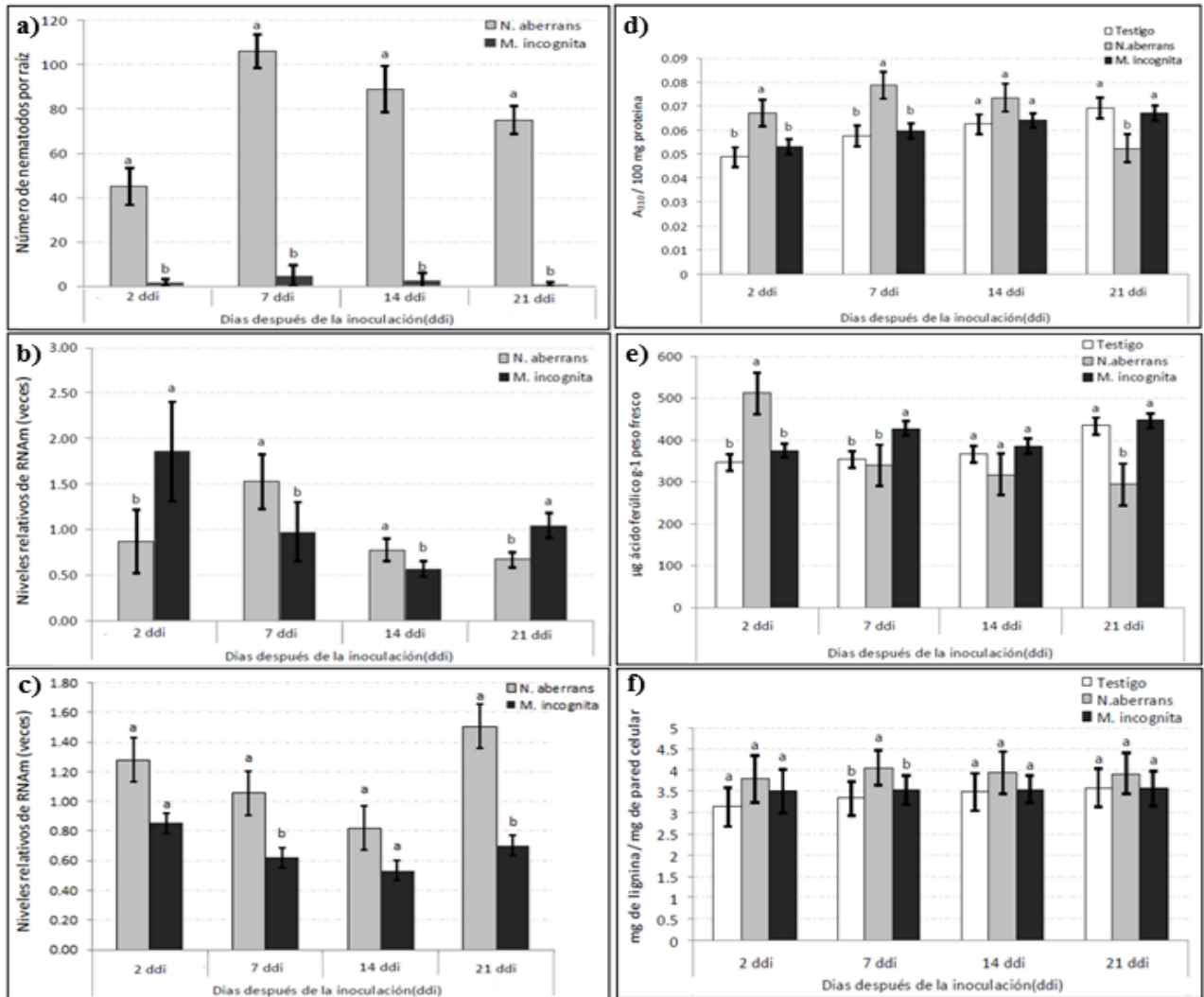


Figura 1. Número de individuos de *N. aberrans* y *M. incognita* observados dentro de raíces de chile CM334 inoculadas con los nematodos (a); acumulación de transcritos del gen C4H (b) y COMT (c); actividad enzimática del ácido cinámico 4-hidroxilasa (d); contenido de fenoles solubles totales (e); y contenido de lignina total (f) en raíces de plantas de chile CM-334 inoculadas con *N. aberrans* y *M. incognita*. La media de cada barra corresponde al promedio de datos obtenidos en experimentos. Para cada tiempo barras con diferente letra muestran diferencia significativa (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

La actividad enzimática C4H guardó cierta relación con la expresión del gen que la codifica (*C4H*), el cual constituye un importante componente en la ruta fenilpropanoide, y además de estar implicado en los primeros pasos de biosíntesis de lignina también participa en la biosíntesis de otros compuestos involucrados en defensa como flavonoides. En raíces de chile inoculadas con *Mi*, la actividad enzimática en cada tiempo de muestreo incrementó gradualmente; no obstante dicho incremento también se presentó en el testigo. *COMT* está relacionado directamente con la biosíntesis de lignina S, necesaria para la reestructuración de la pared celular, fundamental para la formación del sincitio en la interacción compatible (*Na*); mientras que en la interacción incompatible (*Mi*), probablemente se relacionó con defensa. Así,

en la interacción CM334-*N. aberrans*, la ruta fenilpropanoide pudiera ser dirigida hacia la síntesis de monómeros que contribuyan a la formación de un tipo de lignina que favorezca la formación de SEA funcionales para el nematodo, durante el proceso de reestructuración y síntesis de nuevas PC en los sitios de infección.

En general, el contenido de fenoles solubles totales fue mayor en raíces de chile CM334 inoculadas con *Mi*, sugiriendo que en esta interacción la ruta de los fenilpropanoides pudo ser re-dirigida hacia la síntesis de otros compuestos fenólicos implicados en defensa y no precisamente a la biosíntesis de unidades monoméricas de lignina. Por ejemplo, Moon *et al.* (2010) y Pegard *et al.* (2005), señalan que la resistencia de CM334 a *Mi* se puede explicar por la presencia de barreras físicas en la raíz que dificulten la penetración de los juveniles J2, y que una vez dentro de la raíz, respuestas bioquímicas como la reacción de hipersensibilidad y la acumulación de compuestos fenólicos contribuyen a la resistencia de CM334.

En el presente trabajo, se encontró mayor cantidad de lignina en raíces de plantas CM334 inoculadas por ambos nematodos en comparación con raíces de plantas testigo, sin embargo en raíces de plantas CM334 inoculadas con *Na* la cantidad de lignina total en todos los tiempos de evaluación (2, 7, 14 y 21 ddi), fue mayor que la obtenida en aquellas inoculadas con *Mi*. Se sabe que durante el desarrollo de sincitios, ocurre el engrosamiento extensivo de las paredes celulares del mismo, y aunque la composición del nuevo material depositado no ha sido del todo caracterizado, se ha observado la presencia de lignina y algunos polifenoles en el centro de las paredes corticales externas, así como en el centro de algunos fragmentos de pared celular, dentro de los sincitios (Jones y Northcote, 1972). Se considera que durante una interacción compatible el incremento en la síntesis y acumulación de la lignina podría contribuir a la formación de pared celular *de novo*, para ayudar a proteger y fortalecer el sincitio (Ithal *et al.*, 2007).

### AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a Erika Lagunes Fortiz, así como al Fideicomiso Revocable de Administración e Inversión No. 167304 para el Establecimiento y Operación de los Fondos para la Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del Centro Público Colegio de Postgraduados.



## LITERATURA CITADA

- Atanassova R, N. Favet, F. Martz, B. Chabbert, M. T. Tollier, B. Monties, B. Fritig, y M. Legrand. 1995. Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing O-methyltransferase sequences in sense and antisense orientation. *The Plant Journal* 8:465-477.
- Bonawitz N. D., and C. Chapple. 2010. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. *Annual Review of Genetics* 44: 337-363.
- García-Espinoza, J.A. 2011. Expresión de los genes *SS* y *CAS* en Chile CM334 inoculado con *Nacobbus aberrans* y con *Meloidogyne incognita*. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Edo. de México. 43 p.
- Gayoso C, Pomar F, Merino F and Bernal MA. 2004. Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annuum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon. *Scientia Horticulturae* 102:1-13.
- Godínez-Vidal D.M., M. Soto-Hernández, M. Rocha-Sosa, E. Lozoya-Gloria, R.I. Rojas-Martínez, L. Guevara-Olvera y E. Zavaleta-Mejía. 2010. Contenido de capsidiol en raíces de Chile CM-334 infectadas por *Nacobbus aberrans* y su efecto en juveniles del segundo estadio. *Nematropica*. 40:227-237.
- Godínez-Vidal, D., M. Rocha-Sosa, E. B. Sepulveda-García, J. Lara-Reyna, R. I. Rojas-Martínez, y E. Zavaleta-Mejía. 2008. Phenylalanine ammonia lyase activity in chilli CM-334 infected by *Phytophthora capsici* and *Nacobbus aberrans*. *European Journal Plant Pathology* 120:299-303.
- Iiyama K, Wallis FA. 1988. An improved acetyl bromide procedure for determining lignin in woods and wood pulps. *Wood Sci Technol*. 22:271-280.
- Ithal N, Recknor J, Nettleton D, Maier T, Baum TJ and Mitchum MG. 2007. Developmental transcript profiling of cyst nematode feeding cells in soybean roots. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 20:510-525.
- Jones MGK and Northcote DH. 1972. Nematode induced syncytium - a multinucleate transfer cell. *Journal of Cell Science* 10:789-809.
- Lamb Cj, Rubery PH. 1975. A spectrophotometric assay for Trans-cinnamic acid 4-Hydroxylase activity. *Anal Biochem* 68: 554-561.
- Livak, K. J., and Schmittgen T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$  Ct method. *Methods* 25: 402-408.
- Menden, B., Kohlhoff M., and B. M. Moerschbacher. 2007. Wheat cells accumulate a syringyl-rich lignin during the hypersensitive resistance response. *Phytochemistry* 68:513-520.
- Meyer K, Shirley AM, Cusumano JC, Bell-Lelong DA, Chapple CCS. 1998. Lignin monomer composition is determined by the expression of a cytochrome P450-dependent monooxygenase in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95, 6619-6623.
- Pegard, A., G. Brizzard, A. Fazari, O. Soucaze, P. Abad and C. Djian-Caporalino. 2005. Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 95:158-165.
- Pomar F, Caballero N, Pedreño MA, Ros Barceló A. 2002. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation during the auto-oxidation of coniferyl alcohol drives the oxidase activity of a highly conserved class III peroxidase involved in lignin biosynthesis. *FEBS Letters* 529, 198-202.
- Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdicphosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144-158.
- Skyba O, Douglas CJ, Mansfield SD. 2013. Syringyl-rich lignin renders poplars more resistant to degradation by wood decay fungi. *Appl Environ Microbiol.* 79:2560-71.
- Vargas, E.M.T., E. Zavaleta-Mejía, A. A. M. Hernández. 1996. Rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* Leo en Chile (*Capsicum annuum* L) serrano CM-334 por *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen. *Nematropica* 26:159-166.
- Wuyts, N., G. Lognay, R. Swennen, and D.D. Waele. 2006. Nematode infection and reproduction in transgenic and mutant *Arabidopsis* and tobacco with an altered phenylpropanoid metabolism. *Journal of Experimental Botany* 57:2825-2835.
- Zavaleta-Mejía, E. 2002. Rompimiento de resistencia a hongos fitopatógenos por nematodos fitoparásitos, una hipótesis. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20:118-122.

## DISEÑO DE PRIMERS PARA LA DETECCIÓN DEL GEN DE QUITINASAS IMPLICADO EN LAS RESPUESTAS DE DEFENSA EN PLÁNTULAS DE CHILE JALAPEÑO

Ismael F. **Chávez-Díaz**<sup>1</sup>, Alejandro **Alarcón**<sup>2</sup>, Sergio **Aranda Ocampo**<sup>1</sup>, Julián **Delgadillo Martínez**<sup>2</sup>, John **Larsen**<sup>3</sup>, Emma **Zavaleta Mejía**\*<sup>1</sup>.

### INTRODUCCIÓN

Las plantas se encuentran expuestas a ser infectadas por diversos agentes bióticos como bacterias, hongos, virus, nematodos y oomicetos. Para defenderse, emplean diferentes mecanismos. En este contexto, las plantas de chile acumulan compuestos tóxicos, refuerzan sus paredes celulares e incrementan la actividad de proteínas específicas relacionadas con la patogénesis (PR) (Castro-Rocha *et al.*, 2012). Entre estas, las quitinasas (CHI) hidrolizan la quitina contenida en la pared celular de patógenos fúngicos. La pared celular de los oomicetos se constituye de glucanos; sin embargo, algunos como *Pythium ultimum*, contienen pequeñas cantidades de quitina (Chérif *et al.* 2000). Por otra parte, durante interacciones incompatibles entre plantas de chile y *Phytophthora capsici* Leo., se detectan altos contenidos y actividad enzimática de CHI en el apoplasto y tejido vascular en tallos y hojas (Lee *et al.*, 2000). Aunque el género *Phytophthora* aparentemente carece de quitina, la hidrólisis de pared celular del oomiceto por acción de PRs, produce pequeñas cantidades de N-acetil-glucosamina como subproducto, la cual, solo puede ser generada por CHI en presencia de quitina o glicoproteínas (Kim y Hwang, 1994). Así mismo, se ha evidenciado que una alta acumulación de CHI en chile inoculado con *P. capsici*, es capaz de inhibir la germinación de zoosporas e inhabilitar los tubos germinativos, reduciendo la incidencia de la infección (Kim y Hwang, 1996). La acumulación sistémica de CHI se encuentra vinculada a la vía de señalización del etileno en la inducción de resistencia sistémica (ISR), que a su vez, puede ser activada por la aplicación de agentes de control biológico (ACB) (Veloso y Díaz, 2012). Las evidencias sugieren que de alguna manera las CHI se encuentran vinculadas a la defensa en plantas de chile y que pueden ser utilizadas como marcadores de la ISR por ACB.

<sup>1</sup> Instituto de Fitosanidad-Fitopatología. <sup>2</sup> Programa de Edafología-Microbiología de suelos. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. <sup>3</sup> Laboratorio de Agroecología. CIECO-UNAM. \*Autor de correspondencia: [zavaleta@colpos.mx](mailto:zavaleta@colpos.mx)

En el presente trabajo de investigación se hizo uso de diferentes herramientas bioinformáticas de libre acceso con la finalidad de diseñar y estandarizar primers para PCR capaces de detectar la expresión de *CHI* en plantas de chile inoculadas con agentes de control biológico y *P. capsici*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Diseño de primers.** Los primers fueron diseñados mediante la herramienta bioinformática Primer 3 Plus® a partir de una secuencia completa de mRNA de quitinasa básica tipo II (Hong *et al.*, 2000) con número de acceso AF091235 en el banco de genes del NCBI. El diseño se realizó mediante la herramienta bioinformática. El análisis de sus características se llevó a cabo usando el software Oligo analyzer 3.1®. Para corroborar teóricamente su especificidad y eficiencia se usó la herramienta iPCR® con la que se generó un amplicón virtual. Finalmente se observó la identidad y cobertura del amplicón virtual mediante el Nucleotide Blast® del NCBI. Los primers denominados CaChiF y CaChiR se mandaron sintetizar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM (USS-IBT).

**Establecimiento de bioensayos.** Se germinaron semillas de chile jalapeño desinfestadas. Las plántulas se trasplantaron diez días después de germinadas a macetas con capacidad de 40 g conteniendo turba y perlita estériles (1:1, V:V). Se mantuvieron durante 30 días a 26°C con fotoperiodos de 14 h luz por 10 h oscuridad (intensidad de 6,786 lux), regando con agua estéril (AE) cada tercer día. Al contar cuatro hojas verdaderas se inocularon por separado con alícuotas de 4 ml según los siguientes tratamientos: T1= *Trichoderma atroviride* ( $10^7$  conidios/mL<sup>-1</sup>), T2= *Pseudomonas tolaasi* ( $3 \times 10^8$  células/mL<sup>-1</sup>), T3= *Phytophthora capsici* ( $1 \times 10^6$  zoosporas/mL), Control= tratada con agua esterilizada (AE). Cada tratamiento constó de cinco plantas y el experimento se repitió al menos dos veces. Según Lee *et al.*, (2000), la acumulación de transcritos de *CHI* inicia a las 6 h, alcanzando niveles máximos a las 24 h, por lo consiguiente las plantas se retiraron a las 24 h y se congelaron en nitrógeno líquido. En el T2 se consideró el doble de plantas con la finalidad de utilizarlas para la estandarización de la reacción de PCR.

**Extracción de RNA total y síntesis de cDNA.** Se extrajo RNA total de raíces y parte aérea de cada tratamiento por separado a partir de 100 mg de tejido congelado usando TRIzol® (Life Technologies) (Chomczynski, 1993). Se cuantificó en un Nanodrop® y se verificó la calidad en gel de agarosa al 1%. La síntesis de cDNA constó de dos pasos: 1) se incubaron 2 ng de RNA total con 0.4 µL de oligo dT<sub>15</sub> (Promega®) en un volumen final de 12 µL, se aforó con agua libre de nucleasas (ALN) durante 10 min a 65°C. 2) se añadieron 6 µL de buffer 5X para

retrotranscripción, 1  $\mu\text{L}$  de dNTP (10 pmol/ $\mu\text{L}$ ) y 1  $\mu\text{L}$  de retrotranscriptasa (200 u/ $\mu\text{L}$ ) (M-MLV Promega®). La mezcla se incubó 60 min a 37°C y después 10 min a 70°C en un termociclador Techne® modelo TC-512.

**Estandarización de condiciones de la PCR.** A partir del cDNA obtenido con plantas de T2 se realizaron gradientes de temperatura y de concentración de  $\text{MgCl}_2$ . Como positivo se utilizó el gen endógeno gliceraldehido 3-P deshidrogenasa (GAPDH) y como blanco se utilizó la misma reacción en ausencia de cDNA. La mezcla de PCR consistió en 2.5  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción 10X, con concentraciones de 1.2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0.12 mM dNTP, 0.4 pmol/ $\mu\text{L}$  de cada primer, 0.2  $\mu\text{L}$  de Amplificasa® (BioTecMol) y 1  $\mu\text{L}$  de cDNA (20 ng/ $\mu\text{L}$ ) en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  (se aforó con ALN). Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial a 95°C/2 min, seguida de 30 ciclos a 94°C/40 s, un gradiente de temperaturas a 57.4, 60, 62.4, 65.4 y 67.2°C/1 min y 72°C/1 min, con una extensión final de 72°C/10 min, el blanco y el positivo en el segundo paso tuvieron una incubación a 62.4°C. Los gradientes de concentración de  $\text{MgCl}_2$  se realizaron bajo las mismas concentraciones de reacción, modificando la concentración de  $\text{MgCl}_2$  (3, 2.7, 2.5, 2.3, 2 y 1.7 mM) y bajo las mismas condiciones de amplificación, en el segundo paso se incubó a la temperatura determinada como óptima.

**Amplificación del gen *CHI* y análisis de la secuencia del amplicón.** La banda amplificada correspondiente al gen *CHI* se volvió a amplificar y el producto se corrió en gel de agarosa para limpiarse con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega®. Las muestras se ajustaron a 100 ng/ $\mu\text{L}$  de amplicón y se enviaron junto con muestras de los primers (10 pmol/ $\mu\text{L}$ ) a la USS-IBT, en donde se analizaron en un analizador genético 3130xl de Applied Biosystems® bajo las condiciones estándar de secuenciación. A partir de los cromatogramas de las secuencias forward y reverse se obtuvieron las secuencias FASTA con el programa Chromas 2.4.3 de Technelysium®. Se realizó una corrección consenso de cada una y se obtuvo la secuencia complementaria-reversa de la secuencia reverse mediante la aplicación Edit RevSeq de la European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS). Posteriormente se hizo un apareamiento de secuencias mediante la herramienta bioinformática Clustal Omega del European Molecular Biology Laboratory (EMBL-EBI) para verificar que las regiones sintetizadas por los primers coincidiesen. Por último, se corroboró la identidad y cobertura del gen secuenciado mediante la herramienta Nucleotide Blast® comparando la secuencia con la base de datos de genes del NCBI.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Diseño de Primers.** En el Cuadro 1 se muestran las características de los primers diseñados en el presente estudio.

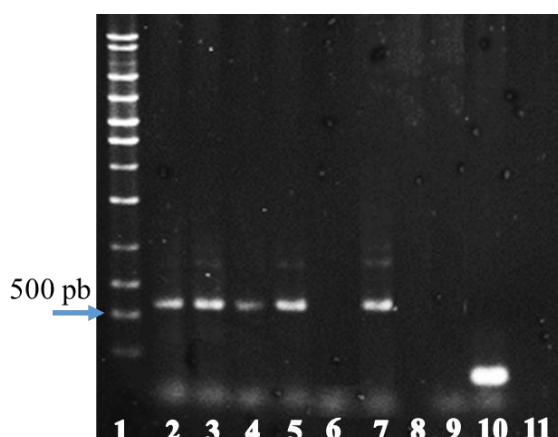
**Cuadro 1. Primers para amplificación del gen *CHI* en plantas de Chile.**

Gen	Codifica	Accesion	Tamaño amplificación	Primers		
				Nombre	Secuencia (5'-3')	TM %GC
<i>CaChi2</i>	PR2, Quitinasas basicas tipo 2	AF091235	483 pb	CaChiF	CAGGGACTTGTTTGAACGG	53.8 52.6
				CachiR	GCTGACCTATCTGCTGGTG	55.3 57.9

TM: Temperatura de fusión; %GC: Contenido de Guanina-Citosina; en azul se muestran las grasas G-C.

**Condiciones óptimas de PCR.** Los gradientes de temperatura permitieron deducir que se obtienen mejores amplificaciones a una temperatura de 60°C. La mejor concentración de MgCl<sub>2</sub> fue en el rango de 2.3 y 2.7 mM, eligiéndose 2.5 mM como concentración óptima.

**Expresión de quitinasas.** La acumulación de transcritos de *CHI* se detectó exitosamente. El amplicón obtenido con el par de primers superó la longitud teórica de 483 pb propuesto por el programa iPCR®, situándose por arriba de las 500 pb según el marcador molecular **KB** (Axygen®), no obstante, la información contenida en el mismo corresponde al gen *CHI*. En el gel de agarosa, se observaron bandas claras e intensas en todos los casos con excepción del carril correspondiente a la extracción de raíz del T2 (*P. tolaasii*) y ausencia de bandas en los controles y en la extracción de raíz del T3 (*P. capsici*) (Figura 1).



**Figura 1. Expresión de quitinasas en planta de Chile.**  
 1) Marcador molecular 1 KB; 2) *T. atroviride* (raíz);  
 3) *T. atroviride* (parte aérea); 4) *P. tolaasii* (raíz); 5)  
*P. tolaasii* (parte aérea); 6) *P. capsici* (raíz); 7) *P.*  
*capsici* (parte aérea); 8) Control (raíz); 9) Control  
 (parte aérea); 10) Gen constitutivo GAPDH; 11)  
 Blanco.

**Análisis de la secuenciación del amplicón.** Una vez realizadas las correcciones consenso, se determinó que CaChiF y CaChiR amplifican la misma zona del gen debido a que entre ambos amplicones hay una zona de convergencia correspondiente a 446 pares de bases (Figura 2). La secuencia final mostró un 100% de identidad y un 100% de cobertura con genes de quitinasas

de *Capsicum annuum*, así mismo, mostró coberturas del 100% e identidades variables de entre 85% y 90% con genes de quitinasas de otras solanáceas como papa, tomate, tabaco y tomate silvestre (*Solanum pennelli*).

```

CaChiF -----GTGT CGCGGGATATGTTGTAGCAAT
CaChiR TTTTATGTGGTTCTCAGGCAGGAGGTGCAC TTTGTGCCGCGGATTATGTTGTAGCAAAAT
          *  * * * *

CaChiF TTGGT TGGT GTGGCAACACCAATGACTATTTGGTGTCTGGAAAT TGCCA TAGCCAGTGTCT
CaChiR TTGGT TGGT GTGGCAACACCAATGACTATTTGGTGTCTGGAAAT TGCCA GAGCCAGTGTCT
*****

CaChiF CCGGC GATT CCGGT CCTACTGGAGACCTCGGCAGCATCATTTCAAATTCATGTTTGATG
CaChiR CCGGC GATT CCGGT CCTACTGGAGACCTCGGCAGCATCATTTCAAATTCATGTTTGATG
*****

CaChiF AGATGCTTAAGCATCGCAACGATAATGCTTGTCAGGAAAGAACAATTTCTACAGTTACA
CaChiR AGATGCTTAAGCATCGCAACGATAATGCTTGTCAGGAAAGAACAATTTCTACAGTTACA
*****

CaChiF ATGCTTTCATCACTGCTGCAAAGTCTTTTCTGGCTTTGGCACCCTGGTGATACCGCTG
CaChiR ATGCTTTCATCACTGCTGCAAAGTCTTTTCTGGCTTTGGCACCCTGGTGATACCGCTG
*****

CaChiF TCCGAAAAAGGAAATGCTGCTTCTTTGCCAAACCTCCCATGAACTACTGGAGGAT
CaChiR TCCGAAAAAGGAAATGCTGCTTCTTTGCCAAACCTCCCATGAACTACTGGAGGAT
*****

CaChiF GGCCTACAGCACCAGATGGACCATACGCATGGGGT TACTGCTTCCTTAGAGAACAAAGGTA
CaChiR GGCCTACAGCACCAGATGGACCATACGCATGGGGT TACTGCTTCCTTAGAGAACAAAGGTA
*****

CaChiF GTCCGGCGACTACTGTTACCAAGTGGTCAATGGCCTTGTGCGCCTGGTAGAAAAATTT
CaChiR GTCCGGCGACTACTGTTACCAAGTGGTCAATGGCCTTGTGCGCCTGGTAGAAAAATTT
*****

CaChiF TCGGACGAGGCCCATCCAAATTT CATACTCAACTATGGGCCATGTGGAAGGCCA
CaChiR TCGGACGAGGCCCATCCAAATTCATACATCTCTGACCC -----
*****
          *  *

```

**Figura 2. Apareamiento de secuencias de amplicones generados a partir de CaChiF y CaChiR.**

En el presente estudio se observó que la temperatura de alineamiento óptima para la amplificación de los primers supera la temperatura de fusión teórica sugerida por el programa Oligo analyzer 3.1®, sin implicar un obstáculo para obtener una amplificación aceptable. La obtención de bandas únicas y de buena intensidad denota la alta especificidad y eficiencia en los primers diseñados (Dieffenbach *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos a partir del Nucleotide blast® sugieren que el par de primers podría ser utilizado para amplificar genes de quitinasas de otras solanáceas como tomate, papa y tabaco.

A diferencia de los demás tratamientos, los transcritos de *CHI* no fueron detectados en las raíces de plantas tratadas con *P. capsici*. Posiblemente dicha ausencia se relacione a la capacidad de este oomiceto fitopatógeno para secretar efectores de forma local capaces de suprimir la defensa basal de las plantas de Chile (Brich *et al.*, 2008).



**LITERATURA CITADA**

- Brich PRJ, Boevink PC, Gilroy EM, Hein I, Pritchard L, Whisson SC. (2008). Oomycete RXLR effectors: delivery, functional redundancy and durable disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology*. 11:337-379.
- Castro-Rocha A, Fernández-Pavía SP, Osuna-Avila P. (2012) Chili defense mechanisms in the *Capsicum annuum-Phytophthora capsici* pathosystem. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 30:49-65.
- Chérif M, Benhamou N, Bélanger RR. (2000). Occurrence of cellulose and chitin in the hyphal walls of *Pythium ultimum* a comparative study with other plant pathogenic fungi. *Canadian Journal of Microbiology*. 39:213-222.
- Chomczynsk P. 1993. A reagent for the single-step isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissues samples. *Biotechniques*. 15:532-537.
- Dieffenbach CW, Lowe TM, Dveksler GS. (2010). General concepts for PCR primer design. *PCR Methods and Applications*. 3:530-537.
- Kim YJ, Hwang BK. (1994). Differential accumulation of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of *Phytophthora capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 45:195-209.
- Kim YJ, Hwang BK. (1996). Purification, N-terminal amino acid sequencing and antifungal activity of chitinases from pepper stems treated with mercuri chloride. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 48:417-432.
- Lee YK, Hippe-Sanwald S, Jung, HW, Hong JK, Hause, B, Hwang BK. (2000). *In situ* localization of chitinase mRNA and protein in compatible and incompatible interactions of pepper stems with *Phytophthora capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 57:111-121.
- Veloso J, Díaz J. (2012). *Fusarium oxysporum* Fo47 confers protection to pepper plants against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora capsici*, and induces the expression of defense genes. *Plant Pathology*. 61:281-288.
- Vidhyasekaran, P. (2015). Plant hormone signaling system in plant innate immunity. (Ed) Baluska, F. Springer Dordrecht Heidelberg New York London. P. 473. DOI: 10.1007/978-94-017-9285-1.

## DESARROLLO DE UNA POLISONDA PARA DETECTAR *mexican papita viroid*, *Pepino mosaic virus* Y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* EN JITOMATE (*Solanum lycopersicum*)

Erika J. Zamora Macorra <sup>1\*</sup>, Daniel L. Ochoa Martínez <sup>1</sup>, Guadalupe Valdovinos Ponce <sup>1</sup>, Reyna I. Rojas Martínez <sup>1</sup> Sergio Ramírez Rojas <sup>2</sup>, Vicente Pallás. <sup>3</sup>, Jesús Sánchez Navarro <sup>3</sup>, Frederic Aparicio-Herrero<sup>3</sup>

### INTRODUCCIÓN

El tomate es la hortaliza de mayor distribución en el mundo y es susceptible a diversos problemas fitosanitarios (Arauz, 1998). En invernadero, el *Pepino mosaic virus* (PepMV) causa una de las principales enfermedades y puede reducir hasta el 38% de la producción (Hassen y Thomma, 2010). Así mismo, los viroides causan severas pérdidas económicas en este cultivo (Singh, 1971). En México se encontró al *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd) y al *Mexican papita viroid* (MPVd) afectando de manera simultánea plantas de tomate en grandes extensiones de invernaderos (Ling y Zhang, 2009). El cancro provocado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Smith (Cmm), es una enfermedad severa y distribuida en todas las zonas productoras, cuyo manejo y tratamiento es costoso (Chang *et al.*, 1991).

El manejo de cualquier problema fitosanitario requiere la correcta identificación del agente causal; es frecuente encontrar varios patógenos afectando el cultivo en el mismo periodo de tiempo, por lo que es necesario desarrollar técnicas rápidas y precisas que permitan su detección simultánea (De Boer y López, 2012). Las técnicas basadas en PCR son sensibles; sin embargo, debido frecuentemente a la baja concentración del patógeno y a la presencia de inhibidores en muchos tejidos vegetales, se limita su detección, además de que no permiten el rápido procesamiento de un gran número de muestras. Técnicas como ELISA pueden utilizarse para analizar más muestras, pero tienen menor sensibilidad y no se aplica para viroides (James *et al.*, 2006). La técnica de hibridación molecular no radioactiva se ha utilizado con polisondas para hacer detecciones simultáneas de virus y viroides en diversos cultivos (Peiró *et al.*, 2012; Herranz *et al.*, 2004; Aparicio *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011); actualmente se pueden detectar hasta 18 virus en una sola prueba.

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km.36.5, CP 56220. Texcoco, estado de México, México.

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias- Zacatepec. Morelos. México.

<sup>3</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia (UPV-CSIC), Avenida de los Naranjos s/n, 46022 Valencia, España.

Autor de correspondencia\*: [erikazam@gmail.com](mailto:erikazam@gmail.com)

Esta técnica sirve para el diagnóstico masivo de plantas en programas de certificación de tomate (Saldarelli *et al.*, 1996) y también se ha utilizado con sondas específicas para algunas bacterias (Fanelli *et al.*, 2007).

Con base en lo anterior, los objetivos de este trabajo fueron: **1)** Sintetizar una sonda específica para la detección de Cmm mediante hibridación molecular no radioactiva; **2)** Integrar la sonda de Cmm a las sondas de PepMV y MPVd (poli3) para determinar su sensibilidad respecto a las sondas individuales y **3)** Evaluar la poli3 como un método de detección de estos fitopatógenos en plantas de tomate en producción.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron plantas de tomate con síntomas asociados a MPVd, PepMV y Cmm en diferentes zonas productoras de esta hortaliza en México. Estos patógenos se inocularon, aislaron y mantuvieron en plantas sanas de tomate saladette, previa corroboración de su identidad mediante RT-PCR o PCR, respectivamente.

**Síntesis de las sondas individuales y la poli3:** se realizó en el laboratorio del IBMCP de la Universidad Politécnica de Valencia, España. Para obtener las sondas del PepMV y MPVd, se utilizaron los clones pSK/poli6 (Aparicio *et al.*, 2009) y pSK/MPVd. Los fragmentos se liberaron mediante enzimas de restricción y se subclonaron (Herranz *et al.*, 2005) con la región *pat-1* de Cmm para obtener el vector pSK/Cmm/PepMV/MPVd. Para sintetizar las sondas individuales y la poli3, los vectores linealizados se utilizaron como molde para la transcripción con la T7 RNA pol, utilizando nucleótidos marcados con digoxigenina (Pallás *et al.*, 1998).

**Hibridación molecular no radioactiva con plantas infectadas:** se inocularon plantas de tomate saladette sanas con Cmm, PepMV y MPVd. Ocho días después los peciolo de estas plantas se cortaron transversalmente para hacer impresiones de savia sobre membranas de nylon cargada positivamente y se fijaron con luz UV. Simultáneamente se extrajeron ácidos nucleicos de las plantas inoculadas (Thompson *et al.*, 2003), se desnaturalizaron y se aplicaron sobre las membranas. La prehibridación e hibridación se hicieron con el método descrito por Pallás *et al.* (1998) y para el revelado, la película se expuso con la membrana, previamente tratada con el sustrato quimioluminiscente CSPD, durante 30-40 minutos.

**Sensibilidad de las sondas:** se hicieron diluciones seriales de ácidos nucleicos de plantas de tomate sanas e infectadas con Cmm, PepMV y MPVd para analizarse por hibridación, PCR (Cmm) y RT-PCR (PepMV y MPVd). Asimismo, una suspensión de Cmm se diluyó serialmente en agua y cada dilución se analizó por hibridación y PCR.

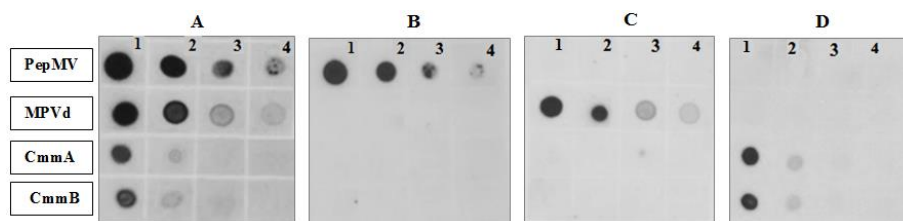
**Especificidad de la sonda de Cmm:** para asegurar que la sonda individual de Cmm y la poli3 solo reaccionará con Cmm, se probó con cepas de *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Pectovacterium carotovorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis*, *Pseudomonas marginalis* y *Pseudomonas helianthi* procedentes de la colección del laboratorio de Bacterias Fitopatógenas del Colegio de Postgraduados.

**Evaluación de las sondas en campo:** se recolectó tejido foliar de 80 plantas adultas de tomate asintomáticas y con síntomas asociados a los patógenos en estudio, en tres localidades productoras del centro y occidente de México para la extracción de ácidos nucleicos y posterior análisis por hibridación, PCR (Cmm) y RT-PCR (PepMV y MPVd).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La hibridación con la poli3 detectó simultáneamente al PepMV, MPVd y Cmm. Solo el virus y el viroide se detectaron en las impresiones de savia (datos no mostrados), minimizando el costo y el tiempo invertido en la extracción de ácidos nucleicos. Esto se debe probablemente a la mayor cantidad de RNA de ambos en el tejido, contrariamente a lo que ocurre con bacterias cuya pared y membrana celular impiden que los ácidos nucleicos estén fácilmente disponibles en la savia de plantas infectadas.

**Sensibilidad de las sondas:** las sondas individuales tuvieron la misma sensibilidad que la poli3 (Fig.1), lo cual concuerda con los resultados de diversos trabajos para detectar virus y viroides (Peiró *et al.*, 2012; Herranz *et al.*, 2004; Aparicio *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011). Para Cmm, la PCR fue 100 veces más sensible que la hibridación (datos no mostrados). Diversos métodos de detección para Cmm se han desarrollado y la sensibilidad reportada es muy variable (Johnson y Walcott, 2012; de León *et al.*, 2008; de León *et al.*, 2011), lo cual dificulta estandarizar un método confiable para detectar a esta bacteria en plantas naturalmente infectadas. Hasta el momento, la manera más confiable de detectar bajas concentraciones de Cmm en plantas asintomáticas o en semilla, es aislar al patógeno del tejido infectado y multiplicarlo en medio de cultivo (Gitaitis *et al.*, 1991; de León *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Hibridación molecular de la poli3 (A) y sondas individuales (B: PepMV; C: MPVd; D: Cmm), para detectar al PepMV, MPVd y Cmm con diluciones de ácidos nucleicos obtenidos de tejido infectado (PepMV 1: 1238.4ng, 2: 123.84ng, 3: 24.76ng y 4: 4.95ng) (MPVd 1: 254.4ng, 2: 25.44ng, 3: 5ng, 4: 1ng) (CmmA: Planta de tomate infectada 1) 1: 2985ng, 2: 298.5ng, 3: 59.7ng, 4: 11.94ng) (CmmB : planta de tomate infectada 2) 1: 1665ng, 2: 166.5ng, 3: 33.3ng, 4: 6.66ng). PepMV: *Pepino mosaic virus*; MPVd: *Mexican papita viroid*; Cmm: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

**Especificidad de la sonda de Cmm:** Solamente la sonda individual de Cmm y la poli3 hibridaron con las diluciones bacterianas de Cmm. No se observó señal de hibridación con ninguna de las especies bacterianas evaluadas (datos no mostrados).

**Evaluación de las sondas en campo:** de las 80 muestras analizadas, solo 5 resultaron positivas para Cmm mediante hibridación utilizando la sonda de Cmm y la poli3. Estas mismas muestras amplificaron por PCR. No se detectaron muestras positivas a PepMV o MPVd mediante hibridación ni RT-PCR, (datos no mostrados).

Con base en la sensibilidad de la sonda de Cmm y la poli3 ( $10^7$  UFC/mL), podrán detectarse en campo plantas infectadas de tomate con esta bacteria que muestren síntomas iniciales y muy probablemente también plantas asintomáticas. Considerando que la poda y la cosecha, incrementan la incidencia de plantas con síntomas ocasionados por Cmm (Chang *et al.*, 1991; Gitaitis *et al.*, 1991), se sugiere analizar muestras después de cuatro días de realizadas las primeras podas para su oportuna detección en campo.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), al programa “Ramón y Cajal” del Ministerio de la Educación y Ciencia de España, por el apoyo económico para la realización del presente trabajo y al Dr. Sergio Aranda Ocampo por proporcionar las cepas bacterianas evaluadas en el presente trabajo.

**LITERATURA CITADA**

- Aparicio, H. F., Soler S., Aramburu J., Galipienso L., Nuez F., Pallás V., López C. (2009). Simultaneous detection of six RNA plant viruses affecting tomato crops using a single digoxigenin-labelled polyprobe. *Eur J of Plant Pathology*, 123:117–123.
- Arauz, C.L.F. (1998). *Fitopatología. Un enfoque agroecológico*. Ed. de la Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 443 p.
- Chang, R.J., Rie S. M. and Pataky J. K. (1991). Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato plants. *Phytopathol.*, 81(10):1276-1281.
- De Boer, S. H. y López M. M. (2012). New Grower-Friendly Methods for Plant Pathogen Monitoring. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 50: 197–218.
- De León L., Siverio F., López M. M. and Rodríguez A. (2011). *Clavibacter mchiganensis* subsp. *michiganensis*, a Seed borne Tomato Pathogen: Healthy Seed are Still de Goal. *Plant Disease*, 95(11): 1328-1338.
- De León L., Siverio F., López M. M. and Rodríguez A. (2008). Comparative efficiency of chemical compounds for *in vitro* and *in vivo* activity against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomato bacterial canker. *Crop Prot.* 27:1277-1283.
- Fanelli, V., Cariddi C. and Finetti-Sialer M. (2007). Selective detection of *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* using dot blot hybridization and real-time PCR. *Plant Pathology*, 56: 683–691.
- Gitaitis, R.D., Beaver R.W., Voloudakis A.E. (1991). Detection of *Clavibacter michiganensis* susp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant disease*, 75: 834-838.
- Hanssen, I. M. and B. P. H. J. Thomma. 2010. *Pepino mosaic virus*: a successful pathogen that rapidly evolved from emerging to endemic in tomato crops. *Molecular plant pathology*, 11(2): 179–189.
- Herranz, M.C., Sánchez-Navarro J.A., Aparicio F., Pallás V. (2005). Simultaneous detection of six stone fruit viruses by non-isotopic molecular hybridization using a unique riboprobe or 'polyprobe'. *Journal of Virological Methods* 124: 49–55.
- James, D., A. Varga, V. Pallás and Candresse T. (2006). Strategies for simultaneous detection of multiple plant viruses. *Can. J. Plant Pathol.* 28: 16–29.
- Johnson, K. L. and Walcott R.R. (2012). Progress Towards a Real-time PCR Assay for the Simultaneous Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Pepino mosaic virus* in Tomato Seed. *J Phytopathol* 160: 353–363.
- Ling, K.S. and W. Zhang. 2009. First Report of a Natural Infection by *Mexican Papita Viroid* and *Tomato Chlorotic Dwarf Viroid* on Greenhouse Tomatoes in Mexico. *Plant Disease* 93 (11).
- Pallás, V., Más P., Sánchez-Navarro J.A., (1998). Detection of plant RNA viruses by nonisotopic dot-blot hybridization. *Methods Mol. Biol.* 81, 461–468.
- Peiró, A., Pallás V. and Sánchez-Navarro J.Á. (2012). Simultaneous detection of eight viruses and two viroids affecting stone fruit trees by using a unique polyprobe. *Eur J Plant Pathol* 132:469–475.
- Saldarelli, P., Barbarossa L., Grieco F., Gallitelli D. (1996). Digoxigenin labelled riboprobes applied to phytosanitary certification of tomato in Italy. *Plant Disease*, 80: 1343–1346.
- Singh, R.P, Finnie R.E., Bangall RH. (1971). Losses due to the potato spindle tuber virus. *Am Potato J* 48: 262-267.
- Zhang, Z., Peng S., Jiang D., Pan S., Wang H. and Li. S. (2012). Development of a polyprobe for the simultaneous detection of four grapevine viroids in grapevine plants. *Eur J Plant Pathol.* 132:9–16.



# COMPATIBILIDAD SEXUAL Y VEGETATIVA ENTRE ESPECIES DEL CLADO *Colletotrichum gloeosporioides* (Orden: Glomerellales, Familia: Glomerellaceae) Y SU RELACIÓN CON SU IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Raúl A. Rodríguez Villarreal<sup>1</sup>, José A. Mora Aguilera<sup>1</sup>, Daniel Nieto Ángel<sup>1\*</sup>, Daniel Téliz Ortiz<sup>1</sup>, Santos G. Leyva Mir<sup>2</sup>.

## INTRODUCCIÓN

Desde la descripción del género *Colletotrichum* por Corda en 1831 (von Arx y Müller, 1954), ha cambiado la relación de especies que lo conforman. En 1957 se tenían reportadas 700 especies (Von Arx.). En 1992, Sutton distinguió a varias especies como sinónimas, agrupándolas en 39 especies en base a morfología. En las revisiones del género realizadas por Hyde *et al.* (2009) y Phoulivong (2011), se propusieron 67 y 68 especies respectivamente, basándose en características morfológicas junto con secuencias de ITS. Sin embargo, se ha considerado que *Colletotrichum* cuenta con varios complejos de especies, en donde las secuencias ITS no permiten distinguir fácilmente las especies filogenéticas que los conforman (especies crípticas) (Cannon *et al.*, 2012; Damm *et al.*, 2012; Weir *et al.*, 2012). A partir de este conocimiento, han surgido estudios para encontrar nuevos marcadores moleculares y separar estas especies. Por esto, en la revisión de Cannon *et al.* (2012) aumenta el número de especies propuestas a 113, basándose principalmente en varios loci como actina (ACT),  $\beta$ -Tubulina (TUB2), Calmodulina (CAL), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y factor de elongación 1- $\alpha$  (EF1  $\alpha$ ).

Actualmente, continúan los trabajos que estudian nuevas regiones de ADN en *Colletotrichum* para precisar la separación de especies, como es el caso del locus *Apn2/Mat* (Silva *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2014). No obstante, al considerar un mayor número de secuencias nucleotídicas en la delimitación de especies, también podremos ver reflejada la diversidad genética natural que presentan los organismos estudiados; por lo cual, éstos pueden ser separados incorrectamente en diferentes grupos y ser propuestos como nuevas especies. La compatibilidad sexual y vegetativa son eventos biológicos en donde ocurre flujo de información genética entre organismos relacionados biológicamente.

<sup>1</sup>Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados campus Montecillos.

<sup>2</sup>Parasitología, Universidad Autónoma Chapingo.

\*Correo de correspondencia: [dteliz@colpos.mx](mailto:dteliz@colpos.mx)

De no encontrar estos eventos entre aislamientos de diferentes especies filogenéticas, se fortalece la designación de especies mediante este método (análisis filogenéticos); de lo contrario, sería conveniente utilizar estas evidencias biológicas en conjunto con datos filogenéticos para designación de especies.

El objetivo de la presente investigación es determinar la capacidad de compatibilidad sexual y vegetativa entre cuatro especies filogenéticas relacionadas del clado gloeosporioides.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material biológico.** Los aislamientos del género *Colletotrichum* estudiados provinieron de tejido de mango (hojas, ramas y frutos) con síntomas típicos de antracnosis y fueron proporcionados por el Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza, del Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados. Los aislamientos fueron identificados previamente como *C. asianum*, *C. dianesei*, *C. fructicola* y *C. tropicale* mediante el marcador molecular *Apn2/MAT*. Los aislamientos se reactivaron, purificaron y conservaron en agua destilada a temperatura ambiente y ultracongelación a -80 °C. Los aislamientos se mantuvieron conservados en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA marca Difco) durante la investigación.

**Compatibilidad sexual y micelial.** Se realizaron confrontaciones por triplicado entre todos los aislamientos para determinar su capacidad de reproducción sexual y su compatibilidad micelial. Las pruebas se realizaron en cajas Petri conteniendo PDA, de manera similar a como se reportó previamente (Cisar *et al.*, 1994). Por cada caja, se transfirieron fragmentos de colonia (5 mm<sup>2</sup>) con 10 días de crecimiento a una distancia de 2.7 cm entre cada fragmento e incubaron a 25 °C en oscuridad por 30 días.

Bajo un microscopio estereoscópico y con ayuda de una aguja entomológica adherida a una aguja de disección, se exploró la línea de contacto del micelio desarrollado por ambos fragmentos en busca de peritecios. Tres categorías se establecieron: (1) ausencia de peritecios, (2) presencia de peritecios inmaduros y (3) la presencia de peritecios maduros con ascos y ascosporas. En el mismo ensayo también se determinó la compatibilidad micelial entre aislamientos de manera similar como lo reporta Darshana *et al.* (2014) para *C. gloeosporioides*. Se observó la línea de contacto del crecimiento de las colonias confrontadas por la parte inferior de las cajas Petri y se registró su respuesta utilizando las siguientes tres categorías: (1) ausencia de una barrera de color oscuro (compatibilidad micelial), (2) una barrera de color oscuro tenue y (3) presencia de una barrera de color oscuro intenso (incompatibilidad micelial).

**Obtención de mutantes *nit*.** Para las pruebas de compatibilidad vegetativa, primero se obtuvieron mutantes *nit* a partir de los aislamientos silvestres de *Colletotrichum* spp., como describieron Brooker *et al.* (1991). Los aislamientos se inocularon en cajas Petri conteniendo medio basal (MB) e incubaron por 10 días. A partir de las colonias desarrolladas en MB se transfirieron tres fragmentos (5 mm<sup>2</sup>) a cada una de 10 cajas Petri con MB más clorato (1.6 g de L-asparagina disuelta en 20 mL de agua y esterilizada por filtración, 25 g de KClO<sub>3</sub>) e incubaron hasta por 6 semanas. Posteriormente, con ayuda de un microscopio compuesto y aguja entomológica adherida a una aguja de disección, se transfirieron a MB hifas de sectores mutantes *nit*, distinguibles por su rápido crecimiento y escaso micelio aéreo.

**Pruebas de compatibilidad vegetativa.** Primeramente se realizaron confrontaciones en MB entre mutantes de cada aislamiento. Aquellas parejas de mutantes que desarrollaron un crecimiento tipo silvestre (abundante micelio aéreo) en la línea de contacto, se consideraron complementarias, capaces de formar un heterocarión y fueron seleccionadas dos parejas por cada aislamiento (mutantes probadoras). Posteriormente, las mutantes probadoras obtenidas de todos los aislamientos (previamente identificados como especies distintas por métodos moleculares) fueron confrontadas entre ellas. La ocurrencia de crecimiento tipo silvestre en la línea de contacto entre mutantes de aislamientos distintos, se consideró como evidencia de la formación de un heterocarión y los aislamientos se consideraron miembros de un mismo grupo de compatibilidad vegetativa.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Compatibilidad sexual y micelial.** Se realizaron 828 confrontaciones entre los 23 aislamientos estudiados. En las pruebas de compatibilidad sexual todos los aislamientos fueron autoincompatibles. Sólo ocho confrontaciones desarrollaron peritecios en al menos una repetición (**Cuadro 1**), cuatro entre aislamientos de la misma especie filogenética (*C. dianesei*) y otras cuatro entre aislamientos de *C. dianesei* contra aislamientos de *C. tropicale*, *C. fructicola* y *C. asianum*.

La ocurrencia de compatibilidad sexual en especies de *Colletotrichum* ha sido ampliamente documentada (Pinto *et al.*, 2012; Barcelos *et al.*, 2014), a pesar de considerarse difícil de observar en laboratorio (Cai *et al.*, 2009).

La formación de peritecios con ascas entre dos especies filogenéticas distintas (aislamiento Ca2 de *C. asianum* con Cd3 de *C. dianesei*) es interesante ya que demuestra el intercambio de información genética y que no están aisladas genéticamente (Souza *et al.*, 2010).

**Cuadro 1. Compatibilidad sexual entre especies filogenéticas del clado gloeosporioides de *Colletotrichum*. Se registró un criterio donde ocurrió el mismo resultado en las tres repeticiones.**

	Ct <sup>a</sup>	Cf	Ca1	Ca2	Cd1	Cd2	Cd3	Cd4	Cd5	Cd6
Ct	1 <sup>b</sup>									
Cf	1	1								
Ca1	1	1	1							
Ca2	1	1	1	1						
Cd1	2 <sup>c</sup>	2	1	1	1					
Cd2	1	1	1	1	1,2,2	1				
Cd3	1	1	1	3,2,3	1	1	1			
Cd4	1	1	1	1	1	1	1,3,2	1		
Cd5	1	1	1	1	2,1,1	1	1	1	1	
Cd6	1	1	2	*	1,2,1	1	1	*	1	*

<sup>a</sup> Ct= *C. tropicale*, Cf= *C. fructicola*, Cd= *C. dianesei*, Ca= *C. asianum*.

<sup>b</sup> (1) Ausencia de peritecios, (2) presencia de peritecios inmaduros, (3) presencia de peritecios maduros con ascos y ascosporas y (\*) no se realizó.

<sup>c</sup> Celdas sombreadas= confrontaciones con peritecios maduros o inmaduros.

maduros o inmaduros.

**Cuadro 2. Compatibilidad micelial entre algunos aislamientos confrontados. Solo se registró un dato donde ocurrió el mismo resultado para las tres repeticiones.**

	Ct <sup>a</sup>	Cf	Ca1	Ca2	Ca3	Ca4	Ca5	Cd1	Cd2	Cd3	Cd4	Cd5	Cd6
Ct	1 <sup>bc</sup>												
Cf	3	1											
Ca1	3	1,2,1	1										
Ca2	3,3,2	2,3,3	3,3,1	1									
Ca3	3	2,1,1	1	1	1								
Ca4	2,3,1	2,1,2	1	2	3,1,3	1							
Ca5	2,1,1	1	2,2,3	3	1,2,1	2,3,3	1						
Cd1	3,1,2	1	1	2,2,1	1	1	2,2,1	1					
Cd2	3	2,3,3	3,2,3	2,3,2	2	1,2,2	3	1	1				
Cd3	3	3,2,2	2,3,3	3,2,3	3,3,2	2,3,3	2,1,2	2,2,1	3,3,2	3,1,3			
Cd4	3,3,2	1	1	1,1,2	1	2,3,3	1,2,1	1	1	1,3,2	1		
Cd5	2,3,3	1	1	1,1,2	2	2,1,1	1	1	1	*	1	1	
Cd6	3,2,3	1	1	*	1	3,2,*	*	3	3	3,3,2	*	2,1,1	*

<sup>a</sup> Ct= *C. tropicale*, Cf= *C. fructicola*, Ca= *C. asianum*, Cd= *C. dianesei*.

<sup>b</sup> (1) Ausencia de una barrera de color oscuro, (2) una barrera de color oscuro tenue, (3) una barrera de color oscuro intenso y (\*) no se realizó.

<sup>c</sup> Con negritas, donde ocurrió compatibilidad micelial en las tres repeticiones.

La evaluación de compatibilidad micelial entre las cuatro especies filogenéticas mostró que todos los aislamientos son autocompatibles. Además, se observó compatibilidad entre aislamientos de las especies *C. fructicola*, *C. asianum* y *C. dianesei* (**Cuadro 2**). El reporte que se ha encontrado de compatibilidad micelial en este género (Darshana *et al.*, 2014) concuerda con las características de las interacciones en las líneas de contacto entre aislamientos confrontados en esta investigación. Aunque estudios de compatibilidad micelial no son

comunes en especies de *Colletotrichum*, los resultados obtenidos demuestran que son frecuentes los aislamientos de distintas especies filogenéticas que comparten un mismo grupo de compatibilidad micelial.

**Compatibilidad vegetativa.** A pesar que la obtención de mutantes *nit* no fue posible en algunos aislamientos, se obtuvieron alrededor de 400 crecimientos mutantes en total. Hubo compatibilidad vegetativa entre aislamientos de *C. fructicola*, *C. asianum* y *C. dianesei* (**Cuadro 3**). Algunos de estos resultados están siendo corroborados y otras confrontaciones están por ser evaluadas.

**Cuadro 3. Compatibilidad vegetativa de algunas de las confrontaciones realizadas.**

	Cf <sup>a</sup>	Ca4	Ca3	Ca6	Cd6	Cd8	Cd9	Cd12
Cf	1 <sup>b</sup>							
Ca4	1	1						
Ca3	2	3	1					
Ca6	1	*	*	1				
Cd6	1	1	*	2	1			
Cd8	1	2	*	2	2	1		
Cd9	2	*	*	*	*	2	1	
Cd12	*	*	*	*	*	2	1	1

<sup>a</sup> Ct= *C. tropicale*, Cf= *C. fructicola*, Ca= *C. asianum*, Cd= *C. dianesei*.

<sup>b</sup> (1) Ocurrencia de compatibilidad vegetativa, (2) ocurrencia de compatibilidad vegetativa que se encuentra corroborando, (3) ausencia de compatibilidad vegetativa y (\*) dato no evaluado.

Se considera que esta es la primera investigación donde se demuestra la capacidad de intercambio de información genética entre especies definidas filogenéticamente pertenecientes a un mismo complejo de especies del género *Colletotrichum*. Se recomienda utilizar estas evidencias para consolidar de mejor manera la separación y agrupación de las especies que conforman el género *Colletotrichum*.

La inclusión de más aislamientos de especies filogenéticas del clado gloeosporioides en estudios de compatibilidad sexual, micelial y vegetativa, deberá aportar más bases en la definición clara de especies. Además, estos estudios pueden extenderse a analizar la capacidad de intercambio de información genética en otros clados que incluyen complejos de especies filogenéticas en el género *Colletotrichum*.

## AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT y al Colegio de Postgraduados, por el apoyo brindado durante mi estancia en la maestría.

## LITERATURA CITADA

- Arx J. A., von and E. Müller. 1954. Die amerosperen gattungen der Pyrenomyceten. Beitrage zur Kryptogamenflora der Schweiz 11: 1–434.
- Barcelos Q. L., J. M. A. Pinto, L. J. Vaillancourt and E. A. Souza. 2014. Characterization of *Glomerella* Strains Recovered from Anthracnose Lesions on Common Bean Plants in Brazil. Public Library of Science 9(6): e100438.
- Brooker N.L., J. F. Leslie and M. B. Dickman. 1991. Nitrate nonutilizing mutants of *Colletotrichum* and their use in studies of vegetative compatibility and genetic relatedness. Phytopathology 81: 672-677.
- Cai L., K. D. Hyde, P. W. J. Taylor, B. Weir, J. Waller, M. M. Abang, J. Z. Zhang, Y. L. Yang, S. Phoulivong, Z. Y. Liu, H. Prihastuti, R. G. Shivas, E. H. C. McKenzie and P. R. Johnston. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. Fungal Diversity 39: 183–204.
- Cannon P. F., U. Damm, P. R. Johnston and B. S. Weir. 2012. *Colletotrichum* – current status and future directions. Studies in Mycology 73: 181–213.
- Cisar C. R., F. W. Spiegel, D. O. TeBeest and C. Trout. 1994. Evidence for mating between isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* with different host specificities. Current Genetics 25: 330-335.
- Darshana C. N., R. Praveena, S. Ankegowda and C. N. Biju. 2014. Morphological variability, micelial compatibility and fungicidal sensitivity of *Colletotrichum gloeosporioides* causing leaf spot of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). Journal of Spices and Aromatic Crops 23(2): 211-223.
- Damm U., P. F. Cannon, J. H. C. Woudenberg, P. R. Johnston, B. S. Weir, Y. P. Tan, R. G. Shivas and P. W. Crous. 2012. The *Colletotrichum boninense* species complex. Studies in Mycology 73: 1-36.
- Hyde K. D., L. Cai, P. F. Cannon, J. A. Crouch, P. W. Crous, U. Damm, P. H. Goodwin, H. Chen, P. R. Johnston, E. B. G. Jones, Z. Y. Liu, E. H. C. McKenzie, J. Moriwaki, P. Noireung, S. R. Pennycook, L. H. Pfenning, H. Prihastuti, T. Sato, R. G. Shivas, Y. P. Tan, P. W. J. Taylor, B. S. Weir, Y. L. Yang and J. Z. Zhang. 2009. *Colletotrichum* – names in current use. Fungal Diversity 39: 147–182.
- Phoulivong S. 2011. *Colletotrichum*, naming, control, resistance, biocontrol of weeds and current challenges. Current Research in Environmental and Applied Mycology 1(1): 53–73.
- Silva D. N., P. Talhinas, V. Várzea, L. Cai, O. S. Paulo and D. Batista. 2012. Application of the *Apn2/MAT* locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: an example from coffee (*Coffea* spp.) hosts. Mycology 104: 396–409.
- Souza E.A., O.A. Camargo Jr. and J. M. A. Pinto. 2010. Sexual recombination in *Colletotrichum lindemuthianum* occurs on a fine scale. Genetics and Molecular Research 9(3):1759-1769.
- Sutton B. C. 1992. The genus *Glomerella* and it's anamorph *Colletotrichum*. In Bailey, JA y Jeger MJ (ed.) *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*: CAB International. pp. 1–26.
- Vieira W. A. S., S. J. Michereff, M. A. de Moraes Jr., K. D. Hyde and M. P. S. Câmara. 2014. Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. Fungal Diversity 67: 181-202.
- Weir B. S., P. R. Johnston and U. Damm. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. Studies in Mycology 73: 115-180.





## DETECCIÓN CARACTERIZACIÓN Y ETIOLOGÍA

## CARACTERIZACIÓN DE LOS FACTORES QUE INFLUYEN EN LA EVALUACIÓN VISUAL DE ENFERMEDADES EN PLANTAS

Lauro Soto Rojas<sup>1</sup>, Daniel Nieto Ángel<sup>1</sup>, Cristian Nava Díaz<sup>1</sup>, Ciro Velasco Cruz<sup>2</sup>, Armando Lozano Rodríguez<sup>3</sup>, Ángel Lagunes Tejeda<sup>4</sup>

### INTRODUCCIÓN

Los agentes fitopatógenos son responsables históricos de las mayores pérdidas de vegetales en condiciones de campo y en almacenamiento. En todo el mundo se realiza una gran cantidad de investigación enfocada al control de enfermedades en plantas, principalmente a través de la aplicación de plaguicidas químicos, aunque también se evalúa la resistencia de nuevas variedades, agentes de control biológico y efectividad de las prácticas culturales. La medición/estimación de la intensidad de la enfermedad tiene distintas aplicaciones en Fitopatología; se emplea en la toma de decisiones y estudios epidemiológicos; además, es útil para estimar pérdidas potenciales, así como para comprender los procesos esenciales de la biología de los fitopatógenos. Las estimaciones inexactas de la intensidad de la enfermedad producen conclusiones erróneas, que a su vez podrían originar decisiones y acciones incorrectas en el manejo de enfermedades.

Las enfermedades en plantas, de forma convencional, son “medidas” a través de variables como la incidencia o la severidad. En estudios minuciosos, el cálculo de la incidencia produce resultados que, en términos descriptivos, son insuficientes; en esta situación, la “medición” de la severidad ofrece información más detallada de la intensidad de la enfermedad. Sin embargo, el proceso de evaluación de la severidad se ha caracterizado por ser subjetivo, lo que irremediamente conduce a errores sustanciales. En la actualidad se utilizan distintos métodos para evaluar la severidad, incluyendo la estimación visual directa del porcentaje de tejido enfermo (EVP), la cual se emplea en el 90% de las investigaciones aplicadas (Bock *et al.* 2010). Además, es frecuente el uso de escalas con intervalos que representan diferentes grados de enfermedad (Chiang *et al.* 2014; Bardsley y Ngugi 2013). La escala más utilizada es la propuesta por Horsfall y Barratt (HB) en 1945 (Bock *et al.* 2013), así como todas las escalas que se han derivado del mismo fundamento (Schwanck y Ponte 2014; Yadav *et al.* 2013; Nita *et al.* 2003).

1. Programa de Fitopatología. Colegio de Postgraduados.

2. Programa de Estadística. Colegio de Postgraduados.

3. Profesor Investigador del Programas en Educación y Humanidades. ITESM

4. Programa de Entomología Agrícola. Colegio de Postgraduados.

Es indispensable que todo método de evaluación produzca datos con exactitud y precisión, sin descuidar indicadores valiosos como la repetitividad y la reproducibilidad (Bock et al. 2010). Se ha comprobado que el método EVP proporciona datos más precisos y exactos en comparación con la escala HB, principalmente en el intervalo de severidad 25-75% (Bock 2013; Bock et al. 2009); esto coincide con los resultados de Nita et al. (2003), quienes además aseguran que la relación entre la severidad real (X) y la severidad estimada (Y) es lineal, no logarítmica como lo supuesto por Horsfall y Barratt. Adicionalmente, diversas investigaciones (Nutter Jr y Esker 2005), sugieren que la Ley de Weber se cumple en estudios de Fitopatometría; sin embargo, la Ley de Fechner no se apegan a la realidad. Por lo anterior, en la evaluación de la severidad, la evidencia científica actual alude a la invalidez del paradigma que dice: *la agudeza visual es proporcional al logaritmo de la intensidad del estímulo*.

Distintas investigaciones confirman la confiabilidad del método EVP (Chiang et al., 2015; Jarroudi et al., 2015; Bock et al., 2015; Bock et al., 2014); sin embargo, exponen la necesidad de un mejor entendimiento del método y la creación de planes de entrenamiento para evaluadores. La presente investigación tiene como objetivo caracterizar, mediante distintos experimentos, las relaciones existentes entre la severidad real (X) y la severidad estimada (Y), además se analizan los factores que incrementan la precisión y exactitud del método EVP.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizará una serie de experimentos, examinando hojas de distintos grupos de cultivos (hortalizas, gramíneas y frutales). Mediante el método EVP se estimará la severidad de la enfermedad, y se analizarán los siguientes casos:

**Estilos cognitivos y su relación con el método EVP.** En el presente estudio se evalúa el estilo cognitivo reflexividad-impulsividad; este estilo es un componente que en cada individuo determina el modo de percibir, recordar y procesar la información obtenida por los sentidos; en este caso se estudiará la percepción visual. Las pruebas a utilizar son de uso común en el estudio de la reflexividad-impulsividad en la psicología científica (Matching Familiar Figures Test 20, Stroop Effect Test y Circle Tracing Task). Los índices obtenidos de las pruebas psicológicas se correlacionarán con el tiempo de respuesta, precisión y exactitud de los valores de severidad estimada (Y) obtenida mediante EVP. Este estudio se realizará con 10 evaluadores experimentados y 10 evaluadores novatos con previa capacitación.

**Morfología foliar y su efecto en la evaluación de la severidad.** Se evalúa el efecto de la forma de las hojas (linear lanceolada, elíptica, palmeada, lobulada, triangular) en la estimación por el

método EVP. Para cada tipo de hoja se tiene un grupo de 32 imágenes que representan todo el rango de severidad (0-100%), cada hoja se generó con el software GIMP usando pinceles creados con patrones reales de síntomas de distintos patosistemas. El rango de severidad se dividió en 30 intervalos iguales (amplitud 3.33%); dentro de cada intervalo se generó un número aleatorio que representó el porcentaje de severidad de la imagen generada. La selección aleatorio de los porcentajes de severidad representados evitó que el estudio fuera afectado por el sesgo sistemático de selección de nudos, el cual se refiere a que los evaluadores tienen una marcada preferencia por ciertos valores (5%, 10%, 15%, etc.), de acuerdo con lo que fue descrito por Bock *et al.* (2010). Cada grupo de imágenes fue evaluado por el método EVP con el apoyo 10 evaluadores experimentados y 10 evaluadores novatos con previa capacitación. En cada intervalo se analizó la distribución estadística de Y en relación con X mediante pruebas de bondad de ajuste. La variable respuesta se analizará mediante un modelo lineal mixto, para estudiar el efecto de la morfología foliar y los evaluadores (20).

**Dimensión y distribución espacial de las lesiones y su efecto en la evaluación de la severidad.** Se evalúa el efecto del tamaño y la distribución espacial de las lesiones en la estimación de la severidad por el método EVP. Para este estudio se tienen nueve grupos de 18 imágenes que representan el rango de severidad más común en patosistemas (0-60%), de acuerdo con Chiang *et al.* (2015). Cada grupo se generó con el software GIMP usando pinceles con tres patrones de distribución de las lesiones (aleatoria, en agregados y uniforme), este factor se combinó con tres distintos tamaños de lesiones (1%, 5% y 10%). El rango de severidad se dividió en 20 intervalos iguales (amplitud 3.33%); dentro de cada intervalo se obtuvo un número aleatorio que representó el porcentaje de severidad de la imagen a generar con las combinaciones de los factores (aleatoria-lesiones 1%, aleatoria-lesiones 5%, aleatoria-lesiones 10%,..., uniforme-lesiones10%). Cada grupo de imágenes fue evaluado por el método EVP con el apoyo 10 evaluadores experimentados y 10 evaluadores novatos con previa capacitación. En cada intervalo se analizó la distribución estadística de Y en relación con X mediante pruebas de bondad de ajuste. La variable respuesta se analizará mediante un modelo lineal mixto, para estudiar el efecto de la distribución espacial, el tamaño de las lesiones y los evaluadores (20).

**Percepción cromática y su efecto en la evaluación de la severidad.** Se evalúa el efecto del color de las lesiones en la estimación de la severidad por el método EVP. Para este estudio se tienen cuatro grupos de 18 imágenes que representan el rango de severidad más común en patosistemas (0-60%), de acuerdo con Chiang *et al.* (2015). Cada grupo se generó con el software GIMP usando pinceles con tres patrones reales de síntomas de distintos patosistemas, este factor tuvo cuatro

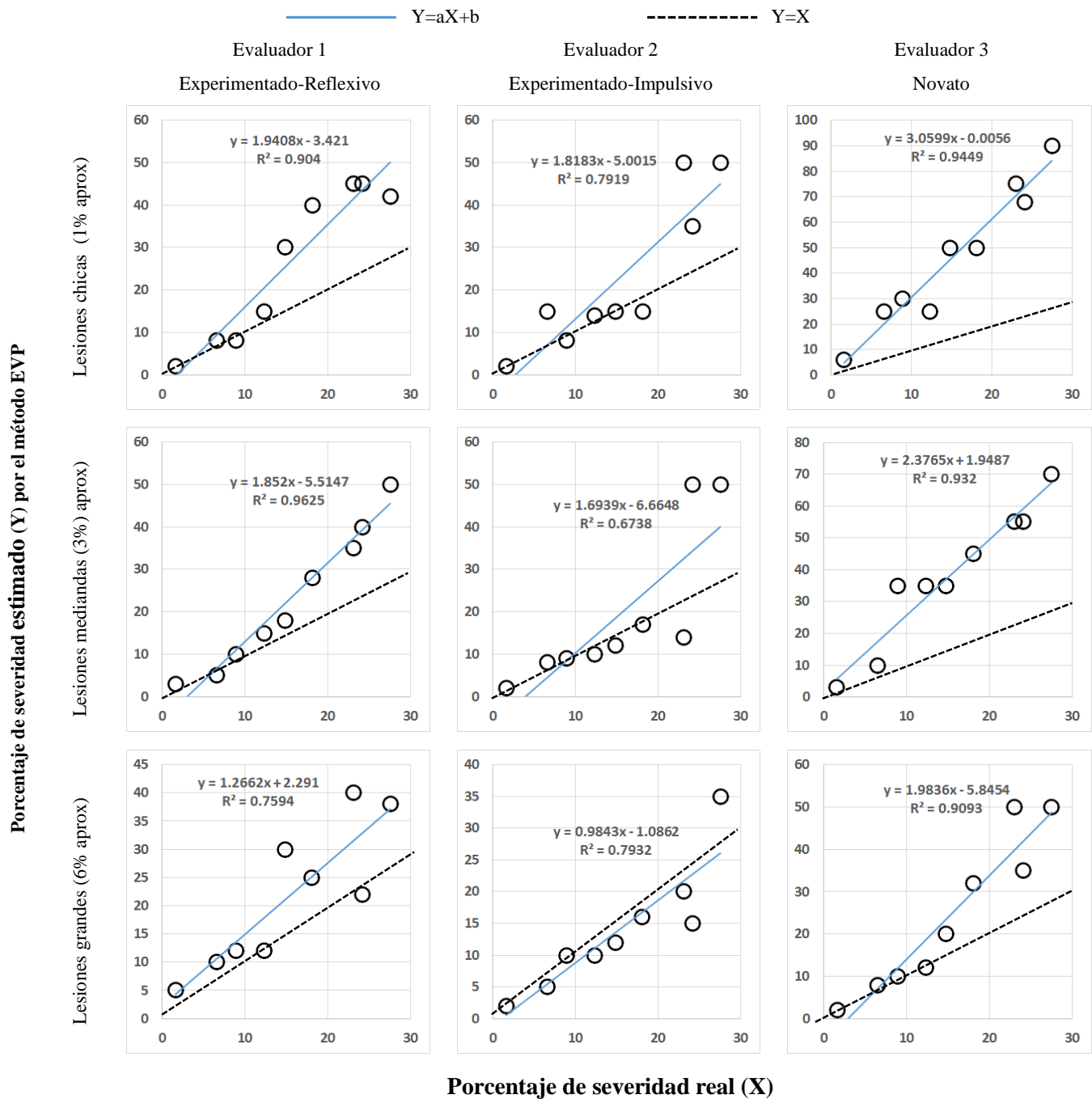
variantes (lesiones negras, lesiones cafés, lesiones grises y lesiones con halo clorótico). El rango de severidad se dividió en 20 intervalos iguales (amplitud 3.33%); dentro de cada intervalo se obtuvo un número aleatorio que representó el porcentaje de severidad de la imagen a generar con las cuatro variantes en color. Cada grupo de imágenes fue evaluado por el método EVP con el apoyo 10 evaluadores experimentados y 10 evaluadores novatos con previa capacitación. En cada intervalo se analizó la distribución estadística de Y en relación con X mediante pruebas de bondad de ajuste. La variable respuesta se analizará mediante un modelo lineal mixto, para estudiar el efecto de la percepción cromática y los evaluadores (20). Adicionalmente se diseñará una prueba para evaluar la interferencia en la evaluación cuando coexisten dos patógenos en la misma hoja.

**Uso de Diagramas de Área Estándar en la evaluación de la severidad.** Se estudiará el efecto del uso de diagramas de área estándar (DAE) con intervalos lineales y con diferente número de imágenes (3, 4, 5, 6 y 7). Los DAE se emplearán de dos formas diferentes: como criterio de clasificación (CC) y como ayuda para estimación visual (AEVP). Para este estudio se tiene un grupo de 22 imágenes que representan todo el rango de severidad (0-100%), cada hoja se generó con el software GIMP usando pinceles creados con patrones reales de síntomas de distintos patosistemas. La primera etapa del experimento se realizará mediante la evaluación de la severidad utilizando el DAE como CC; posteriormente, los DAE se utilizarán como AEVP, las evaluaciones se realizarán a intervalos semanales, variando el número de imágenes que integran el DAE. Se analizan los factores que incrementan la precisión, exactitud, repetitividad y reproducibilidad del método EVP. Cada método de evaluación se ensayó con 5 evaluadores experimentados y 5 evaluadores novatos.

Como avance de esta investigación se tiene la conformación de un banco de imágenes de hojas con diferentes grados de infección; es decir, se tiene hojas con severidad cercana a cero hasta hojas que presenten la mayor parte de la superficie infectada. Cada hoja fue procesada y analizada con el programa GIMP para obtener el porcentaje de tejido enfermo, el cual se considera como el valor real de la severidad de la enfermedad.

## RESULTADOS

En la actualidad se tiene un banco de imágenes de hojas de los diferentes cultivos: aguacate, algodón, calabacita, cebada, chayote, chile, crisantemo, cítricos, cacahuete, durazno, fresa, frijol, jamaica, mango, manzana, maíz, melón, papaya, pepino, rosal, sandía y vid.



En condiciones de campo es difícil conseguir una colección completa de todos los niveles de severidad requeridos para esta investigación. Por lo anterior, se empleó el programa GIMP para crear pinceles a partir de patrones de lesiones reales, con esto se generó la colección completa de imágenes que se requieren para analizar el efecto de los factores descritos en el apartado anterior.



Los resultados de experimentos piloto realizados con tres evaluadores (E1, E2 y E3), indican que E2 (experimentado-impulsivo) tiende a ser más impreciso (menor valor de  $R^2$ ) en comparación con E1 (experimentado-reflexivo); Adicionalmente en los tres evaluadores se observó un sesgo sistemático con una tendencia a sobreestimar (pendiente mayor a 1), principalmente cuando el tejido presenta lesiones pequeñas (1% aproximadamente). Existe una diferencia notable en la exactitud entre evaluadores experimentados y novatos.

### LITERATURA CITADA

- Bardsley & Ngugi, 2013. Reliability and accuracy of visual methods to quantify severity of foliar bacterial spot symptoms on peach and nectarine. *Plant Pathology*, 62(2).
- Bock *et al.*, 2010. Plant Disease Severity Estimated Visually, by Digital Photography and Image Analysis, and by Hyperspectral Imaging. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29(2): 59–107.
- Bock *et al.*, 2009. The Horsfall-Barratt scale and severity estimates of citrus canker. *European Journal of Plant Pathology*, 125(1): 23–38.
- Bock, C *et al.*, 2014. Disease Severity Estimates—Effects of Rater Accuracy and Assessment Methods for Comparing Treatments. *Plant ...* Available at: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-09-14-0925-RE>.
- Bock, CH, Wood, BW & Gottwald, TR. 2013. Pecan scab severity-effects of assessment methods. *Plant Disease*. Available at: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-07-12-0642-RE>.
- Bock, C.H., 2013. The Effect of Horsfall-Barratt Category Size on the Accuracy and Reliability of Estimates of Pecan Scab Severity. *Plant Disease*, 97: 797–806.
- Bock, Hotchkiss & Wood, 2015. Assessing disease severity: accuracy and reliability of rater estimates in relation to number of diagrams in a standard area diagram set. *Plant Pathology*.
- Campbell, C. L. 2007. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley and Sons, New York, NY.
- Chiang *et al.*, 2015. Effects of rater bias and assessment method on disease severity estimation with regard to hypothesis testing. *Plant Pathology*.
- Chiang, K.-S. *et al.*, 2014. What interval characteristics make a good categorical disease assessment scale? *Phytopathology*, 104(6): 575–85.
- Horsfall, J. G., and Barratt, R. W. 1945. An improved grading system for measuring plant disease. (Abstr.) *Phytopathology* 35: 655.
- Jarroudi, E. *et al.*, 2015. A comparison between visual estimates and image analysis measurements to determine septoria leaf blotch severity in winter wheat. *Plant Pathology*, 64(2).
- Madden, L. V., Hughes, G., and van den Bosch, F. 2007. The Study of Plant Disease Epidemics. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Nita, Ellis & Madden, 2003. Reliability and accuracy of visual estimation of phomopsis leaf blight of strawberry. *Phytopathology*, 93(8): 995–1005.
- Nutter Jr, F. & Esker, P., 2005. The Role of Psychophysics in Phytopathology: The Weber–Fechner Law Revisited. *European Journal of Plant Pathology*, 114(2):199–213.
- Schwanck, A. & Ponte, E., 2014. Accuracy and Reliability of Severity Estimates Using Linear or Logarithmic Disease Diagram Sets in True Colour or Black and White: a Study Case for Rice Brown Spot. *Journal of Phytopathology*, 162(10).
- Yadav *et al.*, 2013. Development and validation of standard area diagrams to aid assessment of pecan scab symptoms on fruit. *Plant Pathology*, 62(2).



## DETECCIÓN AÉREA DEL INÓCULO PRIMARIO Y SECUNDARIO DE LA ROYA ASIÁTICA DE LA SOYA EN EL SUR DE TAMAULIPAS

Victorino **Santiago Pérez**<sup>1</sup>, María de J. **Yáñez Morales**<sup>1\*</sup>, María del P. **Rodríguez Guzmán**<sup>1</sup> y Antonio P. **Terán Vargas**<sup>2</sup>

### INTRODUCCIÓN

La roya asiática de la soya causada por *Phakopsora pachyrhizi* Sydow y P. Sydow, es una enfermedad devastadora que se ha expandido a muchas regiones del mundo donde se cultiva la soya [*Glycine max* (L.) Merrill] (Choi *et al.*, 2008); y por ser un parasito obligado, su estudio es complejo. Ocasiona una defoliación prematura y una reducción del rendimiento (Kumudini *et al.*, 2008). Con pérdidas de 20% a 80% en condiciones óptimas de desarrollo, y en regiones donde la enfermedad es endémica los daños son más severos (Tremblay *et al.*, 2013). Su distribución mundial se debe en parte, a que sus uredosporas se separan de los pedicelos en las uredias con gran facilidad y son transportadas por las corrientes de aire (Li *et al.*, 2012). En 2004 fue reportada por primera vez en Estados Unidos en un campo cerca de Baton Rouge, LA (Schneider *et al.*, 2005), y en 2005 en México en Ébano y Tamuín en el estado San Luis Potosí (Cárcamo-Rodríguez *et al.*, 2006) y el sur de Tamaulipas en la variedad Huasteca 400 (ciclo Primavera-Verano) (Terán-Vargas *et al.*, 2007). Actualmente se ha extendido a 10 estados de la república mexicana y de los cuales: cinco aportan el 94.8% de la producción nacional de soya. Otros de los cultivos susceptibles en esos estados son frijol (29.83% de la producción nacional) y jícama (76.82% de la producción nacional) (SIAP, 2014). Por la rápida dispersión de la enfermedad y la importancia económica de los cultivos afectados, es de gran interés conocer la densidad del inóculo primario y secundario de la roya asiática de la soya para generar información que ayude al agricultor a tomar decisiones sobre acciones preventivas contra *P. pachyrhizi*. El objetivo del estudio fue monitorear la densidad y dispersión del inóculo primario y secundario. La hipótesis considera que el inóculo siempre está presente y que de acuerdo a su densidad es la severidad del daño que causa el patógeno.

<sup>1</sup> Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo-Fitosanidad

<sup>2</sup> INIFAP-CEHUAS

\*Autor para Correspondencia: [yanezmj@colpos.mx](mailto:yanezmj@colpos.mx)

## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se estableció el 4 de julio de 2014 en Villa Cuauhtémoc del Sur de Tamaulipas dentro de las instalaciones del Campo Experimental Las Huastecas (CEHUAS), (22°34'14.56'' lat. N; 98°10'19.70'' long. O; 18 msnm) durante el ciclo Primavera-Verano (julio a noviembre) en una parcela de 2.20 ha con la variedad de soya Huasteca 200.

**Identificación morfológica.** Se tomaron muestras con síntomas de la enfermedad y se prensaron. Las muestras fueron observadas en un microscopio estereoscópico (Olympus SZ51) y se compararon con material del Herbario CMPH de Fitopatología (hojas enfermas por *P. pachyrhizi* colectadas en ciclo anterior, 2013). Se hicieron cortes en KOH al 3%, hoja Gillette, portaobjetos, glicerol acidificado al 50% y cubreobjetos; y en un microscopio compuesto (Olympus CX31) los montajes con las estructuras morfológicas fueron comparados con otros obtenidos de tejidos de Herbario con *P. pachyrhizi*. Considerando la forma, color, ornamentación y las medidas en  $\mu\text{m}$ ; y como lo describe Sydow y Sydow (1914), y descripción detallada e ilustrada de Ono *et al.* (1992).

**Identificación molecular.** Se extrajo el ADN, a partir de material infectado y sano, se analizaron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y con primers específicos: Ppm1 y Ppa2 (Frederick *et al.*, 2002).

**Detección del inóculo primario:** antes de la presencia de la enfermedad.

Trampeo aéreo de uredosporas. Inició en 25 septiembre del 2014, cuando el cultivo se encontraba en la etapa fenológica (R3); se instalaron 24 trampas a dos alturas (85 y 142 cm), ubicadas alrededor y centro de la parcela. Las trampas fueron portaobjetos colocados verticalmente e impregnados por un lado con vaselina-hexano que se colocaron en estacas y se orientaron con tres repeticiones al este (E), oeste (O), norte (N) y sur (S); y se cambiaron semanalmente. El conteo de uredosporas fue en microscopio compuesto a 40X. Se colocaron dos gotas equidistantes de ácido láctico por portaobjeto y se cubrió cada una con cubreobjetos de 18 x 18 mm. En cada cubreobjetos se contó en todos los campos el total de uredosporas trapeadas.

**Inóculo secundario:** después de la detección de la enfermedad.

Trampeo aéreo de uredosporas. Se continuó con el trapeo de uredosporas, se consideró como inóculo secundario a todas las uredosporas trampeadas después de la aparición de las primeras pústulas y en base a evaluaciones de incidencia y severidad.

**Incidencia y severidad.** Se evaluaron semanalmente en una etapa reproductiva R5 (octubre 16) y se hicieron cuatro evaluaciones. **a)** Incidencia. Fue el porcentaje de hojas enfermas respecto al total de hojas en cada tercio (inferior, medio y superior) y también, el total de hojas enfermas con respecto al número de hojas muestreados al azar. **b)** Severidad. Se evaluó empleando la escala propuesta por Godoy *et al.*, 2006. Considerando el promedio del porcentaje (área visual) foliar enfermo con respecto al porcentaje total de folíolos evaluados (sanos y enfermos) en cada tercio de la planta. El muestreo fue en forma de W, = a 12 puntos dentro de la parcela, y en cada punto de muestreo se evaluaron 50 plantas, tomando un folíolo en cada tercio de las plantas, los síntomas se observaron con lupa de 40X.

**Análisis estadístico.** Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de correlación, para medir la intensidad y la forma de asociación entre variables climatológicas diarias [velocidad del viento (VV), dirección del viento (DV), precipitación (Pr), temperatura mínima (Tn), media (Tm) y máxima (Tx), y la humedad relativa (HR)] de una estación automática ubicada a 600 m del experimento. Los datos de incidencia y severidad fueron correlacionadas con los datos de inóculo aéreo, obtenidos del conteo de uredosporas en trampas. El análisis se hizo en SAS 9.00 (Statistical Analysis System, Cary North Carolina).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Identificación morfológica:** los síntomas observados fueron manchas necróticas en el haz y envés de las hojas y amarillamiento de las hojas, así como los signos observados al estereoscopio (uredias) y microscopio compuesto (uredosporas) en montajes y correspondieron a *P. pachyrhizi*. Se encontraron uredosporas ovoides, elipsoidales, levemente equinuladas algunas incoloras a color amarillo marrón; con medidas de 17.5 -37.5 x 15-25  $\mu\text{m}$ . Estas medidas fueron similares a las reportadas por Sydow y Sydow (1914) y Ono *et al.* (1992) para *P. pachyrhizi*.

**Identificación molecular.** *P. pachyrhizi* se confirmó en tejido sintomático de las muestras analizadas obtenidas a partir de la aparición de la enfermedad y en muestras analizadas al final del ciclo del cultivo. El peso molecular de las bandas amplificadas con los primers específicos fueron de *P. pachyrhizi* (Frederick *et al.*, 2002). El testigo positivo tuvo las mismas bandas y el negativo fue sin bandas.

**Detección del inóculo primario.** Trampeo aéreo de uredosporas. Las trampas a las dos alturas detectaron el arribo del inóculo primario (uredosporas) en los tres primeros muestreos (25 Septiembre al 16 de Octubre), y que fluctuó por muestreo y orientación de la trampa (se presentaran y discutirán gráficas). Correlación. Esta fue positiva con la orientación de la trampa, temperatura y viento. La densidad del inóculo aéreo trampeado del S a 85 cm de altura se correlaciono con la Tn ( $\rho = 0.99$ ), donde a medida que la Tn aumenta, la cantidad de uredosporas trampeadas del S se eleva. Por otra parte, la cantidad del inóculo aéreo trampeado del N se reduce al incrementar la Tx, y cuando la VV incrementa el inóculo aéreo trampeado del O disminuye  $\rho = -0.99$ .

**Detección del inóculo secundario.** Trampeo aéreo de uredosporas. Las trampas a las dos alturas detectaron el arribo del inóculo secundario (uredosporas) en los siguientes tres muestreos comprendidos del 23 de Octubre al 13 de Noviembre, y que fluctuó por muestreo y orientación de la trampa (se presentaran y discutirán gráficas). Correlación. Si hubo para orientación de trampas. A 85 cm de altura, las uredosporas trampeadas en el N, S, E y O aumentan al incrementarse la incidencia y severidad en el tercio superior ( $\rho = 0.99$ ), mientras que a 142 cm de altura ( $\rho = 0.97$ ) este incremento ocurrió en las trampas del O, S y N. En cuanto a la altura de las trampas, cuando aumentan las uredosporas trampeadas a 85 cm de altura en las trampas del N, S, E y O, también tienden a aumentar en las trampas orientadas S, N y O colocadas a 142 cm de altura ( $\rho = 0.94$ ); mientras que en las trampas orientadas al E aumentan únicamente cuando la cantidad de uredosporas trampeadas del S se eleva; probablemente se deba a que en los vientos del este predominen dos corrientes de aire a esas alturas. Se discutirá temperatura y viento.

**Incidencia y severidad.** La correlación fue positiva entre la severidad en cada uno de los tercios inferior, medio y superior con  $\rho = 0.94$ , lo cual indicó que a medida que la severidad incrementa en un tercio, en el tercio inmediato también incrementa la severidad, lo mismo se observó para la

incidencia. Por otra parte, la severidad y la incidencia en el tercio superior, son reducidas por el incremento de la temperatura media (se mostraran gráficas cuantitativas).

No se encontró correlación entre la densidad del inóculo primario y secundario (este último una mezcla probable con uredosporas de plantas enfermas en la parcela de estudio) con las variables de Pr, Tn, HR; sin embargo, existen datos del inóculo aéreo secundario por analizar. Se concluye que los vientos dominantes introducen el inóculo inicial (*ex-situ*) y dispersan la enfermedad dentro de la parcela donde la temperatura y la velocidad del viento juegan un papel importante en la liberación y la fluctuación de las uredosporas en el ambiente y dosel vegetal de las plantas.

### AGRADECIMIENTOS.

Al CONACYT, y al Colegio de Postgraduados.

### LITERATURA CITADA

- Cárcamo-Rodríguez, A., J. Rios, A., y J. Hernández, R. 2006. First report of asian soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* from Mexico. *Plant Dis.* 90:1260–1260.
- Choi, J. J., N. W. Alkharouf, K. T. Schneider, B. F. Matthews, and R. D. Frederick. 2008. Expression patterns in soybean resistant to *Phakopsora pachyrhizi* reveal the importance of peroxidases and lipoxygenases. *Funct. Integr. Genomics.* 8:341–359.
- Frederick, R. D., C. L. Snyder, G. L. Peterson, and M. R. Bonde. 2002. Polymerase chain reaction assays for the detection and discrimination of the soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*. *Phytopathology.* 92:217–227.
- Godoy, C. V., L. J. Koga, and M. G. Canteri. 2006. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatol. Bras.* 31:63–68.
- Schneider, R. W., C. A. Hollier, H. K. Whitam, M. E. Palm, J. M. McKemy and J. R. Hernández. 2005. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the Continental United States. *Plant Dis.* 89:774.
- Kumudini, S., C. V. Godoy, J. E. Board, J. Omielan, and M. Tollenaar. 2008. Mechanisms involved in rust-induced yield reduction. *Crop Sci.* 48:2334.
- Li, S., J. R. Smith, J. D. Ray, and R. D. Frederick. 2012. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. *Theor. Appl. Genet.* 125:133–142.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2014. Cierre de la producción agrícola por cultivo. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-lalproduccion-agricola-por-cultivo/> (visitado en Abril 9, 2015).
- Tremblay, A., P. Hosseini, S. Li, N. W. Alkharouf, and B. F. Matthews. 2013. Analysis of *Phakopsora pachyrhizi* transcript abundance in critical pathways at four time-points during infection of a susceptible soybean cultivar using deep sequencing. *BMC Genomics.* 14:614.
- Terán-Vargas, A. P., y P. García-Salazar. 2009. Control químico de la roya asiática de la soya para el ciclo primavera-verano 2009. Desplegado para productores No. MX-0-310803-47-03-14-12-08. Campo Experimental Las Huastecas. CIRNE-INIFAP. Villa Cuauhtémoc, Tam., México. 2p.
- Ono, Y., P. Buriticá, and J. F. Hennen. 1992. Delimitation of *Phakopsora*, *Physopella* and *Cerotelium* and their species on leguminosae. *Mycol. Res.* 96:825–850.
- Sydow, H., and P. Sydow. 1914. Beitrag zur kenntnis der parasitischen pilze der insel Formosa. *Annales Mycologici,* 12:105-112.

## VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Xanthomonas fragariae* Y EVALUACIÓN DE SU SEVERIDAD EN GENOTIPOS DE FRESA

Noemí **Rivera Zabala**<sup>1</sup>, Daniel L. **Ochoa Martínez**<sup>1</sup>, Reyna I. **Rojas Martínez**<sup>1</sup>, Douglas **Rodríguez Martínez**<sup>2</sup>, Sergio **Aranda Ocampo**<sup>1\*</sup>

### INTRODUCCIÓN

La mancha angular de la fresa ocasionada por *Xanthomonas fragariae* es una enfermedad de importancia económica a nivel mundial porque reduce considerablemente el rendimiento cuando ataca el cáliz, lo que repercute en la formación y calidad de frutos (Wyenandt y Nitzsche, 2013); por lo que está sujeta a cuarentena en muchos países (Koike *et al.*, 2005). En México, el cultivo de fresa es importante socioeconómicamente; siendo los principales estados productores Michoacán, Baja California, Guanajuato, Jalisco, México, Baja California Sur, Aguascalientes y Puebla. La bacteria se encuentra regulada por la NOM-007-FITO-1995 relacionada con la importación de plántulas de fresa y se considera como ausente (SENASICA, 2012). En 2014 se reportó por primera vez en el estado de Michoacán por Fernández *et al.*; actualmente no se cuentan con estudios de variabilidad genética ni de caracterización de aislamientos que permitan conocer su comportamiento en condiciones específicas del país. El análisis filogenético de los genes *hrp* y *gyrB* se ha utilizado para conocer la variabilidad de esta bacteria así como para evaluar la susceptibilidad y severidad de genotipos de fresa en programas de mejoramiento genético de esta especie. Por lo anterior, los objetivos de la presente investigación fueron estudiar la variabilidad genética de *X. fragariae* y evaluar genotipos de fresa con el fin de generar información que permita un mejor manejo de la mancha angular.

<sup>1</sup>Posgrado en Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados campus Montecillo. Km 36.5 Carretera México- Texcoco, Montecillo, Edo., de México, C.P. 56230,\*Autor para correspondencia: [saranda@colpos.mx](mailto:saranda@colpos.mx)

<sup>2</sup>Investigación Aplicada-Driscoll's México. Libramiento Sur 1620 la Luz s/n. Tabachines. C.P. Jacona. Michoacán de Ocampo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Colecta de material vegetal:** se colectó tejido foliar de plantas de fresa que mostraban lesiones acuosas (síntomas característicos de mancha angular) en los estados de Michoacán, Jalisco y Puebla, el cual se trasladó al laboratorio de Bacterias Fitopatógenas del posgrado en Fitosanidad-Fitopatología del Colegio de Posgraduados, donde fueron procesadas para aislar la bacteria.

**Aislamiento y purificación:** de las lesiones acuosas se tomó fluido y se colocó en cajas Petri con medio de cultivo Wilbrink's-agar (Koike, 1965, citado por Vandroemme *et al.*, 2008). Las cajas se incubaron a 25°C hasta observar crecimiento bacteriano y se reaisló hasta obtener colonias puras con coloración blanco sedoso y apariencia viscosa, las cuales se preservaron en caldo nutritivo + glicerol al 40% y se conservaron a -20°C.

**Pruebas de patogenicidad:** se inocularon 14 aislamientos de *X. fragariae* en plantas de fresa var. Monterrey siguiendo la metodología y escala de severidad propuesta por Maas *et al.* (2000); las plantas inoculadas se mantuvieron en cámara de crecimiento a 25-27 °C con humedad relativa de 50 a 65% y fotoperiodo de 16 horas luz. Se registró el periodo de incubación y la severidad.

**Extracción de ADN bacteriano:** se realizó a partir de colonias puras de 72 horas de crecimiento, siguiendo el protocolo de Minas *et al.*, (2011) con algunas modificaciones.

**Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):** se amplificaron segmentos de los genes *hrp* y *gyrB* con los *primers* propuestos por Roberts *et al.* (1996) y Young *et al.* (2008) que amplifican un fragmento de 537 pb y 865 pb, respectivamente.

**Análisis filogenético:** los productos amplificados fueron secuenciados en MacroGen Corea. Las secuencias obtenidas se editaron y compararon con otras secuencias de *X. fragariae* disponibles en el GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)). Se construyeron árboles filogenéticos por el método Neighbour-joining mediante el Programa MEGA 6, empleándose bootstrap con 2000 repeticiones.

**Evaluación de la severidad:** se seleccionó la cepa bacteriana con menor período de incubación obtenido en el test de patogenicidad para realizar las inoculaciones en los siguientes genotipos de fresa: Fortuna, Festival (variedades públicas), Var. 1, Var. 2, Var 3, Var 4 y Var 5 (variedades de empresa privada). Se utilizaron dos métodos de inoculación:

- **Inyección:** con una suspensión bacteriana ( $3 \times 10^8$  UFC/mL) fueron inoculadas 10 plantas de cada variedad, siguiendo la metodología de Maas *et al.* (2000). Las plantas fueron



observadas cada 24 h hasta registrar el período de incubación y posteriormente cada 4 días para evaluar la severidad (diámetro de la lesión) durante 35 días después de la inoculación.

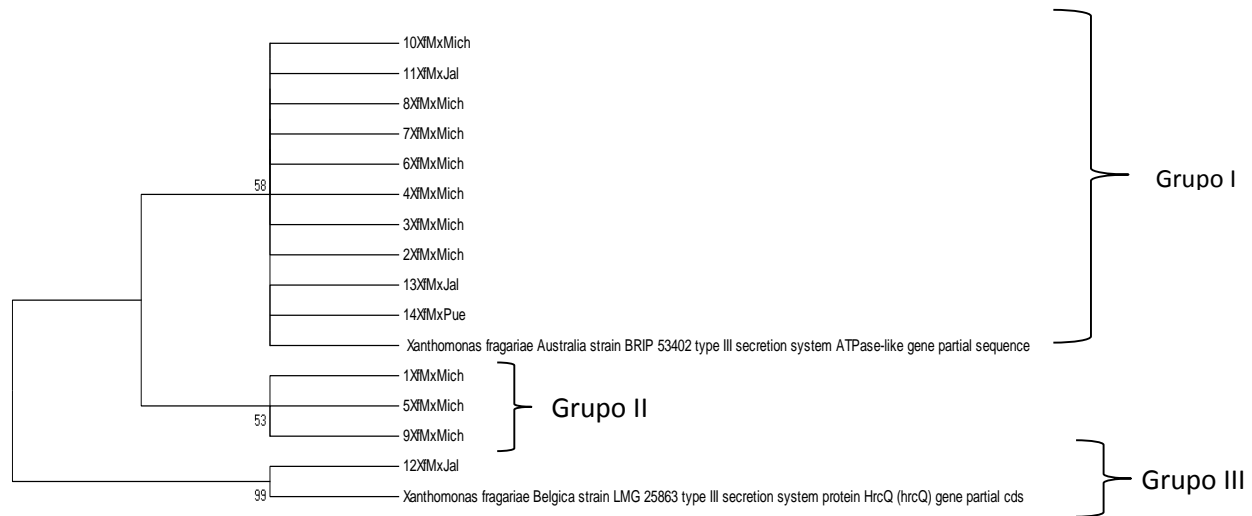
- **Aspersión:** se asperjó hasta punto de goteo una suspensión bacteriana a una concentración de  $3 \times 10^8$  UFC/mL en 10 plantas por variedad siguiendo la metodología de Bestfleisch *et al.* (2015). Se realizaron evaluaciones cada 4 días durante 35 días después de la inoculación para registrar la severidad con la escala propuesta por estos mismos autores.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

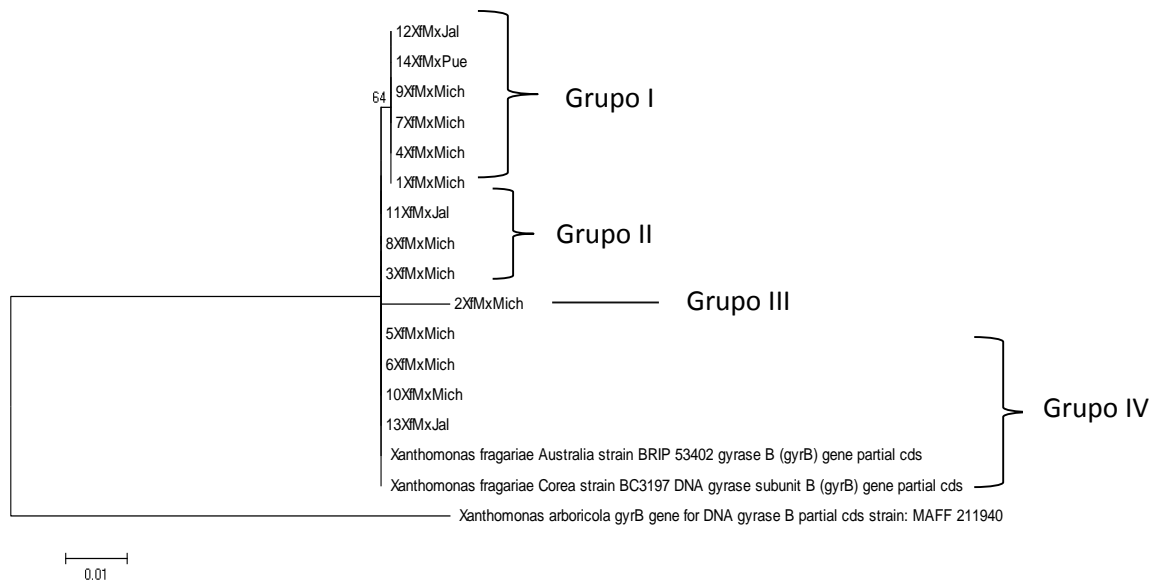
**Pruebas de patogenicidad:** se obtuvieron 10 aislamientos de *X. fragariae* del estado de Michoacán, tres de Jalisco y uno de Puebla. Todos resultaron patogénicos con diferentes periodos de incubación y diámetro de la lesión que formaron (resultados no mostrados).

**Análisis filogenético:** el análisis de las secuencias del gen *hrp* separó al aislamiento 12XfMxJal del resto, y lo agrupó con un aislamiento de Bélgica (GenBank Accession JQ387643.1). El resto de los aislamientos mexicanos se agrupó con un aislamiento de Australia (GenBank Accession HQ223085) (Fig. 1), lo que evidencia que la bacteria se ha dispersado geográficamente entre los continentes, probablemente a través de material vegetal enfermo. Es sabido que el gen *hrp* controla la capacidad de las bacterias fitopatógenas para causar enfermedad y provocar reacciones de hipersensibilidad en las plantas (Lindgren, 1997), por lo que resulta de gran importancia su estudio y análisis.

El agrupamiento filogenético de los aislamientos mexicanos generado a partir de secuencias de la región del gen *gyrB* (Fig. 2) es diferente del obtenido con el análisis del gen *hrp*, por lo que es necesario estudiar otros genes, así como mayor número de aislamientos. Stöger *et al.* (2008) estudiaron la variabilidad genética de *X. fragariae* mediante Repetitive Sequence-based PCR (rep-PCR, por sus siglas en inglés), Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC por sus siglas en inglés) y Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP por sus siglas en inglés) sin encontrar diferencias entre aislamientos, siendo este el primer estudio de las secuencias de ambos genes para *X. fragariae*. Estudios de variabilidad utilizando los genes *hrp* y *gyrB* para otras bacterias fitopatógenas, incluyendo otras especies del género *Xanthomonas* fueron consistentes y resultaron muy útiles en este tipo de investigaciones (Almeida *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2008).



**Figura 1. Árbol filogenético Neighbour-joining basado en las secuencias obtenidas de un fragmento de 537 pb del gen *hrp* de *X. fragariae*. Las distancias fueron determinadas usando el método de alineamiento de secuencias Clustal W, bootstrap 2000 repeticiones.**



**Figura 2. Árbol filogenético Neighbour-joining basado en las secuencias obtenidas de un fragmento de 865 pb del gen *gyrB* de *X. fragariae*. Las distancias fueron determinadas usando el método de alineamiento de secuencias Clustal W, bootstrap 2000 repeticiones.**

**Evaluación de la severidad.** Se encuentra en proceso de desarrollo.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgar la beca durante los estudios de maestría. Al Colegio de Postgraduados especialmente al programa de Fitosanidad-Fitopatología por fomentar mi desarrollo profesional.

## LITERATURA CITADA

- Almeida N. F., S. Yan., R. Cai., R. Clarke C., E. Morris C., W. Schaad N., L. Schuenzel E., H. Lacy G., X. Sun., B. Jones J., A. Castillo J., T. Bull C., S. Leman., S. Guttman D., C. Setubal J., and A. Vinatzer B. 2010. PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology* 100:208-215.
- Bestfleisch M, K. Richter, A. Wensing N, Wünsche J, V. Hanke M, M. Höfer, E. Schulte, and H. Flachowsky. 2015. Resistance and systemic dispersal of *Xanthomonas fragariae* in strawberry germplasm (*Fragaria L.*). *Plant Pathology* 64:71-80.
- Fernández P. S. P., G. Rodríguez A, E. Garay S, and R. Cardenas N. 2014. First report of *Xanthomonas fragariae* causing angular leaf spot on strawberry plants in Mexico. *Plant Disease notes* 98(5):682.
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2012. *Xanthomonas fragariae* Kennedy & King, 1962. Mancha angular de la hoja. Consultado en Octubre de 2015. Disponible en: <http://senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=23490&IdUrl=47115>
- Koike S.T., G. Zalom F, A. Phillips P, C. Toscano N, D. Gubler W, T. Browne G, B. Westerdahl B, A. Fennimore S, and F. Smith R. 2005. Guía para el manejo de las plagas: fresas. University of California. Publicación 3473.
- Koike H. 1965. The aluminium-cap method for testing sugarcane varieties against leaf scald disease. *Phytopathology* 55, 317-9. Citado por: Vandroemme, J., Baeyen, S., Van Vaerenbergh, J., De vos P., Maes, M. 2008. Sensitive real-time PCR detection of *Xanthomonas fragariae* in strawberry plants. *Plant Pathology* 57:438-444.
- Maas J. L, Gouin B. C., Hartung J. S, and Hokanson S. C. 2000. Sources of resistance for two differentially pathogenic strains of *Xanthomonas fragariae* in *Fragaria* genotypes. *HortScience* 35(1):128-131.
- Roberts P. D, B. Jones J, K. Chandler C, E. Stall R, and D. Berger R. 1996. Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in Florida detected by specific primers and nested polymerase chain reaction. *Plant Disease* 80:1283-1288.
- Wyenandt A, and P. Nitzsche. 2013. Angular leaf spot in fall transplanted-strawberries. Plant & Pest advisory. Rutgers, New Jersey Agricultural Experiment Station. <http://plant-pest-advisory.rutgers.edu/angular-leaf-spot-showing-up-in-fall-transplanted-strawberries/>
- Yin H., C. L. Cao., M. Xie., Q. Chen., G. Qiu., J. Zhou., L. Wu., D. Wang., and X. Liu. 2008. Bacterial diversity based on 16S rRNA and *gyrB* genes at Yinshan mine, China. *Systematic and Applied Microbiology* 31:302-311.
- Young J. M, C Park D. C, M. Shearman H, and E. Fargier. 2008. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and Applied Microbiology* 31:366-377.

## ETIOLOGÍA Y CONTROL DE LA PUDRICIÓN DEL COGOLLO DE LA PIÑA

Luis A. **Aguilar Pérez**<sup>1</sup>, Daniel **Nieto Angel**<sup>1</sup>, Daniel L. **Ochoa Martínez**<sup>1</sup>, David **Espinosa Victoria**<sup>2</sup>, Andrés **Rebolledo Martínez**<sup>3</sup>, Abel J. **Rebouças São**<sup>4</sup>

### INTRODUCCIÓN

La piña (*Ananas comosus*) pertenece a la familia de las bromeliáceas (Pegg, 2003), ocupa el tercer lugar de importancia en la producción mundial de frutos tropicales después del banano y los cítricos (Rohrbach *et al.*, 2003). México ocupa el noveno lugar en producción mundial con 701 746 toneladas (FAOSTAT, 2013), siendo los principales estados productores Veracruz, Oaxaca y Tabasco suministrando aproximadamente el 95% de la producción nacional. En la actualidad se está introduciendo el híbrido “MD-2” que tiene gran demanda a nivel internacional (Uriza *et al.*, 2005). Este material es afectado por varias enfermedades, siendo la pudrición de cogollo una de las más importantes, debido a que se presenta inmediatamente después de la siembra, durante el desarrollo del cultivo y hasta en etapa de producción o desarrollo del fruto. Esta enfermedad se caracteriza por causar una pudrición fétida en la base de las hojas, lo cual debilita y causa la muerte de las plantas, además causa altos porcentajes de mortalidad. En Costa Rica y Hawaii se reporta que esta enfermedad es causada por *Phytophthora parasitica* y *P. cinnamomi* (Rohrbach *et al.*, 2003) mientras que en Tailandia se menciona a *Pythium graminicola* como el agente causal (Pornsuriya *et al.*, 2008). En Hawaii posteriormente se encontró a *Erwinia chrysanthemi* asociado a la enfermedad (Kaneshiro *et al.*, *et al* 2008). En México se desconoce el agente causal.

Además de las enfermedades, se tiene pérdida de fertilidad, de materia orgánica y acidificación del suelo propiciado por el monocultivo, quema de residuos de cosecha, aplicación de altas dosis de fertilizantes nitrogenados y labranza excesiva del suelo. Esto contribuye a una mayor susceptibilidad del cultivo a la pudrición del cogollo con la consecuente reducción del rendimiento.

El manejo de la acidez con cal dolomítica así como la siembra e incorporación de abonos verdes antes del establecimiento del cultivo son prácticas que han mostrado una reducción de la incidencia de enfermedades con origen en el suelo (Bučienė *et al.*, 2003).

<sup>1</sup>Fitopatología, <sup>2</sup>Edafología, Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

<sup>3</sup>INIFAP, Campo Cotaxtla;

<sup>4</sup> Universidad Estatal del Sudoeste de Bahía, Brasil.

Negrete *et al.* (2004) mencionan que *Crotalaria juncea* es adecuada para ser usada como abono verde, ya que además de aportar materia orgánica, tienen capacidad de controlar algunas plagas y enfermedades (Oka, 2010). Con base en lo anterior, los objetivos del presente trabajo son: 1) Determinar el agente causal de la pudrición del cogollo y 2) Evaluar estrategias de manejo integrado del cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Aislamiento de microorganismos.** De junio a octubre de 2012 y 2013 se colectaron plantas de piña con síntomas de pudrición del cogollo consistentes en clorosis, amarillamiento, necrosis de las puntas de las hojas apicales, desprendimiento de las hojas del centro de la planta, halo necrótico localizado de 2 a 5 cm, arriba del punto de desprendimiento y olor fétido del tejido necrótico.

Se colectaron 10 plantas asintomáticas y 20 con síntomas, de estas últimas se obtuvieron fragmentos de tejido de aproximadamente 5 mm de la zona de avance de la lesión. En total se tuvieron 600 fragmentos de plantas con síntomas y 300 de las asintomáticas, los cuales se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3% por 3 min, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron con papel absorbente estéril.

Las muestras se sembraron distribuidas homogéneamente en cajas Petri con medio de cultivo PARPH, PDA, V8 y agar nutritivo. Las cajas se mantuvieron a temperatura ambiente en laboratorio y se revisaron cada 24 h para observar el crecimiento de microorganismos. Se obtuvieron oomycetos y bacterias, los cuales se aislaron por cultivo monozoospórico y por estriado, respectivamente.

**Caracterización morfológica y molecular.** Se describieron las características de 100 esporangióforos, esporangios y clamidosporas del oomyceto aislado. La identificación se hizo con las claves morfológicas de Erwin y Ribeiro (1996) y Gallegly y Hong (2008). Las bacterias aisladas se infiltraron en rodajas de papa para determinar si causaban pudrición y en hojas de tabaco para observar respuesta de hipersensibilidad. La identificación molecular, se realizó de acuerdo al método de Ahrens y Seemuller (1992).

**Inoculación y reaislamiento.** Se inocularon 10 mL de zoosporas del oomyceto aislado a tres concentraciones ( $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  zoosporas/mL) en dos sitios de la planta (en la base y en el centro del cogollo). La unidad experimental fue una planta de 30 días de trasplante y se tuvieron 10 repeticiones por cada concentración y sitio de inoculación. Se evaluó el periodo de incubación

y la incidencia de plantas con síntomas. Una vez presentes los síntomas, se aisló el microorganismo en medio de cultivo V8 y se comparó con los aislamientos obtenidos originalmente.

**Manejo integrado del cultivo.** Se evaluaron diferentes estrategias de manejo del cultivo para disminuir la incidencia de la pudrición del cogollo y aumentar la productividad, mejorando la fertilidad, pH y contenido de materia orgánica. Los tratamientos evaluados son: 1. Sin encalado, sin acolchado, Sin *C. juncea*; 2. Encalado solo; 3. Acolchado solo; 4. *C. juncea* solo; 5. Encalado + acolchado plástico; 6. Encalado + *C. juncea*; 7. Acolchado + *C. juncea*; 8. Encalado + acolchado + incorporación de *Crotalaria juncea*.

El encalado del suelo se realizó aplicando manualmente 2 ton de cal dolomita por hectárea previo al encamado; el acolchado se hizo con plástico agrícola negro calibre 90; se sembró a chorrillo *C. juncea* en surcos de 80 cm (20 kg de semilla / hectárea) y a los 138 días después de la siembra (en floración) se incorporaron las plantas con dos pases de rastra. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con arreglo en parcelas divididas.

Se plantaron hijuelos de la variedad MD2 con un peso aproximado de 220 g c/u. Al inicio del experimento se analizó la fertilidad del suelo. Las variables evaluadas son: incidencia de plantas con pudrición del cogollo; altura de la planta considerando a desde su base hasta la punta de las hojas; número de hojas por planta; peso de raíces y peso de parte aérea. Estas variables se registraron mensualmente en 10 plantas por unidad experimental, excepto el peso de plantas y raíces, que se evaluó cada 3 meses en 5 plantas. Adicionalmente se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias de hongos y la población de nematodos de la rizósfera. Se obtuvieron 10 submuestras de suelo del área de raíces de 10 plantas, para obtener una muestra compuesta de 1 kg. Este muestreo se hizo cada 3 meses.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Aislamiento de microorganismos.** *Phytophthora* sp. se presentó en mayor porcentaje en dos de los cuatro medios de cultivo utilizados. En PARPH creció en 142 (94.6%) de 150 fragmentos de tejido sembrados, en el resto crecieron hongos saprófitos no identificados; en medio V8 se aisló

en 82 fragmentos de tejido (54.6%); en PDA y agar nutritivo se obtuvieron tres bacterias con características morfológicas diferentes.

**Caracterización morfológica y molecular.** En medio de cultivo V8 el oomiceto desarrolló colonias esponjosas, de crecimiento algodonoso en forma de roseta; micelio cenocítico, en su mayoría de crecimiento aracnoide, esporangio predominantemente oval con papila muy pronunciada con 44  $\mu\text{m}$  de largo X 35  $\mu\text{m}$  de ancho, clamidosporas intercalares y terminales (28  $\mu\text{m}$  de diámetro en promedio). Las características antes indicadas coinciden con las reportadas para la especie *P. nicotianae* (= *P. parasitica*) (Waterhouse 1956; Erwin y Ribeiro, 1996; Gallegly y Hong, 2008). El producto de PCR obtenido a partir del DNA de los aislamientos obtenidos fue secuenciado y comparado con las secuencias del banco de genes teniéndose un alineamiento del 100% con *P. nicotianae*. Esta secuencia fue depositada en el banco de genes con la clave KJ562359. Las bacterias no causaron pudrición en papa ni respuesta de hipersensibilidad, por lo que se descartaron como fitopatógenas.

**Reproducción de síntomas.** Diez días después de la inoculación se observó marchitamiento y amarillamiento progresivo de las hojas en las plantas que se inocularon con el oomiceto en el cogollo a una concentración de  $1 \times 10^6$  zoosporas por mL; al inocular  $1 \times 10^5$  zoosporas por mL se observaron síntomas a los 22 días. Se hizo el reaislamiento del oomiceto el cual tuvo las mismas características morfológicas del aislado originalmente con lo cual se cumplen los postulados de Koch (Agrios, 2005).

**Manejo integrado del cultivo.** Durante los primeros tres meses de evaluación, no hubo presencia de la enfermedad en ninguno de los tratamientos debido posiblemente a que durante este periodo se presentaron temperaturas elevadas y escasez de lluvias. No hubo diferencias estadísticas significativas durante los primeros 4 meses en las variables altura, número de hojas, peso de parte aérea y peso de raíces. Durante este periodo las plantas alcanzaron en promedio una altura máxima de 84.7 cm. El mayor número de hojas observado hasta esa fecha fue de 39.5. El mayor peso de parte aérea (780 g) se obtuvo en el tratamiento Encalado+*C. juncea*. Los hongos asociados a la rizosfera fueron *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. y *Fusarium* sp. Los nematodos presentes en suelo son *Meloidogyne* sp., *Pratylenchus* sp., *Helicotylenchus* sp. y *Mesocriconema* sp.



## AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos al CONACYT por la beca otorgada.

## LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Elsevier Academic Press. New York. 922 p.
- Ahrens, U., & Seemuller, E. (1992). Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organisms polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S RNA gene. *Phytopathology*, 82: 828 -832.
- Bučienė, A., A. Šlepetienė, D. Šimanskaitė, A. Svirskienė, and B. Butkutė. 2003. Changes in soil properties under high- and lowinput cropping systems in Lithuania. *Soil Use Manage.* 19: 291-297.
- Erwin, D.C. and Ribeiro O.K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. (Chapter 5: cultural and biological control.) APS Press 592 p. St Paul, MN USA.
- FAOSTAT. 2013. Food and Agriculture Organization. (en línea): <http://faostat.fao.org> . Consultado octubre de 2013.
- Gallegly, M.E., and C.X. Hong. 2008. *Phytophthora*: Identifying Species with Morphology and DNA Fingerprints. APS Press. 158 p. ST. Paul, MN USA.
- Kaneshiro, W. S., Burger, M., Vine, B. G., de Silva, A. S., and Álvarez, A. M. 2008. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* from a bacterial heart rot of pineapple outbreak in Hawaii. *Plant Dis.* 92:1444-1450.
- Negrete, F., F. Hessen & J. Morales. 2004. Efecto de la crotalaria juncea L., en arreglos espaciales dentro del sistema yuca/maíz como práctica de manejo cultural del chinche de la viruela *Cyrtomenus bergi* Froeschner. Enero 2005. <http://www.Corpoica, Ecorregión Caribe.com>
- Oka, Y. 2010. Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments-A review. *Appl. Soil Ecol.* 44: 101-115.
- Pegg, G. K. 2003. Disease: Fungi. *In*: D.P. Bartholomew., R.E. Paull y K.G. Rohrbach (eds). The Pineapple: Botany, production and uses. pp. 11-14.
- Pornsuriya, C., Wang H.K., Lin F.C. and Soyong, K. (2008). First report of pineapple root rot caused by *Pythium graminicola* . *Journal of Agricultural Technology* 4(1):139-150.
- Rohrbach, K. G., Leal F. and Coppens, D.G. 2003. History, distribution and World production. *In*: D.P. Bartholomew., R.E. Paull, y K.G. Rohrbach (eds). The Pineapple: Botany, production and uses. pp. 1-12.
- Uriza, A. D., Rebolledo M. A. y Rebolledo M. L. 2005. Diagnostic and Perspectives of Pineapple Cropping in Mexico. *Acta Hort* 666:29-37.
- Waterhouse GM. 1956. The genus *Phytophthora*: diagnoses (or description) and figures from the original papers. Kew, Surrey: Commonw. Mycol. Inst., 12-120.

## ETIOLOGÍA, INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE MANCHAS EN HOJAS Y CÁLCICES DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) EN GUERRERO, MÉXICO

Santo A. **Ortega Acosta**<sup>1</sup>, Javier **Hernández Morales**<sup>1\*</sup>, Daniel L. **Ochoa Martínez**<sup>1</sup>, José A. **Mora Aguilera**<sup>1</sup>, Ciro **Velasco Cruz**<sup>2</sup> y Santos G. **Leyva Mir**<sup>3</sup>

### INTRODUCCIÓN

El estado de Guerrero es el principal productor nacional de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). En años recientes se detectó una enfermedad de etiología desconocida en este cultivo cuya incidencia puede ser del 100%. Los síntomas consisten en manchas en hojas y cálices, que al coalescer forman grandes lesiones de forma circular o irregular que afectan la comercialización de los cálices deshidratados debido a su mala apariencia.

En Guerrero se han reportado los siguientes hongos asociados a hojas: *Leptosphaerulina americana*, *Corynespora cassicola*, *Glomerella cingulata*, *Cercospora* sp. y *Phomopsis* sp. (Hernández-Morales *et al.*, 2008). Por su parte Martínez-Sánchez (2010) reportó a *Coniella musaiaensis*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Corynespora cassicola* y *Phomopsis* sp. asociados al manchado de cálices. A la fecha no se tienen registros del desarrollo de la enfermedad en las diferentes etapas fenológicas de la planta de jamaica, conocimiento que contribuiría al planteamiento de estrategias de manejo. Por lo anterior, los objetivos del presente estudio son: conocer al agente causal de las manchas de hojas y cálices de jamaica y evaluar su incidencia y severidad.

### MATERIALES Y MÉTODOS

**Etiología en hojas y cálices de jamaica.** En 2013 se colectaron hojas de jamaica con manchas circulares o irregulares con centro color pajizo, bordes negros y halo color púrpura, que al coalescer forman grandes áreas necróticas. También se colectaron cálices con manchas necróticas hundidas de forma circular o irregular que se originan en el ápice y se extienden a su base ocasionando un tizón. Como control se colectaron hojas y cálices asintomáticos.

<sup>1</sup>Fitosanidad- Fitopatología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

<sup>2</sup>Estadística. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados.

<sup>3</sup> Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo.

\*Autor para correspondencia: [hjavier@colpos.mx](mailto:hjavier@colpos.mx)

En todos los casos los tejidos colectados se desinfectaron con NaOCl al 1%, se transfirieron a medio de cultivo PDA y se incubaron a 25°C. El hongo obtenido se identificó con claves taxonómicas (Barnett y Hunther, 2006; Ellis, 1979) y mediante PCR utilizando los primers ITS4 e ITS5 (White *et al.*, 1990). Los productos de PCR fueron secuenciados y se obtuvo una secuencia consenso que fue comparada con la base de datos del GenBank. El hongo aislado se inoculó en hojas y cálices sanos de 15 plantas. Como control, en diez plantas sanas se asperjó agua destilada estéril. De las plantas inoculadas que mostraron manchas en hojas y cálices se reaisló el hongo de la manera antes indicada.

**Evaluación de incidencia y severidad en hojas y cálices de jamaica.** La evaluación de incidencia y severidad se realiza en diferentes localidades de Ayutla (Cotzálzin y San Miguel a 314 y 395 msnmm, respectivamente) y Tecoaapa (Tecoanatepec y Xalpatláhuac, ubicadas a 417 y 667 msnmm, respectivamente) en los ciclos 2014 y 2015.

En cada localidad se tiene una parcela de 15 surcos de 6.4 m de longitud (1 m entre surcos) y ocho plantas por surco son evaluadas. Cada planta es dividida en estrato bajo, medio y alto; la incidencia y severidad se estima en cada uno de ellos utilizando una escala logarítmica diagramática que considera el porcentaje de área afectada: a) hojas: clase 0=0%, clase 1=2.3%, 2=6.9%, 3=18.94%, 4=42.41% y 5=69.9%; b) cálices: 0=0%, 1=2.81%, 2=10.1%, 3=30.38%, 4=62.89% y 5=86.81%. Las evaluaciones en hojas se realizan cada 10 días y en cálices semanalmente hasta la cosecha. En las unidades experimentales no se aplican fungicidas y se registra la temperatura y humedad relativa con un higrómetro digital.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Etiología del manchado de hojas y cálices de jamaica.** En estas áreas sintomáticas se aisló a *Corynespora* sp., *Colletotrichum* sp., *Phomopsis* sp. y *Leptosphaerulina* sp. *Corynespora* se encontró con mayor frecuencia. En tejido asintomático se aisló a *Colletotrichum* sp. y *Phomopsis* sp. Las colonias de *Corynespora* en PDA tuvieron una coloración grisácea, conidióforos rectos a ligeramente curvos, no ramificados de color marrón olivo, conidios variables en tamaño, de 34.7-218.4 µm de largos y 7.4-17.6 µm de ancho, obclavados a cilíndricos, rectos a ligeramente curvos y de sub-hialinos a oliváceos, con dos a 13 pseudoseptos, características similares a las descritas

por Ellis (1971) para *C. cassiicola*. La secuencia consenso obtenida de los productos de PCR de los aislamientos procedentes de hojas y cálices de jamaica con síntomas fue de 504 pb y tuvo un 100% de identidad con *C. cassiicola* al compararla con la base de datos del GenBank.

Por otra parte, las plantas sanas inoculadas en invernadero con *C. cassiicola* desarrollaron síntomas en hojas y cálices similares a los observados en campo (Figura 1) mientras que las plantas inoculadas con los otros hongos y las asperjadas solamente con agua no indujeron síntomas. De las plantas inoculadas que mostraron síntomas se reaisló a *C. cassiicola*. El rango de hospedantes de *Corynespora cassiicola* es muy amplio (Dixon *et al.*, 2009) y en México se había reportado previamente asociado a jamaica (Hernández *et al.*, 2008; Martínez-Sánchez, 2010).



**Figura 1. Síntomas inducidos por *Corynespora cassiicola* en plantas sanas de jamaica inoculadas en invernadero**  
A: lesiones necróticas color pajizo con halo púrpura a 12 días después de la inoculación (ddi). B: manchas necróticas hundidas en cálices (12 ddi). C. Coalescencia de manchas necróticas (28 ddi).

**Evaluación de incidencia y severidad.** La incidencia en hojas y cálices en 2014 fue del 100%. La severidad fue variable, en hojas los mayores niveles se tuvieron a finales de octubre y posteriormente se observó un ligero decremento. En hojas la mayor severidad absoluta se registró en la localidad de San Miguel (43%) y la menor en Xalpatláhuac (16.4%). En cálices se observó un incremento gradual de la severidad y el mayor nivel se tuvo en San Miguel (66.3%) y la menor en Xalpatláhuac (12.1%) (Figura 2A y 2B). En hojas y cálices los mayores incrementos de la enfermedad se observaron en la floración y madurez de cálices (Figura 2 y 3) lo cual coincide con lo reportado por Schub (2009) quien observó que en jitomate *C. cassiicola* se asocia más frecuentemente a hojas viejas.

Los valores más altos de severidad en hojas y cálices se tuvieron en San Miguel, Cotzálzin y Tecuantepec, sitios en donde además se registraron las mayores temperaturas y humedades relativas promedio (25.7, 25.8, 25.5 °C y 85.7, 85.1 y 85.2%, respectivamente). Contrariamente, la menor severidad se observó en Xalpatláhuac, lugar donde se registró la menor temperatura y humedad relativa promedio (24.9 °C y 83.4%, respectivamente). La evaluación del ciclo 2015 se encuentra en proceso.

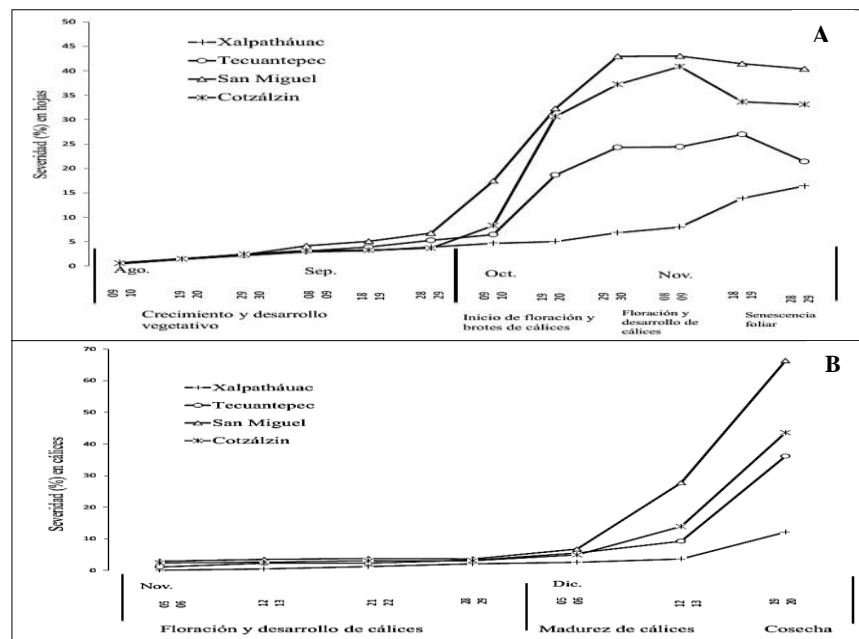


Figura 2. A) Severidad en hojas y B) cálices de jamaica inducidas por *Corynespora cassicola*, en cuatro localidades de Guerrero (Ciclo 2014).



**Figura 3. Severidad de manchas en hojas y cálices de jamaica (Ciclo 2014). A: 2.3% (agosto). B: 69.9% (noviembre). C: 2.81% (noviembre). D: 62.89% (diciembre).**

Hasta el momento los resultados sugieren que:

- *Corynespora cassiicola* es el agente causal del manchado en hojas y cálices de jamaica en Guerrero, México.
- La mayor incidencia y severidad de la enfermedad se produjo en la floración y maduración del cáliz.
- Se observó una asociación entre la severidad de la enfermedad con temperaturas superiores a 25°C y humedad relativa mayor del 85%.

### AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados, al CONACYT por la beca otorgada para realizar estudios de doctorado y al proyecto “163972” del Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT por el financiamiento de esta investigación.

### LITERATURA CITADA

- Barnett, L. H. and Hunter, B. B. 2006. Illustrated genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. Am. Phytopathology. Soc. St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.
- Dixon, L. J., Schlub, R. L., Pernezny, K., and Datnoff, L. E. 2009. Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. Phytopathology 99:1015-1027.
- Ellis, M. B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. CMI, Kew, Surrey, England. 608 pp.
- Hernández-Morales, J., Ayala-Escobar, V., y Alanís-Martínez, I. Caracterización de hongos asociados al síntoma de „ojo de gallo“ de follaje de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México. Memorias del XXXV Congreso Nacional de Fitopatología. Sociedad de Fitopatología. Monterrey Nuevo León. C-45.
- Martínez-Sánchez, C. 2010. Etiología e incidencia de hongos asociados al manchado de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero. Tesis de maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, edo. De México. 101 p.
- Schlub, R. L., L. J. Smith, L. E. Dantoff, and Pernezny, K. 2009. An overview of target spot of tomato caused by *Corynespora cassiicola*. Acta Hort 808:25-28.
- White, T. Bruns, J., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: A Guide to Methods and Applications, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds). Academic Press, San Diego, USA. pp: 315-322.



IDENTIFICACIÓN Y  
RESISTENCIA A  
ENFERMEDADES EN AVENA,  
CEBADA, MAIZ Y TRIGO





## IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE RAZAS FISIOLÓGICAS DE *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* EN VALLES ALTOS DE MÉXICO

Adriana **Zamudio Colunga**<sup>1</sup>, José S. **Sandoval Islas**<sup>1</sup>, Héctor E. **Villaseñor Mir**<sup>2</sup>, Julio **Huerta Espino**<sup>2</sup> y Eduardo **Espitia Rangel**<sup>2</sup>

### INTRODUCCIÓN

La roya del tallo (*Puccinia graminis* f. sp. *avenae*) es una enfermedad fungosa del cultivo de avena (*Avena sativa* L.), que daña cualquier parte de la planta que se encuentre sobre la superficie del suelo, desde la etapa de plántula hasta la de llenado de grano (Zilinsky, 1984). En ocasiones reduce el rendimiento hasta en 75% (Epstein *et al.*, 1988). Se controla mediante la siembra de variedades resistentes, sin embargo, se ha detectado que la mayoría de las variedades recomendadas para siembra se han vuelto susceptibles a esta enfermedad (Leyva *et al.*, 2004).

En los programas de mejoramiento genético del cultivo de avena la identificación de razas fisiológicas de *P. graminis* f. sp. *avenae* es importante, pues permite obtener variedades con mayor resistencia, conocer los mecanismos de herencia, particularmente la similitud y cuantía de genes de los genotipos hospedantes inoculados con aislamientos específicos del hongo, detectar nuevas razas potencialmente peligrosas así como nuevos genotipos hospedantes (Stewart y Roberts, 1970).

En avena es difícil lograr consenso para generar y utilizar una sola nomenclatura para identificar y designar razas fisiológicas de royas. La falta de uniformidad se debe a que distintas variedades se usan como una misma diferencial, los ambientes para identificar las razas son diferentes y los sistemas de designación de las razas también varían. La confusión aumenta cuando se designan nuevas razas que fisiológicamente pueden ser las mismas ya clasificadas (Stewart y Roberts, 1970; Chong *et al.*, 2000).

<sup>1</sup>Fitosanidad- Fitopatología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX), A. P. 10. C.P. 56230, Coatlinchan, Texcoco, estado de México. Tel: (595)9542277 Ext. 127.

Autor de correspondencia: [zamudio.adriana@colpos.mx](mailto:zamudio.adriana@colpos.mx)

Stakman *et al.* (1923) identificaron las primeras razas de roya del tallo en avena con las diferenciales Victory, White Tartar y Monarch al analizar muestras provenientes de colectas de

Estados Unidos y Canadá, en 1925, se publicó una clave analítica para formas fisiológicas en las variedades White Tartar, Richland y Joannette Strain (Bailey, 1925). Stewart y Roberts (1970) identificaron 97 razas al usar un grupo de siete diferenciales. Harder (1994) identificó 74 razas en Canadá al utilizar 10 diferenciales. Posteriormente en Estados Unidos Fetch y Jin (2007) al usar 13 genotipos con los genes Pg1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 15 y 16 y Pga, identificaron 67 razas.

Mariscal *et al.* (2011) determinaron siete genotipos como diferenciales para observar la diversidad genética del patógeno en México así como para identificar las razas fisiológicas. Para seleccionar cultivares diferenciales se considera que la planta no se afecte por la densidad de inóculo, que tengan un solo gen resistente a la virulencia del patógeno, y que presente una reacción diferencial (Roelfs y Martens, 1988).

Las áreas cultivadas con avena del norte de México, las Grandes Planicies de los Estados Unidos de América y las praderas del este de Canadá, constituyen una sola área epidemiológica relativamente estable de la roya del tallo, dominada desde 1963 por un solo fenotipo virulento del hongo, la raza NA 27 (Roelfs *et al.*, 1979). Villaseñor *et al.* (2007) mencionan que en Valles Altos de México al parecer inciden más de 10 razas distintas, que si son clasificadas pudieran ayudar a conocer la respuesta de los genotipos a estas razas y a determinar la duración en campo de las nuevas variedades. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue identificar las razas fisiológicas del hongo *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* para conocer la evolución y dispersión regional del patógeno y su uso potencial en programas de mejoramiento genético de este cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Aislamiento de *Puccinia graminis* f. sp. *avenae*.** En 2014 se colectaron 170 muestras de tallos, hojas y panículas, en los estados de Hidalgo (22), Morelos (4), Tlaxcala (46), Puebla (33), estado de México (64) y Distrito Federal (1). De cada muestra se obtuvieron las uredosporas del hongo, las cuales se almacenaron en cápsulas de gelatina a -55°C (Mariscal *et al.* 2011).

**Obtención de monostulares.** En 170 vasos de unisel con un sustrato de tierra (60%) y Peatmoss (40%) se colocaron 12 semillas de la variedad susceptible Ópalo en cada uno, se

mantuvieron en invernadero a 20 °C noche y 23 °C día. Cuatro días después de la siembra (dds) se les agregó el herbicida MH-30 (ácido maléico) (3,6- dihydrozypyridazine, 99%), en una dosis de 0.2 gL<sup>-1</sup> (Sabba *et al.*, 2009). Las uredosporas de cada muestra se suspendieron en aceite mineral Soltrol® y se inocularon en las plántulas a los 12 dds con boquillas aspersoras; una vez que el aceite se evaporó, los vasos se colocaron en cámara húmeda por 13 h de rocío y tres h de luz, posteriormente, se trasladaron al invernadero y se colocaron de manera separada en jaulas plásticas a 20 °C noche y 23 °C día. Ocho días después de la inoculación (ddi) se observaron las primeras pústulas, se dejaron solamente cuatro hojas por vaso, cada una con una pústula para evitar mezclas. Cada pústula formó un aislamiento monopustular, se colectaron con boquillas colectoras y se almacenaron en cápsulas de gelatina a -55 °C. Las uredosporas de cada pústula se incrementaron en plantas de Ópalo para obtener mayor cantidad de inóculo que sirvió para aplicarlo a las diferenciales de avena.

**Inoculación de los aislamientos en diferenciales de avena.** Para identificar las razas fisiológicas del hongo se utilizó un grupo de 31 diferenciales: Pg-1 a Pg-7, Pg-9 a Pg13, Gema, Bachiniva, Diamante, Chihuahua, Cuauhtémoc, Menonita, Karma, Obsidiana, Avemex, Turquesa, Jade, Paramo, Ópalo, S-15, S-106, S-115, S-118, S125 y S-129, las cuales se sembraron en charolas de plástico con sustrato, se realizaron 48 perforaciones con una plancha de acero y se colocaron seis semillas en cada perforación, solo en las hileras 1, 3, 5, 7 y 8 de izquierda a derecha. Las charolas se identificaron y se colocaron en un invernadero, 14 dds se inocularon con los aislamientos monopostulares y se colocaron en una cámara húmeda con 13 h de rocío y tres h de luz, después se mantuvieron en un invernadero a 23°C día y 20°C noche.

**Lectura del tipo de infección en las diferenciales.** Los tipos de infección (TI) se registraron a los 14 ddi cuando hubo pústulas, con el uso de la escala de clasificación del 0 al 4, donde 3 y 4 fueron clasificadas como plántulas susceptibles, y 0-, ;-, 1, 2, X como resistentes (Cuadro 1) (Roelfs *et al.*, 1992).

**Análisis estadístico.** Con la frecuencia de razas identificadas en las muestras se realizó un ANOVA y prueba de comparación de medias con Tukey (P=0.05) para determinar cuál (es) son las prevalentes en Valles Altos de México.

**Cuadro 1. Respuestas del hospedante, tipo de infección y descripción de los síntomas para evaluar la roya del tallo en avena (Roelfs *et al.*, 1992).**

Clase	TI	Síntomas o signos de la enfermedad
Inmune	0-	Ningún uredinio presente
Casi inmune	;-	No hay uredinios, pecas cloróticas/necróticas que indican hipersensibilidad
Muy resistente	1	Uredinios pequeños rodeados por necrosis
Moderadamente Resistente	2	Uredinios pequeños rodeados por clorosis o necrosis; puede haber isla verde rodeada por clorosis o necrosis
Heterogénesis Moderadamente Susceptible	X	Uredinios de tamaño variable distribuidos en una hoja
Susceptible	3	Uredinios medianos con cierta clorosis
Susceptible	4	Uredinios grandes sin clorosis

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los aislamientos hubo diferencias en el tipo de infección, con lecturas de ;- , 1, 2, X, 3 y 4. Las variedades Bachiniva, Diamante, Chihuahua, Karma, Turquesa y Jade presentaron un alto grado de resistencia ante la mayoría de los aislamientos con TI ;- , 1, 2 y X; mientras que Ópalo, Cuauhtémoc y Páramo fueron susceptibles al tener TI 3 y 4.

La diferencial Pg 10 en esta investigación fue susceptible a 48 aislamientos lo que corresponde a un 35% de virulencia, este dato es importante debido a que en el estudio de Harder (1999) se demostró que contiene altos grados de resistencia, lo que indica que existe variabilidad genética del hongo entre México y Estados Unidos.

Se detectaron 57 razas diferentes en los Valles Altos de México, de las cuales en el Estado de México se encontró el mayor número de razas con 41, Tlaxcala con 18, Puebla con 17, Hidalgo con 16, Morelos con 3 y D.F. con 1.

En el Cuadro 2 se presenta la fórmula de avirulencia/virulencia para las razas identificadas con mayor frecuencia, se observó que no hay virulencia para los genes *Pg 8, 10, 12, 13, 15 y 16*, se encontró virulencia en todas las localidades estudiadas para los genes *Pg 2, 3 y 4*. En este mismo cuadro se puede apreciar que la mayoría de las razas detectadas tienen virulencia para los genes *Pg 2, 3, 4 y 6*. La raza que presentó un amplio espectro de virulencia fue TNQ encontrada en 21 localidades, seguida de TNB y TPQ detectadas en 12 localidades respectivamente.

**Cuadro 2. Fórmula de avirulencia/virulencia de razas identificadas en los Valles Altos.**

Razas	Avirulencia	Virulencia	Aislamientos
TNQ	Pg 8, 10, 15,16	Pg 1,2,3,4,6,9,12,13	21
TNB	Pg 8,10, 12, 13,15, 16	Pg 1,2,3,4,6,9	12
TPQ	Pg 8,15,16	Pg 1,2,3,4,6,9,10,12,13	12
TLQ	Pg 8,9, 10,15,16	Pg 1,2,3,4,6, 12,13	10
TNG	Pg 8,10,12,15,16	Pg 1,2,3,4,6,9,13	8
KNQ	Pg 1,8,10,15,16	Pg 2,3,4,6,9,12,13	5
TLG	Pg 8,9,10,12,15,16	Pg 1,2,3,4,6,13	4

En las zonas productoras de avena existe variabilidad genética de *P. graminis* f. sp. *avenae*, al presentar diferentes tipos de infección en los aislamientos analizados, se corroboró una relación gen a gen en este patosistema.

### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme una beca para realizar mis estudios de Maestría.

### LITERATURA CITADA

- Bailey, D. L. 1925. Physiologic specialization in *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* Erikss. and Henn. Minn. United States Department of Agriculture Technical Bulletin. 35.
- Chong J., J., J. K. Leonard, and J. J. Salmerón. 2000. A North American system of nomenclature for *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. Plant Disease 84:580-585.
- Epstein, A. H., M. D. Simons, K. J. Frey, and P. G. Rothman. 1988. Field resistance of oats to *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* measured via yield and seed weight reduction. Plant Disease 72:154-156.
- Fetch J., T. G. and Y. Jin. 2007. Letter code system of nomenclature for *Puccinia graminis* f. sp. *avenae*. Plant Disease 91:763-766.
- Harder, D.E. 1994. Identification of new races of *Puccinia graminis* f. sp. *avenae*. Plant Disease 78:367-368.
- Harder, D. E. 1999. Usefulness of gene Pg10 as a source of stem rust resistance in oat breeding. Phytopathology 89:1214-1217.
- Leyva M., S. G., E. Espitia R., H. E. Villaseñor M. yJ. Huerta E. 2004. Pérdidas ocasionadas por *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* Eriks. y Henn. Causante de la roya del tallo en seis cultivares de avena (*Avena sativa* L.) en los Valles Altos de México. Revista Mexicana de Fitopatología 22: 166-171.
- Mariscal A., L. A., J. Huerta E., H. E. Villaseñor M., S. G. Leyva M., J. S. Sandoval I. y I. Benitez R. 2011. Selección de genotipos de avena para la identificación de razas de roya del tallo. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 2: 593-600.
- Roelfs, A. P., D. H. Casper, and D. L. Long. 1979. Races of *Puccinia graminis* in the United States during 1978. Plant Disease 63:748-751.
- Roelfs, A. P., and J. W. Martens. 1988. An international system of nomenclature for *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Phytopathology 78:526-533.

- Roelfs, A.P., P.R. Singh, and E. E. Saari. 1992. Las royas del trigo. CIMMYT. DF., México 81 p.
- Sabba, P. R., P. J. Holman, M. Drilias, and J. A. Bussan. 2009. Influence of maleic hydrazide on yield and sugars in potato tubers. *Am. Journal Potatoe Resesearch* 86:272-277.
- Stakman, E. C., M. N. Levine, and D. L. Bailey. 1923. Biologic forms of *Puccinia graminis* on varieties of *Avena* spp. *Journal Agricultural Research* 24:1013-1018.
- Stewart, D. M., and J. B. Roberts. 1970. Identifying races of *Puccinia graminis* f. sp. *avenae*. A modified International System. Technical Bulletin No. 1416. Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture. USA. 23 p.
- Torres P., I., M.González C., H. E. Villaseñor M., J. Huerta E., E. Villordo P., E. Espitia R., R. Guevara G. y L. Guevara O. 2007. Marcadores genéticos de resistencia a roya de tallo (*Puccinia graminis* Persoon f. sp. *avenae*) en avena (*Avena sativa* L.). *Agricultura Técnica en México* 33(3):221-230.
- Zillinsky, F. J. 1984. Guía para la Identificación de Enfermedades en Cereales de Grano Pequeño. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. El Batán, Texcoco, Edo. de México. 141 p.

## GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (Uredinales: Pucciniaceae) EN GENOTIPOS DE TRIGO HARINERO

Elizabeth **García León**<sup>1\*</sup>, Héctor E. **Villaseñor Mir**<sup>2</sup>, Julio **Huerta Espino**<sup>2</sup>, José S. **Sandoval Islas**<sup>1</sup>, Santos G. **Leyva-Mir**<sup>3</sup>, Ignacio **Benítez Riquelme**<sup>4</sup>, Serafín **Cruz Izquierdo**<sup>4</sup>

### INTRODUCCIÓN

El trigo (*Triticum aestivum* L.) es uno de los cultivos alimenticios de primera necesidad con una superficie sembrada de 225 millones de hectáreas en el mundo (FAO, 2013), en altitudes que van desde 0 hasta 3000 m (Huerta-Espino y Singh, 2000). *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (*Pgt*), patógeno causal de la roya del tallo del trigo, es un parásito biótrofo especializado con una alta variación genética para virulencia, debido a mutaciones y recombinación genética (Singh *et al.*, 2011). El mejoramiento genético aplicado al trigo ha reducido los daños por enfermedades, incrementando la productividad y el mejor uso de los insumos. Entre los futuros retos del fitomejoramiento destacan la escasez de agua para el riego, lluvias más erráticas, mayor fluctuación de las temperaturas (ondas de calor y heladas) y la gran variación de razas de roya que, en su conjunto, podrían acabar con la producción nacional (Rajaram *et al.*, 1988).

En México la roya del tallo del trigo se controló genéticamente en 1955 con el gen *Sr2*, derivado de la variedad Hope (McIntosh, 1995), gen que a la fecha es efectivo. Sin embargo, se estima que la raza TTKSK comúnmente denominada *Ug99* (Jin *et al.*, 2007, 2008) ha sido devastadora en el continente africano y podría llegar a México entre 5 y 7 años, por lo que requeriría cambiar al menos el 75 % de las variedades recomendadas actuales debido a su alta susceptibilidad (Villaseñor-Mir, 2006). La combinación de un mayor número de diferentes genes de resistencia con efectividad parcial y total, proporciona una resistencia durable y estable (Anderson, 1998). En diversos países se ha detectado germoplasma con buenos niveles de resistencia a esta enfermedad, mismo que caracterizado, se podría incorporar a las líneas élite de México.

<sup>1</sup>Fitopatología.Colegio de Postgraduados.56230.Montecillo, Estado de México. [elizabeth.garcia@colpos.mx](mailto:elizabeth.garcia@colpos.mx).

<sup>2</sup>Campo Experimental Valle de México. INIFAP. 56250. Los Reyes-Textcoco, Coatlinchán, Estado de México.

<sup>3</sup>Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo, Estado de México. <sup>4</sup>Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética. Colegio de Postgraduados.56230.Montecillo, Estado de México.



Bajo este contexto, en México se introdujo dicho germoplasma con la finalidad de identificar nuevas fuentes de resistencia para incorporarlas a variedades de trigo comerciales actuales. El objetivo de la presente investigación fue: determinar la herencia de la resistencia a la severidad del daño causado por *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* raza RTR en las progenies F<sub>3</sub> de las cruzas entre los genotipos ‘Huites’ y ‘150’ con los progenitores ‘Cacuke’, ‘Bonza 63’, ‘Romero’, ‘Apav-14’ y ‘Apav-92’.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Obtención de generaciones F<sub>1</sub>, segregantes F<sub>2</sub> y familias F<sub>3</sub>:** Los progenitores se sembraron en el vivero de cruzamientos del Campo Experimental Valle de México–INIFAP y se realizaron cruzas entre los genotipos ‘Huites’ y ‘150’ con los genotipos ‘Romero’, ‘Bonza 63’, ‘Cacuke’, ‘Apav-14’ y ‘Apav-92’, originando las cruzas ‘Huites’ X ‘Romero’, ‘Huites’ X ‘Bonza 63’, ‘Huites’ X ‘Cacuke’, ‘Huites’ X ‘Apav-14’ y ‘Huites’ X ‘Apav-92’; ‘150’ X ‘Bonza 63’ y ‘150’ X ‘Cacuke’. Se obtuvo la primera generación filial (F<sub>1</sub>). La F<sub>1</sub> se sembró en parcelas de cuatro surcos de 1.0 m de longitud, de manera espaciada en el ciclo P-V/2012 en el CEVAMEX ubicado en Chapingo, Méx. para avanzarlas a la generación F<sub>2</sub>; en cada parcela se cosecharon todas las plantas individualmente. De cada una de las cruzas se eligieron tres plantas para sembrar su semilla de manera espaciada en el ciclo O-I/12-13, en el Campo Experimental INIFAP Bajío, Gto., con el objetivo de obtener de cada planta 50 familias F<sub>3</sub>.

**Manejo experimental e inoculaciones:** En el CEVAMEX, en el ciclo P-V/2013 se sembraron entre 98 y 118 familias F<sub>3</sub> derivadas de los cruzamientos. Para lograr una alta incidencia de la enfermedad, se sembró una mezcla de genotipos susceptibles a la raza RTR en plántula y planta adulta en bordos con doble surco en la periferia y plantas entre cada parcela, las cuales actuaron como fuente dispersante de inóculo. La raza de roya del tallo usada fue RTR. La inoculación se llevó a cabo mediante aspersores manuales a los 30, 35 y 37 días después de la siembra con una suspensión de urediniosporas en aceite mineral como vehículo de dispersión.

**Registro de datos:** La primera toma de datos se realizó una vez que el progenitor susceptible de cada craza alcanzó de 90 a 100 % de infección en la hoja bandera y la segunda 7 días después. En las familias se registró el porcentaje de infección de acuerdo con la escala modificada de Cobb (Peterson, 1946). En las familias heterocigóticas identificadas por su segregación, se utilizó la misma escala y se registró el dato promedio de infección. Cada familia F<sub>3</sub> se clasificó en cuatro

grupos (Singh y Rajaram, 1994). Grupo 1: Familias homocigóticas con una respuesta similar a la del progenitor resistente; Grupo 2: Familias homocigóticas con una respuesta similar a la del progenitor susceptible; Grupo 3: Familias heterocigóticas segregantes, hasta un porcentaje intermedio; Grupo 4: familias heterocigóticas segregantes en las que se agrupan todas las categorías, de plantas tan resistentes como el progenitor resistente, intermedias y tan susceptibles como el progenitor susceptible.

**Análisis de datos y pruebas estadísticas:** Las frecuencias esperadas de las familias  $F_3$  en planta adulta es bajo el supuesto de que la resistencia es condicionada por al menos un gen de efecto aditivo y que las frecuencias de las familias homocigóticas susceptibles determinan el número de genes de resistencia. Para el análisis genético las frecuencias observadas y esperadas se compararon mediante la prueba de Ji-cuadrada ( $X^2$ ), el valor de tablas y la significancia se determinó de acuerdo a la  $X^2$  que obtuvieron las proporciones de las familias de cada cruce. Para el valor de tablas se usaron  $n-1$  grados de libertad, donde  $n$  es el número de grupos de clasificación de familias  $F_3$  (Infante y Zárate de Lara, 1998).

**Análisis molecular:** Se realizó la caracterización génica a los progenitores mediante la metodología SNP (Single Polymorphic Nucleotide) para la detección de genes en planta adulta; mediante la técnica de extracción DNA-CTAB de los Protocolos del Laboratorio de Mejoramiento Molecular del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) (<http://repository.cimmyt.org/xmlui/handle/10883/3221>).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se observó distribución discreta de clases que pudiese indicar la presencia de genes de resistencia de efectos mayores o factores de resistencia de dominancia completa; lo que se observó fue una variación continua en la expresión de la resistencia de las familias  $F_3$  típica de un tipo de herencia poligénica. Los progenitores ‘Huites’ y ‘150’ mostraron los niveles más bajos de severidad a la raza RTR de 10 y 0 % respectivamente.

**Genética de los cruzamientos con el progenitor ‘Huites’:** En el cruzamiento de ‘Apav-92’ x ‘Huites’; las proporciones de 3:105:1, resistentes, segregantes y susceptibles, respectivamente, se observa que la resistencia de ‘Huites’ en planta adulta está condicionada por dos genes de efecto aditivo, por lo que en las frecuencias observadas en planta adulta de las cruces ‘Apav-14’ x ‘Huites’

20:81:8, 'Huites' x 'Romero' de 18:77:2, 'Huites' x 'Bonza 63' de 31:66:1 y 'Huites' x 'Cacuke' de 25:73:0; resistentes, segregantes, susceptibles se confirma que el progenitor resistente 'Huites' posee dos genes de efecto aditivo, mientras que los progenitores: 'Romero', 'Bonza 63' y 'Cacuke' contribuyen con solo un gen de efecto aditivo. En la cruce de 'Huites' x 'Cacuke' se podría tener por lo menos un gen en común debido a que no se observaron familias homocigóticas susceptibles, además de que al analizar la distribución de frecuencias de los niveles de la enfermedad, las familias tienden a la resistencia, lo que evidencia la presencia de 3 genes de efecto aditivo, dos de 'Huites' y uno de 'Cacuke', además de que en el análisis génico el progenitor 'Huites' tiene el gen *Sr58* y 'Cacuke' los genes *Sr2*, *Sr57* y *Sr58*. En los cruzamientos de 'Huites' x 'Romero' y 'Huites' x 'Bonza 63' el nivel de infección de la enfermedad se relacionó con lo obtenido por Harder (1999), quien demostró que la presencia de 2 a 3 genes de efecto aditivo que contribuyen hacia mayores niveles de resistencia. De acuerdo al análisis génico de éstos progenitores se detectó la presencia del gen *Sr58* en 'Bonza 63' y el gen *Sr57* en 'Romero' cual se detectó por medio de un marcador morfológico, es decir se observó la presencia de necrosis en la punta de la hoja, lo cual coincide con los estudios por Rouse *et al.* (2014) en el que demostraron que el gen *Sr57* confiere resistencia a *Pgt*. Aunado a esto, también se detectó la presencia de un melanismo en la base de las espiguillas y en los entrenudos de los tallos mejor conocido como *Pseudo-black chaff*, marcador morfológico ligado al gen *Sr2*, el cual coincide con lo demostrado por Faris *et al.* (2008), quienes observaron altos niveles de resistencia en contra de la roya del tallo en las familias derivadas con las cruces del progenitor 'Cacuke'.

**Genética de los cruzamientos con el progenitor '150':** En el cruzamiento de '150' x 'Bonza 63', se observó que 'Bonza 63' es susceptible en campo ya que alcanzó niveles de 70 % de severidad sin embargo el progenitor '150' presentó niveles de 0 % de severidad; al analizar las familias observamos que existió una proporción de 8:81:0, con ninguna familia susceptible y con una distribución que tiende a mayor número de familias segregantes, postulando la presencia de 2 genes de efecto aditivo proveniente del progenitor '150' el cual presenta el gen *Sr58* y un gen de 'Bonza 63'; sin embargo, existen familias con niveles de severidad del 0 %, lo cual puede deberse a que tienen un gen en común o existe segregación transgresiva. En '150' x 'Cacuke' se presentan una distribución similar a '150' x 'Bonza 63', ya que tiende a la resistencia, y con solo una familia homocigótica susceptible como el progenitor susceptible, comprobando la presencia de 2 genes de '150' y uno de 'Cacuke'.

Singh *et al.* (2008) realizaron estudios en las estaciones experimentales de CIMMYT para determinar la efectividad del gen *Sr2* en la resistencia a Ug99, y postularon que éste gen tiene efecto aditivo al daño causado por *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* cuando existe la presencia de 2 o 3 genes de efecto poligénico en conjunto.

Villaseñor-Mir (2009) demostró que la presencia de más de tres genes de efecto aditivo en royas es deseable en todo programa de fitomejoramiento; para acumular más de tres genes aditivos quedaría la posibilidad de generar el entrecruzamiento o la combinación entre la variedad Huites o la 150 con otras variedades que posean cierto grado de resistencia. Además, se ha demostrado que no existen efectos negativos en el rendimiento (Huerta-Espino y Singh, 2000; Villaseñor-Mir *et al.*, 2003). Un análisis más detallado de la resistencia a la roya del tallo en poblaciones derivadas de ‘Huites’ y ‘150’ podrían proporcionar a los fitomejoradores de trigo recursos genéticos valiosos para el desarrollo de variedades con niveles deseables de resistencia a royas, incluyendo Ug99. Sin embargo, ésta resistencia debe ser evaluada y confirmada a través del uso de marcadores moleculares y a la caracterización fenotípica de las líneas obtenidas en éste estudio.

Se demostró que ‘Huites’ posee dos genes de efecto aditivo que confieren resistencia en los cruzamientos derivados de este progenitor, mientras que ‘Apav-14’, ‘Bonza 63’, ‘Romero’ y ‘Cacuke’ aportan solo 1 gen de efecto aditivo. En la genética de ‘150’ se observan 2 genes de efecto aditivo sumados al efecto de 1 gen de ‘Bonza 63’ y ‘Cacuke’.

El progenitor ‘Cacuke’ mostró mayor nivel de resistencia al tener como fondo genético a tres genes *Sr2*, *Sr57* y *Sr58* los cuales le confieren resistencia, este progenitor puede ser utilizado para posteriores estudios.

### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado para la realización de éste estudio.

Al proyecto denominado: Sistema de Mejoramiento genético para generar variedades de trigo resistentes a roya, de alto rendimiento y alta calidad para una producción sustentable en México. Numero 146788 financiado por el fondo sectorial SAGARPA-CONACYT. 2012-2017.

**LITERATURA CONSULTADA**

- Anderson J. 1998. Marker Assisted Selection of Disease Resistance Genes in Wheat. *In*: Kolhi M. (ed). International Workshop on the Application of Biotechnologies to Wheat Breeding. INIA, La Estanzuela. 215-240 p.
- FAO. 2014. Wheat Rust Disease Global Programme. Consultado en línea el 12 de diciembre de 2014 en: [www.fao.org](http://www.fao.org)
- Huerta-Espino J., y R.P. Singh. 2000. Las royas del trigo. *In*: Villaseñor-Mir, H. E. y Espitia-Rangel E. (eds.). El Trigo de Temporal en México. SAGAR, INIFAP, CIR-CENTRO CEVAMEX. México. Libro técnico Núm.1. pp: 231-251.
- Infante G., S., y G. P. Zárate de Lara. 1998. Métodos Estadísticos: Un Enfoque Interdisciplinario. 2<sup>da</sup> ed. Editorial Trillas. México, D. F. 643 p.
- Jin Y., R.P. Singh, R.W. Ward, R. Wanyera, M. Kinyua, P. Njau, T. Fetch, Z.A. Pretorius, and A. Yahyaoui. 2007. Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic *Sr* gene lines to race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Disease* 91:1096-1099.
- McIntosh, R. A., C. R. Wellings and R. F. Park. 1995. Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes. CSIRO Publications, East Melbourne, Victoria. Australia. 200 p.
- Singh, P.R., D.P., Hodson, J. Huerta-Espino, Y. Jin, S. Bhavani, N. Njau, S. Herrera-Foeseel, P.K. Singh, S. Singh, and V. Govindan. 2011. The emergence of ug99 races of the stem rust fungus is a threat to world wheat production. *Annual Review of Phytopathology*, 49: 465-481.
- Rajaram, S., R.P. Singh, and E. Torres. 1988. Current CIMMYT approaches in breeding wheat for rust resistance. *In*: Simmonds, N.W. and S. Rajaram (eds.). *Breeding Strategies for Resistance to The Rust of Wheat for Rust Resistance*. Mexico, D.F., CIMMYT. 101-118.
- Rouse, M. N., J.H. Nirmala, Y. Jin, S. Chao, T.G. Fetch, Z. Pretorius, and C. Hiebert. 2014. Characterization of Sr9h, a Ug99-resistant allele of wheat stem rust resistance gene Sr9, and coupling to Sr28 on chromosome arm 2BL. *Journal of Theoretical and Applied Genetics*. 127: 1681-1688.
- Villaseñor-Espín, O. M, J. Huerta-Espino, S. G. Leyva-Mir, H.E. Villaseñor-Mir, R. Singh, S. Sandoval-Islas y E. Espitia-Rangel. 2009. Genética de la resistencia a roya amarilla en plantas adultas de trigo harinero. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32: 217-223.

## ANÁLISIS GENÉTICO E IDENTIFICACIÓN DE REGIONES GENÓMICAS (QTLs) QUE CONDICIONAN RESISTENCIA A ROYAS EN LA VARIEDAD DE TRIGO HARINERO HUITES F95

María F. **Rodríguez García**<sup>1</sup>, Julio **Huerta Espino**<sup>1</sup>, Lan **Caixia**<sup>1</sup>, Reyna I. **Rojas Martínez**<sup>1</sup>, Héctor E. **Villaseñor Mir**<sup>2</sup>, Emma **Zavaleta Mejía**<sup>1</sup>, Sergio **Sandoval Islas**<sup>1</sup>, José F. **Crossa Hiriart**<sup>3</sup>

### INTRODUCCIÓN

La roya de la hoja (LR) y roya amarilla (YR), causadas por *Puccinia triticina* y *P. striiformis* respectivamente, son enfermedades foliares importantes de trigo (*Triticum aestivum*) en el mundo; debido a que puede vencer la resistencia específica de variedades nuevas, por la evolución hacia nuevos biotipos o razas fisiológicas del patógeno y porque se reproducen rápidamente y pueden moverse a distancias muy grandes (Singh *et al.*, 2011). La estrategia que más ha apoyado el control de esta enfermedad, es el uso de la resistencia genética que se basa en utilizar variedades resistentes, requiriéndose así constantemente fuentes de resistencia para este cereal; por lo cual, una alternativa para lograr mayor durabilidad, es generar variedades que posean resistencia durable (poligénica, multigénica, horizontal o cuantitativa) basada en genes que confieren resistencia de patogenia lenta (*slow rusting*) (Singh *et al.*, 2001). En el caso de la roya amarilla se deben combinar de 4 a 5 genes de efecto aditivo para reducir el progreso de la enfermedad a niveles tan bajos que sólo se puedan observar porcentajes de severidad mínimos. Hasta la fecha se han catalogado 67 genes que confieren resistencia para YR y 74 para LR (McIntosh *et al.*, 2013); y de estos *Lr34 / Yr18 / Pm38 / Sr57* (Singh *et al.*, 2012), *Lr46 / Yr29 / Pm39 / Sr58* (Singh *et al.*, 2013), y *Lr67 / Yr46 / Pm46 / Sr55* (Herrera-Foessel *et al.*, 2014). Los genes *Lr68* (Herrera-Foessel *et al.*, 2012) tienen efectos pleiotrópicos y confieren resistencia en planta adulta (APR) a las royas de la hoja, amarilla, del tallo y cenicilla polvorienta.

<sup>1</sup> Fitosanidad- Fitopatología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de México. Coatlinchán Texcoco Edo. de Méx.

<sup>1</sup> Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. El Batán Texcoco Edo. de Méx

Autor de correspondencia: [florenciarg@colpos.mx](mailto:florenciarg@colpos.mx).

Huites F95 desde su liberación como variedad ha mostrado resistencia a roya amarilla y de la hoja en años y ambientes por lo cual, el objetivo del presente trabajo es determinar e identificar loci de carácter cuantitativo (QTLs) que confieren resistencia a LR y YR a la variedad de trigo harinero Huites F95.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal:** el germoplasma utilizado como progenitor susceptible fue “Avocet-YrA” que cruzado con el progenitor resistente “Huites F95” derivó una población de 139 líneas endogámicas recombinantes (RILs). El avance generacional de plantas F<sub>2</sub> a F<sub>5</sub> se realizó por el método masal con selección y en la F<sub>4</sub> se derivaron familias F<sub>5</sub>. Los padres y RILs se multiplicaron y la semilla se utilizó para todos los ensayos.

**Experimentos en campo:** los padres y los RILs de “Avocet/Huites F95” se evaluaron para LR en cuatro ambientes (Valle de Yaqui Cd. Obregón Son. 2012-2013, 2013-2014 y 2014-2015; El Batán Texcoco en 2014). YR se evaluó en Toluca, México en los ciclos 2013, 2014 y 2015, y en El Batán, Texcoco, estado de México en 2015. Las parcelas de campo fueron de aproximadamente 70 plantas que incluyeron dos filas paralelas de 0.7 m. una mezcla de genotipos susceptibles a YR y LR se sembró a un lado de cada parcela y alrededor de la zona experimental. Se crearon epidemias artificiales utilizando una mezcla de las razas de *P. triticina* MCJ/SP y MBJ/SP, y para YR una mezcla de las razas MEX96.11 y MEX08.13. Las inoculaciones se realizaron mediante suspensión de urediniosporas en aceite Sotrol usando un atomizador manual. La severidad de la enfermedad se registró de acuerdo con la escala de Cobb modificada (Peterson *et al.*, 1948) y la respuesta del hospedante a la infección se determinó de acuerdo con Roelfs *et al.* (1992).

**Análisis genético y estadístico:** los experimentos en campo tanto de YR como LR presentaron una sola repetición. Las 139 RILs se clasificaron en tres categorías fenotípicas con base en la severidad de la enfermedad y respuesta a la infección, de acuerdo a Singh y Rajaram (1992): homocigotos parentales tipo resistente (HPTR), homocigotos parentales tipo susceptible (HPTS), y las líneas cuyas respuestas fueron diferentes de las de los dos padres (OTROS). Las estimaciones del número de genes para LR y YR se realizaron mediante el análisis de segregación mendeliana tradicional chi-cuadrada ( $X^2$ ).



**Marcadores moleculares, construcción de mapas de ligamientos y análisis de QTLs:** la extracción de ADN de los padres y de cada uno de las RILs se hizo utilizando el método CTAB (CIMMYT, 2005). El genotipo de la población se realizó con los marcadores DARtS (Diversity Arrays Technology) y SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (Triticarte, Australia) y posteriormente se probaron en la población 50 SSR para identificar posibles regiones genómicas de interés. Los mapas de ligamientos se generaron con JoinMap 4.1, el análisis de QTLs se realizara con el programa QTL IciMapping 4.0 y los mapas de QTL se visualizaran con MapChart 2.3.

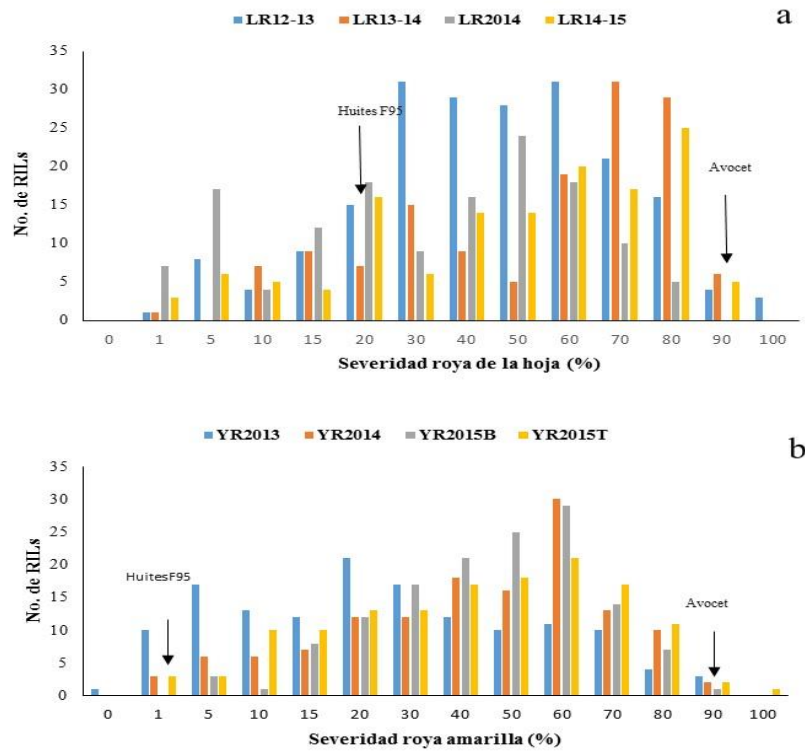
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Análisis genético:** las variables temperatura y humedad favorecieron el desarrollo de la enfermedad en todos los ciclos estudiados, lo que permitió realizar la evaluación y clasificación de las familias Avocet/Huites F95. Al analizar el comportamiento de las familias respecto a los niveles de infección y al clasificarlas en HPTR, HPTS y OTROS, no se observó una distribución discreta de clases que pudiese indicar la presencia de genes de resistencia de efectos mayores; lo que se observó, fue una variación continua o distribución normal que indica que la resistencia en la variedad Huites F95 se debe a varios genes o cuantitativa (Figura 1), esto coincide con los reportes de otros estudios en términos de distribución fenotípica en poblaciones con resistencia lenta a la enfermedad (Singh *et al.*, 2012) . Por otra parte con base a las frecuencias esperadas y observadas mediante la prueba de  $\chi^2$  se determinó que de 4 a 5 genes de efectos aditivos controlan la resistencia a roya de amarilla y de 2 a 3 genes controlan la resistencia a roya de la hoja (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Estimación del número de genes de resistencia en planta adulta a roya de la hoja y roya amarilla basados en el análisis de segregación Mendeliana para la población F<sub>5</sub> Avocet/Huites F95.**

Categoría	No. de RILs (planta adulta)							
	LR12-13	LR13-14	LR2014	LR14-15	YR2013	YR2014	YR2015T	YR2015B
HPTS	33	5	7	16	11	1	4	2
HPTR	17	16	6	11	8	2	3	1
Otros	89	115	125	110	120	130	131	134
Error	0	3	1	2	0	6	2	3
Total	139	139	139	139	139	139	139	139
No. genes	2	3	3	3	4	4	4	4
P valor <sup>a</sup>	.08	.06	.07	.38	.01	.07	.55	.06

<sup>a</sup> P- valor es para la prueba de  $\chi^2$ . La relación esperada para los grupos de RILs: HPTS, HPTR, y Otros son 0.191:0.191:0.618, 0.084:0.084:0.832 y 0.037:0.037:0.926 para la segregación de 2, 3 y 4 genes que se heredan de forma independiente en la generación F<sub>5</sub>.



**Figura 1. Frecuencia y distribución fenotípica de la 139 líneas endogámicas recombinante (RILs) de la población Avocet × Huites F95 evaluada en cuatro ambientes a) lectura final de LR b) lectura final de YR.**

**Análisis molecular:** con la información obtenida del genotipo se procedió a realizar un análisis preliminar para identificar las posibles regiones genómicas de interés, se tomaron en cuenta para el análisis 678 marcadores DArTs y 3400 SNP, posteriormente se probaron en la población 50 Simple Secuencias Repetidas (SSR). Para identificar la presencia del gen *Lr46* se probó en la población un CAPs (Secuencia polimórfica amplificada y corta). Con la información de los marcadores DArTs, SNP, SSR y CAPs se generaron 67 grupos de ligamientos y posteriormente conjuntando la información fenotípica (% de severidad de YR y LR) y con el apoyo del programa QTL IciMapping 4.0 se buscaran los diversos QTLs que le condicionan resistencia a roya de la hoja y amarilla a la variedad de trigo Huites F95.

### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

Al proyecto No. 146788 financiado por el fondo SAGARPA-CONACYT.

**LITERATURA CITADA**

- CIMMYT, 2005. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Third Edition. Mexico, D.F. 81 p.
- Herrera-Foessel, S. A., R. P. Singh., J. Huerta-Espino., G. M. Rosewarne., S.K. Periyannan., L. Viccars., V. Calvo-Salazar., C.X. Lan., and E.S. Lagudah. 2012. *Lr68*: a new gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat. *Theor Appl Genet.* 124:1475-1486.
- Herrera-Foessel, S. A., R. P. Singh., M. Lillemo., J. Huerta-Espino., S. Bhavani., S. Singh., C. Lan., V. Calvo-Salazar., and E. S. Lagudah. 2014. *Lr67/Yr46* confers adult plant resistance to stem rust and powdery mildew in wheat. *Theor Appl Genet.* 127:781-789.
- McIntosh, R. A., Y. Yamazaki., J. Dubcovsky., W. Rogers., C. Morris., R. Appels., and X. Xia. 2013. Catal. of gene symbols for wheat. <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/>.
- Peterson, R. F., A. B. Campbell, and A. E. Hannah. 1948. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stem of cereals. *Can. J. Res. Sect. 26c* (5):496-500.
- Roelfs, A. P., R. P. Singh., y E. E. Saari. 1992. Las Royas del Trigo: Conceptos y métodos para el manejo de esas enfermedades México, D. F. CIMMYT. 81 p.
- Singh, R. P., J. Huerta-Espino., S. Bhavani., S. A. Herrera-Foessel., D. Singh., G. Velu., R. E. Mason., Y. Jin and J. Crossa. 2011. Race non-specific resistance to rust diseases in CIMMYT spring wheats. *Euphytica.* 179:175-186.
- Singh, R.P., S. A. Herrera-Foessel., J. Huerta-Espino., H. Bariana., U. Bansal., B. McCallum., C. Hiebert., S. Bhavani., S. C. Lan., and E. Lagudah. 2012. *Lr34/Yr18/Sr57/Pm38/Bdv1/Ltn1* confers slow rusting, adult plant resistance to stem rust. *In: Proceedings of the 13th international cereal rusts and powdery mildews conference.* Beijing, China. pp. 173.
- Singh, R. P., S. A. Herrera-Foessel., J. Huerta-Espino., C. X. Lan., B. R. Basnet., S. Bhavani., and E. S. Lagudah. 2013. Pleiotropic gene *Lr46/Yr29/Pm39/Ltn2* confers slow rusting, adult plant resistance to wheat stem rust fungus. *In: Proceedings BGRI, 2013 technical workshop, New Delhi, India.* pp: 17.1.
- Singh, R. P., J. Huerta-Espino., and H. M. William. 2001. Resistencia durable a roya de la hoja y roya amarilla del trigo. *In: Estrategias y metodologías utilizadas en el mejoramiento de trigo un enfoque multidisciplinario.* La Estanzuela, Uruguay. 109-117.

## FUENTES DE RESISTENCIA A LA ROÑA DE LA ESPIGA Y PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS EN LÍNEAS AVANZADAS DE CEBADA MALTERA

Mirna **Bobadilla Meléndez**<sup>1</sup>, Ana M. **Hernández-Anguiano**<sup>1\*</sup>, Mauro R. **Zamora Díaz**<sup>2</sup>,  
Pawan **Kumar Singh**<sup>3</sup>, Mónica **Mezzalama**<sup>3</sup>, Sergio **Sandoval Islas**<sup>1</sup>, Mateo **Vargas Hernández**<sup>4</sup>

### INTRODUCCIÓN

La producción de cebada (*Hordeum vulgare* L.) se ve afectada por diversos patógenos entre los que destaca *Fusarium*, agente causal de la fusariosis o roña de la espiga. La fusariosis afecta la producción por la disminución del rendimiento, peso y calidad del grano y semilla lo que repercute en el sector agropecuario, alimenticio e industrial por las pérdidas económicas que se registran (9, 7). En los últimos años la incidencia de esta enfermedad se ha incrementado, en cebada se presenta durante la antesis y maduración del grano cuando las condiciones de temperatura son cálidas y la humedad relativa es alta (1, 3). Debido a que algunas especies de *Fusarium* producen diversas micotoxinas las cuales dañan la salud de animales y personas que consumen granos o productos de cebada contaminados, entre las medidas de control de la fusariosis se encuentra el uso de variedades resistentes (1, 6). Esto para disminuir la incidencia del hongo en el grano pues un porcentaje alto de la producción se destinada a la industria maltera. Cabe destacar que la mayor parte de la superficie sembrada en México se establece con variedades generadas por el Programa Nacional de Mejoramiento de Cebada del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y que las investigaciones que se han desarrollado sobre la resistencia a la fusariosis y producción de micotoxinas son pocas por lo que el objetivo de este trabajo es identificar fuentes de resistencia a la fusariosis y producción de micotoxinas, en líneas avanzadas de cebada maltera del INIFAP.

<sup>1</sup>Fitopatología-Colegio de Postgraduados-Montecillo; <sup>2</sup>INIFAP –CEVAMEX; <sup>3</sup>CIMMYT-El Batán; <sup>4</sup>Universidad Autónoma Chapingo

\*Autor de correspondencia: [ahernandez@colpos.mx](mailto:ahernandez@colpos.mx)

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Evaluación de incidencia y severidad en campo.** Se establecieron módulos en un diseño experimental de cuadro latino, en Almoloya, Hidalgo; Cuyoaco, Puebla; Nanacamilpa, Tlaxcala; y Santa Lucía, Texcoco, Edo. de México. La incidencia y severidad se evaluaron en 131 líneas avanzadas del INIFAP con infección natural de la fusariosis, durante el ciclo primavera-verano 2014 en condiciones de temporal. Las líneas se organizaron en ensayos denominados: 01, 02, 03 y élite en base al ciclo de selección. Para la severidad se usó una escala de 1 a 9 donde: 1 < 5%, 2=5–17%, 3=18–30%, 4=31–43%, 5=44–56%, 6=57–69%, 7=70–82%, 8=83–95% y 9 > 95% (2). Después de la cosecha la semilla se almacenó a 4°C.

**Detección y aislamiento de especies de *Fusarium*.** Se estableció la prueba de papel secante-congelación con semilla del ensayo elite para detectar y aislar especies de *Fusarium* asociadas a cada una de las 16 líneas que conforman este ensayo para pruebas futuras de patogenicidad en campo e invernadero. Se tomó una submuestra de 240 semillas dividida en tres repeticiones de 80 semillas cada una. La semilla se desinfectó con hipoclorito de sodio al 5% por 1 min en agitación y enjuagó con agua destilada estéril. La semilla se colocó en cajas con tapa sobre papel filtro y sanitas humedecidas con agua destilada estéril. Las cajas se mantuvieron a temperatura ambiente por 48 h, después a -20°C por otras 48 h y finalmente a temperatura ambiente por siete días. Las colonias fúngicas desarrolladas en la semilla se observaron bajo lupa, microscopio compuesto (Olympus, modelo CHK) y estereoscópico (Velab, modelo VE-S4). Para la identificación se utilizó el Manual de Laboratorio del CIMMYT (8), y el Manual The *Fusarium* Laboratory Manual (4) considerando: color y textura de colonia, forma y longitud de conidióforos, forma, color y septación de conidios, y presencia de estructuras fructíferas. Se estimó el porcentaje de incidencia de hongos.

De las colonias de *Fusarium* se tomaron muestras para la preparación de cultivos monosporicos. Previamente se verificó la esporulación y producción de macro y microconidios característicos en portaobjeto sobre una gota de agua. Solo aquellas colonias con estructuras típicas se seleccionaron para preparar cultivos a partir de un conidio en agua agar. Después de 24 h se tomó un trozo de la colonia desarrollada y se depositó en PDA sobre una hoja de clavel para incrementar la esporulación del hongo.

**Determinación de resistencia y/o susceptibilidad en invernadero.** Se establecieron dos lotes con semilla de 131 líneas de cebada maltera de ciclos de selección 01, 02, 02A, 03 y Elite. Un lote se estableció el 19 de febrero de 2015 (Fecha 1); y el otro, el 26 de febrero de 2015 (Fecha 2). Estos lotes se establecieron en macetas de plástico de 25x25 con sustrato peat moss, con 10 semillas por maceta y fertilización (100- 40 – 20) con triple 17. En la etapa de grano lechoso las plantas se inocularon por aspersión con una suspensión de conidios de *Fusarium graminearum*, de una cepa del Laboratorio de Fitopatología del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Después de la inoculación, las espigas se cubrieron con bolsa de plástico transparente por 48 h y a los 16 días después de la inoculación se evaluó la incidencia y severidad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Incidencia y severidad de la fusariosis en campo.** Aunque no se encontraron diferencias ( $\alpha=0.05$ ), las líneas de los ensayos 01, 02 y 03, de menor ciclo de selección, presentaron índices de severidad bajos respecto al de las líneas élite, de mayor ciclo de selección (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Incidencia y severidad en líneas de cebada registradas por localidad.**

Línea ciclo de selección	No. de líneas	Promedio incidencia/severidad			
		Santa Lucía	Cuyoaco	Almoloya	Nanacamilpa
01	25	25/1	23/1	22/1	21/1
02	60	59/1	56/1	54/1	50/1
03	30	30/1-3	22/1	26/1	19/1-2
Elite	16	16/1-3	16/1-2	12/1	14/1-2

**Cuadro 2. Promedio anual de las condiciones climáticas en las localidades de estudio.\***

Localidad	Estado	Precipitación mm	Humedad relativa %	Temperatura °C
Almoloya	Hidalgo	500-550	60-80	11
Cuyoaco	Puebla	550-600	60-80	12
Nanacamilpa	Tlaxcala	500-550	60-80	13
Santa Lucía	Edo. de México	550-600	60-80	15

\* Red de estaciones agroclimáticas del INIFAP

En Santa Lucía las líneas élite registraron la mayor incidencia y severidad de la enfermedad resultado que se correlacionó con la mayor precipitación (550-600) y temperatura (15 °C) registrada en la localidad (Cuadro 2). Chrpová, Šíp *et al.* (2011) indican que las condiciones ambientales prevalecientes durante el desarrollo del cultivo tiene un efecto en la incidencia de la

roña de la espiga, mientras que la expresión de la severidad está influenciada por la resistencia de cada material.

**Especies de *Fusarium* asociadas a la semilla.** Se detectaron siete especies de *Fusarium* *F. equiseti*, *F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. dimerum*, *F. sambucinum*, *F. oxysporum* y una especie sin identificar. De *F. equiseti* se aislaron 17 cepas que se caracterizaron por presentar macroconidios de 47 µm de largo x 5 µm de ancho, con 4 a 7 septos, con célula apical alargada y con una célula pie desarrollada, con clamidosporas solitarias, agrupadas o en par, inicialmente las colonias fueron blancas y con el tiempo se tornaron café-naranja. De *F. avenaceum* se aislaron 11 cepas caracterizadas por presentar macroconidios de 52 µm de largo x 4 µm de ancho, célula apical curva-puntiaguda con la célula pie desarrollada, sin clamidosporas, colonias inicialmente blancas y después café. De *F. graminearum* se aislaron 5 cepas que presentaron macroconidios de 40 µm de largo x 4 µm ancho con célula apical curva puntiaguda y célula pie bien desarrollada, clamidosporas en cadena, agrupadas o aisladas, colonia blanco-café. Se ha reportado a *F. graminearum* como la principal especie relacionada con la fusariosis, en este estudio las especies que se encontraron con mayor frecuencia fueron *F. equiseti* y *F. avenaceum*. Logrieco, *et al* (2002) mencionan que tanto *F. graminearum* como *F. equiseti* producen toxinas del grupo de los tricotecenos (Zerealenonas, Deoxinivalenol y Nivalenol).

**Incidencia y severidad de la fusariosis en invernadero.** Aunque todas las líneas registraron incidencia la severidad de la enfermedad fue en general baja en ambas fechas (fecha 1 y fecha 2) de siembra. El promedio de severidad registrado por fecha fue: líneas ensayo 01, 2-3; líneas ensayo 02, 1-1; líneas ensayo 02A, 2-1; líneas ensayo 03, 3-1; y líneas ensayo elite, 2-3, respectivamente. Aunque es posible que las condiciones ambientales del invernadero hayan influido en la baja severidad de la fusariosis los valores registrados son similares a los registrados en campo.

## AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada a la primera autora.

## LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. 5th Edition. Elsevier Academic Press Publications. 922 p.  
Chrpová, J., V. Šíp, L. Štočková, L. Stemberková and L. Tvarůžek. 2011. Resistance to Fusarium Head Blight in Spring Barley. Czech J. Genet. Plant Breed. 47(2): 58–63.



- Gilchrist-Saavedra, L. I. 2000. Problemas Fitosanitarios de los Cereales de Grano Pequeño en los Valles Altos de México. Sociedad Mexicana de Fitopatología. Conferencias Magistrales. 18(2):132-137.
- Leslie, J. F. and Brett A. Summerell. 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing. 387 p.
- Logrieco, A., G. Mulè, A. Moretti and A. Bottalico. 2002. Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. European Journal of Plant Pathology. 108: 597–609.
- Méndez-Albores, A. y E. Moreno-Martínez. 2009. Las micotoxinas: contaminantes naturales de los alimentos. Revista Ciencia. Academia Mexicana de Ciencias. 60(3): 1- 7.
- Velázquez, P.D.y A.N Formento. 2012. Efecto de la fusariosis de la espiga (*Fusarium graminearum* y *Fusarium* spp.) sobre dos genotipos. Resumen XIV Jornadas Fitosanitarias Argentinas.
- Warham, E.J., L.D. Butler y R.C. Sutton. s/a. Ensayos para la semilla de maíz y de trigo. Manual de laboratorio. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). 84 p.
- Zamora, D. M., S. Solano H., R. Gómez M., I. Rojas M., J. Ireta M., R. Garza G. y C. Ortiz T. 2008. Adabella: variedad de cebada maltera para Valles Altos de la Mesa Central de México. Agricultura Técnica en México. 34(4): 491-493.

## HERENCIA DE LA RESISTENCIA A *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (USTILAGINALES: USTILAGINACEAE) EN MAÍZ

Guillermo **Márquez Licona**<sup>1</sup>, Carlos **De León**<sup>1</sup>, Fernando **Castillo González**<sup>1</sup>, Santos G. **Leyva Mir**<sup>2</sup>, Mateo **Hernández Vargas**<sup>2</sup>, Marco A. **Hernández Bello**<sup>3</sup>

### INTRODUCCIÓN

El agente causal del carbón de la espiga del maíz es *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kühn) (Martinez *et al.*, 2001). El síntoma principal de la enfermedad es la producción de soros negros llenos de teliosporas que reemplazan total o parcialmente a la mazorca y/o panoja (Xu *et al.*, 1999). La infección inicia en la raíz, razón por la cual en etapas tempranas de la infección hay una proliferación de hifas alrededor de ésta (Martinez *et al.*, 2001). El hongo puede infectar a las plantas en emergencia o en la etapa de plántula, por medio de teliosporas presentes en el suelo. Una vez dentro de la plántula, el hongo crece sistémicamente con el meristemo (Xu *et al.*, 1999). El carbón de la espiga del maíz es una enfermedad importante en áreas templadas en donde el maíz se cultiva a nivel mundial (Wang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2008). Se han documentado pérdidas importantes por esta enfermedad de hasta 30 al 50 % (Kruger, 1962; Simpson, 1966) y en algunos casos se han reportado pérdidas de hasta el 80% (Tusa *et al.*, 1981). En México, *S. reilianum* causa daños económicos importantes en regiones productoras de maíz en los Valles Altos y la problemática se ha extendido afectando otras áreas del altiplano mexicano (Ramírez *et al.*, 2011). Anteriormente, la principal estrategia de manejo de la enfermedad fue el control químico a través de la incorporación de diferentes fungicidas a la semilla, sin embargo, actualmente la resistencia genética a la enfermedad es la medida más viable para el manejo de la enfermedad (Li *et al.* 2008). Es por lo anterior que el presente trabajo se planteó con el objetivo de determinar la base genética de la resistencia a *S. reilianum* f. sp. *zeae* en germoplasma de maíz con endospermo blanco. Esto coadyuvará al desarrollo de estrategias de mejoramiento genético más efectivas para la incorporación de la resistencia genética en materiales comerciales susceptibles.

<sup>1</sup> Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco 56230, Estado de México.

<sup>2</sup> Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, Texcoco, C.P. 56230. Estado de México.

<sup>3</sup> Sakata Seed America, Inc. 18095 Serene Dr. • Morgan Hill, CA 95037.

Autor de correspondencia: [marquez.guillermo@colpos.mx](mailto:marquez.guillermo@colpos.mx)

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se partió de 60 líneas S2 procedentes de una población de maíz de endospermo blanco, con amplia base genética, derivadas de un programa de selección y mejoramiento para *S. reilianum* f. sp. *zeae* en los estados de México e Hidalgo. En el verano de 2013, 160 líneas S3 de endospermo blanco se generaron en un vivero de selección y mejoramiento que se estableció en el Municipio de Valle de Bravo, Méx. En el invierno de 2014 se recolectaron panojas y mazorcas de plantas de maíz infectadas con *S. reilianum* f. sp. *zeae*, en un lote comercial de maíz del híbrido Cardenal (Asgrow®) localizado en el Municipio de Tenango del Valle, Méx. La viabilidad del inóculo se verificó previo a la inoculación de la semilla. De cada línea S3 se inocularon 22 semillas (Quezada *et al.*, 2013). Se usaron como testigos semillas de maíz de los híbridos AS1503® (Aspros), Az 41801® (Azteca), Dekalb 2061® (DeKalb) y Euros® (Unisem) todos de endospermo blanco y susceptibles al carbón de la espiga.

La respuesta a la infección a *S. reilianum* f. sp. *zeae* de las líneas S3 se llevó a cabo en un predio del Ejido Cinta Larga, Mixquiahuala, Hgo. La respuesta a la infección de las líneas S3 se registró en la etapa de floración por observación visual de los síntomas del carbón tanto en la mazorca como en la panoja de las plantas de cada línea. Se seleccionaron las 10 líneas S3 con grano de endospermo blanco, contrastantes para el carácter resistencia al carbón de la espiga del maíz (5 tolerantes y 5 susceptibles), las cuales sembraron en un terreno localizado en el campo experimental del INIFAP Zacatepec, Mor., con el propósito de generar todas las combinaciones posibles requeridas en el diseño de apareamiento dialélico Tipo Griffing Modelo I.

En el ciclo de siembra de invierno, se realizarán los cruzamientos para constituir un dialelo, en el cual se incluirán todos los cruzamientos directos posibles (RxR, RxS y SxS). Los 10 progenitores y los 45 híbridos resultantes de endospermo blanco conformarán un total de 55 entradas del diseño de apareamiento dialélico. En el ciclo de siembra 2016 primavera-verano se obtendrá la F2 y en el ciclo 2016 otoño-invierno se evaluará la F1, F2 y progenitores en dos localidades, Toluca y Valle de Bravo, Méx. La siembra en campo se realizará agrupando por generaciones (progenitores y cruza) y aleatorizándolas independientemente, utilizando un diseño experimental de parcelas divididas con tres repeticiones. Las parcelas mayores incluirán los diferentes materiales generados (progenitores y cruza) y las parcelas menores las progenies resultantes del cruzamiento directo.

La unidad experimental consistirá de un surco de 3 m separados 80 cm, sembrando 11 sitios separados a 50 cm entre ellas, dejando 2 plantas/sitio después del raleo, para establecer un equivalente a 50 000 plantas/ha. La semilla se inoculará (Quezada *et al.*, 2013) para evaluar la respuesta de las plantas a la enfermedad.

Los datos del dialélico se analizarán siguiendo el método propuesto por Hallauer y Miranda (1981) que combina distintas ventajas de análisis de dialélicos del modelo Gardner y Eberhart (1966) con los de Griffing (1956). Por tratarse de un Modelo I o fijo, ya que las líneas se seleccionarán por su reacción particular de resistencia o susceptibilidad al carbón de la espiga, y constituyen la población que se desea estudiar, el análisis dialélico se restringe a la evaluación de efectos genéticos, especialmente de los valores de aptitud combinatoria general y específica.

Utilizando el programa SAS, se correrán los análisis de varianza de la variable correspondiente al índice de enfermedad para el carbón de la espiga, por localidad y el análisis combinado de las dos localidades. Así, se estimará la magnitud de los efectos de la variación y el tipo de acción génica que controla la resistencia en los materiales evaluados (efectos de aptitud combinatoria general vs aptitud combinatoria específica) utilizando el Modelo I de Hallauer y Miranda (1981) con  $n = 10$  progenitores y 45 cruzamientos. Se determinará la significancia de los factores principales incluyendo ambientes, genotipos, cruzamientos, padres vs cruza, aptitud combinatoria general y específica, así como la interacción con el ambiente y el cuadrado medio de error del experimento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 160 líneas S3 de endospermo blanco evaluadas, 58 mostraron infección por *S. reilianum* f. sp. *zaae*, de las cuales se seleccionaron las 5 líneas con mayor porcentaje de infección para usarse como progenitores susceptibles (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Líneas S3 de endospermo blanco con mayor porcentaje de infección de *S. reilianum* f. sp. *zeae***

No. de línea	No. de plantas	No. De estructuras enfermas			Total enfermas	Porcentaje de incidencia			
		Espiga	Mazorca	Ambas		Espiga	Mazorca	Ambas	Total
14	12	0	2	2	4	0.00	16.67	16.67	33.33
17	13	0	4	1	5	0.00	30.77	7.69	38.46
18	15	1	2	3	6	6.67	13.33	20.00	40.00
77	11	0	0	6	6	0.00	0.00	54.55	54.55
103	11	0	5	0	5	0.00	45.45	0	45.45

De las 102 líneas S3 de endospermo blanco resistentes se seleccionaron las 5 mejores en base a características agronómicas deseables (Cuadro 2), las cuales fungirán como parentales resistentes en el diseño dialélico.

**Cuadro 2. Líneas S3 de endospermo blanco sin infección de *S. reilianum* f. sp. *zeae*, con características agronómicas deseables**

No. de línea	No. de plantas	No. De estructuras enfermas			Total enfermas	Porcentaje de incidencia			
		Espiga	Mazorca	Ambas		Espiga	Mazorca	Ambas	Total
66	14	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
68	20	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
86	17	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
87	16	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
117	10	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar el Doctorado en Fitopatología.

## LITERATURA CITADA

- Gardner, C. O. and Eberhart, S. A. 1966. Analysis and interpretation of the variety cross diallel and related populations. *Biometrics* 22 (3): 439-452.
- Griffing, B. 1956. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel-crossing system. *Australian J. Biol. Sci.* 9 (4): 463-493.
- Hallauer, A. R., and Miranda F. J. B. 1981. *Quantitative genetics in maize breeding*. Iowa St. Univ. Press. Ames, IA. 468p.
- Kruger, W. 1962. *Sphacelotheca reiliana* in maize. *Infection and control studies*. South Afr. J. Agric. Sci. 5: 43-56.
- Li, X. H., Wang, Z. H., Gao S. R., Shi, H. L., Zhang, S.H., Geroge M. L. C., Li, M.S., and C. X. Xie. 2008. Analysis of QTL for resistance to head smut (*Sporisorium reiliana*) in maize. *Field Crops Research*, 106. pp.148-155.
- Martinez, C., Buée, M., Jauneau A., Bécard, G., R. Dargent and C. Roux. 2001. Effects of a fraction from maize root exudates on haploid strains of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. *Plant and Soil*. 236. pp. 145-153.
- Quezada-Salinas, A., De León García-De Alba, C., Hernández-Anguiano, A. M. y Nava-Díaz C. 2013. Evaluación de métodos de inoculación de semillas de maíz con *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kühn) Langdon & Fullerton. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31 (2): 80-90.
- Ramírez, D. J. F., Sánchez P. J. R. y De León, C. 2011. Estabilidad espacio temporal de la distribución del carbón de la espiga del maíz (*Sporisorium reilianum*) en el Estado de México, México. *Revista Mexicana Fitopatología*. 29: 1-14.

- Simpson, W.R. 1966. Head smut of corn in Idaho. *Plant Dis. Repr.*, 50: 215-217.
- Tusa, C., Craiciu, D., Doncila, A., Vonica, I., Buhnea, Z., M. Olangiu. 1981. Possibilities of integrated control of *Sorosporium holci-sorghii* on maize. *Probleme de Protectia Plantelor*. 9: 327-340.
- Wang M., Yan J., Zhao J., Song W., Zhang X., Xiao Y., and Zheng Y. 2012. Genome-wide association study (GWAS) of resistance to head smut in maize. *Plant Sci*. 196. pp.125–131.
- Xu, M.L., Melchinger, A.E. & Lübberstedt, T., 1999. Species-Specific Detection of the Maize Pathogens *Sporisorium reilianum* and *Ustilago maydis* by Dot Blot Hybridization and PCR-Based Assays. *Plant Dis*. 83: 390–395.

## REDUCCIÓN DE ESTRÉS HÍDRICO EN MAÍZ MEDIADA POR BACTERIAS ENDOFÍTAS DE LA RAÍZ

Alma **Sanchez Bautista**<sup>1</sup>, Carlos **De León García de Alba**<sup>1</sup>, Paul **Goodwin**<sup>1</sup>, Sergio **Aranda Ocampo**<sup>1</sup>, Emma **Zavaleta Mejía**<sup>1</sup>

### INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es el tercer cultivo alimenticio más importante en términos de fuentes de energía y proteína en la nutrición humana. Es un cultivo C4 con una alta tasa de actividad fotosintética. El cambio climático y el uso de tierras marginales para la producción de cultivos requieren el desarrollo de sistemas innovadores adaptados a ambientes estresantes, especialmente el estrés por sequía. En este cultivo, se reportan pérdidas de rendimiento anuales por sequía de alrededor del 15% del rendimiento (Edmeades, 2008).

El cambio climático y el crecimiento de la población, proyectan que en los próximos años la producción de los principales cultivos (maíz, cebada, trigo, etc.) sea en zonas marginales principalmente con déficit de agua (Edmeades, 2008). El estrés por sequía tiene efectos drásticos sobre el crecimiento, el contenido de agua de la hoja y la fotosíntesis de las plantas de maíz. Se ha determinado que diversas poblaciones bacterianas son capaces de mantener el equilibrio biológico y la sostenibilidad en el suelo bajo condiciones de estrés (Kavamura *et al.*, 2013); y que en condiciones de estrés, las plantas son más dependientes de estos microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPR) (Kloepper *et al.*, 1989). Varios PGPR se reportan para inducir tolerancia al estrés de sequía en algunas plantas como el trigo, maíz, girasol, caña de azúcar (Kasim *et al.*, 2013). Las bacterias endofíticas pueden llegar a ser más importantes que bacterias de la rizósfera, pues tiene la capacidad de lograr un contacto más íntimo con los tejidos vegetales (Naveed *et al.*, 2014). En esta investigación se pretende determinar si las bacterias endofíticas aisladas de la raíz de maíz: *Pseudomonas geniculata*, *Pseudomonas hibiscola*, *Sinorhizobium meliloti* y *Agrobacterium tumefaciens* pueden mejorar el crecimiento de plántulas de maíz en condición de estrés hídrico.

<sup>1</sup> Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Edo. México

<sup>1</sup> Plant pathology, School of Environmental Sciences, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.

Autor de correspondencia: [zancheza@gmail.com](mailto:zancheza@gmail.com)



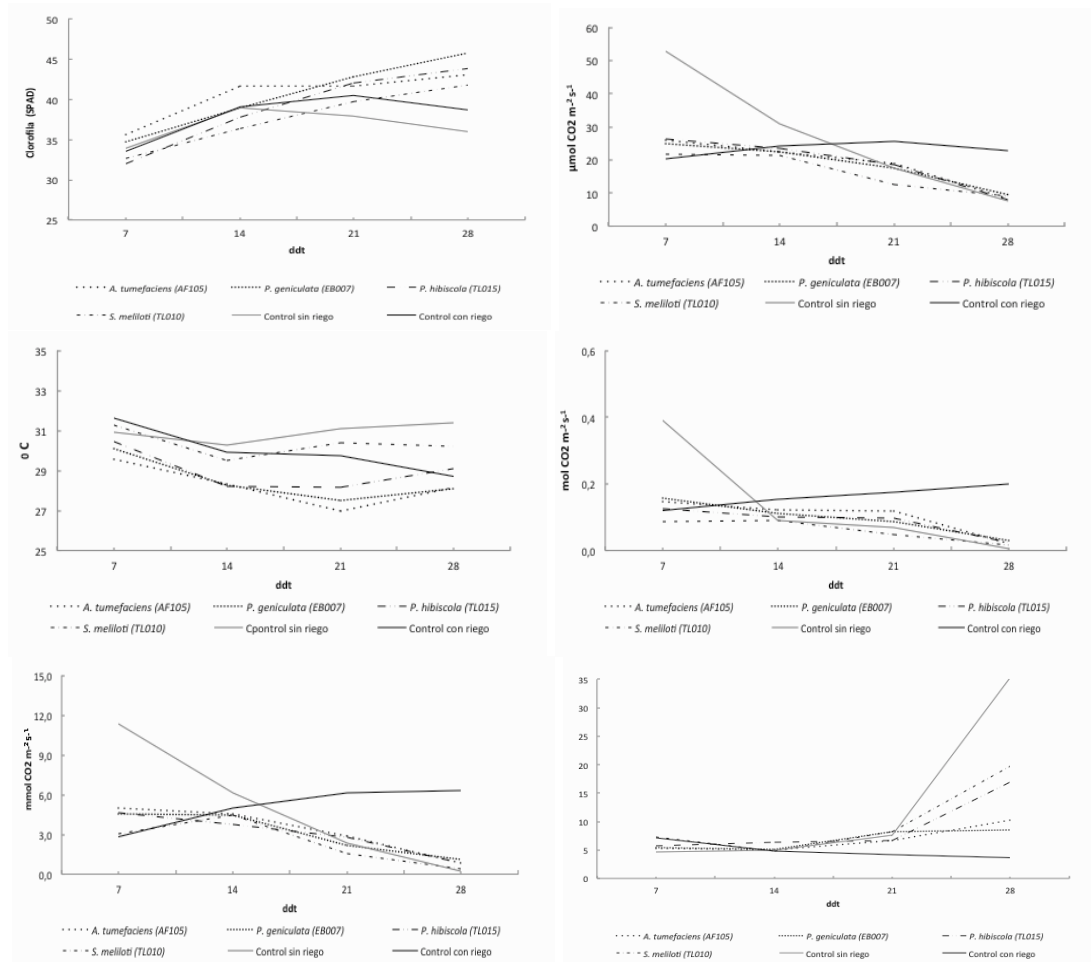
## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó semilla de la línea DTMA-182 susceptible a sequía (línea endocriada de CIMMYT). La semilla se desinfectó con etanol al 70% por 3 min y posteriormente con hipoclorito de sodio al 2% (NaClO) por 5 min, seguido de 3 lavados con agua destilada estéril. Las semillas se sembraron en charolas de cavidades hasta cumplir 10 días a partir de su emergencia. Las bacterias endofíticas aisladas de raíces de plantas de maíz e identificadas como *Pseudomonas geniculata*, *Pseudomonas hibiscola*, *Sinorhizobium meliloti* y *Agrobacterium tumefaciens* se preparó en medio nutritivo agar-extracto de levadura y peptona y se incubaron a 28°C por 48h. El inóculo bacteriano se preparó en una suspensión en 20 ml agua destilada estéril a una densidad de  $10^8$  UFC/ml de acuerdo con la escala de Mcfarland. La inoculación de las raíces se realizó en plántulas de maíz con 10 días de emergencia mediante inmersión en la suspensión bacteriana por 30 minutos en agitación constante a 110 rpm. El experimento en invernadero se realizó en el Colegio de Postgraduados. Las plántulas de maíz inoculadas en la raíz con bacterias endofíticas se sembraron en bolsas negras de plástico con 5 kg de suelo estéril, cada maceta con 5 plántulas de maíz por tratamiento y 5 repeticiones. Se utilizaron 2 controles: 1) control con riego y 2) control sin riego. Los tratamientos se mantuvieron con riego durante 6 días, en el séptimo día se suspendió el riego para todos los tratamientos excepto para el control con riego y se tomaron lecturas de los parámetros fisiológicos: contenido de clorofila, tasa fotosintética con un SPAD 502 Plus, temperatura de la hoja, tasa de transpiración, conductancia estomática con el Li-6400 Sistema de fotosíntesis portátil y se calculó el uso eficiente del agua. Posteriormente se retiraron 3 plantas de cada tratamiento para la lectura de peso fresco y longitud de raíz y tallo. Finalmente, para obtener el peso seco de la planta, se colocaron en un horno de secado (Riossa HS-62) a 60° C por 72hrs. Las evaluaciones se realizaron a los 7, 14, 21 y 28 días después del trasplante. El experimento se repitió 2 veces. Los datos obtenidos fueron graficados para su interpretación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas inoculadas con bacterias endofíticas mostraron diferencias entre tratamientos y con respecto a los controles y. En el contenido de clorofila, se observó que las plantas inoculadas mostraron un incremento significativo en el contenido de clorofila en comparación con los

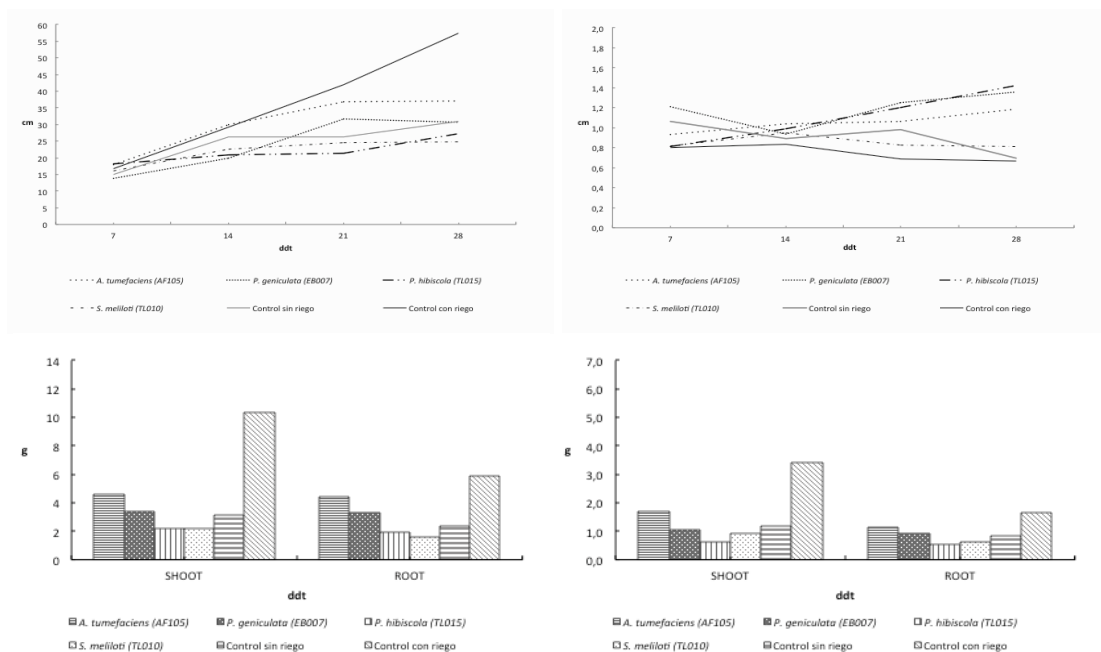
tratamientos control; las plántulas inoculadas con *P. geniculata* presentaron un mayor contenido de clorofila. Respecto a la tasa fotosintética, se observó que después de 7 días en estrés, el control sin riego mostró mayor actividad fotosintética en comparación con el resto de los tratamientos; todos los tratamientos mostraron una reducción de la tasa fotosintética excepto el control con riego que registró un incremento de la tasa fotosintética de los días 7 al 28.



**Figura 1. Parámetros fisiológicos de plántulas de maíz inoculadas con bacterias endofíticas, A) Contenido de clorofila, B) Tasa fotosintética, C) Temperatura de la hoja, D) Conductancia estomática, E) Tasa de transpiración, F) Uso eficiente del agua.**

Para la variable temperatura de la hoja, esta permaneció alta durante los 28 días en el control sin riego en comparación con las plantas inoculadas con *A. tumefaciens* y *P. geniculata* que registraron una reducción en la temperatura de sus hojas a partir de la primera semana sin riego. Una de las variables de mayor relevancia es la conductancia estomática, la cual nos permite evaluar el estado

hídrico evaluar el estado hídrico de la planta ya que existe una estrecha relación entre el cierre de estomas y la falta de agua; por lo tanto, también se llega a dar una reducción de la tasa de transpiración (Sepulcre-Cantó *et al.*, 2006). En este contexto, se observó que en el control sin riego, se redujo la conductancia estomática y la tasa de transpiración, mientras que las plantas del tratamiento control con riego incrementaron ambos parámetros conforme transcurren los días. Existen plantas que son más eficientes en el uso del agua dependiendo de su tasa de transpiración ya que la planta es capaz de reducir la apertura de los estomas por mayor período de tiempo (Cochard *et al.*, 2002). En este experimento se calculó la eficiencia del uso del agua para cada uno de los tratamientos y los resultados indicaron que las plantas del control sin riego mostraron una mayor eficiencia como resultado de mantener los estomas cerrados por un mayor periodo como reacción de defensa a la condición de estrés hídrico. En cuanto a las características agronómicas de las plantas inoculadas con los endófitos, las plantas tratadas con *A. tumefaciens* mostraron mayor longitud del tallo y de raíz. De igual manera, dentro de los tratamientos con bacterias endofíticas, destacan nuevamente las plantas inoculadas con *A. tumefaciens* las cuales registraron la mayor cantidad de peso fresco y seco.



**Figura 2. Características agronómicas de plántulas de maíz inoculadas con bacterias endofíticas (A) Longitud de la planta, (B) Longitud de raíz, (C) Peso fresco planta y raíz, (D) Peso seco planta y raíz.**

En esta investigación, la bacteria endofítica *Pseudomonas geniculata* se proyecta como otro tratamiento que favorece las características agronómicas y fisiológicas de las plántulas de maíz en

condiciones de sequía. Es común ver que el crecimiento y desarrollo de las plantas pueden reducirse en condiciones de estrés debido a los mecanismos bioquímicos y fisiológicos deteriorados. Estas alteraciones adversas a la planta pueden ser reducidas mediante el uso de organismos benéficos que logren mantener un equilibrio en los procesos biológicos de la planta, promoviendo una respuesta mediante diversos mecanismos que ayuden a las plantas en su crecimiento bajo condiciones de estrés.

### AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada al estudiante.

### LITERATURA CITADA

- Cochard, H., Coll, L., Le Roux X. and Améglio, T. 2002. Unraveling the effects of plant hydraulics on stomatal closure during water stress in walnut. *Plant Physiol.* 128:282-290.
- Edmeades, G.O. 2008. Drought tolerance in maize: an emerging reality. A feature. In: James, C. (Ed.), *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2008*. ISAAA Brief No. 39. ISAAA, Ithaca, NY, 12 p.
- Kasim, W.A., Osman, M.E., Omar, M.N., Eldaim, I.A., Bejai, S. and Meijer, J. 2013. Control of drought stress in wheat using plant growth promoting bacteria. *J. Plant Growth Regulation* 32:122-130.
- Kavamura, V.N., Santos, S.N., Da Silva, J.L., Parma, M.M., Ávila, L.A., Visconti, A., Zucchi, T.D., Taketani, R.G., Andreote, F.D. and De Melo, I.S., 2013. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiol. R.* 168:183-191.
- Kloepper, J.W., Lifshitz, R. and Zablutowicz, R.M. 1989. Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7:39-44.
- Naveed, M., Mittera, B., Reichenauer, T.G., Wiczeck, K. and Sessitscha, A. 2014. Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by Burkholderia phytofirmans PsJN and Enterobacter sp. FD17. *Environ. Experim. Botany* 97:30-39
- Sepulcre, C.G., Zarco, T.P., Jimenez, M.J., Sobrino, J. and De Miguel, E. 2006. Detection of water stress in an olive orchard with thermal remote sensing imagery. *Agri. Forest Meteorol.* 136:31-44.

## GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A LA ROYA DEL TALLO EN CUATRO GENOTIPOS DE TRIGOS DUROS

Daniel **Barcenas Santana**<sup>1\*</sup>, Julio **Huerta Espino**<sup>2</sup>, José S. **Sandoval Islas**<sup>1</sup>, Héctor E. **Villaseñor Mir**<sup>2</sup>, Santos G. **Leyva Mir**<sup>3</sup>, Luis A. **Mariscal Amaro**<sup>4</sup>, Alejandro **Michel Aceves**<sup>5</sup>

### INTRODUCCIÓN

Las royas son las enfermedades más destructivas en los cereales y pueden afectar desde la etapa de plántula hasta el llenado del grano, algunas variedades han mantenido cierta resistencia durante muchos años (Roelfs, 1988). El mejoramiento genético es el principal mecanismo para controlar a las royas de los cereales, mediante el empleo de variedades resistentes (Johnson, 1981). Sin embargo, algunas variedades contraen la enfermedad cuando sólo han sido sembradas por una vez, en la mayoría de los casos, si no en todos, los fracasos han obedecido al inadecuado conocimiento previo de las virulencias presentes en la población patógena. En algunos otros casos se han producido mutaciones o quizás recombinaciones de los factores de virulencia existentes que superaron la resistencia del hospedante (Singh *et al.*, 2000).

En México, recientemente no se han realizado estudios de resistencia genética en trigos duros, la falta de ello se debe a que desde 1950 con el efecto del gen *Sr2* se logró el control en México a la roya del tallo (*P. graminis* f. sp. *tritici*) (Huerta-Espino *et al.*, 2011). Por lo que, se tiene que trabajar ante la posible evolución del patógeno por la presión de selección que se ha sometido por estos años.

<sup>1</sup>Fitopatología, Instituto de Fitosanidad, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. Carr. México-Texcoco, Km. 36.5, 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. de México. <sup>2</sup>Campo Experimental Valle de México, INIFAP, km. 13.5, Carr. Los Reyes- Texcoco, Coatlinchan, 56250, Edo. de México.

<sup>3</sup>Departamento de Parasitología Agrícola, UACH, Carr. México-Texcoco, Km. 38.5, 56230, Chapingo, Edo. de México.

<sup>4</sup>INIFAP-Campo Experimental Bajío, Carr. Celaya-San Miguel de Allende Km. 6.5, 38110, Celaya, Guanajuato.

<sup>5</sup>Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, Carr. Iguala-Cocula, km 14.5, Cocula, Gro.

\*Autor para correspondencia: [daniel.barcenas@colpos.mx](mailto:daniel.barcenas@colpos.mx)

El 90 % de la superficie sembrada de trigos duros en México, es ocupada por las variedades 'Cirno C2008', 'Samayoa C2004', 'Movas C2009', 'Quechhueca' y 'Bayoreca' por sus altos rendimientos, pero no se sabe el número de genes que les confiere la resistencia a la roya del tallo, por ello se planteó la presente investigación con los objetivos de conocer cuántos son los genes que le confieren la resistencia a las variedades 'Atil C2000', 'Cirno C2008', 'Samayoa C2004' y 'Movas C2009' y determinar la herencia de la resistencia a roya del tallo en la progenie F<sub>3</sub>.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material genético.** Se utilizaron las variedades de trigo duro 'Atil C2000', 'Cirno C2008', 'Samayoa C2004' y 'Movas C2009', estas variedades sobresalen por su rendimiento, resistencia a las royas y por la superficie sembrada en el Noroeste de México. Se utilizó el genotipo Noio que es susceptible en plántula y planta adulta a todas las razas fisiológicas de la roya del tallo.

**Obtención de las familias F<sub>3</sub> y evaluación en plántula.** Los progenitores se sembraron en la tercera semana de diciembre de 2012 en el campo agrícola experimental valle de México (CEVAMEX) del INIFAP ubicado en Chapingo, México. En marzo de 2013 se efectuaron las cruza de las variedades resistentes con el susceptible (Noio), y entre las variedades resistentes x resistentes mediante el método emasculación-polinización manual simple (González *et al.*, 2005), y se obtuvo la primera generación filial (F<sub>1</sub>), de la cual se avanzó hasta la generación F<sub>3</sub>. La obtención de las familias F<sub>3</sub> fueron seleccionadas en campo y se cosecharon al azar 150 plantas individuales de cada cruza. Las familias F<sub>3</sub> y los progenitores se evaluaron en plántula durante el ciclo P-V/2015 en el invernadero del Laboratorio Nacional de Royas y otras Enfermedades de Trigo (LANARET) del INIFAP-CEVAMEX. Las familias de cada cruza se sembraron en charolas de plástico (20 x 30 x 6 cm de ancho, longitud y profundidad, respectivamente) se agregó una mezcla de tierra preparada y peat moss (60:40), se marcaron pequeños surcos y orificios marcados con una plancha de acero. La siembra se efectuó de dos formas: 1) para las cruza resistentes x susceptibles se sembró en charolas con dos hileras y cinco columnas (capacidad para 10 familias, se colocaron 20 semillas por familia), 2) Para las cruza resistentes x resistentes se sembró en charolas de ocho hileras y seis columnas (capacidad para 48 familias, se colocaron 8 semillas por familia). Las charolas se mantuvieron en un invernadero, a una temperatura de entre 20 y 25°C. Se

utilizó la raza RTR, para inocular las plántulas de 10 días de edad con aspersiones de urediniosporas suspendidas en aceite mineral soltrol a una concentración de  $1 \times 10^{-6} \text{ mL}^{-1}$ . Después, las plántulas se colocaron en una cámara de rocío por 9 h y 3 h de luz a temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$ , y después de haber transcurrido 16 h, se trasladaron a un invernadero con una temperatura de  $24^{\circ}\text{C}$ .

**Clasificación de las familias y análisis estadístico.** A los 12 d después de la inoculación se evaluaron los tipos de infección con una escala de 0 a 4, de acuerdo con Roelfs *et al*, (1992). Las familias se clasificaron en dos y tres grupos. Grupo 1: familias homocigotas con una respuesta similar a la del progenitor resistente (resistentes), grupo 2: familias heterocigotas segregantes en las que se agrupan resistentes y susceptibles como los progenitores y el grupo 3: familias homocigotas con una respuesta similar a la del progenitor susceptible. Las frecuencias observadas y esperadas se compararon mediante la prueba de Ji-cuadrada ( $X^2$ ) (Infante y Zárate de Lara, 1990).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para determinar el número de genes se tomó como referencia el número de familias homocigotas susceptibles, las cuales facilitan tener una estimación fácil y rápida en campo, bajo el supuesto de que la virulencia del patógeno es recesiva y la resistencia en planta es dominante. Las frecuencias observadas y esperadas se muestran en el Cuadro 1 de las familias en plántula de las cruzas de las variedades resistentes x el susceptible (Noio). Las cruzas Noio x 'ATIL C2000 y Noio x 'CIRNO C2008' las frecuencias se agruparon para su análisis en 81:78 y 103:76, resistentes: susceptibles respectivamente, ambas frecuencias se ajustaron a la relación fenotípica 9:7 lo que indica que ATIL C2000 y CIRNO C2008 poseen dos genes dominantes complementarios de resistencia. Zhang *et al*. (2008) en un estudio genético a la resistencia a roya de la hoja encontraron la misma relación génica al evaluar familias F3 con las razas BBBD y THBJ.

En el progenitor MOVAS C2009, las frecuencias observadas en plántula de la crusa Noio x MOVAS C2009 se ajustó a una proporción 249:7, en donde la resistencia está condicionada por cuatro genes dominantes complementarios, por lo que MOVAS C2009 tiene cuatro genes dominantes de resistencia y la resistencia de las plántulas fue alta. Para la crusa Noio x SAMAYOA C2004 se obtuvieron las frecuencias 48:84:38, resistentes: segregantes: susceptibles, la proporción a la que se ajustó fue 1:2:1, lo que indica la presencia de un gen de resistencia dominante.



**Cuadro 1.-Distribución y frecuencias relativas de las familias F3 en plántula de las cruzas con el progenitor susceptible Noio.**

Cruza	Grupo													
	No. de familias F3				Frecuencia relativa									
	RES (1)	SEG INT (2)	SEG (3)	SUSC (4)	T	1	2	3	4	R	No. de genes	TAB X <sup>2</sup>	CAL X <sup>2</sup>	
NOIO/ATIL C 2000	29	52	58	20										
	81			78	159	89.44			69.56	9:7	2*	3.84	1.82	
NOIO/CIRNO C2008	23	80	57	19										
	103			76	179	89.44			69.56	9:7	2*	3.84	2.65	
NOIO/MOVAS C2009	41		131	6										
	172			6	178	173.3			4.87	249:7	4«	3.84	0.27	
NOIO/SAMAYOA C2004	48		84	38	170	42.5		85.0	42.5	1:2:1	1	5.99	1.2	

T= total de familias evaluadas; Res= resistente observado; Seg Int= segregantes intermedios; Seg= segregante; Susc= susceptible; R= relación fenotípica; Cal X<sup>2</sup>= X<sup>2</sup> calculada; Tab X<sup>2</sup>= X<sup>2</sup> de tablas; con 1 y 2 grados de libertad,  $\alpha=0.05$ .

Esto con cuerda con lo reportado con Olivera *et al.* (2008); al realizar la cruce entre plantas resistentes por susceptibles e inocular con la raza TTTT de *P. graminis* f. sp. *tritici*. Singh y McIntosh, (1987) obtuvo la misma relación fenotípica 1:2:1, al igual que Mariscal *et al.* (2009) en familias de avena. En el caso de las cruza resistentes por resistentes no se encontraron familias susceptibles lo que indica que comparten al menos un gen en común entre las variedades.

### AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT, al fondo sectorial SAGARPA-CONACYT (proyecto No. 146788) por el financiamiento otorgado para la realización de la presente investigación y al Laboratorio Nacional de Royas y otras Enfermedades de Trigo (LANARET) del INIFAP-CEVAMEX.

### LITERATURA CITADA

- González, E. A., E. Solís, M., y S. Wood. 2005. Impacto Económico del Mejoramiento Genético del Trigo en México: Variedad Salamanca S75. Publicación Técnica No. 16 INIFAP-SAGARPA. 62 p.
- Huerta-Espino, J; H. E. Villaseñor., E. Espitia R., E. Solís-Moya, and M. Van G. 2011. The history of wheat breeding in Mexico. In: The wheat book V2 history of wheat breeding. Eds. Alain P. Bonjean, William J. Angus, Maarten van Ginkel. Londres, Paris-New York. 275-308 pp.
- Infante, G.S., G. P. Zárate de Lara. 1990. Métodos estadísticos: un enfoque interdisciplinario. 2ª ed. Trillas. Mexico, D.F. 643 p.
- Johnson, R. 1981. Durable disease resistance: Definition of, Genetic Control, and Attainment in Plant Breeding. The American Phytopathological Society. 71:567-568.
- Mariscal A., L., A. J. Huerta-Espino, E., E., Villaseñor M., S., J. Leyva M., S., Sandoval I y I. Benítez R. 2009. Genética de la resistencia a roya del tallo (*Puccinia graminis* f. sp. *avenae* Erikss. & Henning) en tres genotipos de avena (*Avena sativa* L.). Agrociencia 43: 869-879.
- Olivera, P. O., Millet, E., Anikster, Y., and Steffenson B. J. 2008. Genetics of resistance to wheat leaf rust, stem rust, and powdery mildew in *Aegilops sharonensis*. Phytopathology. 98:353-358.
- Roelfs, A.P. 1988. Genetic control of phenotypes in wheat stem rust. Annu. Rev. Phytopathol. 26:351-367.
- Roelfs, A. P., Singh, P. R. y Saari, E. E. 1992. Las royas del trigo: conceptos y métodos para el amenejo de esas enfermedades. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y trigo (CIMMYT). El Batán, Texcoco, Estado de México. 81p.
- Singh, R. P., J. Huerta-Espino y S. Rajaram. 2000. Achieving near-immunity to leaf and stripe rusts in wheat by combining slow rusting resistance genes. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica. 35: 133-139.
- Singh, R. P., and McIntosh. 1987. Genetics of resistance to *Puccinia graminis tritici* in 'Chris' W3746 wheats. Theor. Appl. Genet. 73:846-855
- Zhang, J. X., R. P. Singh, J. A. Kolmer, J. Huerta-Espino, Y. Jin, and J. A. Anderson. 2008. Genetics of leaf rust resistance in Brambling wheat. Plant Disease. 92: 1111-1118.



## RESISTENCIA Y MANEJO DE ENFERMEDADES

**RESPUESTA BIOQUÍMICA DE VARIEDADES DE *Mangifera indica*  
(SAPINDALES, ANACARDIACEAE) A LA INFECCIÓN POR *Fusarium* spp  
(HYPOCREALES; NECTRIACEAE)**

**Elvis García López<sup>1\*</sup>, José A. Mora Aguilera<sup>1</sup>, Daniel Téliz Ortiz<sup>1</sup>, Guadalupe Valdovinos Ponce<sup>1</sup>, Ángel Villegas Monter<sup>2</sup>, Elías Hernández Castro<sup>3</sup>.**

### INTRODUCCIÓN

El cultivo del mango (*Mangifera indica* L.) es uno de los frutales de mayor importancia económica en las regiones tropicales y subtropicales de México y el mundo. Una de las limitantes parasíticas más complejas es la malformación vegetativa y floral (MVF) (*Fusarium* spp.). Los síntomas típicos son pérdida de dominancia apical, proliferación de hojas y tallos vegetativos, flores estériles y acortamiento de entrenudos de tallos y de los ejes primario y secundario de la panícula. Distintos factores bióticos y abióticos se han asociado a la MVF; sin embargo, a varias especies del género *Fusarium* se considera como el agente causal y se ha confirmación por postulados de Koch y análisis molecular. Los cultivares Cotaxtla y Haden son susceptibles y pocos, como Ataúlfo, se consideran tolerantes en México (2). La temperatura, edad del árbol, fertilización y el tiempo de formación de yemas juegan un rol importante en la expresión de susceptibilidad de los cultivares de mango a la MVF.

La infección de un patógeno induce cambios morfológicos y bioquímicos como el incremento en la producción de metabolitos secundarios; los compuestos fenólicos se encuentran en mayores cantidades en hojas con MVF que en hojas sanas; los niveles dependen del cultivar y condiciones climáticas (4). Especies de *Fusarium* se relacionan con elicitores que estimulan la producción de metabolitos fenólicos por la planta; un incremento de compuestos específicos es particularmente la mangiferina, que restringe la entrada de las hifas del hongo dentro de las células (1). La acumulación de ácido clorogénico puede aumentar la biosíntesis fenólica y su acumulación puede estar involucrado en la resistencia (6). La tolerancia a *Fusarium mexicanum* o *F. subglutinans* en

<sup>1</sup> Instituto de Fitosanidad-Fitopatología, <sup>2</sup> Programa de Fruticultura, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados; <sup>3</sup> Sistemas de Producción Animal Sustentable, Universidad Autónoma de Guerrero,

\*Autor para correspondencia: [garcia.elvis@colpos.mx](mailto:garcia.elvis@colpos.mx)

nuevos cultivares de mango con potencial económico en México puede mejorar nuestra competitividad al incrementar la productividad.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la tolerancia a la malformación vegetativa basada en el contenido del ácido clorogénico asociada a mecanismos de defensa y su relación con la intensidad de los síntomas en seis cultivares de mango.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó a partir abril de 2015, en un vivero experimental ubicado en Huamuxtitlán, Guerrero, México con 20 plantas injertadas de seis meses de cada uno de los cultivares Ataúlfo, Haden, Mallika, Ivory, Nan Doc Mai y Rosigold. La patogenicidad se evaluó con *Fusarium subglutinans*, *F. mexicanum* y una mezcla de ambos. Cada planta se inoculó con una suspensión conidial de  $2 \times 10^6$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  con cultivos de 10 días de crecimiento en PDA (DIFCO®, USA) a 25°C. Las plantas se distribuyeron en un diseño de bloques completos aleatorizados. Cinco plantas testigo de cada cultivar se inocularon con 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril. La unidad experimental fue una planta. La inoculación se realizó según el método de García (2012). Las variables evaluadas fueron expresión de síntomas e incidencia de síntomas (%). El experimento se replicó dos veces, con 45 días de diferencia.

El ácido clorogénico se determinó 2 h antes de inoculación y 7, 35, 90, 160 y 240 días después de inoculación (ddi). Hojas de mango se colectaron y liofilizaron durante 5 días y maceraron; a 0.5 g de muestra molida se adicionaron 5 mL de agua °HPLC, se agitó durante 30 min, después se centrifugó a 5000 rpm por 10 min y el sobrenadante se recolectó. El extracto acuoso se filtró a través de acrodiscos de nylon con poros de 0.45  $\mu\text{m}$ . La inyección en el cromatógrafo de líquidos se realizó según el protocolo de Salinas *et al.* (2014). El estándar de ácido clorogénico (SIGMA®, USA) se empleó para construir la curva estándar.

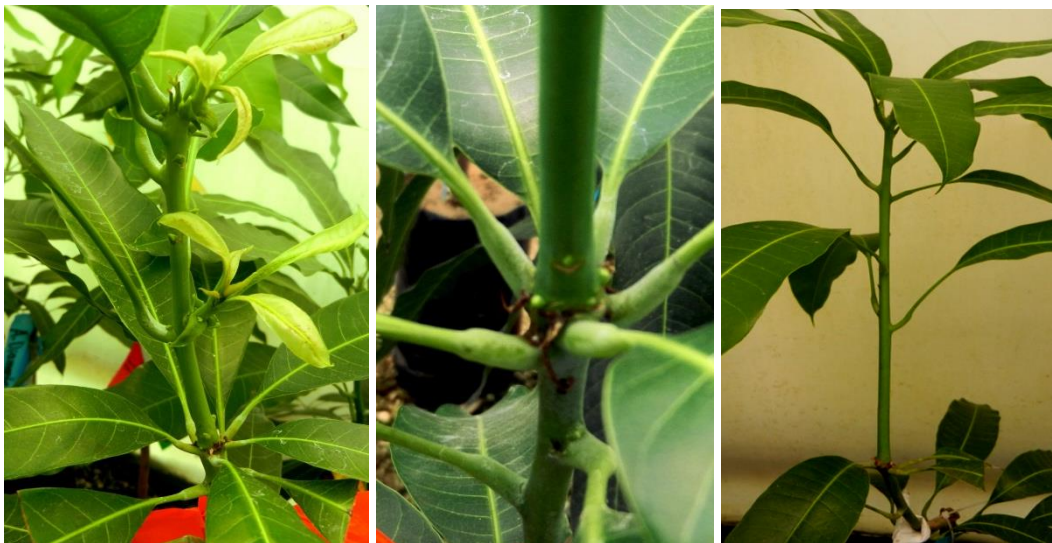
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cultivares que presentan mayor incidencia hasta el momento son: Mallika (55%), Haden (46%) y Nan Doc Mai (10%); mientras que, Ivory y Ataúlfo no presentan síntomas (Tabla 1).

**Tabla 1. Incidencia preliminar de la malformación vegetativa en seis cultivares de mango (*Mangifera indica* L.) en Huamuxtlán, Guerrero, México, 2015.**

Cultivar	Incidencia / tratamiento (%)							
	Replica 1				Replica 2			
	Fs	Fm	A	Total	Fs	Fm	A	Total
Mallika	20	40	40	<b>50</b>	20	40	60	<b>60</b>
Haden	20	20	40	<b>44</b>	20	20	60	<b>48</b>
Nan Doc Mai	0	20	20	<b>20</b>	0	0	0	<b>0</b>
Rosy gold	20	0	0	<b>8</b>	0	0	0	<b>0</b>
Ivory	0	0	0	<b>0</b>	0	0	0	<b>0</b>
Ataúlfo	0	0	0	<b>0</b>	0	0	0	<b>0</b>

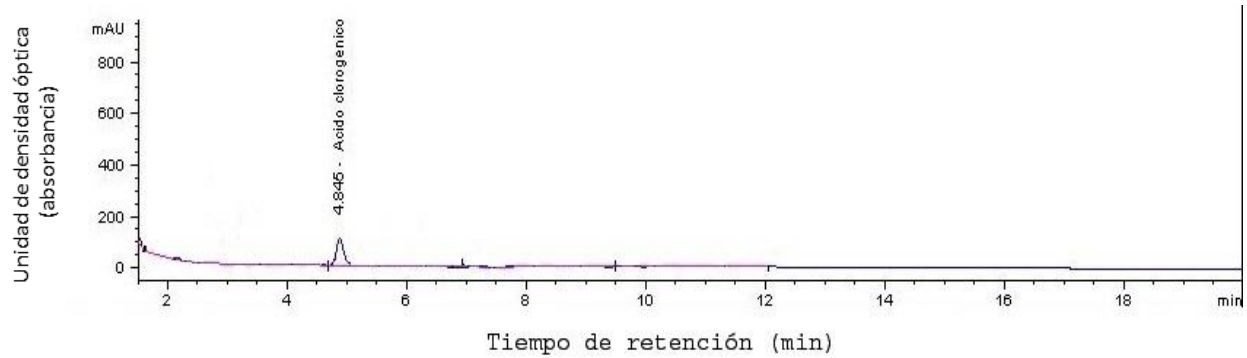
Hasta el momento se confirma lo reportado por García (2012), quien menciona que el cultivar Ataúlfo es tolerante, mientras que Haden se comporta como susceptible; asimismo un experimento previo (sin publicar, 2014), Mallika resulto susceptible (Figura 1).



**Figura 1. Síntomas experimentales de proliferación vegetativa, inoculados con una mezcla de *Fusarium mexicanum* y *F. subglutinans*. A) cv. Mallika, B) cv. Haden, C) cv. Ataúlfo.**

La concentración de ácido clorogénico (A.Cl) se determinó en base a la curva patrón que se preparó con el estándar; el pico cromatográfico indicó el tiempo de retención, el cual fue de 4.845 min (Figura 2).





**Figura 2. Curva de calibración del estándar ácido clorogénico.**

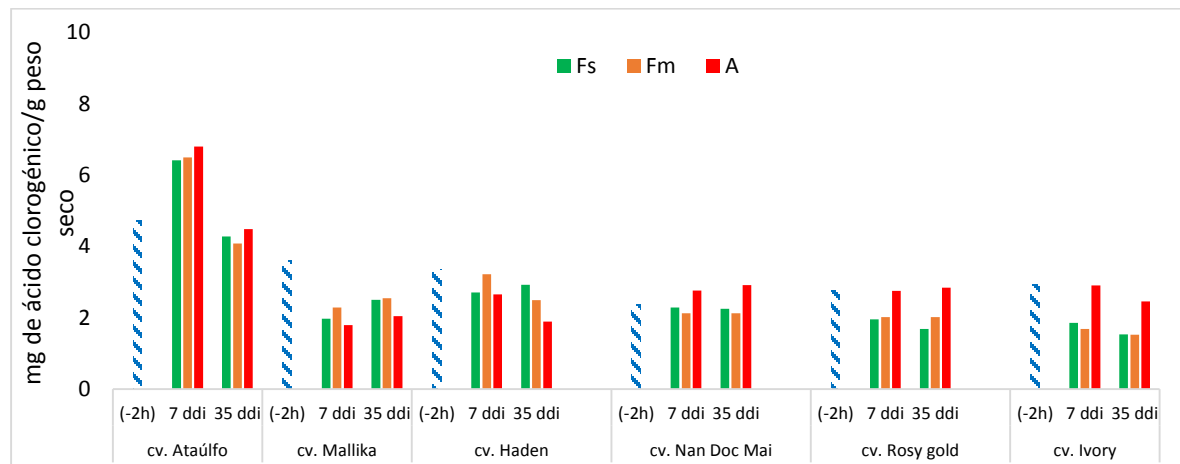
Hasta el momento, los cultivares presentan diferente intensidad de síntomas de proliferación vegetativa, tal el caso de Mallika y Haden (Figura 1), el cual puede ser atribuido a la interacción del cultivar con el patógeno; es decir, ésta influenciado por factores como: fisiología y estructura celular o sistemas de defensas del cultivar (1).

**Réplica experimental 1.** La comparación del contenido de A.Cl muestra una diferencia cualitativa (análisis estadístico pendiente) entre cultivares. En Ataúlfo y Mallika se observó mayor concentración del A.Cl antes de inocularse con *Fusarium*. A los 7 ddi, solo Ataúlfo incrementó sus niveles de A.Cl (Figura 2). En la réplica experimental 2, se observó una tendencia cualitativa similar (análisis estadístico pendiente) respecto a la primera replica; sin embargo la concentración de A.Cl en el tratamiento de la mezcla del patógeno fue mayor 7 ddi (Figura 3).

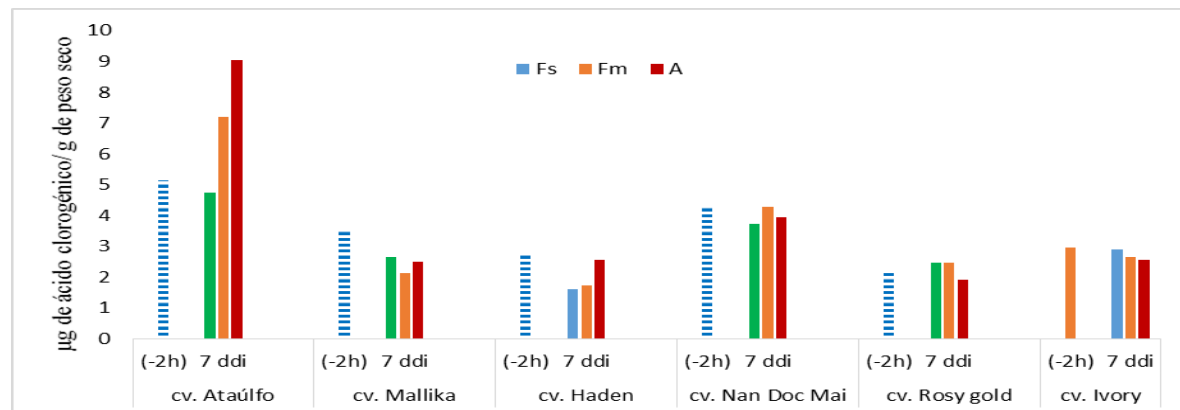
Los cambios morfológicos y bioquímicos en el mango que se presentan con la MVF se han relacionado con un aumento de la producción de metabolitos secundarios en respuesta a la infección, tal es caso del cv Ataúlfo que muestra incremento de A.Cl (Figura 3 y 4). Kumar *et al.* (2011) mencionan que existe mayor proporción de compuestos fenólicos en la parte vegetativa malformada que en plantas sanas y estos niveles dependen de factores como las condiciones climáticas y cultivares. Como se puede observar en la Figura 3 y 4, el tratamiento A (ambos) del cv Ataúlfo está presentando mayor contenido de A.Cl en comparación con Mallika y Haden (Figura 3), lo anterior se puede correlacionar con los síntomas observados en campo (Figura 1). En *Malus domestica*, la infección de *Venturia inaequalis* afectó la acumulación de A.Cl en los cultivares susceptibles, de tal manera que el contenido aumenta en cultivares resistentes; encontrando mayor cantidad (aproximadamente 0.7 mg/g) de A.Cl en la variedad 'Golden Rush' (resistente) que en



'Golden Delicious Clone B' (susceptible) 0.04 mg/g (Mikulič *et al.*, 2003). Farkas *et al.* (2004) evaluaron la susceptibilidad de flores de *Pyrus communis* a *Erwinia amylovora*, encontrando mayor concentración (115 µg/mg) de A.Cl en cultivar 'Beurré Bosc' respecto a 'Hardenpont' como susceptible (58 µg/mg).



**Figura 3. Réplica experimental 1. Concentración de ácido clorogénico en seis cultivares de mango. Los tratamientos son: Fs = *Fusarium subglutinans*; Fm = *Fusarium mexicanum* y A = Mezcla de *Fusarium subglutinans* y *F. mexicanum*; (-2h) = 2 h antes de inoculación, ddi = días después de la inoculación.**



**Figura 4. Réplica experimental 2. Concentración de ácido clorogénico en seis cultivares de mango. Los tratamientos son: Fs = *Fusarium subglutinans*; Fm = *Fusarium mexicanum* y A = Mezcla de *Fusarium subglutinans* y *F. mexicanum*; (-2h) = 2 h antes de inoculación, ddi = días después de la inoculación.**

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado para la realización de estudios de doctorado.

**LITERATURA CITADA**

- Chakrabarti, D.K. 2011. Mango malformation. Ed. Springer. New York. USA. 148 p.
- García, L.E. 2012. Tolerancia de cultivares de mango (*Mangifera indica* L.) a la proliferación vegetativa y floral (*Fusarium* spp.) en México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México. 61 p.
- Farkas, A., Orosz, K.Z., and Bubán, T. 2004. Floral biological studies on pear cultivars in relation to fire blight susceptibility. *International Journal Horticultural Science*. 10(2):25-30.
- Kumar, P., Misra, A.K., and Modi, D.R. 2011. Current status of mango malformation in India. *Asian Journal of Plant Sciences*. 10: 01-23.
- Mikulič, P.M., Usenik, V., and Štampar, F. 2003. The role of chlorogenic acid in the resistance of apples to apple scab (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wind. Aderh.). *Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljublj. Kmet.* 81: 233 – 242.
- Nicholson, R.L., and Hammerschmidt, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Reviews Phytopathology*. 30: 369-389.
- Salinas, R.T., Sanchez, T.T., Ortega, C.M.C., Soto, H.M., Díaz, C.A., Hernández, B.J., Nava C.C., and Vaquera, H.H. 2014. Changes in composition and antioxidant content capacity of coffee pulp during the ensiling process. *Revista Brasileira Zootecnia*. 43(9): 492-498.

## TOLERANCIA DE CULTIVARES DE MANGO (*Mangifera indica*) AMARILLO A *Oidium mangiferae*

Amado Pérez Rodríguez<sup>1</sup>, José A. Mora Aguilera<sup>1</sup>, Carlos de León García de Alba<sup>1</sup>, Sergio Sandoval Islas<sup>1</sup>, Elías Hernández Castro<sup>2</sup>, Alfonso Vásquez López<sup>3</sup>

### INTRODUCCIÓN

Entre 2000 y 2012 México perdió competitividad en la exportación de mango a EEUA., debido al incremento de la participación comercial de India, Tailandia, Brasil, Ecuador y Perú (Hernández y Martínez, 2009). La problemática está asociada a la oferta limitada de mango amarillo de exportación ya que nuestro país cuenta únicamente con la variedad Ataúlfo que enfrenta baja productividad por partenocarpia, plagas, mezclas genéticas, alternancia y estacionalidad de cosecha. En respuesta a esta problemática, a través del proyecto SAGARPA-CONACYT (Núm. 48595) “Evaluación de nuevas variedades con alto potencial productivo y diagnóstico y control de plagas de importancia económica del mango en Guerrero, Veracruz, Chiapas y Oaxaca”, conducido por el Colegio de Postgraduados, en 2011 y 2012 se introdujeron ocho nuevas variedades de mango amarillo con potencial de exportación procedentes de Florida, USA., y registraron dos nuevas variedades locales del clon Ataúlfo. *Oidium mangiferae* es una de las plagas más importantes del mango por causar pérdidas de hasta 80% (Litz, 1997); por ello, es necesario conocer el comportamiento sanitario de los materiales introducidos a este patógeno en las condiciones agroecológicas de México. Pocos trabajos se han realizado para determinar la eficiencia comparativa de técnicas de inoculación de *O. mangiferae* en mango (Litz, 1997). Se ha mencionado la importancia del contenido nutrimental, edad y posición de la hoja, así como su orientación cardinal y posición en los estratos del follaje con la incidencia y severidad por *O. mangiferae* (Chadha *et al.*, 1980). Este proyecto plantea como objetivo evaluar la tolerancia de 10 nuevas variedades de mango amarillo a *O. mangiferae* en plantas de vivero.

<sup>1</sup>Fitosanidad- Fitopatología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Guerrero. <sup>3</sup>Instituto Politécnico Nacional, CIDIIR-Oaxaca.

Autor para correspondencia: [perez.amado@colpos.mx](mailto:perez.amado@colpos.mx)

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el invernadero del Posgrado de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Guerrero, en Iguala, Guerrero, México (18° 20' 39.505" N; 99° 29' 52.796" O: 738 msnm) (SMN, 1981-2014).

**Inóculo y evaluación de severidad.** Se recolectó tejido foliar e inflorescencias con signos de *O. mangiferae* en huertos de mango de 20 años cv. Manililla de Chiapas y Guerrero para obtener reservorio de inóculo. Se fotografiaron 90 hojas con síntomas diversos y se procesaron con ImageJ.Ink®; con base en el diámetro de lesiones, coloración y presencia-ausencia de micelio para obtener un diagrama de severidad.

**Prueba de germinación.** Se utilizaron los siguientes materiales como aditivos: talco de óxido de magnesio, caseína en polvo, Tween 20® (5 %) + surfactante Inex-A® (2%); se mezclaron con esporas de *O. mangiferae* y se depositaron con un pincel fino en tres gotas de agua sobre un portaobjetos a 24 °C en condiciones de luz y oscuridad (15 repeticiones/ tratamiento). Se registró el porcentaje de germinación a 24, 48 y 72 h. Se realizaron análisis de varianza y separación de medias (LSD, 5 %) con el programa SAS® v.9.1.3 (SAS Intitute Inc, 2003).

**Técnica de inoculación.** Se utilizaron plantas susceptibles del cv. Manililla de 16 meses de edad. Para determinar el mejor método de deposición de inóculo se evaluaron cuatro métodos: contacto directo de tejido sano-enfermo (1), espolvoreo de conidios con caseína (2) y talco de óxido de magnesio (3), suspensión de esporas con Tween 20® (5 %) + Inex-A® (2 %) (4) y aspersión de agua estéril (control); los tratamientos se aplicaron en las superficies adaxial y abaxial de hojas de dos edades (8-14 y >20 días) en dos horas contrastantes del día (9:00 y 18:00 h). Se inocularon 25 hojas/método con una concentración de conidios (CC) de  $4.6 \times 10^5$  por mL. Los mejores tratamientos de inoculación que favorecieron el desarrollo típico de síntomas y adecuada evaluación varietal (ausencia de tizones severos que necrosaron por completo la lámina foliar) se validaron considerando las siguientes modificaciones: 50 hojas/método, hojas de 8-14 días de edad e inoculación a las 18 horas. Para estimar la concentración de inóculo más eficiente en la reproducibilidad de síntomas, se evaluaron los tratamientos: espolvoreo de conidios con caseína, suspensión de esporas con Tween 20® (5%) + Inex-A® (2%) y aspersión de agua estéril (control). Se inocularon 50 hojas/método a CC de  $4.6 \times 10^3$ ,  $4.6 \times 10^4$ ,  $4.6 \times 10^5$  y  $4.6 \times 10^6$  por mL en ambas superficies de la hoja, a las 18:00 h y en hojas de 8-14 días en un diseño completamente al azar con

cinco repeticiones. El diseño experimental de todos los experimentos fue completamente al azar con cinco repeticiones. Se registraron los periodos de incubación (PI), incidencia (Inc) y severidad (Sev). Se realizaron análisis de varianza y separación de medias (LSD, 5 %) con el programa SAS<sup>®</sup> v.9.1.3 (SAS Intitute Inc, 2003).

**Tolerancia varietal.** Se determinó la tolerancia a *O. mangiferae* en plantas de vivero injertadas con las variedades Nam Doc Mai, Rosigold, Mallika, Ivory, Alphonse, Neelum, Fairchild, Kesar, Ataúlfo Diamante, A. Zafiro y Cotaxtla-1, de 17 meses de edad, propagadas en Huamuxtitlán, Gro. Se utilizó la técnica de inoculación más eficiente (método y concentración de inóculo) derivado de experimentos previos. Se inocularon 25 hojas/variedad en ambas superficies de la hoja, a las 18:00 h y en hojas de 8-14 días en un diseño completamente al azar con cinco repeticiones. El experimento se replicó tres veces. Las plantas inoculadas mantuvieron invernadero protegido con malla sombra. Las variables ambientales se registraron con un datalogger HOBO<sup>®</sup>. Se realizó un análisis de varianza y separación de medias (LSD, 5 %) de la Inc, Sev y PI con el programa SAS<sup>®</sup> v.9.1.3 (SAS Intitute Inc, 2003).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Diagrama de severidad y germinación de esporas.** De acuerdo con el programa utilizado (ImageJ.Ink<sup>®</sup>) que considero el diámetro y coloración de lesiones en la hoja, así como presencia o ausencia de micelio se obtuvo un diagrama de severidad de cinco clases, útil para caracterizar tolerancia en cultivares de mango (Figura 1). Una escala con estructura similar, fue documentada por Gonçalves *et al.* (2005) para evaluar la severidad de *O. tuckeri* en *Vitis vinifera*. La caseína favoreció la mayor germinación de conidios (24.8 %) y el agua la menor (20.9 %) debido a que las membranas celulares son muy delgadas y se rompen. La oscuridad favoreció la mejor germinación como señalaron Álvarez y Tores (1995).

**Técnica de inoculación.** Los tratamientos de inoculación mostraron síntomas únicamente en plantas mayores a 16 meses. El método de inoculación más efectivo en reproducir la enfermedad fue el contacto directo de tejido sano-enfermo) (PI= 10.4, Inc= 96, Sev= 4.7). La edad de la hoja que favoreció más la infección del patógeno fue de 8-14 días y la hora óptima de inoculación fue a las 18 h. Sin embargo, dado que el contacto directo ejerce una significativa mayor presión de

infección, causando patrones de daño y niveles de severidad naturalmente atípicos que afectan negativamente la estimación de tolerancia natural de la planta, como señalaron Sholberg *et al.* (2001) para cenicilla del manzano, este método se descartó. Con esta consideración, el mejor método de inoculación para evaluar tolerancia varietal fue el Tween 20® + Inex-A® (PI= 5, Inc= 90.1, Sev= 4.8). La concentración de conidios más efectiva fue de  $4.6 \times 10^5$  por mL, de agua.






Clase 1 Resistente	Clase 2 Moderadamente tolerante	Clase 3 Ligeramente tolerante	Clase 4 Susceptible	Clase 5 Muy susceptible
				
Hoja sana o con escasas manchas diminutas (<1 mm) o asociadas a reacción de hipersensibilidad.	Manchas púrpuras o rojizas, necrosadas con poco micelio y diámetro máximo de 5 mm.	Manchas rojizas a oscuras que pueden coalescer y diámetro máximo de 10 mm, se aprecia micelio blanco.	Manchas rojizas a oscuras, diámetro máximo de 15 mm, micelio abundante.	Manchas rojizas a oscuras con micelio abundante y coalescentes >15 mm, frecuentemente extendidas causando tizones

Figura 1. Diagrama de severidad para evaluar la infección de *O. mangiferae*. Hojas de mango criollo tipo Manilla.

Cuadro 1. Evaluación de tolerancia varietal en hojas de 8-14 días de edad de diez variedades de mango infectadas por *Oidium mangiferae*. Iguala, Gro. Marzo-15.

TRATAMIENTO	Periodo de incubación (ddi)	Incidencia (%)	Severidad*	# Manchas/ hoja
NAM DOC MAI	5.3 <sup>1</sup>	84	3.8	13
ROSIGOLD	6.1	86.2	3.6	14.1
NEELUM	4.6	83.1	3.4	13.9
MALLIKA	5.1	90.5	4.7	21.7
COTAXTLA	4.9	91.2	4.4	19.3
KESAR	4.2	91	4.1	15.1
FAIRCHILD	4.7	75.3	3	13.9
ALPHONSE	6.3	70.1	2.7	11.7
IVORY	4.6	93.3	4.7	27.5
A. ZAFIRO	4.8	90.8	4.3	16.3
LSD	1.1	9.3	0.9	5.8
R <sup>2</sup>	91	89	90	92

<sup>1</sup>Media de 25 hojas/tratamiento, LSD 5%. \* Valor de escala de severidad

**Tolerancia varietal.** Las variedades ligeramente tolerantes fueron: Alphonse y Fairchild; susceptibles: Ivory y Mallika (Cuadro 1). Lo cual difiere con Litz (1997) quién mencionó la susceptibilidad alta del cv. Alphonse y resistencia del cv. Mallika.

### AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT, Colegio de Postgraduados y a la Unidad Académica de Ciencias Agronómicas y Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Guerrero.

### LITERATURA CITADA

- Alvarez, B. y Tores, J. A. 1995. Ausencia de huéspedes alternativos de oídio de las cucurbitáceas en la costa oriental de Málaga. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*. 21: 185-193.
- Chadha, K. L., J. Samra and S. R. Thakur. 1980. Standardization of leaf-sampling technique for mineral composition of mango cultivar "Chausa". *Scientia Hort* 13: 323-329.
- Goncalves, R. V., Almeida, C. V. y G, M. J. D. 2005. Avaliação de resistência ao oídio em genótipo de videira. *Ciencia agrotec, Lavras*. 29. 930-934.
- Hernández, S. D y M. Á. Martínez. 2009. Procedimiento para el análisis de equilibrio parcial de las exportaciones mexicanas de mango (*Mangifera indica*) A EE. UU. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 32 (3): 251 – 256.
- Litz, R. E. 1997. *The Mango, Botany, Production and Uses*. CAB International. Wallingford. UK. 587p.
- SMN 1981-2014. Sistema Meteorológico Nacional. Disponible en: [www.siap.gob.mx/index](http://www.siap.gob.mx/index) (accesado, Agosto 2014).
- SAS Institute. 2003. *Language guide for personal computer release 9.0 Edition* SAS Institute. Cary, North Caroline, USA.
- Sholberg, P. L., Lane, W. D., Haag, P., Bedford, K. and Lashuk, L. 2001. A novel technique for evaluation of apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars for susceptibility to powdery mildew. *Canadian Journal of Plant Science*. 81: 289-296.



## RESISTENCIA DE VARIEDADES MEXICANAS DE ARROZ A *Pyricularia oryzae*

Eridani **García Vázquez**<sup>1</sup>, Guadalupe **Valdovinos Ponce**<sup>1</sup>, Emma **Zavaleta Mejía**<sup>1</sup>, Leonardo **Hernández Aragón**<sup>2</sup>, Mario **Orozco Santos**<sup>3</sup>

### INTRODUCCIÓN

*Pyricularia oryzae* es uno de los hongos más devastadores en el cultivo de arroz. Este fitopatógeno puede causar pérdidas del 100% en la producción mundial, comprometiendo el abasto de este cereal para más del 50% de la población (Liu *et al.*, 2014). El arroz, después del maíz, es el segundo cereal de mayor producción en el mundo, por lo que *P. oryzae* ha sido un tema de investigación ampliamente abordado debido a su importancia económica y agrícola.

Una de las medidas de manejo más efectiva y económica para este patógeno es el uso de variedades resistentes. Sin embargo, el hongo es altamente variable, por lo que es muy común la pérdida de resistencia, especialmente cuando está dada por un solo gen (Huang *et al.*, 2014). En este sentido, la identificación de nuevos genes de resistencia en diferentes regiones productoras de arroz juega un papel fundamental en los programas de mejoramiento y en el planteamiento de estrategias para el manejo de *P. oryzae* (Huang *et al.*, 2014).

En México, *P. oryzae* se presenta en las zonas productoras de arroz. En 1975, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) inició un proyecto de mejoramiento para la incorporación de resistencia genética al hongo; se introdujeron materiales resistentes como progenitores donadores de variedades que a la fecha tienen niveles de resistencia aceptable (Jiménez *et al.*, 2014). Sin embargo, en los principales estados productores de arroz se cultiva la variedad Milagro Filipino, la cual es susceptible a *P. oryzae*. Como variedades resistentes generadas en el INIFAP, en colaboración con otras instituciones, se tienen Morelos A-2010, Aztecas, Choca A-05, Morelos A-98, Sureste FL y Noreste FL; no obstante se desconoce el gen o genes de resistencia involucrados, por lo que el objetivo de esta investigación fue identificar estos genes en las variedades mexicanas de arroz.

<sup>1</sup> Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Campo experimental Zacatepec, Morelos.

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Campo experimental Tecomán, Colima.

Autor para correspondencia: [garcia.eridani@colpos.mx](mailto:garcia.eridani@colpos.mx)

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Obtención de material vegetal:** Se evaluaron seis variedades resistentes (Aztecas: A, Choca A-05: ChA05, Morelos A-98: MA98, Morelos A-2010: MA2010, Sureste FL: SFL y Noreste FL: NFL); una medianamente resistente (Silverio: S); una medianamente susceptible (Morelos A-92: MA92) y una variedad susceptible (Milagro Filipino: MF). Todos estos materiales se obtuvieron del banco de germoplasma del INIFAP - Campo Experimental Zacatepec. Las semillas se germinaron en cajas Petri en una cámara de ambiente controlado a 26°C y 12 horas luz. Después de la germinación, las plántulas se trasplantaron a macetas con sustrato Peat Moss y se mantuvieron en la cámara de ambiente controlado a 26°C durante 30 días.

Se mandaron a sintetizar los primers de los genes *Pib*, *Pita*, *Pikm 1*, *Pikm 2*, *Pizt*, *Pik* y *Pita*<sup>2</sup>, los cuales están reportados en la literatura como genes de resistencia a *P. oryzae* (Jia *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2006; Suh *et al.*, 2009; Costanzo y Jia, 2010; Trang *et al.*, 2012; Imam *et al.*, 2013).

**Extracción de ADN:** La obtención del ADN se hizo de tejido foliar con el Kit de extracción Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega), según las instrucciones del fabricante.

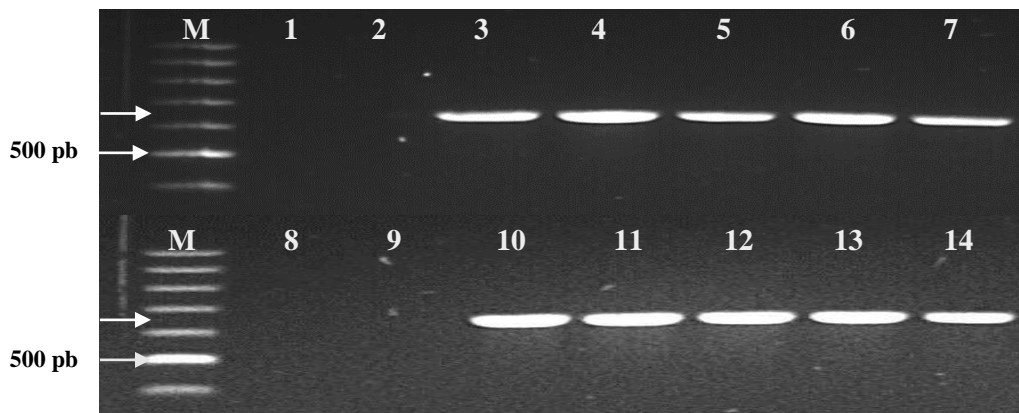
**Amplificación por PCR:** Hasta ahora se han amplificado los fragmentos de los genes *Pib*, *Pita* y *Pikm 1* en un termociclador Thermo Scientific™. Para *Pib* y *Pita* la amplificación se realizó en un volumen total de 25 µL con 40 ng de ADN, 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X de buffer de PCR, 10 pmol/µL de cada primer y 1 U de Taq polimerasa (Promega®). La amplificación se llevó a cabo según las condiciones reportadas por Jia *et al* (2002) y Suh *et al* (2009), esperando una banda de 629 y 440 pares de bases (pb), respectivamente. Para *Pikm 1*, la PCR se hizo en un volumen total de 50 µL con 100 ng de ADN, 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X de buffer de PCR, 10 pmol/µL de cada primer y 1.25 U de Taq polimerasa (Promega®). Las condiciones de amplificación se basaron en lo reportado por Costanzo y Jia (2010) y Trang *et al.* (2012), dando como resultado un fragmento de 223 pb. Los productos de las PCRs se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% a un voltaje constante de 90 V durante 2 h.

**Secuenciación y análisis:** Los productos amplificados fueron purificados y secuenciados en ambas direcciones por la empresa Macrogen. Las secuencias resultantes se analizaron con el programa BIOEDIT Sequence Alignment Editor versión 7.0.5.3 28 (Hall, 1999) y se compararon

con las secuencias reportadas en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

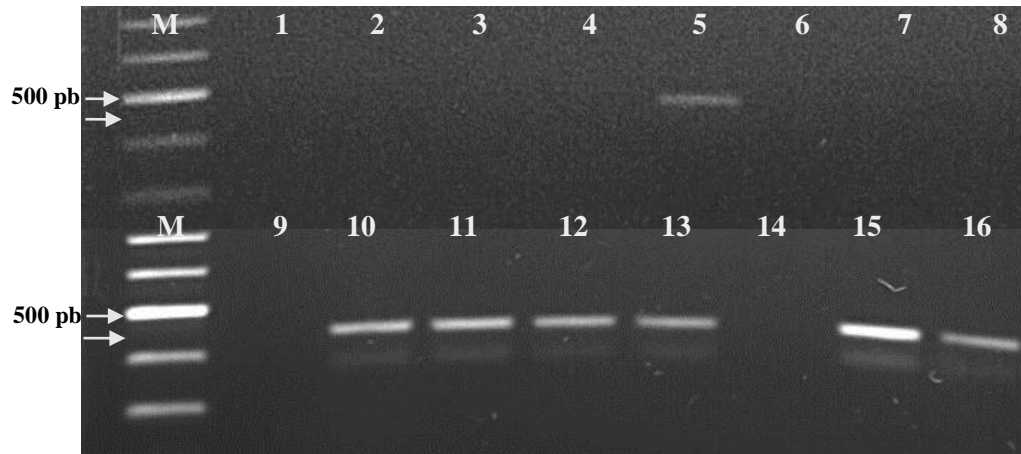
De acuerdo con los resultados de PCR, en todas las variedades resistentes los primers utilizados amplificaron el fragmento esperado para el gen *Pib* (629 pb). Sin embargo, las variedades S, MA92 y MF, las cuales son medianamente resistente, medianamente susceptible y susceptible, respectivamente, también lo presentaron (Figura 1). De acuerdo con Yokoo *et al.* (1978), *Pib* se localiza en el cromosoma 2 y es un gen de resistencia derivado del cultivar *Indica*, el cual codifica una proteína que tiene estructura NBS-LRR. Actualmente, las NBS-LRR representan la mayor familia de genes resistencia (Jiang *et al.*, 2012).



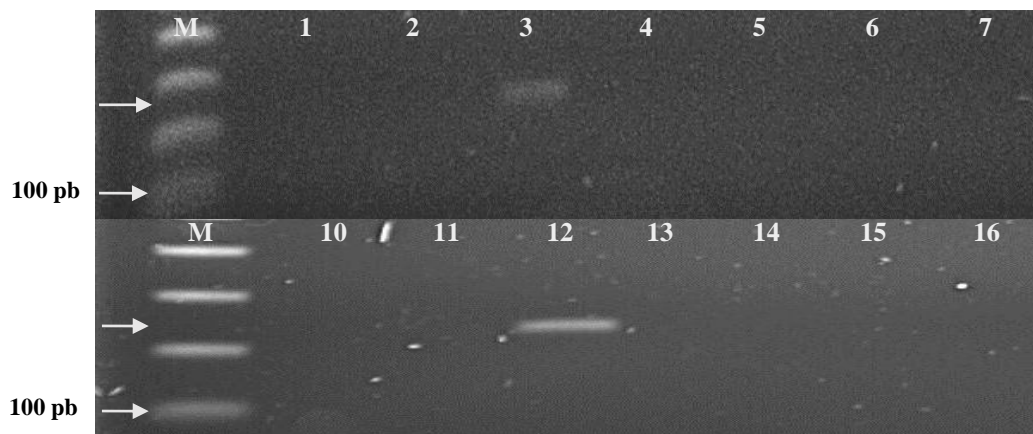
**Figura 1. Productos de PCR (629 pb) amplificados con el par de primers NSb del gen de resistencia *Pib* a partir de ADN foliar de nueve variedades de arroz. M: Marcador de peso molecular (Promega® 100 pb). Carriles 1 y 8: control negativo, carril 2 y 9: sin muestra, carril 3: SFL, carril 4: NFL, carril 5: MF, carril 6: MA98, carril 7: MA2010, carril 10: MA98, carril 11: Morelos A-92, carril 12: ChA05, carril 13: S, carril 14: A.**

El fragmento del gen de resistencia *Pita* (440pb) solo se amplificó en cuatro de las nueve variedades resistentes (A, ChA05, MA98 y MA2010) y en la variedad MA92 (Figura 2), la cual, como se indicó anteriormente, es medianamente susceptible a *P. oryzae*. Este gen se identificó también en *Indica* (Kiyosawa, 1971), se encuentra en el cromosoma 12 (Imam *et al.*, 2014) y desde entonces se utiliza en programas de mejoramiento genético (Costanzo y Jia, 2010).

El fragmento del gen *Pikm 1* se detectó en la variedad moderadamente resistente (S) y en la susceptible (MF) (Figura 3). Este gen se localiza en el cromosoma 11 y su participación en la resistencia depende de la presencia del gen de resistencia *Pikm 2*. Las plantas de arroz con solo uno de los dos genes son susceptibles a *P. oryzae* (Ashikawa *et al.*, 2008).



**Figura 2.** Productos de PCR (440 pb) amplificados con el par de primers YL153 y YL154 del gen de resistencia *Pita* a partir de ADN foliar de nueve variedades de arroz. M: Marcador de peso molecular (Promega® 100 pb). Carriles 1 y 9 control negativo; carril 2: FL, carril 3: NFL, carril 4: MF, carriles 5 y 16: control positivo (Yashiro Mochi), carril 6, 7 y 8: sin muestra, carril 10: MA92, carril 11: MA98, carril 12: MA2010, carril 13: ChA05, carril 14: S y carril 15: A.



**Figura 3.** Productos de PCR (223 pb) amplificados con el par de primers Dkm 1 del gen de resistencia *Pikm 1* a partir de ADN foliar de nueve variedades de arroz. M: Marcador de peso molecular (Promega® 100 pb). Carril 1 y 10: control negativo; carril 2: SFL, Carril 3: MF, carril 4: NFL, carril 11: MA2010, carril 12: S, carril 13: MA92, carril 14: ChA05, carril 15: MA98 y carril 16: A.

En las variedades de arroz Aztecas, Choca A-05, Morelos A-98, Morelos A-2010, Sureste FL y Noreste FL, resistentes a *P. oryzae*, se detectó al gen de resistencia *Pib* y solamente en las primeras cuatro al gen *Pita*. Sin embargo, por ahora se desconoce si en esta resistencia participan estos genes,

ya que las razas de *P. oryzae* que se localizan en los cultivos de arroz en México pueden o no poseer el correspondiente gen de avirulencia. Por otro lado, en las variedades Morelos A-92 (medianamente susceptible) y Milagro Filipino (susceptible), se encontraron los genes *Pib*, *Pita* y *Pikm 1*. La presencia de estos genes implicaría que estas variedades fueran resistentes al hongo, pero debe determinarse si las razas del patógeno que se encuentran en las zonas productoras tienen los respectivos genes de avirulencia. Si las razas poseen estos genes, entonces deberá determinarse si estos genes de avirulencia, y los de resistencia en el hospedante, son dominantes. La ausencia de algunos de los genes o su estado recesivo implicaría el desarrollo de la enfermedad en la planta, que es lo que se observa en los terrenos cultivados con Milagro Filipino. La identificación de nuevos genes de resistencia y avirulencia en las diferentes regiones productoras de arroz, juega un papel fundamental en los programas de mejoramiento y en el planteamiento de estrategias para el manejo de *P. oryzae* (Huang *et al.*, 2014), por lo que los programas de mejoramiento deben basarse en el estudio y entendimiento de la diversidad genética del patógeno y de la planta hospedante (Higuera, 2015).

### AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), al Colegio de Postgraduados y al INIFAP, Campo Experimental Zacatepec, por el apoyo brindado para realizar esta investigación.

### LITERATURA CITADA

- Ashikawa I., N. Hayashi, H. Yamane, H. Kanamori, J. Wu, T. Matsumoto, K. Ono, and M. Yano. 2008. Two adjacent nucleotide-binding site–leucine-rich repeat class genes are required to confer Pikm-specific rice blast resistance. *Genetics*. 180:2267-2276.
- Costanzo S., and Y. Jia. 2010. Sequence variation at the rice blast resistance gene Pi-km locus: implications for the development of allele specific markers. *Plant Science*. 178:523-530.
- Hall T. A. 1999. BioEdit: a userfriendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 4:95-98.
- Hayashi K., H. Yoshida, and I. Ashikawa. 2006. Development of PCR-based allele specific and InDel marker sets for nine rice blast resistance genes. *Theoretical and Applied Genetics*. 113:251-260.
- Higuera A. O. 2015. Comportamiento de progenitores de arroz (*Oryza sativa*) con potencial de resistencia durable en función de la reacción al añublo (*Magnaporthe oryzae*) bajo condiciones del piedemonte llanero. Tesis de maestría. Universidad de Colombia. 80 p.
- Huang J., W. Si, Q. Deng, P. Li, and S. Yan.g 2014. Rapid evolution of avirulence genes in rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *BMC Genetics*. 15:45.

- Imam J., S. Alam, N. P. Mandal, M. Variar, and P. Shukla. 2014. Molecular screening for identification of blast resistance genes in North East and Eastern Indian rice germplasm (*Oryza sativa* L.) with PCR based makers. *Euphytica*. 196(2): 199-211.
- Jia, Y., Z. Wang, and P. Shing. 2002. Development of dominant rice blast *Pi-ta* resistance gene markers. *Crop Science*. 42:2145-2149.
- Jiang Y., Z. Cai, W. Xie, T. Long, H. Yu, and Q. Zhang. 2012. Rice functional genomics research: Progress and implications for crop genetic improvement. *Biotechnology Advances* 30:105-1070.
- Jiménez C., J., L. López R., y E. Esqueda V. 2014. Guía para producir arroz en el estado de Tabasco. INIFAP. 36-37 pp.
- Kiyosawa S. 1971. Genetical approach to the biochemical nature of plant disease resistance. *Japan Agricultural Research Quarterly*. 6:72-80.
- Liu, W., J. Liu, L. Triplett, J. E. Leach, and G. L. Wang. 2014. Novel insights into rice innate immunity against bacterial and fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 52:213-241.
- Suh, J. P., J. H. Roh, Y. C. Cho, S. S. Han, Y. G. Kim, and K. K. Jena. 2009. The *Pi40* gene for durable resistance to rice blast and molecular analysis of Pi40-advanced backcross breeding lines. *Phytopathology*. 99:243-250.
- Trang, T. T. D., T. T. Duc, N. C. Tien, T. T. T. Ha, and T. T. B. Phuong. 2012. Identification of *Pi-km* stable blast resistance gene in some rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Annals of Biological Research*. 3(1):322-329.
- Yokoo M., F. Kikuchi, H. Fujimaki, and K. Nagai. 1978. Breeding of blast resistance lines (BL1 to 7) from indica japonica crosses of rice. *Japanese Journal Breeding*. 28:359-385.



## INCREMENTO DE FENOLES EN NOPAL VERDURA: *Salmonella* COMO INDUCTOR

S. L. De la Riva-Álvarez <sup>1</sup>, A. M. Hernández Anguiano <sup>2\*</sup>, J.E. Corrales García <sup>3</sup>, M. Soto Hernández <sup>4</sup>, J. Patel <sup>5</sup>, B. Reyes Trejo <sup>6</sup>, H. A. Zavaleta Mancera <sup>7</sup>

### INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos son moléculas que se distribuyen en toda la planta y son sintetizados para protegerse contra estrés ambiental o durante procesos infectivos y liberados a través de moléculas señal, donde se expresan en el sitio de ataque y sistémicamente a otras partes no infectadas, generando una serie de cambios fisiológicos, químicos y moleculares coordinados (Shickora *et al.*, 2008). El ácido salicílico es una de las moléculas clave de señalización que conduce a la activación de genes involucrados en la respuesta de defensa o hipersensible, RH. El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta RH a inoculaciones de cladodios con *Salmonella* (8.0 Log<sub>10</sub> UFC) y comparar dicha respuesta entre las variedades comerciales de nopal verdura Atlixco y Milpa Alta, con la determinación de cambios en la concentración del ácido salicílico y ácido jasmónico como indicadores.

### MATERIALES Y MÉTODOS

**Material biológico.** Se utilizaron plantas de las variedades “Atlixco” y “Milpa Alta”, crecidas en invernadero a 21.5°C y 51.8% de humedad relativa; y las cepas *S. typhimurium* (N4), *S. javiana* (N7), aisladas de nopal y *S. typhimurium* ATCC23564 (Sal4) como referencia.

**Inoculación in planta.** Se inocularon 20 cladodios (20 cm) por variedad, 5 por cepa y 5 por testigo con 8.0 Log<sub>10</sub> UFC de suspensión bacteriana o agua (testigo). Después de la inoculación (di) se muestreo a las 4h y posteriormente a intervalos de 24h por 96h.

<sup>1,2</sup>Fitopatología. <sup>4,7</sup>Botánica, COLPOS Campus Montecillo; <sup>3</sup>D.I.A-UACH; <sup>6</sup>Departamento de Preparatoria Agrícola, UACH; <sup>5</sup>Microbiología ambiental y Seguridad de Alimentos USDA. Maryland, Estados Unidos.

\*Autor para correspondencia: [ahernandez@colpos.mx](mailto:ahernandez@colpos.mx)



**Fenoles totales, cuantificación e identificación.** La determinación fue por el método de Folin-Ciocalteu (Slinkard, et al. 1977), la extracción con metanol al 80% y la cuantificación por espectrofotometría para identificar y cuantificar los compuestos: clorogénico, cafeico, felúrico, salicílico y jasmónico. Previamente se prepararon las curvas de calibración con soluciones estándar de ácido gálico (0.1 mg/mL-1) y de los ácidos salicílico (AS) y jasmónico (AJ) (0.02 mg/mL-1) para determinar las ecuaciones y calcular la concentración de los ácidos de interés. Todos los extractos se analizaron en un cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés) con un automuestreador y columna (Nucleosil C18, 125x4 mm), como fase móvil: A: agua pH 2.5 ajustada con ácido trifluoroacético y B: acetonitrilo a 30°C y flujo de 1 mL/min. La detección fue con un detector UV a 280nm.

**Extracción de los ácidos salicílico y jasmónico.** La extracción se hizo por el método modificado de Engelberth *et al.*, (2011). La fracción orgánica evaporada a sequedad se analizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas con un inyector modo (Splitless) de ionización química con volumen de inyección de 1 µL. La columna de separación de compuestos fue HP-1MS (30mx0.250 mmx0.25 µm). La temperatura inicial del horno fue de 60°C y se fue incrementando 7°C por min hasta alcanzar los 200°C. En ésta temperatura se mantuvo por 3 min y luego se fue incrementando 10°C por min hasta lograr los 260° C donde se mantuvo por 30 min. Se utilizó helio como gas portador con flujo constante (0.7 mL/min).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Fenoles Totales.** En presencia de *Salmonella* el contenido de fenoles fue superior al registrado en ausencia de la bacteria, en ambas variedades con la máxima concentración registrada durante las primeras 24 y 48 h di en Atlixco y Milpa Alta, respectivamente, típico de una respuesta RH (Cuadro 1). En contraste, por HPLC no se encontró una clara respuesta con la determinación de los ácidos AS y AJ.

**Cuantificación de AS y AJ.** Se identificaron 117 compuestos entre los que se encuentran terpenos, bencenoides y derivados de ácidos grasos pero no moléculas de los ácidos AS y AJ, en tejido de nopal con y sin *Salmonella* por CG-M. Sin embargo, solamente en las muestras con *Salmonella* se detectaron los intermediarios de la ruta del ácido schikímico (precursor del ácido AS) ácido 4-hidroximandélico y ácido 2,3-dihidroxibenzoico a las 6 y 24 h, respectivamente, después de la inoculación. A estos mismos tiempos se detectaron moléculas de acetato de bencilo

y salicilato de metilo, productos de la degradación de fenilpropanoides e intermediarios del AS, respectivamente (Cuadro 2).

**Cuadro 1. Contenido de fenoles totales en variedades de nopal verdura fresco en invernadero.**

Tratamiento	Tiempo h di	Atlixco	Milpa Alta
		[mg <sup>-1</sup> EAG <sup>a</sup> /mL de extracto]	
Testigo	6	2.31	3.66
Sal4		5.02	6.12
N4		3.70	7.54
N7		6.87	3.58
Testigo	24	2.15	3.34
Sal4		5.93	6.65
N4		6.67	7.39
N7		6.87	7.35
Testigo	48	4.61	4.41
Sal4		5.10	9.03
N4		4.78	7.73
N7		5.53	8.76
Testigo	72	2.57	2.07
Sal4		5.41	7.80
N4		3.03	4.64
N7		5.28	8.69
Testigo	96	2.24	2.73
Sal4		3.82	3.73
N4		1.78	7.01
N7		2.41	8.71

<sup>a</sup>EAG= Equivalente de fenoles como ácido gálico

Después de las 48 h di no se detectaron moléculas relacionadas con el AS. De acuerdo con Oskman e Inze, (2004) las plantas en condiciones naturales están en estrés permanente mientras que en cultivos controlados este es menor y no producen las cantidades de metabolitos secundarios normales. A las 72 h di se detectaron niveles significativos de etileno y éster de ácido linoleico que podrían estar relacionados con la vía del AJ. Sin embargo, el AJ generalmente se produce en bajas concentraciones y es dependiente del estado fisiológico y la etapa de desarrollo de la planta (Oskman e Inze, 2004). En plantas de *L. esculentum* y *N. tabacum* la ruta de transducción de señales dependiente de ácido jasmónico es antagónica con la del AS y su éster acetílico, ya que inhiben la expresión de genes inductores de proteasas (Li *et al.*, 2004; Wiedemann *et al.*, 2015). Lo anterior sugiere que la respuesta de defensa temprana en nopal verdura inducida por *Salmonella* podría ser dependiente de la vía del ácido salicílico.

**Tabla 2. Compuestos fenólicos en las variedades de nopal verdura Atlixco y Milpa Alta en respuesta a las cepas N4 y N7 de *Salmonella* por CG-M.**

Tiempo de retención	Nombre del compuesto	Porcentaje (%)	Grupo Químico
<b>6 h di</b>			
12.73	Fenol, 4-(2-propenil)	0.24 <sup>a</sup>	Fenilpropanoide
12.73	Ácido 4-Hidroximandélico	0.22	Fenolpropanoide
22.52	Acetato de bencilo	1.89	Bencenoide
23.89	Salicilato de metilo	3.29	Éster de ácido silícico
<b>24 h di</b>			
12.93	Isovalerato cis-3-Hexenil	0.04	Derivado de ácido graso
12.93	Ácido 2,3-dihidroxibenzoico	0.04	Fenólico
22.20	Benzoato de metilo	1.91	Bencenoide
23.24	Salicitato de metilo	3.21	Éster de ácido salicílico
<b>48 h di</b>			
12.11	6-Metoxi-3-(p-metoxifenil)-9H-p	1.37	No identificado
12.11	9H-Imidazo[1,2-a]benzimidazole	1.37	Azafentalenos
23.78	3-hexenil-butanoato	0.46	Derivado de ácido graso
24.01	Acetato de bencilo	1.89	Bencenoide
<b>72 h di</b>			
12.97	Etileno	4.56	Auxina
22.08	Eudesma-4(14),11-dieno	0.62	Terpenoide-Sesquiterpeno
32.60	Éster de Ácido etíl Linoleico	2.15	Ácido graso esterificado

<sup>a</sup>Cada valor representa el promedio entre variedades de nopal y cepas de *Salmonella*.

En presencia de *Salmonella* el contenido de compuestos fenólicos registrado en las variedades Atlixco y Milpa Alta fue de dos a tres veces superior al registrado en ausencia de la bacteria. La máxima concentración de compuestos fenólicos se registró a las 48 h di; lo anterior indica que, el nopal verdura respondió hipersensiblemente a *Salmonella*.

La detección de moléculas precursoras del ácido salicílico, ácido 4-hidroximandélico y ácido 2,3-dihidroxibenzoico, y de acetato de bencilo y salicilato de metilo, productos de la degradación de fenilpropanoides e intermediarios del AS, durante las 48 h di, puede indicar activación del mecanismo de defensa (HR) en nopal verdura a *Salmonella*.

## AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca 164965 otorgada a la primera autora.

**LITERATURA CITADA**

- Engelberth JI, Schmelz EA, Alborn HT, Cardoza YJ, Huang J, Tumlinson JH. 2003 Simultaneous quantification of jasmonic acid and salicylic acid in plants by vapor-phase extraction and gas chromatography-chemical ionization-mass spectrometry. *Anal Biochem.* Jan 15;312(2):242-50.
- Li, J. Brader, G. y T. Palva. 2004. The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *The Plant Cell.* 16: 319-331.
- Oksman-Caldentey Kirsi-Marja, Dirk Inze, and Matej Oresic. 2004 Connecting genes to metabolites by a systems biology approach. *PNAS* vol101 no.27 9949–9950, doi: 10.1073/pnas.0403636101
- Schikora A, A Carreri, E Charpentier, H Hirt. 2008. The dark side of the salad: Salmonella Typhimurium overcomes the innate immune response of Arabidopsis thaliana and shows an endopathogenic lifestyle. *PLoS One* 3: 10.137/journal.
- Slinkard, K., Singleton, VL. 1977. Análisis fenol total: Automatización y comparación con los métodos manuales. *American Journal of Viticultura y Enología.* 28: 49-55
- W. Agnés, I. Virlogeux-Payant, Anne-Marie C haussé, A. Schikora and P. Velge. 2015. Interactions of Salmonella with animals and plants. *Frontiers in Microbiology.* 5(791):1-18. [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)

## EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE LA LINEA 35-3 DE CHILE ANCHO TIPO HUACLE (*Capsicum annuum*) CON DOS POBLACIONES DE *Nacobbus aberrans*

Edgar A. **Chavarro Carrero**<sup>1</sup>, Guadalupe **Valdovinos Ponce**<sup>1</sup>, Olga **Gómez Rodríguez**<sup>1</sup>, Víctor H. **Aguilar Rincón**<sup>2</sup> y Ernestina **Valadez Moctezuma**<sup>3</sup>

### INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum annuum*) es uno de los cultivos agrícolas más importantes en México. Uno de los problemas fitosanitarios que se presenta en esta hortaliza es el causado por *Nacobbus aberrans*. El síntoma característico que induce este patógeno es el agallamiento de la raíz debido a la formación de sitios de alimentación. Como consecuencia, ocurre la desorganización estructural y fisiológica del sistema vascular (Davis *et. al.*, 2000), de tal manera que se reduce la producción del cultivo. El control de este patógeno se basa principalmente en el uso de nematicidas, los cuales tienen un impacto ambiental negativo (Zavaleta, 2011), por lo que la búsqueda y caracterización de materiales resistentes son una opción en el control de este patógeno.

En un estudio preliminar realizado en el 2012 (datos no publicados), Gómez-Rodríguez y colaboradores evaluaron colectas de chiles ancho (33-1 a 35-3) infectados artificialmente con una población de *N. aberrans* recolectada en los campos experimentales del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo (CMon). Entre los materiales que se estudiaron, la colecta 35-3 mostró ser altamente resistente al nematodo. En investigaciones independientes, Cabrera *et al* (2014), recolectaron muestras de suelo en varios municipios del estado de Michoacán y encontraron poblaciones de *N. aberrans* infectando al cultivo de jitomate, cuyas raíces presentaron los niveles poblacionales más altos de juveniles J2. Esta población de *N. aberrans*, denominada T85, aparentemente fue más agresiva que las demás, por lo que posteriormente se inoculó en plantas de jitomate (variedad Rio Grande), en donde se manifestó una respuesta similar a lo observado en campo. Con base en estos antecedentes, esta investigación tuvo como objetivo caracterizar la respuesta de la línea 35-3 de chile ancho tipo huacle a las poblaciones T85 y CMon de *N. aberrans*.

<sup>1</sup>Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

<sup>2</sup>Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad - Genética, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

<sup>3</sup>Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor para correspondencia: [chavarro.edgar@colpos.mx](mailto:chavarro.edgar@colpos.mx)

## MATERIALES Y MÉTODOS

Semillas de la línea 35-3 de chile ancho tipo huacle (ChA35-3), Criollo de Morelos 334 (CM334) susceptible y California Wonder (CW) altamente susceptible, se desinfestaron con hipoclorito de sodio al 0.5% y se enjuagaron con agua destilada estéril. Las semillas se colocaron en charolas de unicel con sustrato estéril y se incubaron a 27°C; una vez que desarrollaron la sexta hoja verdadera se trasplantaron a bolsas negras de plástico de 15 L con una mezcla de Peat Moss y agrolita (1:1).

El inóculo correspondió a los juveniles del segundo estadio (J2) de las poblaciones de *N. aberrans* T85 y CMon. T85 se obtuvo a partir de la población inicial que se recolectó en el municipio de Tanhuato en el estado de Michoacán (Cabrera *et. al.*, 2014). CMon se obtuvo de la población aislada de los campos experimentales del Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo. Las dos poblaciones se mantuvieron e incrementaron independientemente en plántulas de jitomate de la variedad Rio Grande. Las masas de huevos se extrajeron según el protocolo de Vrain (1977) y se incubaron a 28°C en cajas Petri con agua destilada estéril en oscuridad. Una vez que emergieron los J2, se preparó y ajustó la concentración del inóculo a 2000 juveniles.

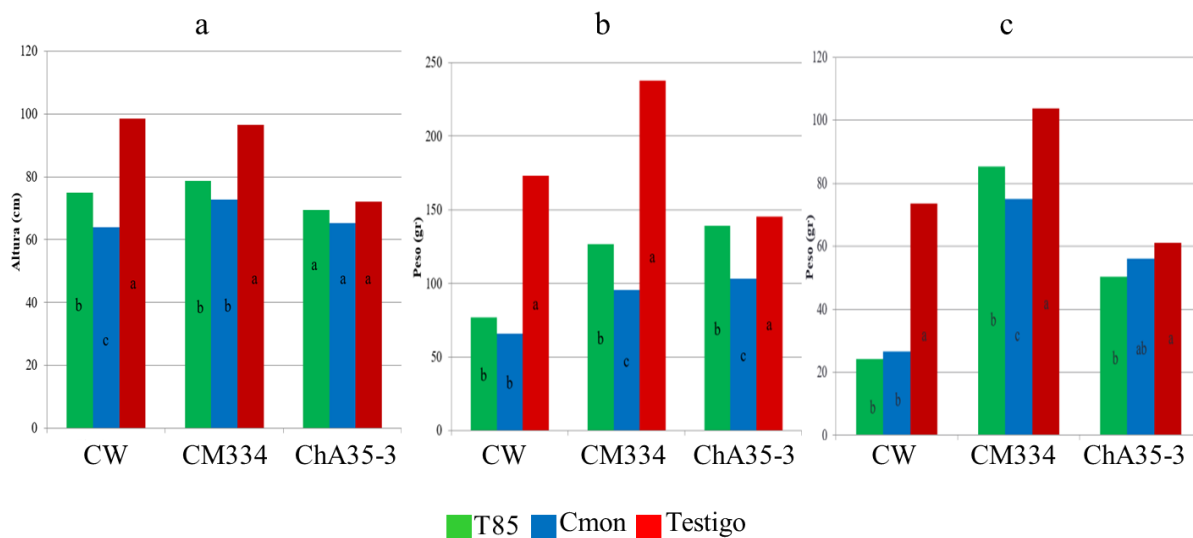
El experimento se estableció en un arreglo factorial en bloques completos al azar. Para cada variedad de chile se establecieron 3 tratamientos con tres repeticiones cada uno. El tratamiento 1 consistió de plántulas inoculadas con la población T85, el tratamiento 2 de plántulas inoculadas con la población CMon y el tratamiento 3 de plántulas no inoculadas. La inoculación se realizó independientemente en 10 plántulas de ChA35-3, CM334 y CW.

Para cada tratamiento y de manera independiente se evaluaron altura de planta (AP), peso fresco aéreo (follaje y tallos) (PFA), peso fresco de raíz (PFR), rendimiento (R), periodo de incubación (PI), número de agallas y número de masas de huevecillos (M). Las raíces se tiñeron con Floxina B (0.15 g L<sup>-1</sup> de agua) durante 20 minutos para contar las agallas y masas de huevecillos en un microscopio estereoscópico. El número de agallas se expresó como porcentaje de agallamiento (PA) según la fórmula de Townsed y Heuberger (1943). Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y prueba de Tukey (p=0.05) con el paquete estadístico SAS (2002).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Altura de planta (AP):** En las condiciones evaluadas, las variedades susceptibles (CW y CM334) sin inocular presentaron una AP mayor (superior a los 90 cm) que la línea ChA35-3, la cual no se vio afectada cuando se inoculó con T85 o CMon3 (Figura 1a). Sin embargo, en CW y CM334 la AP se redujo significativamente cuando se inoculó con las poblaciones de nematodos. Cabe señalar que aun cuando se redujo la AP en CM334, no hubo diferencias significativas cuando se inoculó con T85 o CMon3 (Figura 1a).

**Peso fres aéreo (PFA) y de raíz (PFR):** En CW, el PFA y PFR disminuyeron a más del 50 % cuando se inocularon con T85 o CMon; mientras que en CM334 la mayor pérdida en materia fresca se presentó cuando las plantas se inocularon con CMon. En la línea ChA35-3 también hubo reducción en PFA y PFR; sin embargo, las pérdidas en peso fueron mucho menores de la mitad comparado con las plantas sin inocular (Figura 1 b y c).



**Figura 1.** Efecto de dos poblaciones de *Nacobbus aberrans* (CMon y T85) sobre la altura de planta (a), peso fresco aéreo (b) y peso fresco de raíz (c) en los materiales de Chile California Wonder (CW), Criollo de Morelos 334 (CM-334) y la línea de Chile ancho tipo huacale 35-3 (ChA 35-3). Cada barra representa el promedio de las variables evaluadas en 10 plantas. Para cada variedad de Chile, las barras con letra diferente son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p=0.05$ ).

**Rendimiento (R):** Aun cuando en el Chile CW el PFA y PFR se redujeron a más de la mitad, el R se redujo en mucho menos del 50% cuando se inoculó con CMon o T85. En CM334, el rendimiento fue igual en las plantas inoculadas, pero se perdió prácticamente la mitad de lo que produjeron las plantas sin inocular (Figura 2 a). La reducción en PFA y PFR en las plantas inoculadas de ChA33-5 no afectó significativamente su rendimiento (Figura 2 a), lo cual podría



explicarse porque hubo mayor superficie fotosintética y radical para la producción de glucosa y absorción y translocación de agua y nutrientes que en las plantas susceptibles CW y MC334.

**Periodo de incubación (PI), porcentaje de agallamiento (PA) y número de masas de huevecillos (M):** El tiempo transcurrido entre el momento de la inoculación y la aparición de las primeras agallas (PI) fue menor cuando los materiales evaluados se inocularon con la población CMon; y entre estos chiles el menor PI se presentó en el material altamente susceptible CW (32 días después de la inoculación – ddi). En las plantas susceptibles (CM334) y en las aparentemente resistentes (ChA35-3), el periodo de incubación fue el mismo (39 ddi). Cuando los chiles se inocularon con la población T85, el periodo de incubación se prolongó por 6 días más en CW (38ddi), y por 4 en CM334 y ChA35-3 (42 ddi). Es posible que la población CMon sea más agresiva que T85.

Como se indicó anteriormente, el periodo de incubación fue menor en las plantas de CW, CM334 y ChA35-3 inoculadas con la población de nematodo CMon, pero el PA fue mayor en CW (88 %) seguido por CM334 (59 %) y ChA35-3 (35%) (Figura 2 b). El número promedio de M siempre fue mayor en los materiales de chile que se inocularon con CMon (CW= 90, CM334= 45 y ChA35-3= 16).

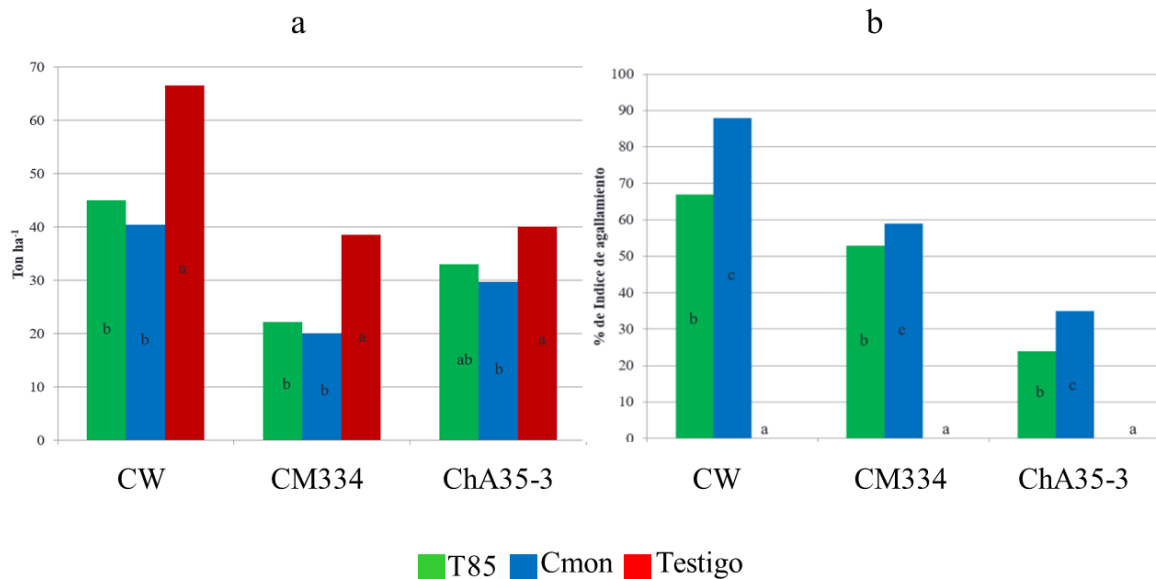


Figura 2. Efecto de dos poblaciones de *Nacobbus aberrans* (CMon y T85) sobre el rendimiento (a) y porcentaje de agallamiento (b) en los materiales de chile California Wonder (CW), Criollo de Morelos 334 (CM-334) y la línea de chile ancho tipo huacle 35-3 (ChA 35-3). Cada barra representa el promedio de las variables evaluadas en 10 plantas. Para cada variedad de chile, las barras con letra diferente son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p=0.05$ ).

Con base en los resultados obtenidos, es posible señalar que la línea de ChA35-3 es resistente a las dos poblaciones de nematodos que se evaluaron; sin embargo, la siguiente etapa en esta investigación es determinar el número total de huevecillos o larvas en las raíces de cada material y suelo en donde se establecieron los ensayos (población final), a fin de calcular un índice de reproducción y poder asignar el grado de resistencia. Dicho índice estaría dado por la población final en ChA35-3, expresado como porcentaje de la población final en CW.

Los resultados también sugieren que la población de *N. aberrans* recolectada en los campos experimentales del Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo es más agresiva que la población recolectada en el municipio de Tanhuato, Michoacán.

### AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo por el apoyo brindado para realizar esta investigación.

### LITERATURA CITADA

- Cabrera H, A. J., G. Valdovinos P., G. Mora A., A. Rebollar A., y N. Marbán M. 2014. Ocurrencia de *Nacobbus aberrans* en cultivos hortícolas del noroeste de Michoacán, México. *Nematropica*. 44: 107-117.
- Davis, E. L., R. S. Hussey, T. J. Baum, J. Bakker, y A. Schots, 2000. Nematode parasitism genes. *Annual Review of Phytopathology*. 38:365-96.
- Hadisoeganda, W. W. and J. N. Sasser. 1982. Resistance to tomato, bean, southern pea, and garden pea cultivars to root-knot nematodes based on host suitability. *Plant Disease* 66: 145-150.
- Townsend, G.R. and J. W. Heuberger. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *The Plant Diseases Report* 27: 340-343.
- Vrain T. C. 1977. A technique for the collection of larvae of *Meloidogyne* spp. and a comparison of eggs and larvae as inoculum. *Journal of Nematology* 9(3): 249-251.
- Zavaleta M. E. 2011. Especies de nematodos que dañan hortalizas. pp. 63-78 in: (ed.) Anaya. R., S. Hortalizas Plagas y Enfermedades. Trillas. México. 544 p.

## DESINFESTACIÓN DE SUELO EN INVERNADERO, PARA EL CONTROL DE *Nacobbus aberrans* (Nematoda: Pratylenchidae) MEDIANTE EL USO DE ENMIENDAS ORGÁNICAS Y REGULADORES BIOLÓGICOS

Herrera **Yáñez Ivonne**<sup>1</sup>, Ignacio Cid **del Prado Vera**<sup>1</sup>, Raquel **Alatorre Rosas**<sup>1</sup>, Mario **Pérez Grijales**<sup>2</sup>, Ignacio **Pérez Rodríguez**<sup>3</sup>.

### INTRODUCCIÓN

El jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) fue el principal producto agroalimentario de exportación de México hasta el 2013 con 70 mil hectáreas dedicadas a su siembra (SIAP 2014). El nematodo agallador *Nacobbus aberrans* es uno de los problemas fitosanitarios que limitan el cultivo del jitomate, debido a que ocasionan la perdidas de hasta el 80% de su producción e incluso propicia la muerte de la planta dependiendo del nivel de población y etapa fenológica de la planta (Cristóbal *et al.*, 2006; Cid del Pardo *et al.*, 1996; Manzanilla-López *et al.*, 2002; SAGARPA, 2013). Para el manejo de los nematodos agalladores se propone la aplicación de técnicas alternativas biológicas que fomenten la restauración de suelos e incremento de una producción orgánica. Entre estas se pretende promover el uso de enmiendas orgánicas por medio del proceso de biofumigación mediante la hidrólisis de volátiles, principalmente isotiocianatos, generados en el suelo después de la incorporación de tejidos vegetales que contienen glucosalinatos. Los cuales mejoran las propiedades físicas y químicas de suelo de tal manera que favorecen el desarrollo del cultivo y la supresión de plagas y enfermedades.

El hongo saprófito *Pochonia chlamydosporia* es un agente de control biológico de nematodos que parasita el embrión del nematodo y previene su eclosión: Dicho hongo tiene además la capacidad de colonizar las raíces sin afectar a la planta. La adición de compuestos orgánicos como la quitina, genera un efecto nematicida por la producción de compuestos durante la degradación de materiales nitrogenados, favoreciendo la activación de la biomasa microbiana e induciendo o inhibiendo diferentes actividades bioquímicas durante la interacción de la planta-patógeno mejorando la tolerancia a una amplia variedad de fitopatógenos (Ramírez *et al.*, 2010; Bello *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2011; Manzanilla *et al.*, 2002; Mahmood, 1996, Gimsing *et al.*, 2009).

<sup>1</sup>Fitopatología, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. 56230. Km. 36.5. Carretera México-Texcoco. Montecillo, Estado de México.

<sup>2</sup> Universidad Autónoma de Chapingo. Depto. Hortalizas.

Autor para correspondencia: [.ivonneherrera@outlook.com](mailto:ivonneherrera@outlook.com)

Por lo anterior, el presente trabajo evaluó el efecto de incorporación individual y conjunta de enmiendas orgánicas mediante el proceso de biofumigación y agentes de control biológico como la quitina y *P. chlamydosporia* en la regulación de poblaciones de *N. aberrans*, para el cultivo de jitomate en condiciones de invernadero.

## MATERIALES Y METODOS

**Fase de laboratorio.** Se colectó suelo de la localidad de Coatlinchan, Municipio de Texcoco Estado de México. El hongo *P. chlamydosporia* se identificó morfológicamente por su crecimiento micelial blanco algodonoso característico, la disposición de conidióforos y la presencia de dictioclamidosporas, (Zem, Gams y Evans, 2001). Se determinaron las características de crecimiento y esporulación en fase líquida en tubos de ensaye con Caldo Sabouraud Dextrosa (SDC) esterilizado a 12 lb/20min. En cada tubo de ensaye se introdujo un disco de PDA con crecimiento micelial de 21 días de *P. chlamydosporia* ( $7 \times 10^6 \pm 2.27$  UFC/ml) colocándolos en un agitador orbital (110 rpm). Se determinó la curva de crecimiento mediante la toma de muestras de biomasa (esporas, fragmentos micelio, blastoesporas) cada 12 h, se realizó el conteo de conidios presentes en los tubos por un periodo de 8 días. El conteo se realizó con una cámara Neubauer. En la evaluación de crecimiento bifásico se usaron matraces de 250ml con sustrato de arroz y maíz (50g) de acuerdo a los descrito por Pérez *et al.* (2010) después de 24h se le colocaron 100 y 200µl de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y ácido láctico, estos fueron inoculados con 6ml del hongo ( $3.81 \times 10^8 \pm 1.7$  UFC/ml) en ambos sustratos se contó con 3 repeticiones más el testigo. La producción masiva del hongo se realizó bajo la metodología antes descrita usando bolsas de polipapel con 250g de maíz, inoculadas con 30ml ( $1.7 \times 10^9 \pm 1.16$  UFC±/ml) del hongo.

**Parasitismo de *P. chlamydosporia*.** De las raíces con agallas, fueron obtenidas masas de huevecillos de *N. aberrans* según la metodología de Flores, 2003 y Velasco, 2011, con la finalidad de evaluar el parasitismo en huevecillos con *P. chlamydosporia* previamente esterilizados y colocados en placas de agar-agua (1%) con Amikacina 500mg/1L. En cada placa se colocaron 200 huevecillos y se inocularon con 10µl de una suspensión de conidios ( $6.35 \times 10^5 \pm 1.7$  UFC/ml). Las placas fueron incubadas a 28°C en completa oscuridad y la infección por los hongos fue evaluada diariamente por un periodo de cuatro días. Los huevos con presencia del hongo fueron considerados como infectados.

**Quitina inhibidor de la eclosión de huevecillos.** Se utilizó el producto comercial concentrado en polvo (HYTC BioQuitina®), en placas de cultivo estéril de 12 pozos (Corning New York®) se colocaron 200 huevecillos de *N.aberrans* en 100µl de agua destilada, con 9 repeticiones. A cada pozo se le colocó 1.5ml de quitina de una solución stock según lo citado por Sánchez, (2010). Siguiendo la metodología antes mencionada s, se utilizó una suspensión de 10µl de *P.chlamydosporia* para probar el efecto del hongo en contacto con la quitina. Se realizaron observaciones de 6, 12 y 24hrs. Evaluando huevos sin degradación, con eclosión y huevos con degradación en el corión, sin eclosión.

**Fase en invernadero.** El presente trabajo fue realizado en invernaderos de la localidad de San Diego, Municipio. Texcoco, Edo. México. Fueron ocupados dos invernaderos de 1200 m<sup>2</sup>, donde a plantas de jitomate en la nave 1 presentaron problemas de agallamiento en el ciclo 2014 y en la nave 2 se presentó la misma situación en el ciclo 2013. Al término del ciclo de cultivo 2014 fue realizado un muestreo sistemático en suelo en ambos invernaderos, con la finalidad de determinar la existencia de las poblaciones de nematodos y confirmar la presencia de *N. aberrans* (como hembras juveniles y maduras en raíces). Se realizó un estudio fisicoquímico de suelo antes y después de la aplicación del tratamiento de Biofumigación, en cada muestra se determinó: potencial de hidrogeno (pH), materia orgánica, conductividad eléctrica y determinación total de macro y micro elementos en el Departamento de Edafología del CP. También se realizó un muestreo de raíces con agallamiento con las cuales fue elaborada en base a Sikora and Brigend, (1990) una escala de severidad, esta escala se utilizó durante el transcurso del proyecto.

Se estableció un diseño experimental completamente al azar que consistió de 8 tratamientos (Fig.1): Biofumigación + HYTC BioQuitina® en polvo + *P.chlamydosporia*, **Biofumigación + HYTC BioQuitina® en polvo**, Biofumigación + *P.chlamydosporia*, **Biofumigación, P.chlamydosporia, HYTC BioQuitina® en polvo**, un control químico (Vydate®) y Testigo. Dichos invernaderos comprenden un total de 39 surcos, cada surco representa una unidad experimental con 5 repeticiones. Mensualmente se evaluaron 3 plántulas de cada tratamiento considerando: Peso fresco y seco (follaje y raíz) e índice de agallamiento (IA). La aplicación de tratamientos fue la siguiente: En el caso de la biofumigación la dosis aplicada fue de 3.9t de brócoli y 2t de estiércol para 1305 m<sup>2</sup> en la nave 2, mientras que para la nave 1 fue de 2.5t de brócoli y 1.5t de estiércol para 765m<sup>2</sup>, se aplicó riego a capacidad de campo y después de la mezcla se cubrió

con plástico transparente (calibre 7); La aplicación de *P.chlamydosporia* consistió en la aplicación mensual de 30ml del hongo ( $2.6 \times 10^9 \pm 1.8$  UFC/ml) por tallo de la planta; La HYTC BioQuitina® en polvo fue aplicada considerando lo recomendado por la etiqueta del producto siendo 1kg por 382m<sup>2</sup>; el control químico Vydate® se aplicó en sistema de riego por goteo, en una dosis según lo recomendado por el producto que consistió en 570ml por 638m<sup>2</sup> de superficie.

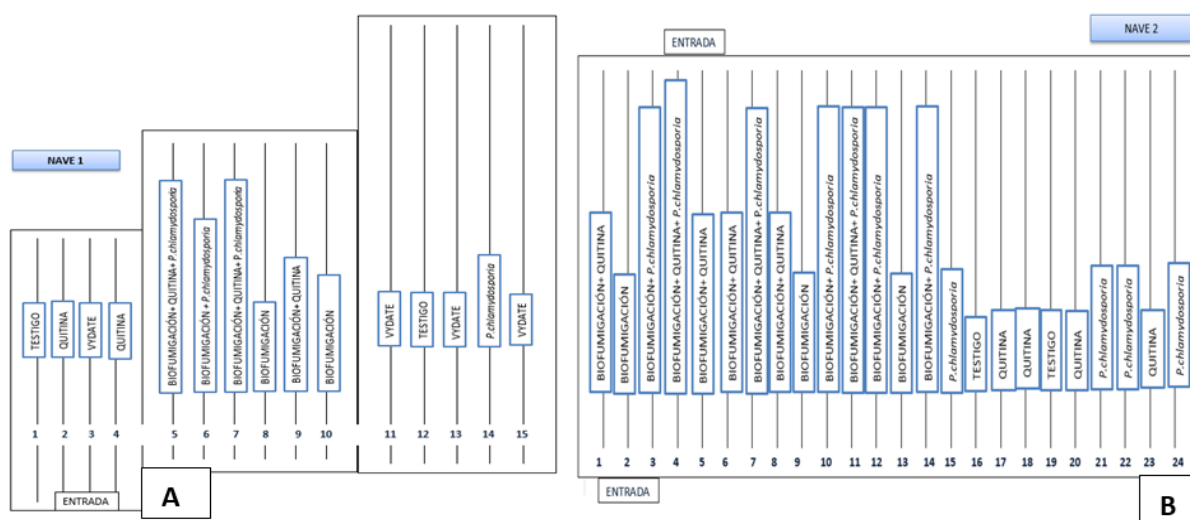
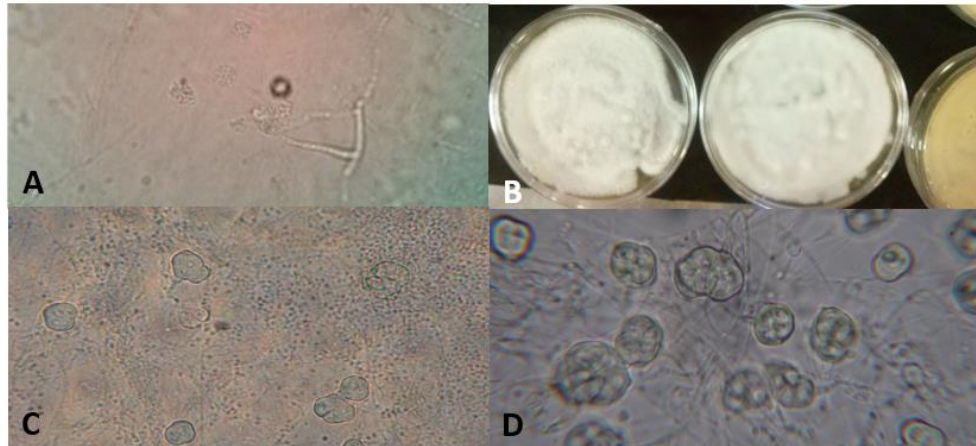


Fig.1. Diseño experimental completamente al azar en la Localidad de San Diego, Texcoco; A) La nave 1 comprende de 24 surcos, B) Mientras que la Nave 2 comprende de 24 surcos.

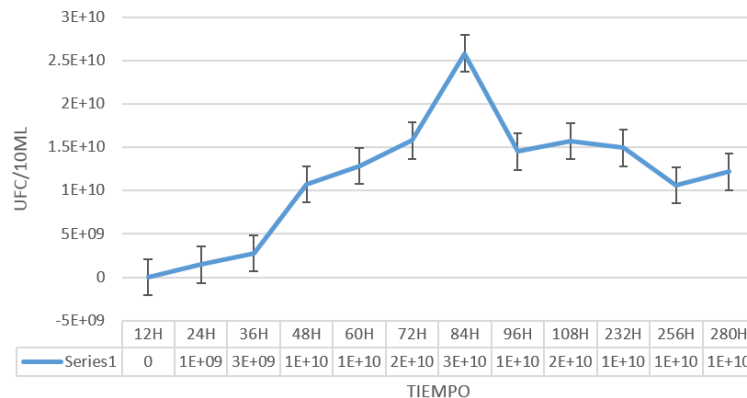
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

**Fase en laboratorio.** Se obtuvo un aislamiento nativo de *P. chlamydosporia* de la localidad de Coatlinchan, Texcoco Estado de México, proveniente de masa de huevecillos de *N. aberrans*. Después de 10 días de incubación en medio PDA (Papa Dextrosa Agar) a 26°C se observaron colonias de color blanco, observándose bajo microscopio estructuras de conidios solitarios en fiálides además de un micelio verticilado. Su crecimiento esponjoso de color blanco con el tiempo adquirió una tonalidad marrón crema y a su reverso una tonalidad amarilla, (**Fig.2B**) (Gams et al., 2001). A los 14 días de crecimiento en el medio de cultivo se observó una abundante cantidad de dictioclamidosporas (**Fig.2C y D**) con paredes gruesas, pecioladas, además de micelio aéreo con fiálides en verticilos. Presenta conidias elipsoidales con paredes delgadas y lisas, dispuestas en conidióforos simples, indicando que se trataba de la variedad *Chlamydosporia* (**Fig.2A**). (Gams et al 2001; Kerry and Bourne 2010).

**Curva de crecimiento de *P.chlamydosporia*.** Se observó un incremento en la formación de esporas, alcanzando un pico de  $2.58 \times 10^{10}$  UFC/ml  $\pm 4.5$  a las 84h, posterior a esta fecha hubo una pequeña declinación estabilizándose la producción de esporas (**Fig. 3 y 4**). La obtención de UFC en fermentación líquida permite considerar el incremento del hongo en tiempos cortos, para posteriormente pasarlos a sustratos sólidos (FS), con lo que se asegura la producción de dictioclamidosporas.



**Fig.2.** A) *P.chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. A) Conidias elipsoidales dispuestas en conidióforos simples B) Colonias crecimiento esponjoso de color blanco. C y D) Dictioclamidosporas, aislamiento Coatlinchan observados en un microscopio óptico (40x).



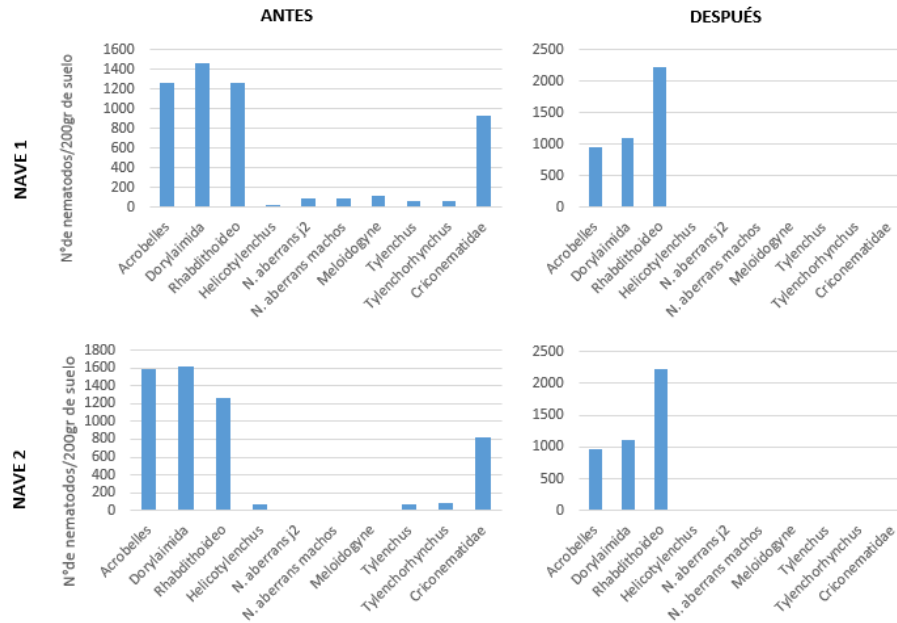
**Fig.3** .Determinación de la curva de crecimiento de *P.chlamydosporia*, en tubos de ensaye con SDC, donde se observó un pico de producción al tercer día.



Repeticiones	Tiempo											
	12H						24H					
	12Hr	24H	36H	48H	60H	72H	84H	96H	108H	232H	256H	280H
1	0	4	9	16	36	26	33	41	28	17	23	25
2	0	3	10	18	26	34	43	23	22	29	17	27
3	0	3	7	25	21	49	69	34	41	40	21	20
4	0	1	4	30	21	20	49	40	34	26	25	23
5	0	4	6	13	32	28	43	21	27	33	12	19
1	0	3	4	26	23	27	67	31	22	32	17	22
2	0	1	3	25	22	32	49	18	24	39	17	37
3	0	3	5	22	24	37	53	24	60	30	26	35
4	0	3	3	20	21	21	54	38	23	22	30	18
5	0	4	4	20	31	41	56	20	33	30	24	17
MEDIA	0	2.9	5.5	21.5	25.7	31.5	51.6	29	31.4	29.8	21.2	24.3
UFC/mL	0	145000000	275000000	1075000000	1285000000	1575000000	2580000000	1450000000	1570000000	1490000000	1060000000	1215000000
10ml	0	1450000000	2750000000	1.075E+10	1.285E+10	1.575E+10	2.58E+10	1.45E+10	1.57E+10	1.49E+10	1.06E+10	1.215E+10

**Fig.4. Tabla de conteo para la determinación de la curva de crecimiento de *P.chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. , en tubos de ensaye con SDC, donde se observó un pico de producción a las 84h.**

**Fase en invernadero.** Después de la aplicación de los tratamientos se observó mayor presencia de nematodos fitopatógenos con poblaciones de *N.aberrans* (J2) mas abundante en la Nave 1 con 88 J2 y 84 adultos, respecto a la Nave 2 que no se observo presencia de *N.aberrans* (Figura 4).



**Fig.4 Efecto del tratamiento de Biofumigación en poblaciones de *N.aberrans* (J2) y de otros nematodos fitopatógenos.**

## AGRADECIMIENTOS.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo financiero para mis estudios y al Colegio de Postgraduados.

## LITERATURA CITADA

- Bello, A. y otros, 2010. Biodesinfestacion de suelos. Sociedad Española de Agricultura Ecológica (SEAE). Ministerio de medio ambiente, Medio rural y marino, Madrid.
- Castro, L., Flores, L. & Uribe, L., 2001. Efecto de vermicomposta y quitina sobre el control de *Meloidogyne incognita* en tomate a nivel de invernadero. *Agronomía costarricense*, 35(2), pp. 21-32.
- Cid del Parado VI, Evans K, Manzanilla L.R., Cristóbal A J, Franco NF.1996.Estarategias para el manejo de *Nacobbus aberrans* asociado al cultivo de tomate (*Lycopersicon esculatum* Mill) .Revista Mexicana de Fitopatología (resumen).Congreso Nacional de Fitopatología. Guadalajara, Jalisco.p.175.

- Cristóbal-Alejo J, Mora-Aguilera G, Manzanilla-López R, Marban-Mendoza N, Sánchez –García P, Cid del Prado V I, Evans K.2006. Epidemiología y control integrado de *Nacobbus aberrans* de tomate en México. *Nematology* 8:727-723.
- Franco-Navarro F., 2002. Incorporación de residuos de col (*Ricinus comunis* L.) para el manejo de *Nacobbus aberrans* y su impacto en la nutrición de tomate. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.
- Gamms, W. 1988. A Contribution to the Knowledge of nematophagous species of *Verticillium*. *Neth.J.Pl.Path.*94: 123-148.
- Kerry BR. Bourner JM. 2002. Un manual para la investigación sobre *Verticillium chlamydosporia*, un agente de control biológico potencial para los nematodos agalladores. IOBC/WPRS, University of Gent.
- Mahmood, Z. A. S. a. I., 1996. BIOLOGICAL CONTROL OF PLANT PARASITIC NEMATODES BY FUNGI: A REVIEW. *Bioresource Tvhnology*, Volumen 58, pp. 229-239.
- Manzanilla L.R.H., C. M. A., Doucet M., Franco J., Inserra R.N., Cid del Prado V.I., Y EVANS K. 2002. El género *Nacobbus* Thorne y Allen, 1994 (Nematoda: Pratylenchidae): Sistemática, distribución, biología y manejo. *Neotropical*, 32, 49-227.
- Pérez, R.I. 2004. Eficiencia de cinco aislamientos del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* Godard para el control de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne and Allen 1944, en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Tesis de licenciatura. ITA 29. Tlaxcala. 64 p.
- Pérez, R.I; Franco N.F; Cid Del Prado y Zavaleta MF. 2010. Control de *Nacobbus aberrans* en chile ancho (*Capsicum annum* L.) mediante el uso combinado de enmiendas orgánicas, hongos nematófagos y nematicidas. *Nematropica* 41: 122-129.
- Ramírez, M., Rodríguez, A. & Peniche, D., 2010. La quitina y sus derivados, biopolímeros con potencialidades de aplicaciones agrícola. *Biotecnología aplicada.*, Volumen 4
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2014.
- SAGARPA, 2013. Estudio de Oportunidades de Mercado e Inteligencia Comercial y estudio delogísticadejitomate.[http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios\\_promercado/TOMATE.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/TOMATE.pdf).consulta: Septiembre 26,2013.
- Velasco A.R. 2014. Actividad de doce especies vegetales del estado de Oaxaca contra *N. aberrans*. Universidad del Mar. Campus Puerto Ángel. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Ambientales.89p.

## GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A LA PATA PRIETA (*Phytophthora parasitica*) EN JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa*)

Rafael **Rojas Rojas**<sup>1</sup>, Carlos **De León-García de Alba**<sup>1</sup>, Víctor H. **Aguilar Rincon**<sup>2</sup>, Javier **Hernández Morales**<sup>1</sup>, Ernestina **Valadez Moctezuma**<sup>3</sup>, Ciro **VelascoCruz**<sup>4</sup>.

### INTRODUCCIÓN

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) es una planta anual originaria de Africa Oriental, susceptible a *Phytophthora parasitica* que causa la pudrición del tallo conocida como “pata prieta” (Amusa *et al.*, 2005). Los síntomas son amarillamiento, necrosis en la base del tallo, marchitez de las hojas y muerte rápida de la planta (Escalante *et al.*, 2001).

En algunos programas de mejoramiento se incluyen caracteres relacionados con resistencia genética a enfermedades como un método económico de control para disminuir pérdidas de rendimiento y reducir costos de producción. Existen técnicas como los diseños dialélicos que permiten conocer la naturaleza de la acción de genes implicados en la determinación de los caracteres cuantitativos (Gardner y Eberhart, 1966), otro método que puede ayudar a la selección son los ISSR´s usados para encontrar marcadores ligados al gen de interés que ayuden a la selección asistida por marcadores (MAS), debido a que pueden ser secuencias de un gen cuya herencia es factible de detección en la progenie (Jimenez-Galindo *et al.*, 2009) como el marcador UBC-855, ligado al gen que confiere resistencia a *Fusarium* sp. en garbanzo (Ratnaparkhe *et al.*, 1998). En México no se ha determinado si existen variedades de jamaica resistentes a *P. parasitica* y tampoco se tiene información de la importancia del componente genético en la expresión del carácter. El objetivo del presente trabajo es evaluar la resistencia genética de variedades de jamaica a *Phytophthora parasitica*, determinar la genética de la resistencia y analizar con marcadores de ADN el polimorfismo relacionado con resistencia.

<sup>1</sup>Fitopatología, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. 56230. Km. 36.5. Carretera México-Texcoco. Montecillo, Estado de México. <sup>2</sup>Genética, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. <sup>3</sup>Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo, Estado de México. <sup>4</sup>Estadística, Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados.

Autor para correspondencia: [rojas.rafael@colpos.mx](mailto:rojas.rafael@colpos.mx)

## MATERIALES Y MÉTODOS

El material genético utilizado en este trabajo fueron ocho variedades progenitoras (cuatro resistentes y cuatro susceptibles a la enfermedad) evaluadas en 2014. Las plantas fueron establecidas en suelo estéril en invernadero durante primavera de 2015 en Montecillo, México.

**Genética de la resistencia.** Para el estudio de los parámetros genéticos se planteó la formación de un diseño dialélico. La siembra fue directa y se establecieron 10 plantas de cada progenitor. Para obtener la F1 se realizaron todas las cruzas directas posibles en dialélico. Las cruzas se realizaron en fase de botón floral emasculando por la tarde y realizando la polinización el día siguiente. Las semillas se cosecharon 50 días después de la polinización. Con las cruzas de la generación F1 se evaluará la resistencia de cruzas y progenitores. Para el análisis de la herencia de la resistencia. A partir de la F1 se avanzará a F2 a través de autofecundaciones de las plantas para observar el tipo de segregación.

**Análisis molecular.** Como material vegetal se usaron plántulas de ocho progenitores y 28 plantas F1 generadas de las cruzas dialélicas. La extracción de ADN se realizó de hojas por el método SDS-acetato de potasio (Weising *et al.* 2005). Para la selección de los marcadores se probaron 100 iniciadores de la Universidad de British Columbia (UBC Primer set no. 9) en un progenitor susceptible y otro resistente a *Phytophthora parasitica* y se seleccionaron aquellos que presentaron mayor polimorfismo. Las condiciones para la amplificación fueron las descritas por Nagaoka y Ogihara (1997), excepto la temperatura de alineamiento. Los productos de PCR fueron analizados en geles de acrilamida 6% (Sambook *et al.*, 1989).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Genética de la resistencia.** Se obtuvo semilla F1 de cada una de las cruzas del diseño dialélico y se obtuvo la generación F2. Se usarán 120 plantas de cada familia F2 para realizar el estudio de la herencia y los parámetros genéticos.

**Análisis molecular.** Se seleccionaron 10 iniciadores ISSR que generaron mayor polimorfismo (Cuadro 1.) en las variedades progenitoras, UAN-8 con reacción resistente y 3-Q-3 susceptible. Se seleccionó la temperatura óptima de alineamiento para cada iniciador y

el tiempo de corrida del gel de acrilamida para la visualización de los productos de PCR se ajustó a 80 minutos.

**Cuadro 1. Secuencia de nucleótidos de 10 ISSR seleccionados y temperatura de alineamiento.**

Primer no.	Secuencia (5'-3') <sup>a</sup>	Temperatura de alineamiento (°C)
UBC-826	ACACACACACACACACC	54
UBC-827	ACACACACACACACACG	54
UBC-834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	56
UBC-836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	54
UBC-837	TATATATATATATART	40
UBC-842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	54
UBC-864	ATGATGATGATGATGATG	48
UBC-874	CCCTCCCTCCCT	56
UBC-890	HVHGTGTGTGTGTGTGT	50
UBC-891	HVHTGTGTGTGTGTGTG	51.5

<sup>a</sup>**R=A+G, H=A+T+C, V= G+A+C, Y=C+T**

### CONCLUSIONES

Se cuenta con semilla de los progenitores, las generaciones F1 y F2 para el estudio de la herencia y los parámetros genéticos.

Los iniciadores ISSR seleccionados fueron UBC-826, UBC-827, UBC-834, UBC-836, UBC-837, UBC-842, UBC-864, UBC-874, UBC-890 y UBC-891.

### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico durante la realización de éste estudio. Se agradecen los apoyos recibidos por parte de proyecto CONACYT-SAGARPA-163972 “Validación de variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) con alta concentración de bioactivos, alto rendimiento y tolerantes a

enfermedades, determinación de plagas y enfermedades e innovación de la maquinaria agrícola para una producción sustentable”

### LITERATURA CITADA

- Amusa, N. A., Adegbite, A. A., and Oladapo, M. O. 2005. Vascular wilt of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) in the humid forest region of Southwestern Nigeria. *Plant Pathol. J.* 4:122-125.
- Gardner, C. O., and S. A. Eberhart. 1966. Analysis and interpretation of the variety cross diallel and related populations. *Biometrics* 22: 439-452.
- Jimenez-Galindo, J. C., E. Valadez-Moctezuma, y N. Marban-Mendoza. 2010. Evaluación y caracterización de *Phaseolus* spp. como fuente de resistencia a *Fusarium oxysporum* f sp. *phaseoli* (Fop). *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 16:99-105.
- Nagaoka T, and Y. Ogihara. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 94:597-602.
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolff, and G. Kahl. 2005. DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications, 2nd ed. Boca Raton: CRC Press. 472 pp.
- Ratnaparkhe, M.B., M. Tekeoglu, and F.J. Muehlbauer, 1998. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theor. Appl. Genet.* 97: 515-519.
- Sambrook, J., E. F. Fritch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Second edition. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY, USA. 18.51-18.57 pp.



## AVANCES EN EL ESTUDIO DE LA SECADERA DE PINO Y APLICACIÓN DE *Trichoderma harzianum* EN TRES SUSTRATOS

Silvia E. **García Díaz**<sup>1</sup>, Dionicio **Alvarado Rosales**<sup>1</sup>, David **Cibrián Tovar**<sup>2</sup>, José T. **Méndez Montiel**<sup>2</sup>, Arnulfo **Aldrete**<sup>1</sup>, Guadalupe **Valdovinos Ponce**<sup>1</sup> y Armando **Equihua Martínez**<sup>1</sup>.

### INTRODUCCIÓN

En México, la producción de especies forestales, se realiza en contenedores utilizando principalmente como medio de crecimiento la turba (peat moss), agrolita y vermiculita que se conoce como mezcla estándar; una desventaja de esta mezcla es su alto costo de producción en plantas de vivero y por su alto contenido de materia orgánica y humedad es favorable al daño por *Fusarium* spp. Hernández (2014), señala que el aserrín y la corteza de pino son desechos de la industria forestal que pueden ser utilizados como sustratos.

La enfermedad de la secadera en pino causada por *Fusarium* spp. ha sido una limitante en la calidad de la planta, ocasionando pérdidas de hasta un 40% en su producción (García *et al.*, 2007). Una alternativa que se ha utilizado para su control es la aplicación de *Trichoderma harzianum* en los viveros forestales. Se desconoce la respuesta de *Fusarium* spp. en los diferentes tipos de sustratos y por ende se planteó, identificar morfo y molecularmente la especie de *Fusarium* spp. que causa la secadera y pudrición de raíz en *Pinus gerrgii* Engelm, evaluar la germinación y patogenicidad en tres sustratos para el manejo de *Fusarium* sp. y determinar la respuesta de la aplicación de *Trichoderma harzianum*.

<sup>1</sup>Fitosanidad. Colegio de Postgraduados campus Montecillos. Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Edo., de México, C.P. 56230, Texcoco, Edo. De México.

<sup>2</sup> División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Km 38.5 Chapingo, Edo. De México C.P. 56230. Texcoco, Edo. De México.

Autor de correspondencia: [silvia.garcia@colpos.mx](mailto:silvia.garcia@colpos.mx).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Colecta de material enfermo e Identificación morfo y molecular del hongo.** Se realizó la colecta de material enfermo de *Pinus greggii* en el vivero Forestal Militar de Atlangatepec, Tlaxcala. Se llevaron al laboratorio del Colegio de Postgraduados para su análisis y obtener la cepa pura, monoconidial del hongo de *Fusarium* sp. La identificación morfológica se realizó con mediciones de conidios, circinas, color de la colonia. Con lo que respecta a la parte molecular, se realizó extracción de DNA con el kit comercial DNeasy Plant mini kit (Quick-Start Protocol. QIAGEN), se obtuvo 100 µl de ADN en solución, se hizo la PCR y fueron enviados a Seúl, Corea, para su secuenciación en Macrogen.

**Área de estudio.** El experimento se llevó a cabo en los invernaderos de la División de Ciencias Forestales (DiCiFo), Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México.

**Preparación de sustratos y siembra de semilla.** Las mezclas de sustratos fueron: S1- peat moss, agrolita y vermiculita (PM+Ag+V), S2- aserrín, corteza y peat moss (As+Corteza+PM), y el S3- corteza, aserrín y peat moss (C+As+PM); en proporciones de 60:20:20 respectivamente (Hernández, 2014). Se agregó a las mezclas de cada sustrato fertilizante de lenta liberación Osmocote Plus® (15-9-12), con tiempo de liberación de 8 a 9 meses, en dosis de 7 gr por litro de sustrato. Se utilizaron tubetes de 174 ml y charolas de 42 cavidades. La semilla utilizada es de *Pinus greggii* de Pueblo Nuevo, Puebla. La siembra se realizó el 13 de febrero de 2015. La germinación inició el 11 de marzo y terminó el 13 de abril de 2015. Se realizó la evaluación hasta los cinco meses de edad de la planta. El riego fue diario al inicio durante la germinación, posteriormente cada tercer día.

**Inoculación del patógeno *Fusarium* sp y el hongo antagonista *Trichoderma harzianum*.** Para la inoculación de *Fusarium* sp. (F), se tomaron tres cepas de hongo desarrolladas en caja Petri, se molieron en la licuadora con 300 ml de agua destilada estéril y se impregnó la semilla con el hongo a una concentración de  $7.9 \times 10^4$  esporas por ml. Se realizaron tres aplicaciones de *Trichoderma harzianum* (Th) con una dosis de 3.4 g por litro, la primera se impregnó la semilla bajo un remojo de 24 horas, la segunda al mes y la tercera a los tres meses de edad de la planta. Se tomaron 20 plántulas por repetición, con cuatro repeticiones, son 80 plantas por tratamiento dando un total de 960 plántulas.

**Diseño experimental y análisis estadístico.** El diseño experimental fue completamente al azar con 12 tratamientos (3x2x2) tres sustratos con y sin *Fusarium*, con y sin *Trichoderma*, con cuatro repeticiones; cada repetición fue una charola y se tomaron solamente las 20 plantas del centro, se utilizó el procedimiento Mixto de SAS, versión 9.0 (SAS Institute, 2002) y la comparación de medias se hizo con la prueba de Tukey. Para evaluar la variable germinación se obtuvo el porcentaje y se transformaron los datos en  $\sqrt{\text{arccoseno}}$ . Para el porcentaje de plantas enfermas por *Fusarium* sp., se tomaron los datos semanalmente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Sintomatología y patogenicidad.** La sintomatología observada, en la etapa de cerillo, se manifestó con un estrangulamiento en la punta de la planta, de forma que se veía chupada o seca de la parte de arriba, la plántula moría a la semana. Una vez desarrollada la planta presentó caída del brote principal y decoloración de acículas de amarillo a color rojizo con pudrición de raíz. Lo cual coincide con los síntomas descritos por Herrón (2015), donde señala que las plántulas de un año de edad presentan caída del brote terminal y decoloración de acículas. Se aislaron 264 cepas de *Fusarium* de los tratamientos.

**Identificación morfo y molecular.** El hongo se identificó como *Fusarium circinatum* de acuerdo a los microconidios sin septos, que miden 8x3.5  $\mu\text{m}$ , de forma oval, aislados o en falsas cabezas, que surgen de monofiálides y polifiálides, desarrollan circinas (hifas estériles tabicadas y curvadas que tienden a enroscarse) en medio MSA, ausencia de clamidosporas, los macroconidios miden 35x4  $\mu\text{m}$ . Estas características concuerdan con las reportadas por Leslie *et al.*, (2006). La identificación molecular coincide con lo reportado por Kvas *et al.*, (2009) que con su estudio filogenético lo ubica en el clado de América. La cepa se depositó en el banco de genes con clave de acceso (en proceso).

**Inoculación en semilla de *Fusarium circinatum* y *Trichoderma harzianum* en germinación y planta.** Mediante el análisis estadístico de la germinación de semilla, se obtuvo que al aplicar un tratamiento con *Trichoderma harzianum* y *Fusarium circinatum* tiene un efecto directo, ya que disminuye el número de semillas germinadas independientemente del sustrato, como se muestra en el cuadro 1. Mukherjee *et al.*, (2013),

menciona que el comportamiento de *Trichoderma* spp., es micoparasito, produce antibióticos y es un agente de biocontrol para enfermedades en plantas. Los resultados nos señalan la importancia de realizar más estudios para saber el momento oportuno de la aplicación de *Trichoderma harzianum*.

**Cuadro 1. Medias en la germinación de semilla de *Pinus greggii* en tres sustratos con y sin *F. circinatum* y *T. harzianum*.**

Sustrato	Tratamiento	Germinación (media)
S3	T12(C+PM+As)	0.00 a
S2	T8(As+PM+C)	0.11 a
S1	T4(PM+Ag+V)	0.06 a
S1	T2(PM+Ag+V) +Fc	0.56 b
S3	T10(C+PM+As)+Fc	0.53 b
S2	T6(As+PM+C)+Fc	0.62 b
S2	T5(As+PM+C)+Fc+Th	0.68 b
S2	T7(As+PM+C)+Th	0.69 b
S3	T11(C+PM+As)+Th	0.75 b
S3	T9(C+PM+As)+Fc+Th	0.77 b
S1	T3(PM+Ag+V) Th	0.80 b
S1	T1(PM+Ag+V)+Fc+Th	0.84 b

S1=Peat moss+agrolita+vermiculita, S2 =Aserrín+peat moss+corteza) S3=Corteza +peat moss+aserrín), (Fc) *Fusarium circinatum*, (Th) *Trichoderma harzianum*. §Valores promedio en una columna con diferente letra son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ )

En los tratamientos que fueron inoculados solamente con *Fusarium* sp. se obtuvo un porcentaje de 93% de planta enferma, independientemente del sustrato a las 10 semanas, mientras que con *Fusarium* más *Trichoderma*, el porcentaje es ligeramente más bajo. Esto concuerda con lo que señalan Mukherjee *et al.*, (2013), al decir que tiene un efecto en el control de enfermedades (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Porcentaje de planta afectada por *Fusarium circinatum* en cada sustrato semanalmente en el período de marzo a mayo de 2015.**

Sustrato	Tratamientos	Semanas										Total (%)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
S1	T1(PM+Ag+V) +Fc+Th	0	6	19	3	19	19	14	8	3	0	91
S1	T2(PM+Ag+V) +Fc	21	16	19	0	14	9	0	7	2	5	93
S2	T5(As+PM+C)+Fc+Th	4	13	10	10	17	8	4	2	2	10	80
S2	T6(As+PM+C)+Fc	0	8	15	6	25	8	6	8	2	15	93
S3	T9(C+PM+As)+Fc+Th	5	7	26	12	10	17	0	5	0	5	87
S3	T10(C+PM+As)+Fc	8	14	15	7	14	17	3	5	7	3	93

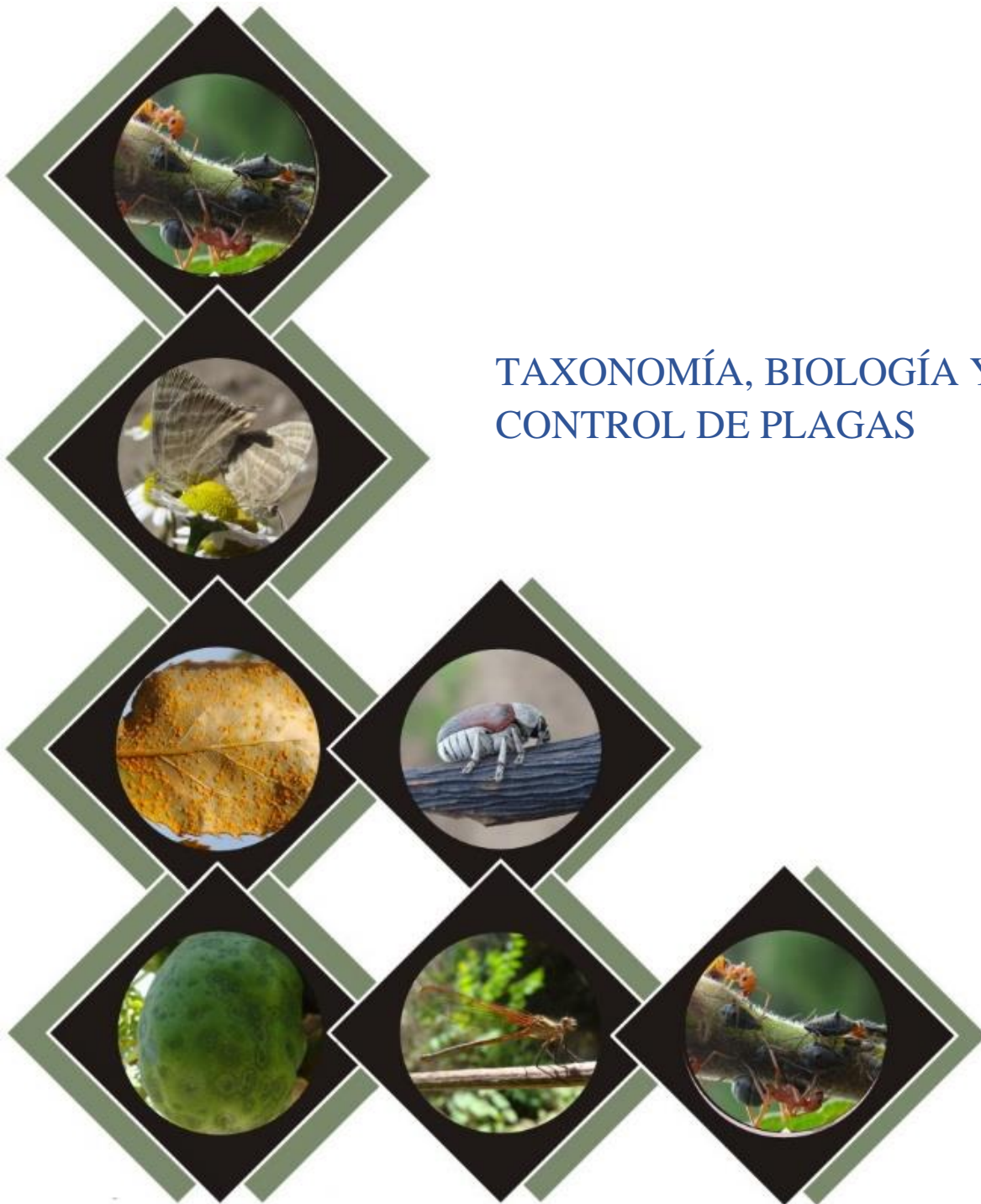
S1=Peat moss+agrolita+vermiculita, S2 =Aserrín+peat moss+corteza) S3=Corteza +peat moss+aserrín). (Fc) *Fusarium circinatum*, (Th) *Trichoderma harzianum*.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el Colegio de Postgraduados, gracias a una beca de doctorado por CONACyT y al proyecto por convocatoria del Fideicomiso 167304 en la modalidad 3 de financiamiento a Proyectos de Investigación 2013.

## LITERATURA CITADA

- García D., S. E., D. Cibrián T., y D. Alvarado R. 2007. Damping –off y pudrición de raíz por *Fusarium*. *Fusarium oxysporum* Schltdl (Moniliales, Moniliaceae). In: Enfermedades forestales en México/Forest diseases in México. Cibrián T. D; D. Alvarado R. y S. E. García D. (Eds.). 2007. U. A. Ch.; CONAFOR-SEMARNAT, México; Forest Service USDA, EUA; NRCAN Forest Service, Canadá y COFAN, FAO. Chapingo, México.
- Herron, D.A., M.J. Wingfield, B.D. Wingfield, C.A. Rodas, S. Marincowitz and E.T. Steen Kamp. 2015. Novel taxa in the *Fusarium fujikuroi* species complex from *Pinus* spp. Mycology 80:131-150.
- Hernández, Z.L., A. Aldrete, M. Ordaz, U. J. López y M. A. López. 2014. Crecimiento de *Pinus montezumae* Lamb en vivero influenciado por diferentes mezclas de sustratos. Agrociencia 48(6), 627-637.
- Leslie J.F, Summerell BA. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Ames, IA, USA. 388 pp
- Mukherjee P.K., B.A. Horwitz, U.S. Singh, M. Mukherjee y M. Schmoll. 2013. *Trichoderma* Biology and Applications. CABI. USA 237 p.
- Kvas, M., Marasas, W.F.O., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. and Steenkamp, E.T. (2009). Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. Fungal Diversity 34:1-21.



**CONTROL QUÍMICO DE *STRUTHANTHUS INTERRUPTUS*  
(SANTALALES-LORANTHACEAE) EN EL JARDÍN ALEXANDER  
PUSHKIN, DISTRITO FEDERAL**

**Claudia Contreras Ruiz<sup>1</sup>, Dionicio Alvarado Rosales<sup>1</sup>, David Cibrián Tovar<sup>2\*</sup>,  
Guadalupe Valdovinos Ponce<sup>1</sup>**

**INTRODUCCIÓN**

Los muérdagos son un grupo diverso de plantas parásitas pertenecientes al orden Santalales, con una amplia gama de coníferas y otras plantas leñosas como hospedantes (Geils *et al.* 2002; Vázquez *et al.*, 2006). En este orden se encuentra la familia Loranthaceae que constituye el grupo de plantas parásitas con mayor distribución en el mundo representada por 65 géneros y 850 especies, siendo *Struthanthus* uno de estos géneros (Herrera, 2005).

El género *Struthanthus* reúne entre 50 y 60 especies distribuidas desde México hasta Brasil, reportándose 8 para México; sin embargo, se requiere de una revisión taxonómica cuidadosa (Cibrián y Alvarado, 2007). Una de las principales causas de afectación en el arbolado urbano en la Ciudad de México es la infección por diferentes muérdagos de los géneros *Struthanthus*, *Cladocolea*, *Phoradendron* y *Psittacanthus* principalmente (Marchal, 2009). Cibrián *et al.* (2010) realizaron un ensayo con diferentes reguladores de crecimiento para el control químico de *Cladocolea diversifolia* sobre el arbolado urbano de la Ciudad de México y determinaron que etefón y Mezcla MKI (muérdago killer inyectable) en dosis altas provocaron la mayor mortalidad (52% y 34% de brotes nuevos de la planta, respectivamente). Debido a que la dosis alta de etefón causó un impacto sobre el hospedante, Cibrián *et al.* (2010) recomendaron realizar ajustes para evitar fitotoxicidad, así como evaluar este producto sobre otras especies de muérdago de importancia como *Cladocolea loniceroides* y *Struthanthus interruptus* en el área urbana del Distrito Federal; así como también evaluarlo en otras especies de árboles hospedantes.

<sup>1</sup> Programa de Fitosanidad. Fitopatología. Colegio de Postgraduados Carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco.

<sup>2</sup>Departamento de Silvicultura y Ecología, División de Ciencias Forestales, Chapingo.

\*Autor de correspondencia: [dcibrian@correo.chapingo.mx](mailto:dcibrian@correo.chapingo.mx)



Por lo anterior, fue necesario realizar el control químico con etefón del muérdago *Struthanthus interruptus* en árboles de *Populus deltoides*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Área de estudio.** El jardín Alexander Pushkin se ubica en Av. Cuauhtémoc s/n (Eje 1 Pte.), colonia Roma Norte en la Delegación Cuauhtémoc, entre las calles Morelia y Álvaro Obregón. Las principales especies arbóreas que se encuentran en el área de estudio pertenecen a los géneros *Populus*, *Acer* y *Ligustrum*, los cuales están siendo afectados en diferente grado por el muérdago verdadero *Struthanthus interruptus*.

**Diagnóstico del arbolado urbano.** El género de mayor abundancia en el jardín es *Populus*, por ello, se seleccionaron al azar 28 árboles de chopo americano *Populus deltoides* (Martínez, 2008). Se registraron variables dasométricas como altura total y diámetro normal, así como también el nivel de infección de cada individuo. El nivel de infección del arbolado se evaluó a partir de una escala de evaluación de tres niveles; Nivel 1-infección baja, Nivel 2-infección media y Nivel 3-infección alta.

**Diseño experimental.** Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con un arreglo factorial 4×7, donde el primer número corresponde al número de tratamientos (cuatro) y el segundo al número de repeticiones (siete). La unidad experimental estuvo constituida por un árbol del hospedante *Populus deltoides*. El número total de árboles que se estudiaron fueron 28. La variable que se evaluó fue la densidad de follaje (%) del muérdago *Struthanthus interruptus*, así como también la densidad de follaje (%) del hospedante.

**Determinación de tratamientos.** Se establecieron cuatro tratamientos para el control del muérdago. En tres tratamientos se aplicó el producto químico etefón® a diferentes dosis, mientras que en el cuarto tratamiento se aplicó agua destilada estéril. La dosis tanto del producto químico así como de agua destilada estéril en cada árbol, se determinó de acuerdo al diámetro normal del mismo. Los tratamientos se muestran a continuación en el Cuadro 1.

**Cuadro 1. Tratamientos para el control del muérdago *Struthanthus interruptus*.**

Tratamiento	Producto	Dosis		
		(ml de producto/cm de diámetro normal)		
1	Etefón	Alta	(A)	4 ml
2	Etefón	Media	(M)	3 ml
3	Etefón	Baja	(B)	2 ml
4	Agua destilada estéril	Testigo	(T)	2 ml

**Aplicación de tratamientos.** Los árboles seleccionados se marcaron con una placa de aluminio en la cual se registró el número de árbol de 1 a 28 y la dosis que de forma aleatoria se aplicó, alta (A), media (M), baja (B) o testigo (T). La aplicación de tratamientos se realizó mediante el sistema de inyección denominado Bio-dosificador Sistémico (en patente), sistema de baja presión que dirige la dosis de producto determinada al xilema del hospedante. La inyección consistió en realizar perforaciones con taladro y broca de 3/8" en la base del tronco, se introdujo un arborplug® de número 4 en cada perforación, se colocó el Bio-dosificador Sistémico® y se llenó con la dosis de producto determinada en cada punto de inyección, finalmente se inyectó el producto con ayuda de una bomba de aire. El número de puntos de inyección se determinó de acuerdo a la circunferencia de la base del árbol. Se hizo una perforación a cada 30 cm y la dosis del producto se repartió equitativamente en cada punto de inyección; aunque dependiendo de cada individuo, el número de puntos de inyección cambió. Se realizaron dos aplicaciones de tratamientos, la primera el 17 de abril y la segunda el 4 de agosto de 2015. Cabe señalar que durante la segunda aplicación de tratamientos se realizaron nuevas perforaciones.

**Evaluación de la densidad de follaje de muérdago.** Para evaluar el efecto de los tratamientos aplicados en el muérdago y el hospedante, se realizó la evaluación de la densidad de follaje de la planta parásita con una escala de evaluación de densidad de follaje de diez categorías, mientras que para el hospedante se utilizó una escala de evaluación de densidad de follaje de cuatro categorías. Se realizó una evaluación previa a la aplicación del primer tratamiento y se continuó realizando las evaluaciones cada siete días durante los siete meses posteriores a dicha aplicación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Densidad de follaje del muérdago.** Durante las evaluaciones de la densidad de follaje del muérdago, se observó la defoliación de la planta parásita independientemente de la dosis de etefón que se aplicó. Debido a que por el momento se está realizando la última evaluación

de la densidad de follaje de la planta parásita, el análisis de los datos no se ha realizado todavía. Sin embargo, con este trabajo se espera contribuir al conocimiento sobre el efecto de la aplicación del producto químico etefón al tronco de los árboles de *Populus deltoides* como parte del control químico del muérdago *Struthanthus interruptus* en el Jardín Alexander Pushkin; así como también determinar a partir de los tres tratamientos con etefón cuál es la dosis con mayor efectividad para el manejo del muérdago, que logre la defoliación y en algunos casos la muerte de la planta parásita.

### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Colegio de Postgraduados. Por el financiamiento y aceptación para realizar mis estudios de postgrado.

### LITERATURA CITADA

- Cibrián T, D.; Cibrián Ll., V. D.; Ruíz F., D. G.; Burke R., A. F.; Barrera R.; U. M.; Álvarez S., H. C. y Cadena B., J. M. 2010. Manejo del arbolado urbano infestado por muérdago y otros agentes que afectan su salud en el Distrito Federal. Uso de plaguicidas con base en reguladores del crecimiento para el control del muérdago en arbolado urbano, México, D. F. 105 p.
- Cibrián T., D. y Alvarado R., D. 2007. Muérdago *Struthanthus*. In Enfermedades Forestales en México. Texcoco, Méx.: Universidad Autónoma Chapingo. 436-437 pp.
- Geils, B. W., Cibrián T., J. y Moody, B., 2002. Mistletoes of North American Conifers, Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. 2-4 pp.
- Herrera M, F., 2005. Principales Loranthaceas que afectan plantaciones de naranja en Costa Rica. Agricultura Tropical, (35), 27-38 pp.
- Marchal V., D., 2009. El muérdago en la Ciudad de México. ArbolAMA, 18-22 pp.
- Vázquez C., I., Villa R., A. y Madrigal H., S., 2006. Los muérdagos (Loranthaceae) en Michoacán, Uruapan, Mich. 93 p.

## ESPECIES DE *Phyllophaga* (COLEOPTERA: MELOLONTHIDAE) EN LA ZONA DE ABASTO DEL INGENIO EMILIANO ZAPATA, MORELOS, MÉXICO

Mónica **Zaragoza Ortega**<sup>1</sup>, Obdulia L. **Segura León**<sup>1</sup>, Julián **Hernández Cruz**<sup>2\*</sup>, Miguel **Á. Morón Ríos**, Jorge M. **Valdez Carrasco**<sup>1</sup>, Saúl **Sánchez Soto**<sup>3</sup>

### INTRODUCCIÓN

La producción de caña de azúcar en diferentes regiones en México se ve afectada por diversos insectos, entre ellos los coleópteros de los géneros *Phyllophaga*, *Ciclocephala*, *Anómala*, *Dyscinetus*, *Euetheola*, *Macroductylus* y *Ligyris*, la mayoría conocidos como gallina ciegas (Flores, 1994). Riess y Flores (1976) señalan la presencia de 15 especies plaga para el cultivo de caña de azúcar en México, entre las que destacan *Phyllophaga sturmi* Bates, *P. crinalis* Bates, y *P. lalanza* Saylor (Morón 1997); *Anomala sincta* Say y *Ciclocephala fulgurata* Burm. Particularmente para Morelos se reportan a *P. obsoleta*, *P. brevidens*, *P. vetula*, *P. setifera*, *P. pruinosa*, *P. lenis*, *P. ravida*, *P. fulviventris* y *P. ilhuicaminai* como plagas de caña de azúcar y maíz (Rodríguez del Bosque y Morón, 2011).

Por otra parte los estudios taxonómicos y faunísticos sobre el género *Phyllophaga* (*sensu lato*) en el estado de Morelos se han documentado por Deloya, 1993 Deloya *et al.*, 1988, 1993, 1995, Deloya y Morón (1994, 1998), Aragón y Morón (2003), Morón (2004), Rodríguez del Bosque y Morón (2011) en los que además se han descrito nuevos taxa. Sin embargo se tiene escasa información entre la asociación de este complejo de especies y el cultivo de caña de azúcar en esta zona que permita una inmediata determinación específica y el consecuente desarrollo de estrategias de manejo y control. De este complejo específico, las larvas se catalogan como de gran importancia ecológica y además económica ya que se alimentan del sistema radicular y causan marchitamiento de las plantas, reducción en la capacidad de absorción de agua, minerales y nutrimentos, lo que retarda el crecimiento y limita la producción (Flores, 1994; Riess y Flores, 1976).

<sup>1</sup> Entomología. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. 56230, México. <sup>2</sup> Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional. Hornos 1003, Col. Nochebuena. Sta. Cruz Xoxocotlán, Oaxaca 71230, México. \*Autor por correspondencia: [jhccidir@yahoo.com.mx](mailto:jhccidir@yahoo.com.mx) <sup>3</sup> Entomología. Campus Tabasco. Colegio de Postgraduados. Carretera Libre Cárdenas-Coatzacoalcos km 21, Poblado C-27, Cárdenas, Tabasco. 86500. México

La similitud de la morfología de las diferentes especies en estados inmaduros hace difícil la identificación de las especies en campo por lo que un primer paso para el reconocimiento de estas, es la identificación de los adultos de la zona con base en características taxonómicas de los machos. Por lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo identificar y describir la morfología de los adultos de las especies de *Phyllophaga* presentes en la zona de abasto del ingenio Emiliano Zapata en el estado de Morelos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Características del área de estudio.** La investigación se realizó en cuatro municipios del estado de Morelos, Tlaltizapan, Tlaquiltenango, Jojutla y Xochitepec pertenecientes a la zona de abasto del ingenio Emiliano Zapata, situados en la provincia fisiográfica de la Sierra Madre del sur y la depresión del Balsas, con temperatura media anual de 24°C y promedio de precipitación anual de 917 mm.

**Metodología.** La captura de adultos del género *Phyllophaga* se realizó con ayuda de trampas tipo embudo con luz blanca y colectas manuales, durante los meses de lluvias entre mayo-septiembre de 2013 a 2015. Los ejemplares colectados se conservaron en alcohol al 70%; posteriormente se hizo la separación de morfoespecies para finalmente se montarlos en alfileres entomológicos junto con su genitalia. Posteriormente se tomaron las imágenes de los ejemplares representantes de cada especie y de sus caracteres diagnósticos, con el microscopio Tessoovar, Carl Zeiss® adaptado con cámara digital para microscopía Paxcam 3.2. ® Las imágenes fueron procesadas en Gimp versión 2.8. Para la determinación específica se utilizaron los criterios propuestos por Morón (1986, 2004). Se redactó la diagnosis de los grupos identificados y se construyó una clave dicotómica para separar los machos de las especies colectadas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante los tres años de colecta en los cuatro municipios se obtuvieron 1,066 adultos machos del género *Phyllophaga*, distribuidos en cuatro subgéneros: *Listrochelus*, *Chlaenobia*, *Phytalus* y *Phyllophaga* (*s. str.*), el cual fue el mejor representado con tres

grupos: *porodera*, *ravida*, y *anodentata* y cuatro especies: *P. porodera*, *P. ravida*, *P. lenis* y *P. brevidens*. La distribución de las demás especies se muestra en el cuadro 1.

**Cuadro 1. Número de individuos por especie de *Phyllophaga* (*sensu lato*) colectados en la zona de abasto del ingenio Emiliano Zapata, Zacatepec, Morelos.**

Subgénero	Grupo	Especie	Ejemplares
<i>Listrochelus</i>	“cavata”	<i>P.riverana</i> Morón	22
<i>Chlaenobia</i>	“vexata”	<i>P. rzedowskiana</i> Aragón y Morón	217
<i>Phytalus</i>	“pruinosa”	<i>P. hoogstraali</i> Saylor	65
<i>Phytalus</i>	“macrocera”	<i>P. batillifer</i> (Bates )	31
<i>Phyllophaga</i>	“porodera”	<i>P.porodera</i> (Bates)	26
<i>Phyllophaga</i>	“ravida”	<i>P.ravida</i> (Blanchard)	15
<i>Phyllophaga</i>	“incerta sedis”	<i>P.martinezpalaciosi</i> Morón	7
<i>incerta sedis</i>	“incerta sedis”	<i>P.ilhuicaminai</i> Morón	191
<i>Phyllophaga</i>	“anodentata”	<i>P.lenis</i> (Horn)	317
<i>Phyllophaga</i>	“anodentata”	<i>P.brevidens</i> (Bates)	175
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>1066</b>

La especie con mayor predominio fue *P. lenis*. Esta especie tiene amplia distribución en los estados de la región occidental, centro y sureste del país y forma parte del grupo de especies que han desarrollado de la capacidad de colonizar diversos ambientes a distintas latitudes y altitudes. La otra especie con mayor predominio fue *P. rzedowskiana* la cual representa un endemismo de la región, ya que el paratipo de la especie fue encontrado en la región de estudio de este trabajo lo cual explica su comportamiento.

La comunidad de *Phyllophaga* en el área de estudio muestra una mezcla interesante de especies ya que combina elementos de amplia distribución (*P. lenis* y *P. ravida*), con elementos provenientes de ambientes húmedos (*P. riverana*, *P. hoogstraali*), ambientes xéricos (*P. ilhuicaminai*) y endemismos (*P. rzedowskiana*).

A continuación se presenta la diagnosis del grupo *anodentata*, el cual fue el grupo más abundante (*Sensu* Morón 1986):

***Anodentata*.** Longitud corporal entre 13-20 mm. Cuerpo ovalado, robusto, notablemente ensanchado hacia atrás. Color pardo oscuro, pardo rojizo, castaño rojizo, castaño amarillento, y frecuentemente con un viso grisáceo o blanquecino. Región dorsal cubierta con sedas largas y cortas muy abundantes. Más notorias en la mitad anterior, y en ocasiones con una cubierta aterciopelada muy fina. Cabeza pequeña en proporción con el protórax, ojos

grandes poco prominentes. Clípeo corto, redondeado, casi hemicircular, en ocasiones con el borde anterior ligeramente sinuado. Antenas formadas por 10 artejos. Maza antenal masculina de igual longitud o hasta dos veces más larga que este. Labro reniforme, poco excavado, setífero, poco prominente.

Pronoto 1.5-1.7 veces más ancho que largo, con los bordes laterales moderadamente proyectados en su porción media; puntuación en general circular, muy fina y muy densa, aunque en ocasiones es tosca; ángulos anteriores prominentes y aguzados o poco notables y redondeados; ángulos posteriores obtusos pero bien marcados. Pigidio masculino poco convexo. Placa anal masculina con un reborde anterior que alcanza los extremos laterales, y cuya parte mesial presenta un proceso bilobado o bidentado; y en otros casos este reborde solo está marcado hacia los lados.

Ambos espolones metatibiales masculinos articulados. Uñas masculinas y femeninas similares con el dentículo intermedio corto, semitriangular y frecuentemente un poco aproximado hacia la pequeña dilatación basal. Parámetros cortos, fusionados en anillo con una pequeña proyección bidentada ventral y dentículos latero-distales simétricos. Edeago esclerosado muy ornamentado con espinas, sedas y un filamento recurvado ligeramente asimétrico en algunas especies.

***P. Phyllophaga lenis***: placa anal con dos dentículos en el borde anterior, sin un área granulosa en el penúltimo segmento abdominal. Especies de color pardo rojizo, cuerpo ovalado. Dorso con sedas largas. Uñas dentadas con el diente ubicado en posición basal. Longitud corporal 18 mm. Genitalia con parámetros cortos fusionados dorsoventralmente, con los ápices convergentes y con una proyección bidentada, aguda, orientada hacia abajo. Edeago semitubular esclerosado con dos proyecciones laterales orientadas caudalmente y un flagelo en posición dorsal-apical, largo, recurvado y espinoso el ápice.

***P. (Phyllophaga) brevidens***: Placa anal sin dentículos, con un área granulosa en el penúltimo segmento abdominal. Especies de color pardo rojizo, cuerpo ovalado. Longitud corporal 18 mm. Dorso con sedas cortas. Uñas dentadas, recurvadas con el diente en posición basal. Genitalia con parámetros cortos fusionados dorsoventralmente, con los ápices convergentes, con una proyección bidentada ventral orientada caudalmente y una notable



proyección a los lados, que en vista lateral da un aspecto bifurcado. Edeago semitubular, medianamente esclerosado con un ornamento preapical recurvado y setoso en el ápice.

Las colectas de adultos de gallina ciega en la zona de abasto del ingenio Emiliano Zapata durante los tres años, señala la presencia de un complejo de diez especies del género *Phyllophaga*, las cuales coinciden con las señaladas por Deloya *et al.*, 1988, 1993, 1995, Deloya y Morón (1994, 1998), Aragón y Morón (2003, 2004), Rodríguez del Bosque y Morón (2011), con base en estos resultados se señala una gran diversidad de especies del género *Phyllophaga* en el estado de Morelos, que contribuyen al conocimiento del género en la zona de estudio y su posible relación con el cultivo de caña de azúcar por haber sido colectadas en la zona producción. Es importante llevar a cabo monitoreos tempranos de larvas en el cultivo de caña de azúcar puesto que se colectaron ejemplares adultos de las especies *P. ravidata*, *P. ilhuicaminai*, *P. lenis* y *P. brevidens* reportadas como plagas para este cultivo.

### AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar estudios de maestría del primer autor.

### LITERATURA CITADA

- Aragón, A., M.A. Morón. 2003. Two new species of *Phyllophaga* Harris (Coleoptera: Scarabaeidae: Melolonthidae) from South Central, México. Proc. Entomol. Soc. Wash. 105 (39): 559-567
- Deloya, C. 1988. Coleópteros lamellicornios asociados a depósitos de detritos de *Atta mexicana* (Smith) Hymenoptera: formicidae en el Sur del Estado de Morelos. Folia Entomológica Mexicana 75: 77-91.
- Deloya, C. 1993. El género *Phyllophaga* Harris en Cuernavaca, Morelos, México. En: Diversidad y manejo de plagas subterráneas (M.A. Morón compilador). Publicación especial de la Sociedad Mexicana de Entomología e Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz, México. pp.39-54.
- Deloya, C., A. Burgos., J. Blackaller., J.M. Lobo. 1993. Los coleópteros lamellicornios de Cuernavaca, Morelos, México, (Passalidae, Trogidae, Scarabaeidae y Melolonthidae), Boletín Soc. Ver. Zool. 3(1): 15-55.
- Deloya, C., M. A. MORÓN. 1994. Coleópteros Lamellicornios del distrito de Jojutla, Morelos, México (Melolonthidae, Scarabaeidae, Trogidae y Passalidae). Listados faunísticos de México. V. Instituto de Biología. UNAM. México. Pp1-49
- Deloya, C., M. A. Morón. 1998. Nuevas especies *Phyllophaga* Harris (Coleoptera: Melolonthidae) de Morelos, Puebla y Chiapas, México. Folia Entomológica Mexicana 104: 109-119.
- Deloya, C., M. A. MORÓN., J.M. LOBO. 1995. Coleoptera Lamellicornia (Macleay, 1819) del sur del Estado de Morelos, México. Acta Zoológica Mexicana (n.s) 65: 1-42.

- Flores, S.1994. Las plagas de la caña de azúcar en México. México. 350 p.
- Morón, M. A. 1986. El género *Phyllophaga* en México. Morfología, distribución y sistemática supraespecífica (Insecta: Coleoptera). Publicación 20. Instituto de Ecología, México. 344 pp.
- Morón, M.A. 2004. Revision of the *cavata* group of *Phyllophaga* (*Listrochelus*) Blanchard (Coleoptera: Melolonthidae: Melolonthinae) Ann. Entomol. Soc. Am. 91: 77-96
- Riess, H. C. M., S. Flores, S. 1976. Catálogo de plagas y enfermedades de la caña de azúcar en México. Comisión Nacional de la Industria azucarera. Instituto para el mejoramiento de la producción de azúcar. México.
- Rodríguez del Bosque, L. A., M.A MORÓN. 2011. Plagas del suelo. Mundi Prensa. México D. F. 416 p.

## ¿TIENE ALGÚN EFECTO SOBRE LA BIOLOGÍA REPRODUCTIVA ALIMENTAR CON CASEÍNA (PROTEÍNA) A ADULTOS DE *Catolaccus hunteri* (HYMENOPTERA: PTEROMALIDAE)?

Agustin J. **Gonzaga-Segura**<sup>1</sup>, Esteban **Rodríguez-Leyva**<sup>2</sup>, J. R. **Lomeli-Flores**<sup>2</sup>

### INTRODUCCIÓN

Los insectos requieren de fuentes de energía como proteínas, lípidos y carbohidratos para el desarrollo de las funciones vitales como la supervivencia y reproducción. Estas demandas también son requeridas en todos los parasitoides de Hymenoptera y la adquisición y almacenamiento de esos nutrientes pueden llevarse a cabo durante el desarrollo del estado inmaduro. No obstante, en especies sinovigénicas (Rivero y Casas, 1999; Jervis, *et al.*, 2001), la alimentación de las hembras adultas sobre su huésped para obtener una fuente de proteína es importante para manifestar su potencial reproductivo (Wheeler, 1996).

Los nutrientes complejos que se almacenan en algunos tejidos del parasitoide se desdoblan a nutrientes menos complejos para que puedan ser absorbidos por el intestino, facilitando el movimiento hacia la hemolinfa. Con respecto a las proteínas, éstas pueden proceder de fuentes exógenas ingeridas por el adulto, o a partir de aminoácidos sintetizados en el cuerpo; esta síntesis puede ser útil para la formación de oocitos, y la vitelogenina es la proteína más importante absorbida por el ovario (Rivero y Casas, 1999). En distintas especies de parasitoides se ha documentado el aumento de longevidad y fecundidad cuando tienen suplementos alimenticios en estados inmaduros o en adultos, entre estos una fuente de carbohidratos (miel), proteínas, vitaminas y lípidos (Coskun *et al.*, 2009).

Aunque existen trabajos que indican que los suplementos de carbohidratos o incluso de algunas proteínas o vitaminas prolongan la vida de varias especies, y permiten que la fecundidad sea mayor que en parasitoides sin esa fuente de alimento (Guerra y Martinez, 1994; Rojas *et al.*, 1996), no se ha explorado completamente si una fuente de proteína puede tener alguna influencia en la dinámica de fecundidad y alimentación sobre el huésped. Para conocer el efecto de un suplemento a base de proteína sobre una especie sinovigénica se usará como modelo de estudio a *Catolaccus hunteri* (Hymenoptera: Pteromalidae). Este es un ectoparasitoide solitario, sinovigénico y generalista que ataca al picudo del chile, *Anthonomus eugenii* (Coleoptera: Curculionidae) (Rodríguez-Leyva *et al.*, 2000, 2007).

<sup>12</sup> Posgrado en Fitosanidad, Entomología y Acarología, Colegio de Postgraduados, Km. 36.5, Carretera México- Texcoco, Montecillo, C.P. 56230 Texcoco, Estado de México, México.

Además de la biología particular de esta especie, que facilita el modelo de estudio, se tiene establecida la metodología de cría sobre el huésped facticio *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) (Rodríguez-Leyva *et al.*, 2002, Vasquez *et al.*, 2005), y una metodología de exposición del huésped en cápsulas de Parafilm® (Morales-Ramos *et al.*, 1996; Rodríguez-Leyva *et al.*, 2000) que facilitará las observaciones sobre la oviposición y alimentación sobre el huésped. Por lo anterior, el objetivo de este estudio es evaluar si un parasitoide sinovigénico alimentado con proteína (caseína) y carbohidratos en estado adulto, modifica la biología reproductiva, específicamente la fecundidad y el número de larvas muertas por alimentación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material biológico.** El trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Control Biológico del Colegio de Postgraduados en Texcoco, Estado de México. Se estableció una cría de *Catolaccus hunteri* sobre una colonia de un huésped facticio (*Callosobruchus maculatus*), sobre semillas de garbanzo de acuerdo a la metodología de Vásquez *et al.* (2005) y Rodríguez-Leyva *et al.* (2002). En la cría del parasitoide se han seleccionado a aquellas hembras que ovipositan los primeros siete días después de la emergencia. Para el ensayo se utilizaron *C. hunteri* adultos de 18 h o menos de edad. Todos los ensayos y experimentos se realizaron a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 60-70% H. R. y un fotoperiodo de 12:12 h L:O.

**Unidad experimental y tratamientos.** La unidad experimental se conformó por dos machos y una hembra del parasitoide confinados dentro de una caja de Petri (10x10x2 cm) con un orificio de ventilación y un algodón húmedo, además de la aplicación del tratamiento respectivo. Los tratamientos consistieron en 0, 30, 60 y 120 mg de caseína/1 mL miel. Dentro de cada arena, y con una jeringa de 5 mL, se proporcionó cada tratamiento sobre la cara

interna de la caja de Petri para la alimentación *ad libitum* de los insectos. Además de esto se colocó una lámina de 12 cápsulas de Parafilm® (forma de óvalo), cada cápsula contenía dos larvas de *C. macullatus* del último instar, para evaluar la fecundidad y alimentación sobre el huésped (Morales-Ramos *et al.*, 1992; Rodríguez-Leyva *et al.*, 2000). La caseína (fuente de proteína) y miel se renovaba cada 48 h, mientras que las láminas de Parafilm® con el huésped cada 24 h. Cada tratamiento se evaluó sobre una hembra de manera individual y se realizaron 10 repeticiones de cada tratamiento.

**Variables respuesta:** En cada tratamiento se determinó el número total de huevos por hembra por día (oviposición), y el número de larvas muertas por alimentación por hembra por día.

**Análisis estadístico.** En el experimento se utilizó un diseño completamente al azar. Los resultados de oviposición y alimentación sobre el huésped se sometieron a un análisis de varianza usando el programa Stati stix 8.1 (Analytical Software, 2003). Las medias se compararon usando la prueba de separación Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las hembras que tuvieron acceso a caseína y miel mostraron mayor oviposición con respecto a aquellas que tuvieron solo miel ( $F_{3, 246}=3.30$ ;  $P=0.0211$ ), específicamente la mayor fecundidad fue de  $118.15 \pm 9.03$  comparado con  $79.65 \pm 7.88$  (Cuadro 1). Este estudio muestra que un suplemento a base proteína con carbohidratos, además del huésped, puede incrementar la fecundidad del parasitoide. A pesar que la miel se ha utilizado como un suplemento para la cría de enemigos naturales (Harvey *et al.*, 2012), una fuente externa de proteína puede ser importante para la maduración y aumento en la producción de huevos (Jervis *et al.*, 2001). La explicación de estos fenómenos puede ser a que una mayor cantidad de aminoácidos se puede tener más vitelogenina, proteína importante absorbida por el ovario (Kamura, 2011) y por consecuencia una mayor oviposición del parasitoide.

**Cuadro 1. Efecto de diferentes concentraciones de caseína mezclada con miel sobre parámetros biológico de *Catolaccus hunteri*.**

Tratamiento (mg de caseína/ 1 ml miel)	Parámetro biológico ( $\pm$ EE)	
	Fecundidad <sup>1</sup>	Alimentación <sup>2</sup>
Cas 120	93.9 $\pm$ 9.87 ab	60.36 $\pm$ 2.76 ab
Cas 60	118.15 $\pm$ 9.03 a	60.43 $\pm$ 2.31 ab
Cas 30	89.78 $\pm$ 9.32 ab	52.89 $\pm$ 2.56 b
Cas 0	79.65 $\pm$ 7.88 b	64 $\pm$ 3.29 a

Medias con la misma letra en una columna no difieren estadísticamente entre sí (Tukey  $p \leq 0.05$ ). Fecundidad <sup>1</sup> $F_{3, 246} = 3.30$ ;  $P = 0.0211$ ; Alimentación <sup>2</sup>  $F_{3, 246} = 0.0431$ ;  $P = 0.0091$ .

En cuanto la alimentación sobre el huésped (Cuadro 1), aquellas hembras que se les proporcionó la caseína en 30 mg y miel fueron las que menos larvas depredaron, comparada con las hembras alimentadas con miel ( $F_{3, 246} = 0.0431$ ;  $P = 0.0091$ ). La alimentación del parasitoide sobre el huésped asegura su crecimiento y desarrollo, además de que es un estímulo importante para el proceso de oogenesis (Morales-Ramos *et al.*, 1996). Una de las características de la hemolinfa del huésped es tener un complejo de sustancias, entre éstas se encuentra las proteínas, indispensables en la producción de huevos (Kapranas y Luck, 2008).

Algunos trabajos demuestran que la alimentación de parasitoides sobre su huésped y un suplemento alimenticio puede incrementar algunos parámetros biológicos (Morales-Ramos *et al.*, 1996), en este estudio se encontró que la combinación de miel y una fuente de proteína (60 mg caseína/mL miel) contribuyeron a que *Catolaccus hunteri* manifestara mayor fecundidad, sin que se incrementara el número de huéspedes eliminados por alimentación (Cuadro 1), quizá esto se debe a que el insecto obtiene mayores recursos para la producción de huevos (proteína).

## AGRADECIMIENTOS

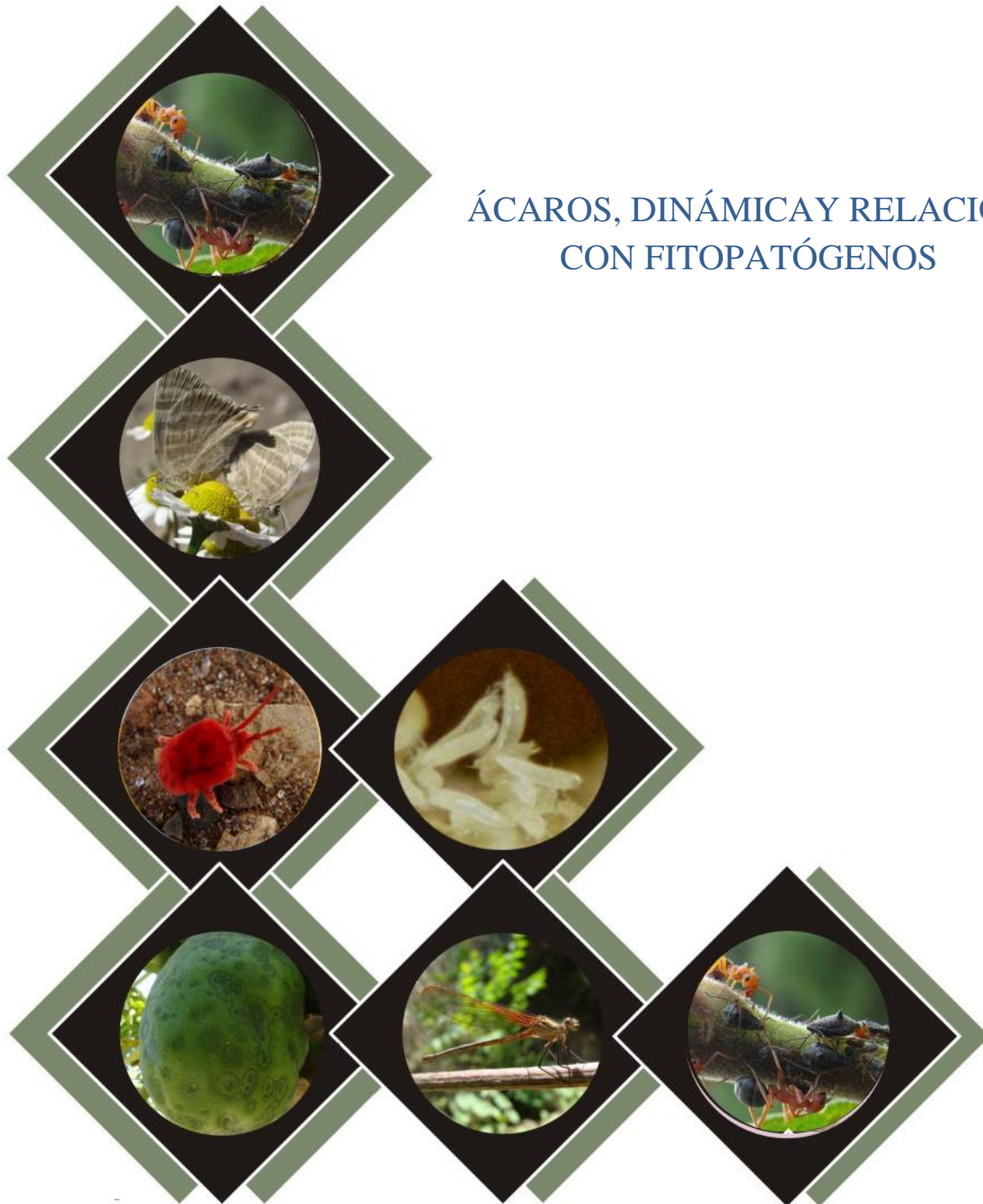
Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca completa de doctorado al primer autor.

## LITERATURA CITADA

- Coskun, M., T. Kayis, P. Ozalp, K. Kocalar, C. I. Tatlicioglu, and I. Emre. 2009. The effects of a meridic diet on the sex ratio of offspring, on glycogen and protein content, and on productivity and longevity of adult *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) for five generations. *Belgian Journal of Zoology*, 139: 103-108.
- Guerra, A. A., Martinez, S., and Del Rio, H. S. 1994. Natural and synthetic oviposition stimulants for *Catolaccus grandis* (Burks) females. *Journal of Chemical Ecology*, 20: 1583-94.

- Harvey, J. A., J. Cloutier, B. Visser, J. Ellers, F. L. Wäckers, and R. Gols. The effect of different dietary sugars and honey on longevity and fecundity in two hyperparasitoid wasps. *Journal Insect Physiology*, 58: 816-23.
- Jervis, M. A., G. E. Heimpel, P. N. Ferns, J. A. Harvey, and N. A. C. Kidd. 2001. Life-History Strategies in Parasitoid Wasps: A Comparative Analysis of 'Ovigeny'. *The Journal of Animal Ecology*, 70: 442-458.
- Kamakura, M., 2011. Royalactin induced queen differentiation in honeybees. *Nature* 473: 478-483.
- Kapranas, A., and R. F. Luck. 2008. Egg maturation, host feeding, and longevity in two *Metaphycus* parasitoids of soft scale insects. *Biological Control*, 47: 147-153.
- Morales-Ramos, J. A., and J. R. Cate. 1992. Laboratory determination of age-dependent fecundity, development and rate of increase of *Catolaccus grandis* (Burks) (Hymenoptera: Pteromalidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 85: 469-476.
- Morales-Ramos, J. A., M. G. Rojas, and E. G. King. 1996. Significance of adult nutrition and oviposition experience on longevity and attainment of full fecundity of *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 89: 555-563.
- Morales-Ramos, J. A., M. G. Rojas, R. J. Coleman and E. G. King. 1998. Potential use of in vitro-reared *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae) for biological control of the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology*, 91: 101-109.
- Rivero, A., and Casas, J. 1999. Incorporating physiology into parasitoid behavioural ecology: the allocation of nutritional resources. *Researches on Population Ecology*, 41: 39-45.
- Rodríguez-Leyva, E., J. Leyva L., V. Gómez, N. Bárcenas M., and G. W. Elzen. 2000. Biology of *Catolaccus hunteri* (Hymenoptera: Pteromalidae), A Parasitoid of Pepper Weevil and Boll Weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 93: 862-868.
- Rodríguez-Leyva, E., P. A. Stansly, D. J. Schuster, and Bravo-Mosqueda, E. 2007. Diversity and distribution of parasitoids of *Anthonomus eugenii* (Coleoptera: Curculionidae) from Mexico and prospects for biological control. *Florida Entomologist*, 90: 693-702.
- Rodríguez-Leyva, E., V. Gómez T., N. Bárcenas M., y J. Leyva L. 2002. Efecto de diferentes factores sobre la cría de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) para la producción de *Catolaccus* sp. (Hymenoptera: Pteromalidae). *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)*, 86: 87-101.
- Rojas M. G., J. Morales-Ramos A., and E. G. King. 1996. In vitro-rearing of *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae) on meric diets. *Journal of Economic Entomology*, 89: 1095-1104.
- Vásquez E., D. Dean, D. Schuster, and P. Vanetten, 2005. A laboratory method for rearing *Catolaccus hunteri* (Hymenoptera: Pteromalidae), a parasitoid of the pepper weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Florida Entomologist*, 88: 191-194.
- Wheeler, D., 1996. The role of nourishment in oogenesis. *Annual Reviews of Entomology*, 41, 407-431.





## ÁCAROS, DINÁMICA Y RELACIÓN CON FITOPATÓGENOS

## ÁCAROS ERIÓFIDOS (ACARI: ERIOPHYOIDEA) ASOCIADOS A ÁRBOLES DE LA FAMILIA PINACEAE EN MÉXICO

Jesús A. **Acuña-Soto**<sup>1\*</sup>, Edith G. **Estrada-Venegas**<sup>2</sup>, Armando **Equihua-Martínez**<sup>1</sup>,  
Ignacio M. **Vázquez-Rojas**<sup>3</sup>, Jesús **Romero-Nápoles**<sup>1</sup>, Gabriel **Otero-Colina**<sup>1</sup> y Alejandro  
**Rodríguez-Ortega**<sup>4</sup>

### INTRODUCCIÓN

En árboles de importancia forestal tenemos organismos asociados que han utilizado este recurso para su beneficio, con su alimentación pueden mermar la salud del hospedero y ser considerados de importancia económica. Actualmente se conocen más de 200 organismos que afectan la salud de estos árboles, de las cuales el 50 % pertenecen a insectos, 30 % a enfermedades de tipo virales, fungosas y bacterianas, un 19 % a plantas parásitas y solo el 1 % a ácaros de los cuales destacan los de la familia Tetranychidae (Cibrián-Tovar *et al.*, 1995, 2007).

Los eriófidos son otro grupo relevante de ácaros fitófagos, los cuales causan clorosis en la base de las acículas y la deformación en su crecimiento, otras especies atacan los conos causándoles deformaciones y con ello se pierden las semillas, estos daños se acentúan más en plantaciones de monocultivos (cultivos extensivos) causándole al productor una pérdida económica, mientras que en condiciones naturales, raramente su hospedero se ve afectado (Castagnoli *et al.*, 2010). A nivel mundial se conocen alrededor de 15 géneros y aproximadamente 100 especies asociadas a la familia Pinaceae de los géneros *Abies* y *Pinus* (Amrine y Stasny, 1994); para el caso de México a pesar de ser un país con una gran diversidad de pináceas, los trabajos sobre eriófidos asociados a ellas son nulos, el único registro que se tenía hasta 1995 es el referente a *Trisetacus ehmanni* Keifer, 1980 atacando acículas de *Pinus arizonica* y *P. duranguesis* (Cibrián-Tovar *et al.*, 1995), sin que se haya podido corroborar la identidad del ácaro; en trabajos posteriores no se menciona ningún eriófido para estas plantas (Hoffman y López-Campos, 2000; Pérez-Ortiz *et al.*, 2014).

<sup>1</sup>Programa de Entomología y Acarología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

<sup>2</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

<sup>3</sup>Laboratorio de Acarología “Anita Hoffmann”, Facultad de Ciencias, UNAM.

<sup>4</sup>Facultad de Agrotecnología, Universidad Politécnica “Francisco I Madero”.

\* autor para correspondencia: [coleoptero77@hotmail.com](mailto:coleoptero77@hotmail.com)

Estos antecedentes nos dan una idea del poco conocimiento taxonómico que se tiene del grupo, además se desconocen aspectos básicos sobre la biología y comportamiento, así mismo la nula evaluación de los daños que provocan a sus hospederos no esclarecen su importancia económica. Por lo que el objetivo del siguiente trabajo busca contribuir con el conocimiento taxonómico de los eriófidos asociados a árboles de la familia Pinaceae, una evaluación preliminar de los daños ocasionados y su distribución en estas plantas.

## MATERIALES Y MÉTODO

A partir del 2013 se realizaron recoletas de follaje de diversas especies del género *Abies* y *Pinus* en varias localidades de los 26 estados con presencia de estas especies, se tomaron acículas de las partes altas, medias y bajas así como de los cuatro puntos cardinales; este fue trasladado al laboratorio de entomología forestal del Colegio de Postgraduados, campus montecillo, en bolsas herméticas debidamente etiquetadas. Se montaron ejemplares botánicos para su determinación taxonómica. Los eriófidos se extrajeron y montaron de acuerdo a lo propuesto por Amrine y Manson (1996); la clasificación a género se realizó con las claves de Amrine, *et al.* (2003), y para las especies se revisaron las descripciones originales. Para la evaluación de los daños y observaciones de comportamiento, se tomó un 20 % del follaje, y se realizaron observaciones bajo microscopio estereoscópico.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se recolectaron un total de 39 hospederos de los cuales 35 taxones son del género *Pinus* y cuatro de *Abies*, en ellos se encontraron 28 especies de ácaros eriófidos asociadas, de las cuales 17 pertenecen a la familia Eriophyidae y 11 a Phytoptidae, no se encontraron representantes de la familia Diptilomiopidae. Hasta el momento del total de especies encontradas se presentan únicamente 14 las cuales han sido determinadas a nivel específico y sus hospederos, las restantes se encuentran en proceso taxonómico ya que es posible que sean nuevas (Cuadro 1).

Diferentes especies de eriófidos asociadas a los pinos, se encontraron habitando en las partes más tiernas de las acículas esto es en su base y donde se encuentran protegidos de las

condiciones climáticas adversas así como de sus depredadores, algunos otros en las partes más maduras, de las especies asociadas al género *Abies*, los organismos se encontraron vagando libremente sobre las acículas y unos cuantos en la base de estas y que por lo general eran organismos en estados quiescentes. Todas las coníferas presentaron daños en las acículas, asociados a donde se encontraron los eriófidos, este fue variable en proporción y tipo en cada una de las plantas evaluadas, se encontró desde acículas con manchas cloróticas en su base, y brotes de acículas enrolladas, cabe señalar que no se encontraron agallas en los conos como se ha reportado para algunas pináceas (Castagnoli *et al.*, 2010); mientras que para las especies de los abetos, presentaron acículas cloróticas en su base. El follaje evaluado presentó un daño de entre 5 y 40 % (Cuadro 1).

Los daños son más evidentes, en las partes altas de los árboles y disminuye su proporción hacia las partes más bajas de este, así mismo se observó que los daños son más notorios en los puntos este, oeste y sur del árbol y menores en la cara norte.

**Cuadro 1. Relación de especies de eriófidos encontradas y determinadas para las pináceas en México.**

Pinaceae	Estados	Especies de Eriófidos	Daño	% de daño
<i>Pinus caribea</i>	QROO	<i>Platyphytoptus pineae</i>	Clorosis	40
		<i>Setopus jonesi</i>	Deformación	5
<i>P. contorta</i>	BCN	<i>Trisetacus camponodus</i>	Clorosis	10
		<i>Platyphytoptus multisternatus</i>	Errante	15
<i>P. halepensis</i>	MEX	<i>Trisetacus halepensis</i>	Clorosis	10
		<i>Platyphytoptus sabiniana</i>	Clorosis	5
<i>P. jeffreyi</i>	BCN	<i>Platyphytoptus eloradensis</i>	Errante	35
		<i>Phyllocoptes farkasi</i>	Clorosis	5
		<i>Setoptus jonesi</i>	Deformación	10
<i>P. lambertiana</i>	BCN,	<i>Trisetacus alborum</i>	Clorosis	35
<i>P. lumholtzii</i>	CHIH, JAL, ZAC	<i>Setoptus strobacac</i>	Deformación	20
<i>P. oocarpa</i>	JAL, GRO, CHIA	<i>Setopus viator</i>	Clorosis	40
		<i>Platyphytoptus pineae</i>	Errante	15
<i>P. ponderosa</i>	BCN	<i>Platyphytoptus eloradensis</i>	Errante	45
		<i>Setopus jonesi</i>	Deformación	20
<i>P. quadrifolia</i>	BC	<i>Platyphytoptus eloradensis</i>	Errante	20
		<i>Setopus jonesi</i>	Deformación	15
<i>Abies concolor</i>	BCN, CHIH	<i>Eptrimerus abietis</i>	Clorosis	25

De las 14 especies determinadas, todas son consideradas nuevos registros para los estados donde fueron encontradas, cabe mencionar que no se ha encontrado a *Trisetacus ehmanni* en ninguno de los árboles colectados, la cual ha sido la única especie reportada para el país (Cibrián-Tovar *et al.*, 1995). Como era de esperarse al no contar con estudios faunísticos del

grupo en México, el 50 % de la especies restantes (14) resultaron ser nuevas y asociadas a pinos endémicos del país, lo que nos da una idea de todo lo que falta por ser estudiado.

Como se observa en el cuadro 1, algunas especies de pinos albergan hasta tres especies de eriófidos y de familias diferentes, y lo que se ha observado es que cada una de ellas ocupa un espacio diferente en las acículas, las especies de los géneros *Setoptus* y *Trisetacus*, habitan en la base de las acículas en donde está el tejido en crecimiento y protegidos por las brácteas que las rodean, pero *Setoptus* lo hace internamente y *Trisetacus* al exterior mientras que *Phyllocophes* y *Platyphytoptus* se encuentran fuera de estas y son especies errantes, lo mismo sucede con *Epitrimerus* en el género *Abies*. Es por ello que las especies de *Setoptus* y *Trisetacus* son la que causan un daño más notable al estar alimentándose en las partes en crecimiento; sin embargo en este estudio, las especies de *Setoptus* han sido mucho más abundantes que *Trisetacus* y se considera que son las que más afectan a los árboles a diferencia de lo que reportan Cibrián-Tovar *et al.* (1995).

Los daños encontrados pudieran no ser considerados como importantes; sin embargo nunca se ha realizado una evaluación de la salud del árbol, ya que es posible que con la constante alimentación de estos ácaros a lo largo del tiempo puedan mermar su salud, como ha sido estudiado para el eriófido *Eriophyes cerasicrumena* Walsh, 1867, que produce agallas en hojas del capulín (*Prunus serótina*) y *Aculus fockeui* Nalepa y Trouessart, 1981, en hojas de durazno (*Prunus persica*) en ambos casos disminuye la tasa fotosintética de la planta debido a la constante alimentación de los ácaros (Larson, 1998; Kondo y Hiramatsu, 1999).

Es importante mencionar que todas las acículas evaluadas provienen de árboles maduros de bosques naturales en los cuales los daños más evidentes son en las acículas nuevas (clorosis) y en acículas maduras en menor proporción y son muy contrastantes, por otro lado y en menor proporción las deformes (enrolladas) que se presentan únicamente en renuevos; esto se debe a que ha encontrado que la turgencia de las células es un factor importante en la alimentación de los eriófidos por que dependen de la presión contenida en estas para tomar su alimento, ya que al perforarla, su contenido sube por capilaridad a través de los estiletes y esta presión es mayor en células en crecimiento (Whitmoyer *et al.*, 1972).

Por lo tanto de las 14 especies determinadas consideramos que las del género *Setoptus* son las que más daño causan y las más abundantes dentro de las acículas en comparación con el

género *Trisetacus*; respecto a los daños provocados se requieren de más estudios en los cuales poder establecer si estos ácaros tienen potencial para ser considerados como especies de importancia económica. Con este estudio podremos esclarecer la relación que los ácaros eriófididos presentan con las pináceas y para ello es necesario primeramente contar con un listado faunístico de especies asociadas y posteriormente realizar estudios más complejos como los biológicos y ecológicos; se sigue trabajando en la taxonomía, así como en estudios de biología y comportamiento.

### AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por la beca otorgada para los estudios de doctorado del primer autor.

### LITERATURA CITADA

- Amrine, W. J., T. H. A. Stansny and H. W. C. Fletchtman. 2003. Revised keys to world genera of eriophyoidea (Acari: Prostigmata). Indira. Publishing House. W. Bloomfield, Mich. 244 pp.
- Amrine Jr., J. A., and D. C. M. Manson. 1996. Preparation, Mounting and Descriptive Study of Eriophyid Mites. In: E. E. Lindquist, M. W. Sabelis and J. Bruin. (eds.) Eriophyoid mites – Their biology, natural enemies and control. Elsevier Science Publ. Amsterdam, The Netherlands. pp. 383-396
- Amrine, J.W. and T.A. Stasny. 1994. Catalog of the Eriophyoidea (Acarina: Prostigmata) of the world. Indira Publishing House, West Bloomfield, Michigan 798 pp.
- Cibrían-Tovar, D., J.T., Méndez-Montiel, R., Campos-Bolaños, H.O., Yates III, y J.E. Flores-Lara. 1995. Insectos Forestales de México. UACH. Sec. Agr. Recursos Hidráulicos, México. USDA, For. Serv., Nat. Resources, Canada, Com. For. de América del Norte, FAO, México. 453 p.
- Cibrían-Tovar, D., D. Alvarado y S. E. García. 2007. Enfermedades Forestales en México. Universidad Autónoma Chapingo, CONAFOR-SEMARNAT. U. S. Forest Service, Canadian Forest Service y FAO. Chapingo. 587 p.
- Castagnoli, M., M. Lewandowski., G. S. Łabanowski., S. Sauro. and G. M Soika. 2010. An insight into some relevant aspects concerning eriophyoid mites inhabiting forests, ornamental trees and shrubs. Exp. Appl. Acarol. 51:169-189.
- Hoffman, A. y G. López-Campos. 2000. Biodiversidad de ácaros de México. UNAM. CONABIO. México. D. F. 230 pp.
- Kondo, A. y T. Hiramatsu. 1999. Analysis of peach tree damage caused by peach silver mite, *Aculus fockeui* (Nalepa et Trouessart) (Acari: Eriophyidae) Jpn. J. Appl. Entomol. Z. 43, 189-193
- Larson, K. 1998. The impact of two gall forming arthropods on photosynthesis rates of their host. Oecologia. 115:161-166
- Pérez, M. T., C. Guzmán-Cornejo., G. Montiel-Parra., R. Paredes-León. y G. Rivas. 2014. Biodiversidad de ácaros en México. Rev. Mex. Biodivers. Supl. 85: 399-407.
- Whitmoyer, R.E., L.R. Nault and O.E. Bradfute, 1972. Fine structure of *Aceria tulipae* (Acarina: Eriophyidae). Ann. Ent. Soc. Amm., 65(1): 201-215.



## DINÁMICA POBLACIONAL DE *Oligonychus punicae* y *Oligonychus perseae* (ACARI: TETRANYCHIDAE) EN DOS HUERTAS DE AGUACATE DEL MUNICIPIO DE URUAPAN, MICHOACÁN

Laura A. **Salvador- De Jesús**<sup>1\*</sup>, Edith G. **Estrada –Venegas**<sup>2</sup>, Armando **Equihua-Martínez**<sup>3</sup>, M. P. **Chaires-Grijalva**<sup>4</sup> y Gabriel **Otero-Colina**<sup>5</sup>.

### INTRODUCCIÓN

México es uno de los principales productores de aguacate (*Persea americana* Mill.) es la cuarta fruta tropical más importante en el mundo. La producción nacional del aguacate se ha incrementado en cuanto a superficie cultivada y volumen de producción, siendo el estado de Michoacán quien ocupa el primer lugar con 1 millón de toneladas de producción equivalente al 90% seguido de Nayarit con 26, 000 t (2.5 %), Morelos con 25, 000 t (2.2 %) y el Estado de México con 21,000 t (2%) (SIAP, 2010; Rubí *et al.*, 2013). Sin embargo la producción disminuye, debido a los daños ocasionados por plagas y enfermedades, ocasionando pérdidas económicas y altos costos para su control.

Los ácaros de la familia Tetranychidae asociados al cultivo del aguacate son uno de los grupos de mayor importancia en número y diversidad de especies descritas (Pritchard y Baker, 1955; Gutierrez, 1985; Baker y Tuttle, 1994; Quirós *et al.*, 1996). Las bases de los quelíceros están fusionados y forman un estilóforo, adaptado para penetrar en el tejido de las plantas, normalmente los daños se presentan con puntos cloróticos ocasionando bronceado o puntuación, disminuyendo la actividad fotosintética (Cerna *et al.*, 2009).

En México se han reportado dos especies para el cultivo del aguacate, *Oligonychus punicae* (Hirst) y *Oligonychus perseae* (Tuttle, Baker y Ababtiello), considerados como los más perjudiciales (Estrada-Venegas, 2002).

<sup>1</sup>Fitosanidad- Fitopatología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

\*Autor de correspondencia: [salvador.jesus@colpos.mx](mailto:salvador.jesus@colpos.mx)



*Oligonychus punicae* – Esta especie probablemente es originaria de México y Guatemala, Barbosa (1983) menciona que su ciclo de vida a 22 °C es de 15.74 días. La población se desarrolla a lo largo del nervio central de la hoja, introduciendo sus estiletes en los tejidos de la planta provocando un manchado rojizo (Aponte y McMurty, 1997; Cerna *et al.*, 2009).

*Oligonychus perseae*- Es una plaga de las más importantes debido a su resistencia a los organosfosforados, se encuentra en el envés de las hojas jóvenes, agrupados en colonias y como protección están cubiertas por una telaraña, a mayor población se forman largas tiras necróticas a lo largo de las nervaduras de las hojas (Salinas *et al.*, 1985).

Ante la problemática que estas dos especies representan, el objetivo de este trabajo fue conocer la dinámica poblacional en dos huertas de aguate hass en diferentes condiciones agroecológicas con la finalidad de generar información básica sobre el comportamiento que sea aplicable a los programas de manejo.

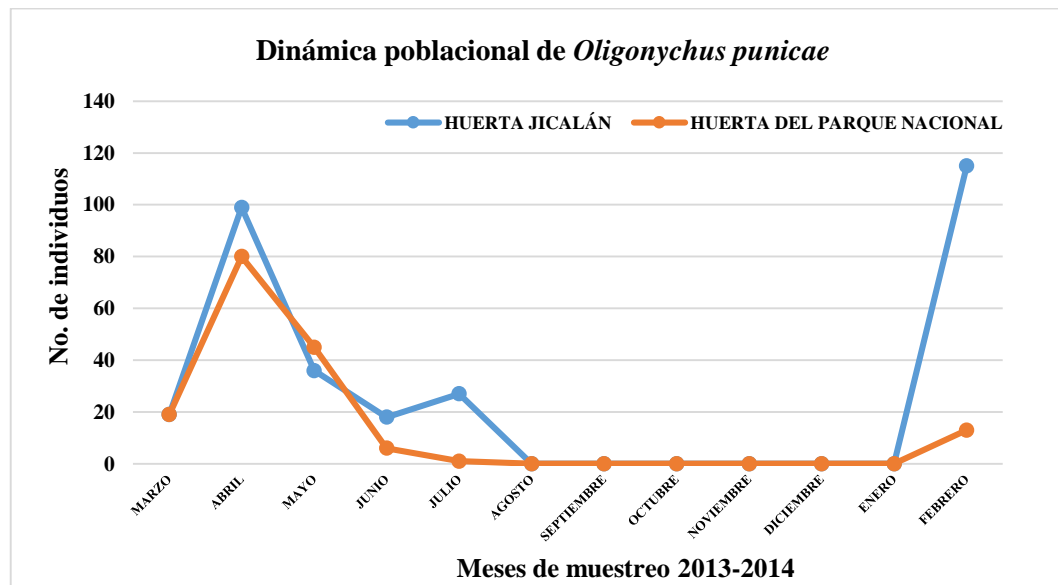
## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en dos huertas del municipio de Uruapan, en el estado de Michoacán. La huerta Jicalán ubicado en las coordenadas 19° 23' 06.38'' N y 102° 04' 13.41'' W, altitud de 1593 msnm, se caracteriza por tener un manejo de tipo convencional, un monocultivo donde se usan agroquímicos para el control de plagas y enfermedades. La huerta del Parque Nacional Barranca del Cupatitzio ubicado en las coordenadas 19° 25' 44.65'' N y 102° 05' 40.95'' W, altitud 1779 msnm, se caracteriza por ser una huerta de tipo orgánico, un monocultivo rodeado de diversidad de flora y fauna, para el control de plagas utilizan insecticidas botánicos y realizan labores culturales.

Los muestreos se realizaron a partir del mes de marzo de 2013 y finalizando el mes de febrero de 2014. En cada sitio de muestreo se seleccionaron 10 árboles al azar y 3 hojas por cada punto cardinal. Las muestras se depositaron en bolsas de plástico y se trasladaron al laboratorio en Texcoco, Estado de México. En el laboratorio el follaje fue revisado en el microscopio estereoscópico, se colectaron los organismos y una parte representativa fue seleccionada para el aclarado y montaje con líquido de Hoyer, se realizaron las preparaciones que fueron utilizados para la determinación taxonómica mediante claves dicotómicas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*Oligonychus punicae* En el primer mes de muestreo realizado en marzo 2013, hay una menor población, durante el mes de abril hasta julio las huertas presentan una disminución en el número de individuos, y de septiembre a enero se presenta poca actividad, mientras que en la huerta del Parque Nacional en el mes de abril presenta un pico poblacional, a partir del mes de mayo decrece la población y para el mes de febrero de 2014 vuelve a presentarse en menor cantidad.



**Figura 1** Dinámica poblacional de *Oligonychus punicae* en dos huertas de aguacate en condiciones agroecológicas diferentes. Presenta dos picos poblacionales en el mes de abril 2013 y febrero 2014.

En la figura 1 Las dos huertas presentan ligeras diferencias a nivel poblacional, presentando dos picos poblacionales en el mes de abril de 2013 y en el mes de febrero de 2014, en el Parque Nacional solo se presenta durante el mes de abril de 2013, estos datos difieren con la investigación realizada en Coatepec de harinas en el Estado de México, ahí se presentan dos picos poblacionales, uno en el mes de mayo y otra en noviembre (Estrada, 2002) posiblemente la diferencia de aparición de los picos poblacionales en Michoacán y en el Estado de México, se debe a los factores climáticos de cada lugar, el tipo de manejo de la huerta o el nivel de vegetación del lugar.

*Oligonychus perseae* Las poblaciones de *O. perseae* tienden a crecer de forma exponencial al comienzo del verano, seguido de un rápido descenso en el final del verano

(Kerguelen y Hoddle 1999; Hoddle *et al.*, 1999, 2000; Montserrat *et al.*, 2013; Zapalà, *et al.*, 2015), los datos obtenidos del muestreo coinciden con el pico más alto obtenido durante el verano en la huerta del Parque Nacional, disminuyendo a partir del mes de septiembre, en la huerta Jicalán *O. perseae* en el mes de junio y julio presentan una mayor actividad, sin embargo no presenta picos poblacionales altos.

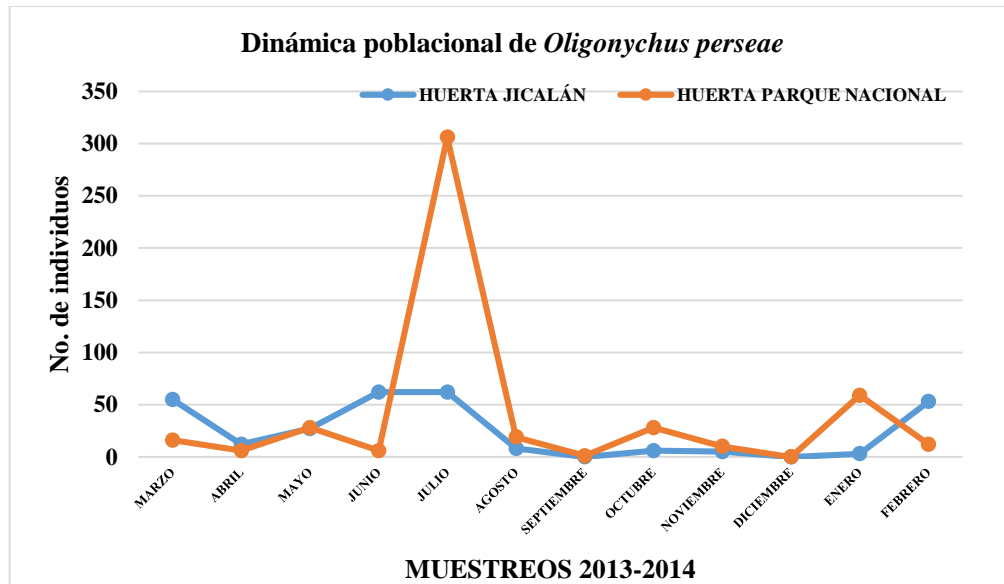


Figura 2 Dinámica poblacional de *Oligonychus perseae*. Pico poblacional en el mes de julio 2013 en la huerta del Parque Nacional

Al comparar las dos sitios en diferentes condiciones agroecológicas, el ANOVA mostró que no hay diferencias significativas entre ellas ( $F= 0.54$ ;  $p>0.0001$ ), la prueba de Tukey confirmó que el tipo de manejo (convencional u orgánico) no influyen en el comportamiento poblacional *O. punicae* y *O. perseae*, debido a que en la huerta con manejo orgánico sigue el mismo paradigma de la agricultura convencional donde el objetivo es superar al factor limitante (*O. punicae* y *O. perseae*) sustituyendo insumos, y que desde la perspectiva agroecológica, debe existir una relación entre la biodiversidad, procesos ecosistémicos y la productividad (Altieri y Nicholls, 2007).

En conclusión, en la huerta Jicalán, se presenta el mayor número de individuos de *Oligonychus punicae*, además presenta dos picos poblacionales en el mes de abril y febrero, mientras que en la huerta del Parque Nacional se presenta el mayor pico poblacional de *Oligonychus perseae* en el mes de Julio, Estadísticamente los sitios aun con diferentes

condiciones agroecológicas, no existen diferencias significativas y se debe a que posiblemente al tratarse de que ambas huertas son monocultivos de aguacate, no hay autoregulación poblacional de manera natural, al verse interrumpido por el uso de acaricidas sintéticos y botánicos, disminuyendo el número de depredadores y aumentando el número de otros artrópodos asociados al cultivo del aguacate.

### AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONACYT por la beca otorgada para la realización de esta investigación.

### LITERATURA CITADA

- Altieri M. A. y C. I. Nicholls. 2007. Conversión agroecológica de sistemas convencionales de producción: teoría, estrategias y evaluación. *Revista ecosistemas*. 16(1): 3-12.
- Baker, E. W. y D. M Tuttle. 1994. A guide to the spider mites (Tetranychidae of the United States. Indira Publishing House 347 p.
- Cerna, E. Badii, MH, Ochoa Y, Aguirre L.A. y Landeros J. 2009. Tabla de Vida de *Oligonychus punicea* (Acari: Tetranychidae) en hojas de aguacate (*Persea americana* Mill) Variedad Hass, fuerte y criollo. 25(2).
- Estrada V. E., S. Rodríguez R. y J. A. McMurtry. 2002. Some avocado mites from Michoacán, México. *International Journal of Acarology*. 28: 4, pp. 387-393.
- Gutierrez J. 1985. Anatomy, phylogeny and systematics. In: H. Helle y M. Sabelis (eds) world crop pests. Spider mites. Elsevier Sci. Pub. B.V., Amsterdam, V: (1) A pp. 75-90.
- Pritchard, A. E. Y E.W. Baker. 1955. A revision of the spider mite family Tetranychidae. *Mem. Pac. Coast Entomol. Soc.* 2:1-472
- Quirós D G, M., R. Viloría., y R. Carvajal. 1996. Especie nueva del género *Mononychellus* (Prostigmata: Tetranychidae), sobre *Desmodium uncinatum* (Papilionaceae), en Venezuela. *Anales Inst. Biol. Universidad Nacional autónoma de México, Ser. Zool.* 67 (2): 245-250.
- Rubí-Arriaga M, A.L. Franco-Malvaíz; S. Rebollar-Rebollar, E. E. Bobadilla-Soto; I. Martínez- De la Cruz, Y. Siles- Hernández. 2013. Situación actual del cultivo del aguacate (*Persea americana* Mill.) en el Estado de México, México. *Tropical and subtropical Agroecosystems* 2013, 16 (1): 93-101.
- Salinas- Anaya, P. y Reséndiz-García,B. 1985. Ciclo Biológico de la Araña cristalina del aguacatero, *Oligonychus perseae* (Tuttle, Baker y Abbatiello) (Prostigmata: Tetranychidae). *Revista Chapingo, Serie Protección Vegetal* 2(1): 53-56.
- Zappalà L., Kreiter S., Russo A. Tropea G.G. y Auger P. 2015. First record of the perseae mite *Oligonychus perseae* (Acari: Tetranychidae) in Italy with a review of the literature *International Journal of Acarology*. 41: (2), 97-99.

## ENEMIGOS NATURALES (ÁCARO-PATÓGENO Y DEPREDADORES) DE *Raoiella indica* EN MÉXICO

**Morales de la Cruz** Cipriana<sup>1</sup>, **Otero Colina** Gabriel<sup>1\*</sup>, **Alatorre Rosas** Raquel<sup>1</sup>,  
**Martínez Bolaños** Luciano<sup>1</sup>, **Estrada Venegas** Edith Guadalupe<sup>1</sup> y **Sánchez Soto** Saúl<sup>1</sup>

### INTRODUCCIÓN

El ácaro rojo de las palmas, *Raoiella indica* Hirst (Acari: Tenuipalpidae), es una plaga de importancia cuarentenaria, procedente de países alrededor del Océano Índico y que se detectó por primera vez en el año 2009 en isla Mujeres y en Cancún, Quintana Roo, donde ocasiona graves daños en palmas de coco y a plátano, así como a diversas especies vegetales (SENASICA, 2012). En el transcurso de su expansión en México y otros países de América tropical se ha adaptado a nuevos ambientes y hospedantes, donde puede llegar a poblaciones muy altas y causar un daño significativo. Su control resulta difícil, ya que se necesitan aplicaciones repetidas de insecticidas (Mendoza *et al.*, 2005). Las plantas afectadas por la presencia del ácaro, muestran manchas amarillentas dispersas en el haz y envés de las hojas, las que posteriormente se tornan completamente amarillentas. La alta infestación de esta plaga puede ocasionar aborto de flores o frutos pequeños (Hoy *et al.*, 2006).

Existen varios enemigos naturales de *R. indica* como los ácaros depredadores *Amblyseius channabasavanni* (Phytoseiidae) y el coccinélido *Stethorus keralicus* (Coccinellidae) (Hoy *et al.*, 2006). También se reporta a *Amblyseius largoensis* como un depredador muy común, que se presenta durante todo el año asociado con *R. indica* en Trinidad, Tobago y en Puerto Rico (Carrillo *et al.*, 2010; Carrillo y Peña, 2011). En Florida, EE.UU., los mismos autores reportan que las poblaciones de *A. largoensis* son capaces de aumentar cuando se alimentan solamente de *R. indica*. En Cuba, y Colombia reportan que este fitoseido es el único depredador asociada con el acaro rojo de las palmas, con preferencia por estado del huevo. Este depredador presentó una respuesta funcional de tipo II y numérica positiva al aumento de las densidades de *R. indica* (Ramos *et al.*, 2010; Carrillo *et al.*, 2011b).

<sup>1</sup>Fitosanidad- Entomología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

Autor de correspondencia: [cipri\\_morales@hotmail.com](mailto:cipri_morales@hotmail.com)

En cuanto a los patógenos, no hay estudios específicos que hablen sobre hongos ácaro-patógenos. Como ejemplo de un dato sobre parasitismo de un hongo en ácaros fitófagos, Rosas-Acevedo y Sampedro-Rosas (2006) mencionan a *Hirsutella* infestando *Brevipalpus phoenicis*. Por esta razón se llevó a cabo esta investigación, con el objetivo de identificar los enemigos naturales de *Raoiella indica* tanto depredadores como patógenos en zonas de prevalencia de este ácaro.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Entre 2013 y 2014 se hicieron recorridos en varios estados de la República Mexicana, en zonas de prevalencia de *R. indica*, como son: Veracruz, Tabasco, Chiapas, Oaxaca, Campeche, Quintana Roo, Yucatán y Baja California Sur, con el propósito de determinar la presencia de los diferentes enemigos naturales de dicho ácaro. Para esto se visitaron huertas comerciales, plantas de tranpatio y malecones donde se cortaron entre 12 a 15 foliolos de las hojas de palma de coco y se guardaron en bolsas de polietileno, se llevaron lo más pronto posible al laboratorio en hieleras con geles refrigerantes o bolsas de hielo y ahí se revisaron detenidamente bajo microscopio estereoscópico. Se colectaban con un pincel todos los insectos y ácaros depredadores que se encontraban en el foliolo y se transferían a frascos con alcohol al 70%. Si se encontraban ácaros micosados (ácaros con micelio saliente del cuerpo) se les marcaba con un círculo para luego colectarlos y sembrarlos en medio de cultivo.

Para la siembra de los ácaros micosados se preparó medio H el cual contiene sacarosa, dextrosa, peptona de soya, extracto de levaduras y agar. En cada caja Petri con el medio H se marcaron siete u ocho puntos en donde se sembraron los ácaros micosados, para facilitar la ubicación de las colonias que se llegarán a desarrollar. Una vez identificado un ácaro con crecimiento de micelio, usando una aguja de punta fina previamente desinfectada con alcohol y flameada en el mechero se tomó el ácaro micosado y se transfirió en el primer punto de la caja con el medio H; con el mismo procedimiento se hicieron las siembras de otros ácaros hasta completar los siete ácaros en una caja Petri. Todas las cajas sembradas se incubaron a 27°C, cada dos días se observaba para ver si el crecimiento del hongo era uniforme y también

si no había contaminantes, entonces se tomó una pizca con la ayuda de una aguja de disección y se transfirió a una caja Petri nueva con el medio de cultivo H, revisando continuamente para evitar el crecimiento de hongos contaminantes.

Cuando una colonia había alcanzado un diámetro de aproximadamente 2 cm, se tomó una pizca de ella, se hizo un frotis entre porta y cubreobjetos con lactofenol como medio de montaje y se observó en el microscopio de contraste de fases. También se observó el aspecto que tenían las colonias cuando las cajas Petri se invertían (base hacia arriba) y a partir esas cajas se hicieron cultivos monospóricos para su purificación. Se identificaron con base en características morfológicas y por análisis de segmentos del gen ITS 1 y 2. Los ácaros e insectos presentes en las muestras, se colectaron con un pincel de punta fina y se conservaron en alcohol al 70% otra parte de la muestras se colectó por lavado y tamizado de los foliolos con detergente para facilitar el desprendimiento de cualquier ácaro e insecto, posteriormente todo lo que quedaba en el asiento del tamiz se transfirió en un frasco para su revisión. Los ácaros se montaron entre porta y cubreobjetos en líquido Hoyer y los insectos se montaron con alfileres. Se usó microscopio de contraste de fases para la identificación de los ácaros y microscopio estereoscópico para la identificación de los insectos

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En todas las muestras colectadas en los estados de Tabasco, Chiapas, Oaxaca, Campeche, Quintana Roo y Yucatán hubo presencia de Ácaro-patógenos así como también de ácaros e insectos depredadores.

Entre los ácaro-patógenos el que predominó fue el género *Hirsutella* (Figura 1); este hongo se ha reportado en diferentes ácaros, como *Brevipalpus phoenicis* Rossi-Zalaf, 2008; McCoy y Kanavel. (1969) observaron a *Hirsutella thompsonii* en *Phyllocoptruta oleivora* en plantas de cítricos en Florida causando epizootias. También se ha encontrado a *Hirsutella* spp. de manera natural en México en *Aceria guerreronis* (Hall *et al.*, 1980). En este trabajo se encontró que este hongo tiene la capacidad de provocar intensas epizootias sobre este ácaro. Es un patógeno que se ha registrado en los ácaros de las familias *Eriophyidae* y *Tetranychidae*, El parasismo por el hongo se manifiesta cuando el micelio empieza a salir



del cuerpo del ácaro radialmente adhiriéndose sobre el sustrato, con lo que el ácaro queda totalmente firme o pegado al foliolo de la hoja (Figura 1 B y C). Un ácaro sano presenta un color rojo intenso pero cuando es parasitado se torna de color negro obscuro y se empiezan a observar los micelios transparentes salientes del cuerpo de este (Samson *et al.*, 1980). En este trabajo se ha encontrado tres variedades diferentes: *thompsonii*, *vinacea* y *sinematosa* (Figura 2). La identificación a partir del segmento del gen ITS 1 y 2 permitió corroborar preliminarmente que los hongos pertenecen al género *Hirsutella*.

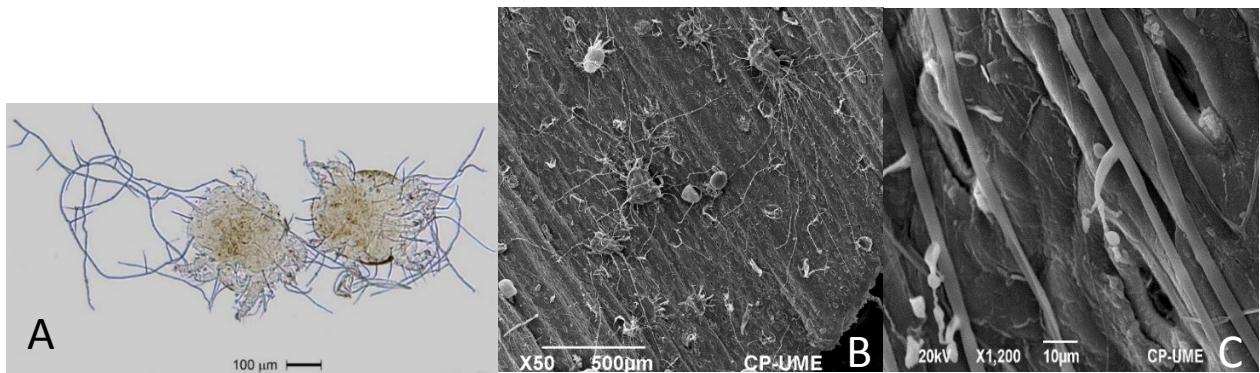


Figura 1. Ácaropatógenos montados en lactofenol entre porta y cubreobjetos y observados en el microscopio Carl Zeiss A) dos adultos de *R. indica* micosados por *Hirsutella* sp. B y C) Fotografía del microscopio electrónico del barrido.

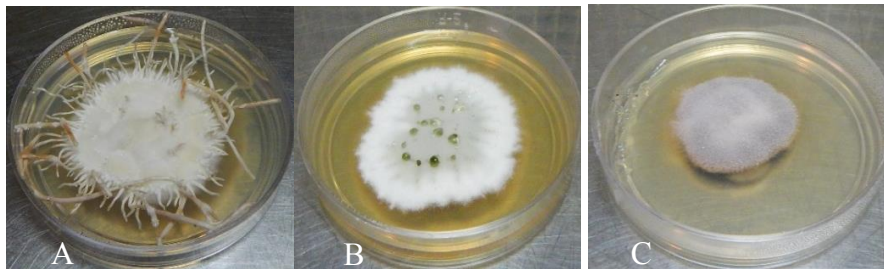


Figura 2. *Hirsutella thompsonii* var. A) *sinematosa*, B) *thompsonii* y C) *vinacea*

Se encontraron ácaros depredadores como *Amblyseius largoensis*, (Phytoseiidae). Este ácaro tiene amplia distribución; en muchos sitios vive donde *R. indica* no está presente (De Moraes *et al.*, 2004). Sin embargo, Carrillo *et al.* (2010) mencionan que este ácaro tiene la capacidad de alimentarse sólo de *R. indica*. En cuanto a los insectos depredadores, se encontraron trips de la familia Aelothripidae alimentándose de las larvas de *Raoiella indica*, así como neurópteros de familia Chrysopidae y coleópteros de la familia Coccinellidae. Carrillo *et al.* (2011b) mencionan la relación de estos insectos con el ácaro rojo de las palmas.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento a CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por el apoyo que me otorga para seguir con este trabajo de investigación.

## LITERATURA CITADA

- Carrillo D., Peña J. E., Hoy M.A., Howard J. F. 2010. Development and reproduction of *Amblyseius largoensis* (Acari: Phytoseiidae) feeding on pollen, *Raoiella indica* (Acari: Tenuipalpidae), and other microarthropods inhabiting coconuts in Florida, USA. *Exp. Appl. Acarol* (2010) 52:119-129.
- Carrillo D., Navia D., Ferragut F, Peña J. E. 2011. First report of *Raoiella indica* Hirst (Acari: Tenuipalpidae) in Colombia. *Fla Entomol* 94(2):370–371
- Carrillo C., A. J. Howard Frank, Jose Carlos V. Rodrigues, Jorge E. Peña. 2011b. Review of the natural enemies of the red palm mite, *Raoiella indica* (Acari: Tenuipalpidae). Springer Science+Business Media B.V. 2011.
- De Moraes, G.J., McMurtry J.A., Denmark H.A.M. 2004. Campos catalog of the mite family Phytoseiidae. (*Zootaxa* 434) 494 pp.
- Hall R.A., Hussey, N.W., y Mariau, D. 1980. Results of biological control agents of the coconut mite *Eriophyes guerreronis*. *Oléagineux*. 35(8-9):395-400.
- Hoy M. A., Peña J and Nguyen R. 2006. Red palm mite, *Raoiella indica* Hirst (Arachnida:Acari: Tenuipalpidae). Institute of Food and Agricultural Sciences (IFAS) University of Florida, Florida. Pág. 6.
- McCoy, C. W., Kanavel, R. F. 1969. Isolation of *Hirsutella thompsonii* from the citrus rust mite, *Phyllocoptruta oleivora*, and its cultivation on various synthetic media. *J. Invertebr. Pathol.*, 14, 386- 390.
- Mendoça R.S., Navia, D., Flechtmann, C.H. 2005. *Raoiella indica* Hirst (Prostigmata: Tenuipalpidae), o ácaro vermelho das palmeiras-um ameaça para as Américas. *Embrapa recursos genéticos e Biotecnologia*.
- Rosas-Acevedo, J. L.; Sampedro-Rosas, L. 2006. Variability of *Hirsutella thompsonii* strains, isolated from phytophagous mites from three terrestrial systems in the State of Colima, Mexico. *Rev. Mexicana de Biodiversidad*. 77: 7-16.
- Ramos M., Gonzales A. I, Gonzales M (2010) Management strategy of *Raoiella indica* Hirst in Cuba, based on biology, host plants, seasonal occurrence and use of acaricide. In: XIII International Congress of Acarology, Recife, Brazil, Abstract book, pp 218–219.
- Samson R. A., McCoy, C. W., O' Donnell, K.L 1980. Taxonomy of the acarine parasite *Hirsutella thompsonii*. *Mycologia*, 72, 359-377.

## *Steneotarsonemus spinki*: DINÁMICA DE POBLACIONES, EVALUACIÓN DE DAÑOS EN CAMPO Y ENEMIGOS NATURALES EN LAS ZONAS PRODUCTORAS DE TABASCO Y VERACRUZ, MÉXICO

Marco A. **Salazar Santiago**<sup>1</sup>, Gabriel **Otero-Colina**<sup>1\*</sup>, Remigio A. **Guzmán Plazola**<sup>2</sup>, Raquel **Alatorre Rosas**<sup>1</sup>, Alejandro **Pérez Panduro**<sup>1</sup>, Carlos F. **Ortíz García**<sup>3</sup>

### INTRODUCCIÓN

El arroz es una planta gramínea del género *Oriza*, la cual se cultiva principalmente para la obtención de sus granos, principal alimento del ser humano en la mayor parte del mundo. Actualmente existe un gran número de especies y variedades en este género; sin embargo, las más comunes son de la especie conocida como *Oriza sativa* (Martínez, 2001). El arroz es afectado por el ácaro *Steneotarsonemus spinki* Smiley (Acari: Tarsonemidae), el cual causa daño mecánico a la planta en el interior de las vainas de las hojas, afecta directamente el raquis de las panículas e influye en los mecanismos de circulación de los nutrimentos. Las lesiones son poco profundas, el mayor problema consiste en que disemina al hongo oportunista *Sarocladium oryzae*. La población de *S. spinki* se incrementa a partir de la fase de inicio del primordio floral hasta la apertura de panícula (Almaguel y Botta, 2005). *Sarocladium oryzae* (Sawada) es un patógeno que causa la enfermedad de la putrefacción de la envoltura de arroz. Las lesiones se agrandan y tienden a unirse, afectando toda la vaina de la hoja. Las panículas afectadas producen escasos granos llenos. En la década de los 70 *S. spinki* produjo en China daños al arroz con pérdidas de 30 a 90% en rendimiento, mientras que Taiwán registró hasta el 20 a 60% de granos vacíos; sin embargo, desde 1930 se atribuyen daños a *S. spinki* en el cultivo de arroz en India (Almaguel y Botta, 2005).

<sup>1</sup>Fitosanidad- Entomología, <sup>2</sup>Fitoatología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

<sup>3</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, Estado de Tabasco, México

\* Autor para correspondencia: [gotero@colpos.mx](mailto:gotero@colpos.mx)

Se observó a *S. spinki* infestando al arroz en Cuba (Ramos *et al.*, 2001) y de ahí ha tenido una rápida diseminación, de manera que actualmente se encuentra en muchos países de América (Almaguel y Botta, 2005; Instituto Colombiano Agropecuario, 2005; Castro y Ochoa, 2006). En el año 2006 se observó la presencia de *S. spinki* en Palizada Campeche, México (Trujillo, 2007).

Los objetivos de este trabajo son determinar la asociación de fenología del arroz con las infestaciones de *S. spinki*, identificar a los hongos asociados con *S. spinki* y con el vaneo y las especies de enemigos naturales de *S. spinki* presentes y probar su efectividad para el control del ácaro, así como determinar los factores que afectan a las poblaciones de *S. spinki*. El trabajo se restringe a Tabasco y Veracruz, aunque hay otras zonas arroceras afectadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se establecieron plantas de arroz traídas de los estados de Tabasco y Veracruz (Var. Milagro Filipino) a una temperatura de 25°C a 27°C, fotoperiodo y humedad controlados, con la finalidad de tener ácaros disponibles para iniciar la cría. Tres meses antes y con el fin de contar con plantas hospedantes se sembraron plantas de arroz (Var. Milagro filipino) en suelo estéril para eliminar cualquier organismo presente en el suelo. Para asociar los daños del ácaro con la fenología del cultivo se contó con plantas en las diferentes fases fenológicas, todas estas traídas de campo: vegetativa (activo amacollamiento, altura de la planta y emergencia de las hojas), reproductiva (declinación de macollas, engrosamiento del tallo y floración), maduración (incremento tamaño y peso del grano). Se buscó conocer la composición de la población y sus cambios a lo largo del ciclo fenológico de las plantas.

Para la parte de campo los trabajos se realizaron en plantaciones de arroz de la variedad Milagro Filipino en los municipios de Cárdenas, Huimanguillo y Comalcalco, Tabasco, en siembras de temporal, de julio de 2014 a julio de 2015, con muestreos quincenales en los que se estimaron las poblaciones, la composición de estadios de desarrollo, el efecto del clima y la fenología de las plantas hospedantes sobre dichas poblaciones, sus mecanismos de dispersión y donde se identificaron organismos asociados.

De manera complementaria, se contaron plantas en campo de diferentes edades, para determinar la presencia de hongos (entomopatógenos y fitopatógenos) a partir de la etapa de espigamiento, con y sin síntomas de presencia del ácaro y de vaneo, se verificó la presencia de *S. spinki* y de él se aislaron hongos para identificarlos mediante métodos selectivos. Se observó al microscopio muestras constituidas por 50 plantas infestadas por este ácaro para determinar la presencia de cadáveres del mismo con apariencia de estar parasitados por hongos; éstos se revisaron para determinar las características del hongo asociado, tipo de esporas y realizar una identificación preliminar.

Se realizaron montajes de ácaros asociados, posiblemente depredadores, en lactofenol azul de algodón y se observaron al microscopio óptico de contraste de fase. Se caracterizó morfológicamente e identificaron siguiendo claves. Para la siembra de estos ácaros se transfirieron a cajas Petri (75 x 15 mm) con Saboraud glucosa agar (SGA) más antibióticos y se incubaron y se revisaron hasta que los hongos logren desarrollarse (Cabrera *et al.*, 2005). Se tomaron datos de temperatura y humedad relativa, estos se obtuvieron de registros regulares de estaciones climáticas provenientes de CONAGUA.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la etapa vegetativa (germinación, plántula y amacollamiento) no había aun infestación de ácaros; al inicio de la floración se observó un promedio de 350 ácaros totales/planta; la población máxima coincidió con la fase de emersión o salida de la floración, y fue mayor en las plantaciones germinadas entre los meses de julio y agosto, donde se elevó a 15 760 ácaros totales/planta (huevos, larvas, estados inactivos o ninfocrisálidas, machos y hembras) en las etapas de plena floración, llenado de granos y maduración. Lo anterior ubica a la variedad Milagro Filipino como altamente susceptible al ataque de *S. spinki*. Los estadios más abundantes fueron las hembras y las ninfocrisálidas. Esto se puede observar en el cuadro 1 y 2.



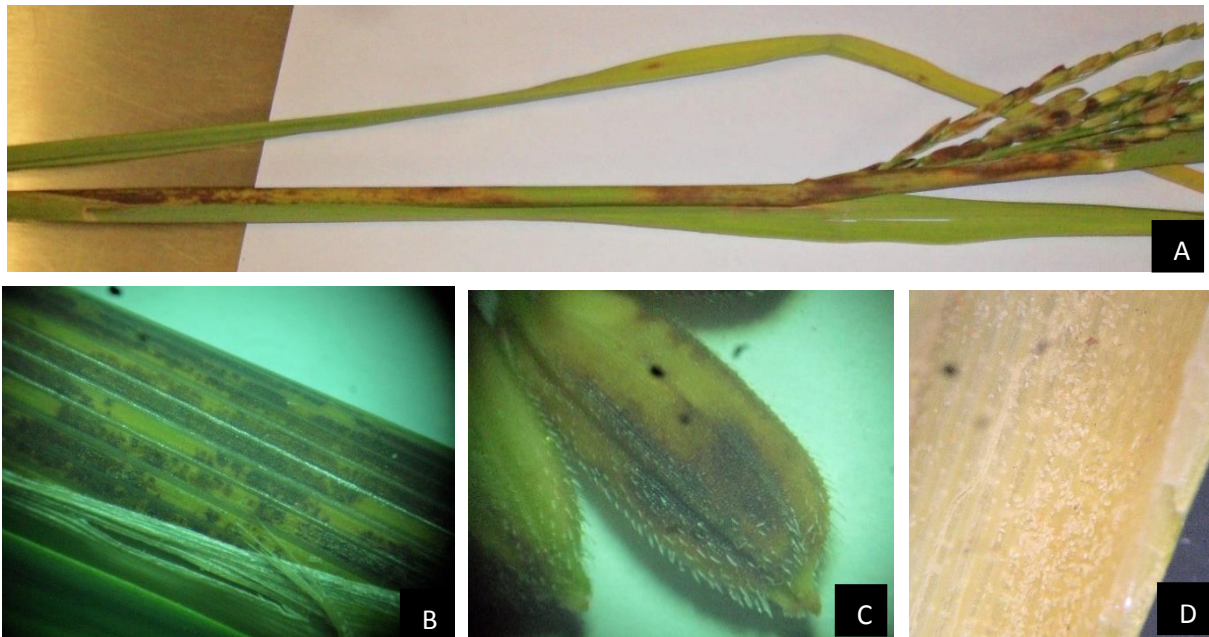
**Cuadro 1. Presencia de *S. spinki* entre finalización de amacollamiento e inicio de floración.**

Planta	Ácaros	Ácaros/tallo	Ácaros/tallos
Presenta entre 8 a 10 tallos	Huevos	35	350
	Larvas	2	20
	Estados inactivos	3	30
	Hembras	0	0
	Machos	2	20

**Cuadro 2. Presencia de *S. spinki* entre floración, espigamiento y maduración.**

Planta	Ácaros	Ácaros/tallo	Ácaros/tallos
Presenta entre 8 a 10 tallos	Huevos	589	5890
	Larvas	278	2780
	Estados inactivos	475	4750
	Hembras	141	1410
	Machos	153	1530

En la figura 1 se observó necrosis en los tallos, marchitez y granos vanos consecutivos al ataque de *S. spinki*. Se postula que la población de *S. spinki* es asocia más fuertemente con la fenología de las plantas que con algún factor climático en particular.



**Figura 1. A) Daños en los tallos de la planta de acuerdo a la población de *S. spinki*, B) Necrosis en tallo, C) Necrosis en semillas y D) poblaciones de *S. spinki*.**

Al mismo tiempo se identificaron plantas hospederas importantes como se observa el cuadro 3, las cuales son refugios *S. spinki*, mientras no hay plantas disponibles del cultivo.

El viento fue un medio de dispersión y no se observó el transporte forético sobre insectos. Como organismos asociados se identificaron ácaros del género *Neoseiulus* (Phytoseiidae) y hongos de la especie *Hirsutella nodulosa*, *Hirsutella thompsonii*, *Hirsutella sinensis*. No se identificó al hongo *Sarocladium oryzae*, lo que sugiere que los daños observados en producción de arroz en la zona de estudio son causados directamente por *S. spinki* y no por la asociación con dicho hongo.

**Cuadro 3. Lista de plantas hospedantes de *S. spinki*, donde se les encontró mientras no hay presencia del cultivo de arroz.**

Familia	Especie
Poaceae	<i>Leptochloa scabra</i> Nees
	<i>Echinochloa colona</i> (L.) Link
	<i>Panicum máximum</i> Jacq.
Cyperaceae	<i>Cyperus hermaphroditus</i> (Jacq.) Standl

### AGRADECIMEINTOS

Al Consejo Nacional y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización de esta investigación y la beca se me ha estado otorgando durante mis estudios doctorales.

### LITERATURA CITADA

- Almaguel R., L.; Botta F., E. 2005. Manejo Integrado de *Steneotarsonemus spinki*, Smiley. Resultado de Cuba y transferencia para la región de Latinoamérica y el Caribe. Laboratorio de Acarología. Instituto de Investigación de Sanidad Vegetal.
- Cabrera R. I., García, A., Otero. C. G., Almaguel, L., G., A. 2005. *Hirsutella nodulosa* y otros hongos asociados al ácaro Tarsonémido del arroz *Steneotarsonemus spinki* (Acarina: Tarsonemidae) en Cuba. Folia Entomol. Méx. 44 (2), Pp. 115–121.
- Castro B. A., Ochoa R. C. 2006. The threat of the panicle rice mite, *Steneotarsonemus spinki* Smiley, to rice production in the United States. In: Proceedings of the Thirty First Rice Technical Working Group. The Woodlands, Texas, Pp. 97–98.
- Instituto Colombiano Agropecuario. 2005. Resolución No. 001195 de 2005. Diario Oficial, edición 45.892. Miércoles 27 abril de 2005. Bogotá Colombia, Pp. 17.
- Martínez G., J. 2001. Instructivo técnico del cultivo del arroz (segunda edición). Instituto de Investigación del arroz. Ministerio de la Agricultura.
- Ramos M., G., C.; Cabrera, R., I. 2001. Presencia de *Steneotarsonemus spinki* (Acari: Tarsonemidae) en cuatro variedades de arroz en la Republica Dominicana. Rev. Protec. Veg. 16, Pp. 6–9.
- Trujillo A.J. 2007. <http://www.pestalert.org/oprDetail>. Fecha de consulta: 25 de septiembre 2012.



## DIVERSIDAD GENÉTICA DEL GÉNERO *Brevipalpus* EN CUATRO ESPECIES DE CÍTRICOS

Delfina **Salinas Vargas**<sup>1</sup>, Ma. Teresa **Santillán Galicia**<sup>1</sup>, Ariel W. **Guzmán Franco**<sup>1</sup>, Laura Delia **Ortega Arenas**<sup>1</sup>, Gustavo **Mora Aguilera**<sup>2</sup>, Antonio **López Hernández**<sup>3</sup>

### INTRODUCCIÓN

Los ácaros de la familia Tenuipalpidae son conocidos como falsas arañitas o ácaros planos (Childers *et al.*, 2001), y fueron descritos por Berlese en 1913 (Jeppson *et al.*, 1975), con 891 especies en 34 géneros distribuidas en el mundo (Mesa *et al.*, 2009). Son ácaros de hábitos fitófagos, se alimentan principalmente de hojas cerca de la nervadura central en el envés, aunque hay otras especies que se alimentan de frutos, corteza y botones florales (Jeppson *et al.*, 1975). Su importancia radica en que los ácaros son transmisores de virus; tal es el caso de los cítricos, el café, el maracuyá y algunas plantas ornamentales como las orquídeas (Bastianel *et al.*, 2006). La identificación taxonómica, basada en características morfológicas, del género *Brevipalpus* es característico para su estudio; sin embargo, debido a su amplio rango de hospedantes y su distribución mundial, existe una variación morfológica entre las especies, ya que se tiene una relación específica entre los virus que transmiten, por lo que, es probable de que existan especies crípticas, ya que las especies de importancia económica han sido clasificadas de acuerdo a las similitudes morfológicas (Beheregaray y Caccone, 2007). Debido a las características similares que presentan las especies del género *Brevipalpus* spp. es posible que la identificación en muchos casos se haya realizado erróneamente, además, se han observado variaciones intraespecíficas dando lugar a sinonimias (Navia *et al.*, 2013). El gen citocromo oxidasa subunidad I (COI) se ha usado para determinar la diversidad genética y estructura poblacional en distintas poblaciones de ácaros de importancia en cítricos (Yuan *et al.*, 2010).

<sup>1</sup>Fitosanidad- Entomología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

<sup>2</sup>Fitosanidad- Fitopatología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

<sup>3</sup>LANGEBIO, CINVESTAV-I.P.N. Unidad Irapuato.

Autor de correspondencia: [teresa.santillan.galicia@gmail.com](mailto:teresa.santillan.galicia@gmail.com)

Estudios recientes en poblaciones de complejo *Brevipalpus phoenicis* s. l. recolectados en México y Brasil demostraron la presencia de cuatro haplotipos (Sánchez-Velázquez *et al.*, 2015). Así mismo, la variación genética observada pareciera estar influenciada por el hospedante por lo que consideramos realizar esta investigación para determinar si la variedad genética de los individuos del género *Brevipalpus* está relacionada con la especie de cítrico en donde se desarrollan.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Recolección de ácaros en huertas de especies cítricas.** Hembras adultas del género *Brevipalpus* spp. fueron recolectadas de hojas y frutos en cuatro especies de cítricos: naranja, toronja, mandarina y limón persa en huertas heterogéneas y homogéneas de los estados de Sinaloa, Michoacán y Veracruz. Se seleccionaron cinco árboles de cada especie cítrica dentro de la huerta, se tomaron hojas y frutos que mostraron síntomas de daños por ácaros y con la ayuda de una lupa de campo se cercioró la presencia del género *Brevipalpus* spp., las muestras de cada árbol se pusieron en charolas de plástico para su transporte. De la misma huerta se cosecharon frutos (en madurez fisiológica) para la manutención de los ácaros recolectados.

**Establecimiento de las colonias de las hembras recolectadas** Las hembras se establecieron en frutos de la especie de cítrico de donde se recolectaron. Para ello, los frutos se lavaron con jabón y agua, y se secaron al ambiente durante 12 horas; después a cada fruto se le impregnó (sólo la mitad de éste y la parte inferior) con parafina. Posteriormente se demarcaron los frutos con “insect barrier glue”, para separar la parte inferior impregnada con parafina y la parte superior para confinar a los ácaros. En esta última, se colocó una mezcla de arena, harina y yeso (en la misma proporción) como sitio de refugio y oviposición. Una vez preparados los frutos, se procedió a la transferencia de las hembras bajo un microscopio estereoscópico y con la ayuda de un pincel fino se colocaron individualmente en frutos de naranja, limón persa, mandarina y toronja, previamente etiquetados con sus respectivos datos de colecta. Los frutos ya infestados se mantuvieron en charolas de plástico a una temperatura de 24 – 26 °C y una humedad relativa del 60%, de acuerdo con el método de Chiavegato-Gonzaga (1986). Las colonias se mantuvieron hasta obtener todos los descendientes de la

primera generación. Para garantizar el desarrollo de las colonias, los frutos que mostraban signos de deshidratación, fueron reemplazados y los ácaros transferidos a frutos nuevos.

**Extracción de DNA y amplificación** El DNA genómico fue extraído de dos hembras adultas de la primera generación de las colonias previamente desarrolladas. Para la extracción se empleó el Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Germantown, MD, USA) con adaptaciones para la extracción del DNA total en artrópodos pequeños. El DNA obtenido se amplificó mediante PCR utilizando oligonucleótidos de la región citocromo oxidasa I (COI) del DNA mitocondrial DNF- 5' TGA TTT TTT GGT CAC CCA GAA G 3' y DNR- 5' TAC AGC TCC TAT AGA TAA AAC 3' (Navajas *et al.*, 1996). La PCR para la región COI se realizó en un volumen total de reacción de 25  $\mu$ L, que contenía 5  $\mu$ L de DNA, 2.5  $\mu$ L de buffer 10X (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA), 1  $\mu$ L de MgSO<sub>4</sub> [(50 mM) (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA)], 0.5  $\mu$ L de dNTP (10 mM), 1  $\mu$ L de la mezcla de oligonucleótidos (10  $\mu$ M) y 0.5  $\mu$ L de Taq Platinum® DNA polimerasa. El volumen se ajustó con agua grado PCR. Las amplificaciones se realizaron con un termociclador MyCycler TM (BIO-RAD Laboratories Inc., Hercules, CA, USA).

**Secuenciación del DNA** El DNA extraído y amplificado de todas las muestras fue enviado a la empresa Macrogen Inc en Corea del Sur para su secuenciación.

**Análisis de datos** Las secuencias fueron editadas y ensambladas mediante el programa BIOEDIT 7.2.0 (Hall, 1990), y el alineamiento múltiple de las secuencias fue realizado mediante el programa Clustal W (Thompson *et al.* 1994). Se realizó el análisis de reconstrucción filogenética por el método de máxima verosimilitud mediante el programa MEGA versión 5.2 (Tamura *et al.* 2011). El nivel de confianza de las ramas fue estimado mediante análisis bootstrap con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985). Finalmente, la significancia en la variación genética entre poblaciones provenientes de diferentes especies de cítricos y entre estados fueron determinadas mediante análisis de varianza molecular (AMOVA por sus siglas en inglés), estimado mediante el cálculo del estadístico F usando el programa Arlequín versión 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010) con 10000 permutaciones.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total se obtuvieron 105 secuencias parciales del gen COI, de las cuales después de ser alineadas y cortadas se obtuvo una secuencia final de una longitud de 325 pb. El análisis de máxima verosimilitud mostró una separación evidente entre especies que fueron catalogados como *Brevipalpus yothersi* y *B. californicus*, con un valor de bootstrap del 100%. Solo seis secuencias fueron para *B. californicus*, y cinco de estas provenían del estado de Veracruz, y la otra de Michoacán.

El análisis AMOVA reveló poca variación entre las muestras recolectadas en las diferentes especies de cítricos (2.44%), así como entre estados (2.04%).

Estos resultados muestran que la variación genética no está dada por la especie citrícola en donde se hospedan o se alimentan los ácaros, lo cual indica que las especies encontradas en las huertas citrícolas del país no se han sometido a una presión de selección. Lo que garantiza que cualquier estrategia de control que se implemente contra el ácaro será eficiente en estos estados.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada, al Colegio de Postgraduados, a los Comités Estatales de Sanidad vegetal del estado de Sinaloa, Michoacán y Veracruz.

## LITERATURA CITADA

- Bastianel, M., Freitas-Astúa, J., Kitajima, E. W., Machado M. A. 2006. The citrus leprosis pathosystem. *Summa Phytopathologica*, 32(3), 211-220.
- Beheregaray, L. B., Caccone, A. 2007. Cryptic biodiversity in a changing world. *Journal of Biology*, 6(4), 9.
- Chiavegato-Gonzaga, L. 1986. Biología do ácaro *Brevipalpus phoenicis* em citros. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 21(8), 813-816.
- Childers, C. C., Kitajima, W. E., Welbourn, C. W., Rivera, C., Ochoa, R. 2001. *Brevipalpus* como vectores de la leprosis de los cítricos. *Manejo Integrado de Plagas* 60, 61-65.
- Excoffier, L., Lischer, H. E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10(3), 564-567.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39(4), 783-791.
- Hall, T. A. 1990. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.

- Mesa, N. C., Ochoa, R., Welbourn, W. C., Evans, G. A., De Moraes, G. J. 2009. A catalog of the Tenuipalpidae (Acari) of the World with a key to genera. Auckland, New Zealand: Magnolia Press 185 p.
- Navajas, M., Fournier, D., Lagnel, J., Gutiérrez, J., Boursot, P. 1996. Mitochondrial COI sequences in mites: evidence for variations in base composition. *Insect Molecular Biology* 5(4), 281-285.
- Navia, D., Mendonça, S. R., Ferragut, F., Miranda, C. L., Trincado C. R., Michaux, J., Navajas, M. 2013. Cryptic diversity in *Brevipalpus* mites (Tenuipalpidae). *Zoologica Scripta*, 42(2), 406-426.
- Sánchez-Velázquez, E. J., Santillán-Galicia, M. T., Novelli, V. M., Nunes, M. A., Mora-Aguilera, G., Valdez-Carrasco, J. M., Otero-Colina, G., Freitas-Astúa, J. 2015. Diversity and genetic variation among *Brevipalpus* populations from Brazil and Mexico. *PLoS ONE*, 10(7), 1-16.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10), 2731-2739.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22), 4673-4680.
- Yuan, M. L., Wei, D. D., Zhang, K., Gao, Y. Z., Liu, Y. H., Wang, B. J., Wang, J. J. 2010. Genetic diversity and population structure of *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae), in China based on mitochondrial COI gene sequences. *BioOne*, 103(6), 2204-2213.

## GAMA DE HOSPEDANTES Y DIAGNÓSTICO POR PCR DE LEPROSIS CITOPLASMÁTICA DE LOS CÍTRICOS TRANSMITIDA POR ÁCAROS.

Yuridia **Duran-Trujillo**<sup>1</sup>, Gabriel **Otero-Colina**<sup>1</sup>, Ma. T. **Santillán Galicia**<sup>1</sup>, Guadalupe **Valdovinos Ponce**<sup>2</sup>, Carlos F. **Ortiz García**<sup>3</sup>, José J. **Velázquez Monreal**<sup>4</sup>

### INTRODUCCIÓN

Los cítricos son cultivos de gran importancia agrícola que son afectados por una gran variedad de plagas y enfermedades. Algunas de ellas son los ácaros, los cuales también pueden ser vectores de enfermedades. La leprosis de los cítricos es una enfermedad de los cítricos que fue descubierta en Florida, en los Estados Unidos de América, hacia 1860, donde se le consideró un importante problema debido a que en 1920 casi destruyó el 70 % de la producción de los cítricos en Florida (Childers *et al.*, 2003). Se han determinado dos tipos de leprosis, los cuales tienen síntomas visuales semejantes pero son fácilmente reconocibles al microscopio electrónico de transmisión, así como por técnicas moleculares; uno de ellos ha sido designado como leprosis de tipo citoplásmico y el otro como leprosis de tipo nuclear. La leprosis citoplásmica es la más importante y de amplia diseminación; es causada por el virus denominado CiLV-C, tiene dos subtipos (1 y 2), se asocia con climas cálidos o tierras bajas y sobre ella se han realizado profundas investigaciones para esclarecer su etiología y modo de transmisión, se ha determinado su genoma y se han desarrollado métodos moleculares para su diagnóstico (Bastianel *et al.*, 2010). La leprosis de tipo citoplásmico afecta hojas, retoños, ramas delgadas y frutos de cítricos, principalmente naranja dulce. Los síntomas ocasionados por esta enfermedad en hojas son lesiones redondas u ovaladas, con una mancha central café oscura de 2-3 mm de diámetro, rodeada por un halo clorótico, en el cual puede haber de uno a tres anillos cafés que rodean a la mancha central.

<sup>1</sup>Fitosanidad- Entomología, <sup>2</sup>Fitopatología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

<sup>3</sup>Colegio de Postgraduados, campus Tabasco, Estado de Tabasco, México.

<sup>4</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Forestales y Pecuarias. Estado de Colima. México.

Autor de correspondencia: **duty\_1@hotmail.com**

En frutos, las lesiones empiezan por ser de color amarillento pero luego se vuelven de color café oscuro, de 10-20 mm de diámetro con centro necrótico. En tallos, se presenten lesiones protuberantes en la corteza, grises o parduscas, que llegan a unirse una a otras y pueden causar la muerte de las ramas.

Como daños generales a las plantas se observan declinación, caída de frutos y pérdida del valor de mercado de éstos, defoliación y, en caso extremos, muerte de las plantas, a lo que hay que agregar los costos de su control, que en Brasil se elevan a 100 millones de dólares al año (Rodrigues *et al.*, 2003). Luego de inicios inciertos para determinar su etiología, la leprosis ha sido definida como una enfermedad viral transmitida casi exclusivamente por ácaros de tres especies del género *Brevipalpus* (Childers y Derrick, 2003). Se ha determinado que la presencia de ácaros de este género es condición indispensable para que se desarrollen los síntomas de la leprosis, salvo en casos experimentales de transmisión por injerto. No se ha observado transmisión por semilla (Rodrigues *et al.*, 2003). *Brevipalpus californicus* fue considerada la especie vector (o causante directa) de la leprosis en Florida; *B. obovatus* fue incriminada como tal en Argentina, y *B. phoenicis* lo fue en Brasil. En realidad sólo con esta última especie se tienen evidencias experimentales de su papel como vector del CiLV. Por tal motivo el objetivo de este trabajo es conocer la especie de ácaro del género *Brevipalpus* asociada como vector de la leprosis de los cítricos. Se cuenta con técnicas de microscopía electrónica de transmisión (Kitajima *et al.*, 1972), así como de RT-PCR (retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa, Locali *et al.*, 2003); sin embargo, para estas técnicas se requiere equipo costoso, no siempre disponible.

## MATERIALES Y MÉTODO

Para la confirmación de la transmisión de leprosis de tipo citoplásmico en diversos cultivares de cítricos y mediante el dos ácaros del género *Brevipalpus*, se instaló un experimento en el Colegio de Postgraduados, km 21, en Cárdenas, Tabasco. El experimento estuvo dividido en dos fases, una primera fase infestando con *B. yothersi* y una segunda infestación con *B. californicus*; para cada una de las fases se necesitaron ácaros provenientes de zonas libres de CiLV-C, por tal motivo se fundaron colonias de ácaros de ambas especies.



Cuando las colonias fueron suficientemente grandes, se iniciaron las actividades de infestación de acuerdo a los tratamientos establecidos (Cuadro 1).

Plantas de diferentes variedades de cítricos obtenidas de viveros certificados, cultivadas bajo cubierta. Se llevó un seguimiento visual de estas plantas al desarrollarse los síntomas sospechosos se tomaron muestras para su análisis.

La primera fase del experimento se realizó el 26 de julio de 2014, la cual consistió en la infestación con ácaros con diferentes tratamientos que se muestran en el cuadro 1.

**Cuadro 1. Tratamientos utilizados para la primera fase del experimento con *B. yothersi***

tratamientos		
Tratamiento 1	Ácaros colectados de hojas, tallos y frutos con daños de leprosis.	Podrán ser larvas, estados ninfales y adultos
Tratamiento 2	Ácaros alimentados en hojas traídos de campo con CiLV- C	Alimentados por 72 h de hojas con daño de leprosis.
Tratamiento 3	Ácaros de colonias criadas en el CP libres de leprosis.	Libre de virus
Tratamiento 4	Sin ácaros	

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar, con cuatro repeticiones por tratamiento y con nueve variedades de cítricos: Mandarina Satsuma, Mandarina Fairchild, Mandarina Dancy, Toronja Río red, Naranja Campbell, Naranja Mars, Naranja Valencia, Naranja agria, Limón persa. La segunda fase del experimento consistió en infestar las diferentes variedades de cítricos con ácaros *B. californicus*, en la cual se realizaron dos infestaciones, una el 18 de abril y la segunda el 18 de junio del 2015, con las mismas variedades utilizados en el primera fase del experimento.

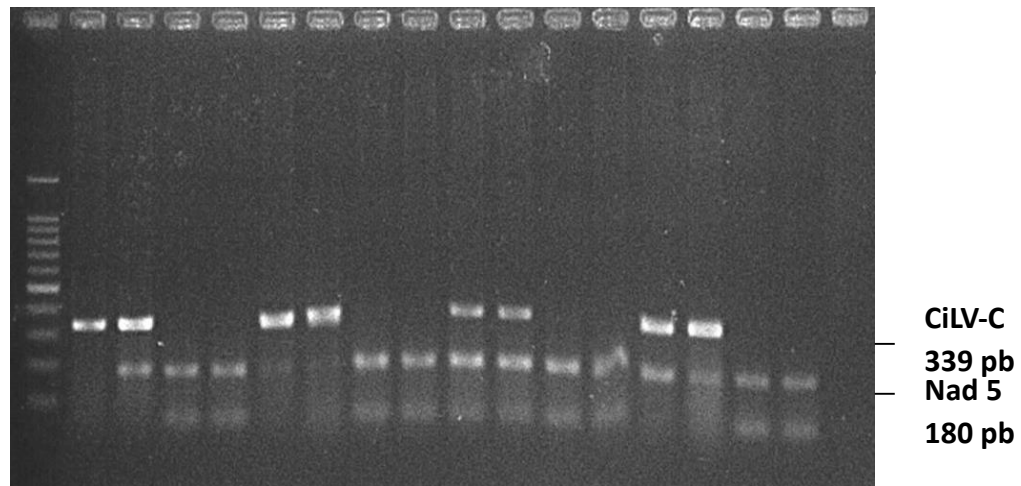
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los tratamientos aplicados para la primera fase del experimento con *B. yothersi* en las diferentes variedades, los síntomas se observaron en hojas y en tallos y se presentaron un mes después de la infestación. Con esto podemos decir que *B. yothersi* presenta una gran eficiencia como vector.. Las variedades en las cuales se observaron síntomas son: naranja valencia, naranja Campbell, naranja march, mandarina dancy en hojas y tallo en los

tratamientos uno y dos, los tratamientos tres y cuatro no presentaron síntomas, en la mandarina satsuma sólo se presentaron síntomas en el tratamiento dos.

Con *Brevipalpus californicus* no se observaron síntomas en hojas, ni tampoco tallos; y está en proceso realizarles las pruebas moleculares, así como las pruebas de microscopía electrónica.

Para comprobar que los síntomas correspondieran al CiLV-C se realizaron pruebas moleculares, con los primers MP, y con ayuda del kit Qiagen OneStep RT-PCR, las cuales resultaron positivas, como se muestra en la figura 1.



**Figura 1.** Se muestran las variedades que presentaron síntomas, 1: marcador de peso molecular 100 bp, 2: naranja valencia (Trat. 1), 3: naranja valencia (Trat. 2), 4: naranja valencia (Trat. 3), 5: naranja valencia (Trat. 4), 6: N. march (Trat. 1), 7: N. march (Trat. 2), 8: N. march (Trat. 4), 9: N. march (Trat. 5), 10: Mandarina dancy (Trat. 1), 11: Mandarina dancy (Trat. 2), 12: Mandarina dancy (Trat. 3), 13: Mandarina dancy (Trat. 4), 14: N. Campbell (Trat. 1), 15: N. Campbell (Trat. 2), 16: N. Campbell (Trat. 3), 17: N. Campbell (Trat. 4), 18: testigo (H<sub>2</sub>O).

Con esto podemos decir que *B. yothersi* presenta una gran eficiencia como vector. Sin embargo, Childers *et al.* (2001), y de la misma manera Izquierdo *et al.* (2011) no mencionan a *B. yothersi* como vector de la CiLV-C. La mayor parte de los estudios se han hecho en la variedad “Pera” (Kitajima *et al.*, 1972; Rodrigues *et al.*, 1997, 2003, entre otros). Garita *et al.* (2014) mencionan a *Citris sinensis* como susceptible al CiLV-C pero no hacen mención a alguna variedad, en México la variedad Valencia es la más importante y ésta fue definida como resistente por Knorr *et al.* (1968); sin embargo, según nuestras observaciones la naranja valencia resultó ser susceptible al CiLV-C.

## AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por brindarme el apoyo económico para poder llevar a cabo mi investigación.

A mi consejero y asesores por las sugerencias y ayuda para la realización de la investigación.

## LITERATURA CITADA

- Bastianel, M., V.M. Novelli, E.W. Kitajima, K.S. Kubo, R.B. Bassanezi, M.A. Machado, J. Freitas-Astúa. 2010. Citrus leprosis. Centennial of an unusual mite-virus pathosystem. *Plant Disease*. 94(3): 284-292.
- Childers, C.C., K.S. Derrick. 2003. *Brevipalpus* mites as vectors of unassigned rhabdoviruses in various groups. *Experimental and Applied Acarology* 30: 1-3.
- Childers, C.C., J.C. Rodrigues, E. W. Kitajima, W. K. Derrick, C. Rivera, C. W. Welbourn. 2001. Estrategia de manejo para romper el ciclo del vector *Brevipalpus* spp. - Rhabdovirus, causante de la leprosis de los cítricos. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 60: 71-75.
- Childers, C.C., J.C. Rodrigues, W.C. Welbourn. 2003. Host plants of *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, and *B. phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) and their potential involvement in the spread of viral diseases vectored by these mites. *Experimental and Applied Acarology* 30(1-3): 29-105
- Garita, L. C., A. D Tassi, R.F. Calegario, J. Freitas-Astúa, R.B. Salaroli, G.O. Romao y E.W. Kitajima. 2014. Experimental host range of Citrus leprosis virus C (CiLV-C). *Tropical Plant Pathology*. 39 (1):043-055.
- Izquierdo, C.I., L.F. Zermeño D., W. Mendez, G. Otero-colina, J. Freitas-Astúa, E.C. Locali-Fabris, G.J. de Moraes, R. Faier C., A.D. Tassi y E.W. Kitajima. Confirmation of the presence of the Citrus leprosis virus C (CiLV-C) in Southern Mexico. *Tropical Plant Pathology*. 36 (6):400-403.
- Kitajima, E.W., G.W. Müller, A.S. Costa, V.A Yuki. 1972. Short, rod-like particles associated with citrus leprosis. *Virology* 50: 254-258.
- Knorr, L.C., H.A. Denmark, H.C. Burnett, 1968. Occurrence of *Brevipalpus* mites, leprosis, and false leprosis on citrus in Florida. *The Florida Entomologist* 51(1): 11-17 + 2 lams.
- Locali, E. C., J. Freitas-Astua., A. A. Souza, M. A. Takita, G. Astua-Monge, R. Antonioli, E. W. Kitajima, M. A. Machado. (2003). Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis a major treat to the citrus production in the Americas. *Plant Disease* 87: 1317-1321.

## LEPROSIS NUCLEAR DE LOS CÍTRICOS: GAMA DE HOSPEDANTES Y TRANSMISIÓN POR ÁCAROS DEL GÉNERO *Brevipalpus* EN MÉXICO.

Paul **García Escamilla**<sup>1</sup>, Gabriel **Otero Colina**<sup>1</sup>, Ma. T. **Santillán Galicia**<sup>1</sup>, Carlos F. **Ortiz García**<sup>2</sup>, Saúl **Sánchez Soto**<sup>2</sup>, José J. **Velázquez Monreal**<sup>3</sup>.

### INTRODUCCIÓN

La leprosis de los cítricos es una enfermedad viral, transmitida por ácaros *Brevipalpus phoenicis*, *B. californicus* y *B. obovatus* (Tenuipalpidae) (Childers *et al.*, 2001b; Welbourn *et al.*, 2003; Kitajima *et al.*, 2003). Se han determinado dos modalidades, una es la leprosis de tipo citoplásmico (CiVL-C), de amplia diseminación, que se asocia con climas cálidos o tierras bajas (Bastianel *et al.*, 2010). La segunda es leprosis de tipo nuclear (CiVL-N), ésta tiene una distribución más restringida, asociada con climas templados o tierras altas, y de ella se tienen pocos datos, además se ha detectado en cultivos de cítricos ácidos.

La enfermedad afecta hojas, ramas delgadas y frutos de cítricos, principalmente naranja dulce; causan en plantas declinación, caída de frutos, defoliación, en casos extremos, muerte de las plantas. Los costos de su control son altos, en Brasil se eleva a 100 millones de dólares al año (Rodrigues *et al.*, 2003; Clari *et al.*, 1993). Actualmente la detección del virus se realiza con técnicas moleculares para ahorrar tiempo y costos, pero el microscopio electrónico de transmisión continúa utilizándose (Kitajima *et al.*, 1972; Kitajima *et al.*, 1974; Lovisolo, 2001; Locali *et al.*, 2003; Freitas-Astúa *et al.*, 2005). Aproximadamente en 1860 la leprosis de los cítricos fue descubierta en Florida, EE.UU., posteriormente en 1960 por causas desconocidas la enfermedad desapareció en ese estado desde los últimos 50 años (Childers *et al.*, 2003b), sugiriéndose como resultado de la aplicación de plaguicidas contra el ácaro *Phyllocoptruta oleivora* (Knorr *et al.*, 1968). En 1940 fue detectada en Argentina y después en Brasil, de donde se ha dispersado hacia el norte (Childers *et al.*, 2001b).

<sup>1</sup> Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, México.

<sup>2</sup> Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, Estado de Tabasco, México.

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Forestales y Pecuarias (INIFAP), Estado de Colima, México Campo Experimental Tecomán.

Autor de correspondencia: **paul\_ge@hotmail.com**

México tiene 548 mil ha de cítricos, donde el 70% de las mismas son de naranja dulce, con un rendimiento neto de 7.03 millones de toneladas y con un valor de \$16 mil millones de pesos (SIAP, 2014). En el 2005 la leprosis de los cítricos fue detectada en México, en los estados de Chiapas y Tabasco (NOM-EM-046-FITO-2006). Actualmente se distribuye en estas dos entidades, así como en Veracruz y Querétaro (Izquierdo *et al.*, 2011, SENASICA). Con este estudio se pretende generar información de utilidad sobre la leprosis de los cítricos tipo nuclear en nuestro país, para el fortalecimiento de las campañas para su control. El trabajo se delimitará a la leprosis de tipo nuclear porque es una enfermedad de la cual no existen los suficientes estudios o información necesaria para un buen manejo de la misma.

## MATERIALES Y MÉTODO

El estudio se lleva a cabo en el poblado de Tolimán, Querétaro, área de prevalencia de esta enfermedad. Se cuenta con un vivero en un sitio cerrado, al que entran sólo los participantes en este estudio. Se mantienen plantas de cítricos de naranja Valencia, naranja navel, naranja agria, mandarina reina (criolla), mandarina Dancy, mandarina Mónica, toronja Rio Red, limón persa, limón mexicano y lima criolla. Éstas se obtuvieron en viveros certificados que las producen en zona considera libre por no haber registros del virus.

**Gama de hospedantes y transmisión por ácaros.** Sobre frutos de naranja agria se desarrollan colonias de ácaros del género *Brevipalpus* procedentes de sitios sin prevalencia de leprosis, siguiendo el método desarrollado por Juliana Freitas-Astúa y colaboradores (comunicación personal). Estos ácaros serán considerados “libres de virus”. Se postula todas las plantas usadas en los experimentos que estaban libres de leprosis, ya que vienen de un vivero certificado, pero esto se confirmó por microscopía electrónica y RT-PCR para descartar la leprosis. Las plantas de cada especie o cultivar, dispuestas en un diseño de parcelas separadas, fueron infestadas con ácaros de los siguientes orígenes: (1) ácaros procedentes de plantas no portadoras de virus; (2) ácaros procedentes de plantas con síntomas de leprosis; (3) ácaros procedentes de plantas asintomáticas, los que previamente serán confinados durante 72 horas en hojas con lesiones de leprosis, para obligarlos a

alimentarse de ellas; (4) plantas testigo, no inoculadas. Cada planta recibió 10 ejemplares de ácaros (preferentemente inmaduros) y el follaje de una planta no tocaba al de otra. Las plantas se mantuvieron en el vivero durante un tiempo hasta la aparición de síntomas. Se llevó un registro fotográfico de cada una para la descripción del progreso de la enfermedad y sus daños. Al final, se tomaron muestras vegetales, para el diagnóstico de virus por microscopía electrónica de barrido y RT-PCR.

Este experimento se realizó con dos especies; *B. yhotersi* y *B. californicus*.

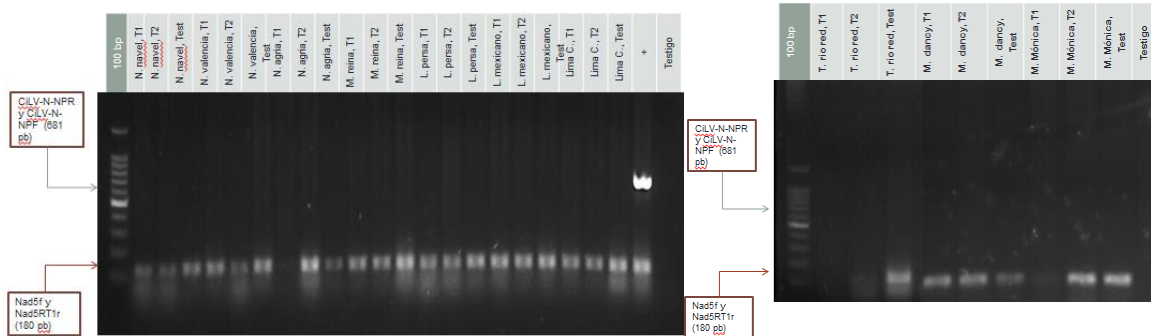
**Gradientes altitudinales** Se realizarán dos transectos de muestreos que iniciarán en zonas altas y terminarán en zonas bajas, tratando de obtener variantes en altitud, temperatura, humedad y precipitación. Uno cubrirá los estados de Chiapas a Tabasco y el segundo los estados de Querétaro a Colima. Se coleccionarán muestras de plantas con síntomas para su diagnóstico mediante microscopio electrónico y RT-PCR. Y se analizará si presentan alguna relación estos factores con el CiVL-N.

**Desarrollo de síntomas** En huertos establecidos en el municipio con plantas de cítricos infestadas por los diferentes ácaros de interés se lleva un seguimiento fotográfico y un registro a lo largo del tiempo de la aparición y del avance de los síntomas tanto en hojas, tallos y frutos y serán comparados con el testigo. En huertos establecidos en el municipio con plantas de cítricos infestadas por los diferentes ácaros de interés se lleva un seguimiento fotográfico y un registro a lo largo del tiempo de la aparición y del avance de los síntomas tanto en hojas, tallos y frutos y serán comparados con el testigo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Gama de hospedantes y transmisión por ácaros.** Se realizó la infestación con *B. yothersi* en las 10 variedades de cítricos, especie que autores como Childers *et al.* (2001a) no reportan y está presente en México. Los resultados fueron que *B. yothersi* no transmitió o no se presentaron síntomas y resultaron ser negativas al CiLV-N como se muestra en la figura 1. Se realizó la infestación con *B. yothersi* en las 10 variedades de cítricos, especie que autores como Childers *et al.* (2001a) no reportan y está presente en México. Los resultados fueron que *B. yothersi* no transmitió o no se presentaron síntomas y resultaron ser negativas

al CiLV-N como se muestra en la figura 1. Se observó alrededor de un año y después de realizar tres infestaciones se colectaron muestras vegetales y se procesaron para microscopia electrónica y se realizaron las pruebas de RT-PCR con ayuda del Kit Qiagen OneStep RT-PCR Cat. No. 210212, utilizando los primers CiLV-N-NPR y CiLV-N-NPF (681 pb) para saber si eran positivas al CiLV-N y el primer Nad5f y Nad5RT1r (180 pb) para saber que la prueba resultó bien.



**Figura 1. Prueba de RT-PCR resultando ser negativa a CiLV-N, demostrando que *B. yothersi* no fue capaz de adquirir y transmitir el virus.**

Falta por concluir el experimento con *B. californicus*.

**Gradiente altitudinal Chiapas – Tabasco, México.** Se obtuvieron 55 localidades muestreadas dentro un margen de altitud de 0 a 1800 metros. Los cultivares muestreados fueron Naranja dulce, naranja agria, mandarina, lima, limón mexicano, limón persa, limón-mandarina. Están en proceso las pruebas de RT-PCR y microscopia electrónica de transmisión.

**Desarrollo de síntomas** Se continúa con el registro fotográfico de brotes con hojas sintomáticas de cuatro variedades de cítricos, donde hasta el momento se ha observado que el tamaño del síntoma característico de la leprosis inicia con un pequeño punto amarillo y lentamente este va aumentando de tamaño. El tiempo de vida de las hojas sintomáticas se reduce y tienden a una caída pronta. Con esto aumenta el número de observaciones de hospedantes del CiLV-N en cítricos de importancia en México y que en otros países reportan *Citrus sinensis* (Garita *et al.* 2014) en listas de hospedantes de la leprosis.



## AGRADECIMIENTOS

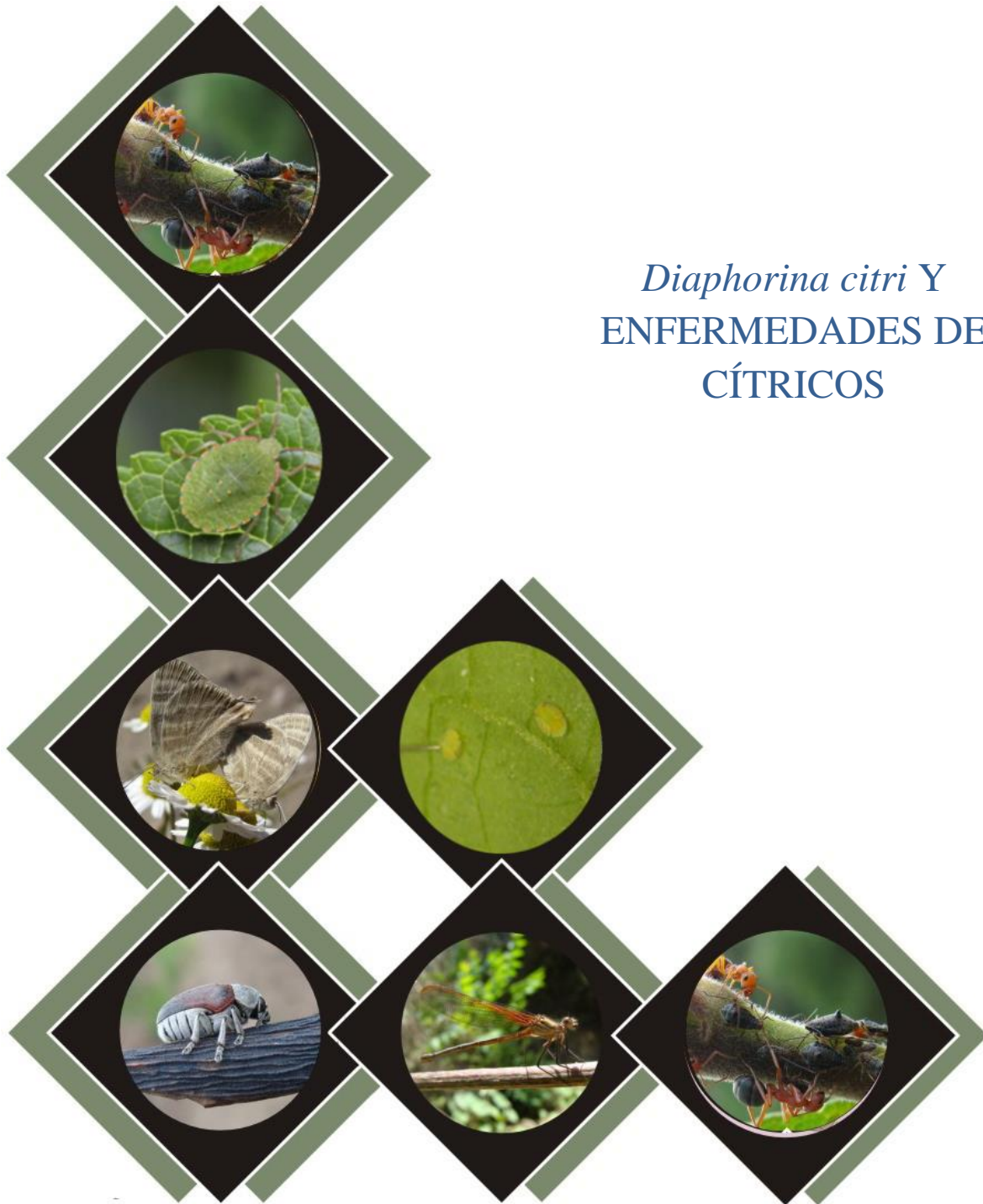
Al CONACyT por la beca otorgada para poder cumplir con el tema de investigación.

A mi consejero y asesores por el apoyo y enseñanzas que me brindan.

## LITERATURA CITADA

- Bastianel, M., Novelli V., M., Kitajima E., W., Kubo K., S., Bassanezi R., B., Machado M., A. and Freitas-Astúa, J. 2010. Citrus leprosis. Centennial of an unusual mite-virus pathosystem. *Plant Disease*. 94(3): 284-292.
- Childers C., C., French J., V. and Rodrigues J. C., V. 2003a. *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, *B. phoenicis*, and *B. lewisi* (Acari: Tenuipalpidae): a review of their biology, feeding injury and economic importance. *Experimental and Applied Acarology* 30(1-3): 5-28.
- Childers C., C., Kitajima E., W., Welbourn C., W., Rivera, C. and Ochoa, R. 2001a. *Brevipalpus* como vectores de la leprosis. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 60: 61-65.
- Childers C., C., Rodrigues J., C., Kitajima E., W., Derrick K., Rivera, C., Welbourn C., W. 2001b. Estrategia de manejo para romper el ciclo del vector *Brevipalpus* spp. - Rhadovirus, causante de la leprosis de los cítricos. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 60: 71-75.
- Childers C., C., Rodrigues J. C., V., Derrick K., S., Achor D., S., French J., V., Welbourn W., C., Ochoa, R. and Kitajima E., W. 2003b. Citrus leprosis and its status in Florida and Texas: past and present. *Experimental and Applied Acarology* 30(1-3): 181-202.
- Clari A., I., Cardoso M. A., C., Hamamura R., Rangel R., C., Regitano E., B., Mesquita L., F. y Mariconi F. A., M. 1993. Ensaio de combate ao ácaro da leprose ce citros *Brevipalpus phoenicis* (Geiskes, 1939) com novo juvenoide e outros acaricidas. *Scientia Agricola* 50(1): 63-66.
- Freitas-Astúa, J., Locali E., C., Antonioli-Luizon, R., Astúa-Monge, G., Targon M. L. P., N., Rodrigues, V., Kitajima E., W. and Machado M., A. 2005. RT-PCR for the simultaneous detection of citrus tristeza and leprosis viruses. *Fitopatologia Brasileira* 30(6): 669.
- Garita C., L., Tassi D., A., Calegario R., F., Freitas-Astúa, J., Salaroli B., R., Romão O., G. and Kitajima W., E. 2014. Experimental host range of Citrus leprosis virus C (CiLV-C). *Tropical Plant Pathology*, vol. 39(1):043-055.
- Izquierdo C., I., Zermeño D. L., F., Mendez W., Otero-Colina, G., Freitas-Astúa, J., Locali-Fabris E., C., De Moraes G., J., Faier C., R., Tassi A., D. and Kitajima E., W. 2011. Confirmation of the presence of the citrus leprosis virus C (CiLV-C) in Southern Mexico. *Tropical Plant Pathology* 36: 400-403.
- Kitajima E., W., Chagas C., M. and Rodrigues J., C.V. 2003. *Brevipalpus*-Transmitted Plant Virus and Virus-Like Diseases: Cytopathology and Some Recent Cases. *Experimental and Applied Acarology* 30(1-3): 135-160
- Kitajima E., W., Müller G., W., Costa A., S. and Yuki, V.A. 1972. Short, rod-like particles associated with citrus leprosis. *Virology* 50: 254-258.
- Kitajima E., W., Rosillo M., A., Portillo M., M., Müller G., W. y Costa A.S. 1974. Microscopia electrónica de tejidos foliares de laranjeira infetadas pela lepra explosiva de Argentina. *Fitopatologia (Peru)* 9: 55-56.
- Knorr L., C., Denmark H., A. and Burnett H.C. 1968. Occurrence of *Brevipalpus* mites, leprosis, and false leprosis on citrus in Florida. *The Florida Entomologist* 51(1): 11-17 + 2 lams.
- Locali E., C., Freitas-Astua, J., Souza A., A., Takita M., A., Astua-Monge, G., Antonioli, R., Kitajima E., W. and Machado M. A. 2003. Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis a major treat to the citrus production in the Americas. *Plant Disease* 87: 1317-1321.
- Lovisol, O. 2001. Citrus leprosis virus: properties, diagnosis, agro-ecology, and phytosanitary importance. *EPPO Bull.* 31: 79-89.
- NOM-EM-046-FITO- 2006. NORMA Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-046-FITO-2006, Por la que se instrumenta el Dispositivo Nacional de Emergencia, con el objeto de confinar, erradicar y prevenir la dispersión de la leprosis de los cítricos en el Estado de Chiapas. *Diario Oficial de la Federación*, 18 de abril de 2006.
- Rodrigues J., C. V., Kitajima E., W., Childers C., C. and Chagas C., M. 2003. Citrus leprosis virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on citrus in Brazil. *Experimental and Applied Acarology* 30(1-3): 161-179.

- SIAP (Sistema de Información Agropecuaria y Pesquera). 2014. [www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx) (Visitado el 15 de septiembre de 2015).
- Welbourn W., C., Ochoa, R., Kane E., C. and Erbe E., F. 2003. Morphological observations on *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) including comparisons with *B. californicus* and *B. obovatus* (Acari: Tenuipalpidae). *Exp. Appl. Acarol.* 30: 107–133.



## INTERACCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS Y PARASITOIDES PARA EL CONTROL DEL PSÍLIDO ASIÁTICO DE LOS CÍTRICOS *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera:Liviidae)

Karla H. **Ibarra Cortés**<sup>1\*</sup>, Héctor **González Hernández**<sup>1</sup>, Ariel W. **Guzmán Franco**<sup>1</sup>,  
Laura D. **Ortega Arenas**<sup>1</sup>, Juan A. **Villanueva Jiménez**<sup>1</sup>, Agustín **Robles Bermúdez**<sup>2</sup>.

### INTRODUCCIÓN

El psílido asiático de los cítricos (PAC) *Diaphorina citri* (Kuwayama) es una plaga de importancia citrícola. Las ninfas y adultos de *D. citri* ocasionan daños directos e indirectos. Los daños directos ocurren cuando los insectos se alimentan, extraen la savia de las plantas y esto provoca su debilitamiento; el exceso de las excreciones de los insectos forma fumagina en hojas y tallos. Además, durante su alimentación inyectan toxinas a la planta que detienen el crecimiento de los brotes y deforman las hojas. El daño indirecto es la transmisión de la enfermedad Huanglongbing (HLB) de los cítricos, donde el agente causal es la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Michaud, 2004; Bové, 2006). Durante la década pasada el PAC se ha dispersado hacia Norteamérica, Sudamérica y el Caribe (Halbert *et al*, 2004). Para México, el HLB se identificó en la Península de Yucatán por primera vez en el 2009 y actualmente está en la mayoría de las zonas citrícolas del país. (Trujillo-Arriaga, 2010).

Existen diferentes estrategias potenciales que podrían utilizarse en el manejo de este insecto, donde el control químico es el más usado, pero también se ha evaluado el uso de parasitoides (Hall, 2008). En México, el control biológico del PAC, se desarrolla con la liberación del parasitoide *Tamarixia radiata* y los hongos entomopatógenos *Isaria fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae*; no obstante, se carece de evaluaciones sobre su posible interacción. El conocimiento de estas interacciones es importante para poder diseñar las mejores estrategias dentro de un programa de manejo integrado de plagas. Por lo anterior este trabajo tuvo como objetivo estudiar las interacciones que existen entre ninfas infectadas con aislamientos seleccionados de hongos entomopatógenos y el parasitoide *T. radiata*.

<sup>1</sup>Fitosanidad- Fitopatología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Nayarit. Facultad de Agronomía, Xalisco. Nayarit.

\*Autor de correspondencia: **khic26@hotmail.com**.

## MATERIAL Y METODOS

Esta investigación se realizó en el Departamento de Hongos Entomopatógenos del Centro Nacional de Referencia en Control Biológico (CNRCB) de la Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA-SAGARPA, en Tecomán, Colima. Los aislamientos utilizados fueron *Beauveria bassiana* B1 y MA129 de *Metarhizium anisopliae* proporcionados por el Laboratorio de Patología de Insectos del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. Las ninfas de *D. citri* y los adultos de *T. radiata* fueron proporcionados por el Departamento de Insectos Entomófagos del CNRCB, Tecomán, Colima.

**Obtención de suspensiones de conidios.** Todas las suspensiones se realizaron a partir de cultivos monospóricos. Los aislamientos se recuperaron de crio-preservación y la metodología de preparación de las suspensiones de conidios fue la misma para todos los aislamientos. Con la ayuda de una espátula metálica en la cámara de flujo laminar, se removió la mayor cantidad posible de conidios y micelio de las cajas de Petri de cultivos con 15 días posteriores a su inoculación en placas de ADS.

El material extraído de una caja de Petri por aislamiento, se depositó en un tubo para centrifuga de 50 mL de capacidad y se añadió 20 mL de Tween 80 estéril al 0.03%. El tubo se agitó con un vortex durante 5 min y el contenido se filtró a otro tubo de centrifuga limpio por medio de una capa de pañalina. De la suspensión de conidios resultante, se tomó una alícuota de 1  $\mu$ L que se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL de capacidad en 999  $\mu$ L de Tween 80 al 0.03%. La suspensión resultante se empleó para estimar la concentración de conidios por mL mediante una cámara de Neubauer. Las concentraciones que se utilizaron en los experimentos fueron la  $CL_{50}$  obtenidas para ninfas de cada aislamiento Ma129  $4.2 \times 10^6$  y B1  $8.5 \times 10^6$ .

**Procedimiento experimental.** El procedimiento de inoculación para las ninfas de *D. citri* fue el mismo para todos los aislamientos. Se inocularon 30 ninfas de cuarto instar con una torre de pulverización equipada con una boquilla de cono hueco (Spraying Systems). El experimento se realizó en recipientes de plástico transparente de 200 mL con tapa y con una ventana lateral de 5 cm diámetro cubierta por tela organza para permitir ventilación. Se

utilizaron dos hembras de *T. radiata* de un día de edad. Todo el experimento se incubó en una cámara climática a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 60% H.R y fotoperiodo 12:12 (L:O).

**Parasitismo y depredación de *Tamarixia radiata* de ninfas inoculadas con hongos entomopatógenos.** Las ninfas de cuarto instar se colocaron sobre brotes con hojas de *Murraya paniculata* previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio (2 ml por litro de agua), mantenidos en agua corriente en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Ninfas y hojas se depositaron dentro de un recipiente de plástico con tapa y se colocó una sanita en la pared de 5x5 cm que se adicionó agua destilada estéril para mantener la humedad.

En los tratamientos duales las ninfas con diferentes días de infección de hongos entomopatógenos 0, 24 y 72 h se expusieron a la acción de un par de hembras de *T. radiata* de un día de edad durante 24 horas. Los parasitoides se retiraron con la ayuda de un aspirador bucal. Cada tratamiento dual tuvo los siguientes tratamientos controles: 1) control absoluto que consistió en ninfas inoculadas con Tween 80 al 0.03%, 2) control de parasitoides esto es ninfas inoculadas con Tween 80 al 0.03% y la introducción de dos hembras parasitoides y 3) un control de hongos donde las ninfas solo fueron asperjadas con cada especie de hongo.

La mortalidad por acción del parasitoide ya sea por depredación y/o parasitismo se registró a los 7 días. En parasitismo se registró el número de momias resultantes y para depredación se contabilizó aquellas ninfas que presentaran vaciado de hemolinfa, sin simetría dorsal y/o adherida a las hojas.

**Diseño experimental y análisis estadístico.** El diseño experimental fue completamente al azar y todos los tratamientos se realizaron el mismo día. Todo el experimento se repitió en cuatro ocasiones. El número de ninfas parasitadas y/o depredadas fue analizado mediante regresión logística con una estructura de contrastes ortogonales jerárquicos, donde primero se esto es se comparó el número de ninfas parasitadas y ninfas depredadas entre testigos e insectos tratados. Enseguida, utilizando únicamente los tratamientos con hongos, se comparó entre aislamientos seguido una comparación entre tiempos de inoculación y finalmente la interacción entre estos factores. Los análisis se realizaron con el paquete estadístico GenStat V. 8.0 (Payne *et al.*, 2005).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Parasitismo de *T. radiata* en ninfas de *D. citri* infectadas con hongos entomopatógenos.** El análisis estadístico mostro que no hay diferencias estadísticas entre repeticiones y esto permitió realizar un análisis en conjunto de las cuatro repeticiones. El número de ninfas parasitadas fue mayor en el tratamiento control comparado con el los tratamientos con hongos ( $P=<0.001$ ). El número de ninfas parasitadas fue diferente entre los tratamientos con diferentes tiempos de infección con hongos ( $P=<0.001$ ). Se observa que al avanzar los días de infección en las ninfas, el parasitismo disminuye y esto nos indica que *T. radiata* parasita a las ninfas enfermas cuando no tiene otra opción de alimento. Probablemente si se hubiese ofrecido ninfas sanas y enfermas nuestros resultados hubieran sido diferentes. Existen diversos trabajos donde los parasitoides tienen un comportamiento similar (Mesquita and Lacey 2001; Tamayo-Mejía *et al.*, 2015).

**Depredación de *T. radiata* en ninfas de *D. citri* infectadas con hongos entomopatógenos.** La proporción de ninfas depredadas fue similar entre los tratamientos control y con hongos ( $P=0.458$ ). En los tratamientos con hongos, la proporción de ninfas depredadas fue diferente en entre los tratamientos con diferentes tiempos de infección ( $P=0.011$ ). A pesar de que la depredación disminuye en ninfas con tres días de infección, en general los parasitoides tienden a alimentarse de ninfas infectadas. Esto puede ser debido a la fuerte necesidad de los parasitoides hembras de buscar fuentes de proteína para el desarrollo del huevo (Hoy *et al.*, 2006). Es probable que este comportamiento ocurra en el campo, pero también es posible que la existencia de ninfas sanas, le de oportunidad al parasitoide de escoger ninfas sanas, cambiando el comportamiento observado en laboratorio, pero este requiere de validación experimental.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada, al Fideicomiso 2013 del Colegio de Postgraduados por el apoyo económico y al CNRCB, DGSV, SENASICA, SAGARPA, por los apoyos recibidos para la realización de la presente investigación.



**ITERATURA CITADA**

- Bové J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*. 88(1): 7-37.
- Hall D. G. 2008. Biological Control of *Diaphorina citri*. I Taller Internacionalesobre del Huanglongbing de los cítricos (*Candidatus Liberibacter* spp) y el psílidoasiático de los cítricos (*Diaphorinacitri*). Hermosillo. Sonora. México.
- Hoy M. A., R. Nguyen., A. Jeyparakash. Classical biological control of Asian citrus psyllid in Florida. Florida IPM 2006. Disponible en: <http://ipm.ifas.ufl.edu/agriculture/citrus/psyllid.shtml>. Consultado: 16 octubre 2015.
- Mesquita A. L.M., Lacey L. A. 2001. Interactions among the entomopathogenic fungus, *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), the parasitoid *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae) and their aphid host. *Biol. Control* 22: 51-59.
- Michaud J. P. 2004. Natural mortality of Asian citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in central Florida. *Biological Control*. 29:260-269.
- Tamayo-Mejía F., P. Tamez-Guerra., A. W. Guzmán-Franco y R. Gómez-Flores. 2015. Can *Beauveria bassiana* Bals. (Vuill) (Ascomycetes: Hypocreales) and *Tamarixia triozae* (Burks) (Hymenoptera: Eulophidae) be used together for improved biological control of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae)?. *Biological Control*. 90:42-48.
- Trujillo Arriaga J. 2010. Situación actual, regulación y manejo del HLB en México. En: Memorias del Segundo Taller Internacional del HLB en Mérida, Yucatán.

COMPORTAMIENTO DE FORRAJEО DE *Tamarixia radiata*  
(HIMENOPTERA: EULIPHIDAE) SOBRE *Diaphorina citri* (HEMIPTERA:  
LIVIIDAE)

Rosalío L. Estrada-Urbina<sup>1\*</sup>, Alejandro Pérez-Panduro<sup>1</sup>, J. R. Lomelí-Flores<sup>1</sup>, Esteban Rodríguez-Leyva<sup>1</sup>, Julio S. Bernal<sup>2</sup>, Roberto Montesinos-Matías<sup>3</sup> y Gustavo Ramírez-Valverde<sup>4</sup>.

## INTRODUCCIÓN

Los insectos presentan comportamiento variado durante la búsqueda y consumo de su alimento (Gutiérrez, 1998), el cual depende de la disponibilidad de recursos y los requerimientos para su progenie (Hardie *et al.*, 2001). La detección del recurso alimenticio se basa principalmente en el olfato, la vista y en estímulos táctiles o vibratorios (Meyhöfer y Casas, 1999). La búsqueda, aceptación y consumo de alimento son conductas del comportamiento de forrajeo (Price *et al.*, 2011), cuya finalidad es adquirir energía a través del alimento (Kramer *et al.*, 2001). Los estudios de comportamiento de forrajeo en parasitoides ponen a prueba la teoría de forrajeo óptimo (Godfray, 1994), que postula la necesidad de minimizar el tiempo de forrajeo y maximizar las calorías consumidas (Gutiérrez, G.1998). La finalidad de estudiar las categorías conductuales permiten comprender la estrategia de forrajeo (Rijk *et al.*, 2013).

La citricultura mundial produce cerca de 21 millones de toneladas de diversos productos, de los cuales, México aporta 6.9 millones de toneladas (SIAP, 2012). Esta producción se encuentra amenazada por la enfermedad Huanglongbing (HLB) (Moreno-Pérez, 2008), causada por la bacteria *Candidatus liberibacter* y transmitida por *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). Esta enfermedad es la más destructiva en la historia de los cítricos (Halbert y Núñez, 2003) y se encuentra presente en 14 de los 23 estados productores en México (López-Collado *et al.*, 2013).

<sup>1</sup>Fitosanidad- Fitopatología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

<sup>2</sup>Departamento de Entomología, Laboratorio de Control Biológico, Universidad de Texas A&M.

<sup>3</sup>Colección de hongos entomopatógenos- Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA.

<sup>4</sup>Estadística, Colegio de postgraduados campus Montecillo, Montecillo, Edo. Mex.

\*Autor de correspondencia [roleu\\_87@live.com](mailto:roleu_87@live.com)

El parasitoide *Tamarixia radiata* destaca entre los enemigos de *D. citri* por ser específico y generar parasitismo mayor al 75% (Ebratt-Ravelo *et al.*, 2011), debido a su eficiencia para encontrar a su huésped (Mann *et al.*, 2010). Hasta el momento se desconoce la conducta de forrajeo, que permita comprender la interacción huésped-parasitoide. El objetivo del presente trabajo fue conocer y diferenciar las categorías del comportamiento de forrajeo de *T. radiata* en presencia de su huésped.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron plantas de *Murraya paniculata* de un cultivo establecido en el Colegio de Postgraduados, campus Montecillo. Se empleó la metodología previamente establecida para la producción de planta (Arredondo-Bernal *et al.*, 2010). Las ninfas de *D. citri* fueron criadas en jaulas entomológicas de 60x60x60 cm sobre plantas de *M. paniculata*, en condiciones de invernadero con ambiente de  $(30 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ , 30 40% HR y fotoperiodo de 12:12). Se aplicó fertirrigación cada tercer día.

Se emplearon adultos de *T. radiata* provenientes de la cría del Centro Nacional de Referencia en Control Biológico (CNRCB), de Tecomán, Colima. Los parasitoides se confinaron por 72 h en recipientes transparentes de 35 cm de altura y 10 cm de diámetro, durante ese tiempo se alimentaron con huéspedes de cuarto a quinto estadio. Los organismos se almacenaron a  $25 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $50 \pm 5 \%$  HR y fotoperiodo 12:12. Para los bioensayos se emplearon hembras de *T. radiata* de 6-8 días de edad, previa confirmación de su capacidad de parasitar. Se ofrecieron 15 ninfas de cuarto estadio y se liberó 1 hembra del parasitoide durante 24 horas, en cajas Petri de 5 cm.

La arena de observación fue una caja circular de 2.5 cm de diámetro dentro de la cual se colocó un foliolo de *M. paniculata*, de aproximadamente 1 cm, con 15 ninfas de cuarto estadio de *D. citri*. Las observaciones de la conducta de forrajeo se grabaron mediante una webcam, Logitech® C930e, acoplada a un estereoscopio. Las cámara web se conectó a una Laptop y mediante un programa de grabación, NCH® Debut Video Capture Software V2.6, se obtuvieron videos de 30 fps en calidad 640x480.

Para determinar la duración de cada video se consideró una metodología de grabación que permitiera observar los estados de comportamiento de *T. radiata* (Altmann, 1973). Se homogeneizó la luz de las videograbaciones acondicionando el estereoscopio con un tubo de papel albanene de máximo grosor. Las grabaciones se realizaron entre las 12:00 y 14:00 hr, a 25° C, 40% HR sobre una mesa con iluminación aproximada de 1,500 luxes.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron ocho videos del comportamiento de forrajeo de *T. radiata* en presencia de su huésped. Cada video presentó una duración de 1h y 30 minutos, lo que permitió grabar los diferentes estados del comportamiento del parasitoide (Cuadro 1) donde se observaron comportamientos correspondientes a estímulos de corto alcance. Se observó que la duración del ataque para alimentación (Host-feeding) fue aproximadamente de 9.30 a 16.40 minutos, mientras que la duración de oviposición fue de aproximadamente 2.35 a 3.3 minutos. En las ocho observaciones las hembras fueron muy activas, presentado poco reposo y seleccionando activamente huéspedes potenciales.

**Tabla 1. Comportamiento de forrajeo de *Tamarixia radiata* en foliolo de limonaria conteniendo ninfas de cuarto estadio de *Diaphorina citri***

Comportamiento	Descripción
Antenación	El parasitoide toca a las ninfas con sus antenas
Ataque	El parasitoide ataca las ninfas del psílido para alimentarse de él u ovipositar
Caminar	El parasitoide camina en la arena experimental
Acicalado	El parasitoide limpia diferentes partes de su cuerpo como antenas, patas y alas
Patas	El parasitoide toca las ninfas con sus patas, camina sobre éstas.
Reposo	El parasitoide se deja de buscar alimento y que queda totalmente estático, sin movimiento

El comportamiento de forrajeo de *T. radiata* coincide con algunas observaciones de *Eretmocerus eremicus* en ninfas de *Bemisia tabaci*, lo que permitió conocer posible modificaciones en el comportamiento en tratamientos de depredación intragremial (Muñoz-Urias *et al.*, 2014). Las categorías de forrajeo de *T. radiata* presentan coincidencia con lo observado en *Phymastichus coffea*, quien respondió a estímulos de corto alcance y se analizó el comportamiento oviposición (Velasco-Hernández *et al.*, 2010).

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al CONACYT por la beca de doctorado otorgada al estudiante Rosalío Lehninger Estrada Urbina, así como al Colegio de Postgraduados por el apoyo otorgado para la realización del presente trabajo de investigación.

## LITERATURA CITADA

- Altmann, J. 1973. Observational study of behaviour: sampling methods. *Behaviour*. 49(3): 227-267.
- Arredondo-Bernal, H., Sánchez-González, J. y Mellín-Rosas, M. 2010. Avances en el control biológico del psílido asiático de los cítricos en México. *VI Simposio Internacional Citrícola y el 1er Simposio Internacional sobre mejoramiento genético de los cítricos*, 4,5 y 6 de Noviembre, Tecomán, Colima, México, Pp 121-132.
- Ebratt-Ravelo, E., Rubio-González, L., Costa, V., Castro-Ávila, A., Zambrano-Gómez, E. y Ángel-Díaz, J. 2011. *Diaphorina citri* (Kuwayama, 1907) and *Tamarixia radiata* (Waterson, 1922) in citrus crops of Cundinamarca, Colombia. *Agronomía Colombiana*. 29(3): 487-493.
- Godfray, H. 1994. *Parasitoids: Behavioural and evolutionary ecology*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- Gutiérrez, G. 1998. Estrategias de forrajeo. En Ardila, R., López, W., Pérez, A., Quiñones, R. y Reyes, F. (Eds.). *Manual de Análisis Experimental del Comportamiento*. Madrid. Pp. 359-381.
- Halbert, S. y Núñez, C. 2003. Distribution of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Rhynchota: Psyllidae) in the caribbean basin. *Florida Entomologist* 87(3): 401-402.
- Hardie, J., Gibson, G. y Wyatt, T. 2001. Insect behaviours associated with resource finding. En Woiwod, I., Reynolds, D. y Thomas, C. (Eds). *Insect Movement Mechanisms and Consequences*. CABI, Publishing. New York, USA. Pp 87-110.
- Kramer, D. 2001. Foraging Behaviour. En Fox, C., Roff, D. y Fairbairn, D. Eds. *Evolutionary Ecology: Concepts and case studies*. Oxford University Press, New York, USA. Pp. 232-249.
- López-Collado, J., López-Arroyo, I., Robles-García, L. y Marquez-Santos, M. 2013. Geographic distribution of habitat, development, and population growth rates of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in Mexico. *Journal of Insect Science*. 13: 1-17.
- Mann, R., Qureshi, J., Stansly, P. y Stelinsky, L. 2010. Behavioral Response of *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae) to Volatiles Emanating from *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) and Citrus. *Journal of Insect Behaviour*. 23: 447-458.
- Meyhöfer, R. y Casas, J. 1999. Vibratory stimuli in host location by parasitic wasps. *Journal of Insect Physiology*. 45: 967-971.
- Moreno-Pérez, M., Pozo-Velásquez, E., Valdés-Herrera, R., Cárdenas-Morales, M. 2008. Distribución espacial de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera: Psyllidae) sobre lima persa (*Citrus latifolia* Tanaka). *Fitosanidad*. 12(1): 33-37.
- Muñoz-Urias, A. y Desneux, N. 2014. Foraging behaviour of the parasitoid *Eretmocerus eremicus* under intraguild predation risk by *Macrolophus pygmaeus*. *Pest Management Science*. 71(9): 1346-1353.

- Price, P., Denno, R., Eubanks, M., Finke, D. y Kaplan, I. 2011. *Insect Ecology: Behaviour, Populations and Communities*. Cambridge University Press, UK.
- Rijk, M., Dicke, M. y Poelman, E. 2013. Foraging behaviour by parasitoids in multiherbivore communities. *Animal Behaviour*. 85: 1517-1528.
- SIAP. 2012. Producción agrícola por cultivo y por estado. México (En línea). Disponible en <http://www.siap.gob.mx/opt/123/69/68.html> (Fecha de consulta 30/04/2013).
- Velasco-Hernández, M., Ramirez-Romero, R., Sánchez-Hernández, C., Biondi, A., López-Guillén, G., Infante, F. y Castillo, A. 2010. Comportamiento de oviposición de *Phymastichus coffea* LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) sobre su huésped natural. *Neotropical Entomology* 39(6): 892-897.

**SUPERVIVENCIA Y REPRODUCCIÓN DE *Diaphorina citri* Kuwayama  
(HEMIPTERA: LIVIIDAE) EN PLANTAS DE NARANJA VALENCIA  
(*Citrus sinensis*) Y LIMÓN MEXICANO (*Citrus aurantifolia*)**

Ana K. **Ramírez Sánchez**<sup>1</sup>, Laura D. **Ortega Arenas**<sup>1</sup>, José J. **Velázquez Monreal**<sup>2</sup>, Jorge  
M. **Valdez Carrasco**<sup>1</sup>

### INTRODUCCIÓN

*Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), también conocida como Psílido Asiático de los Cítricos (PAC), es considerada la plaga más importante de los cítricos en el mundo (Halbert y Manjunath 2004) debido a su capacidad de transmitir bacterias *Candidatus Liberibacter* spp. agentes causales del huanglongbing (HLB) (Garnier y Bové, 2000; Halbert y Manjunath, 2004). El PAC como insecto vector, tiene como hospederos a plantas de la familia Rutaceae, particularmente de los géneros *Citrus* y *Murraya*, donde al alimentarse causa distorsión y alteraciones en brotes jóvenes de los árboles (Tsai *et al.*, 2002; Halbert y Manjunath, 2004). En gran medida su capacidad de oviposición y sobrevivencia depende de factores ambientales y susceptibilidad del hospedante (Aubert y Hua 1990; Hodkinson, 2009). Asimismo, la preferencia del hospedante está determinada por la fenología de la planta, cantidad de ceras en la superficie de las hojas, dureza física del brote y color de la hoja de los árboles, entre otros (Moran y Brown, 1973). Diversos autores han demostrado la existencia de variaciones en ciclo de vida y comportamiento reproductivo del psílido al interactuar en diferentes hospederos (Tsai y Liu, 2000; Nava *et al.* 2007; Fonseca *et al.* 2010). Por lo anterior, se planteó como objetivo determinar la supervivencia y reproducción de *D. citri* en plantas de limón mexicano var. Colimex y naranja dulce var. Valencia, con el fin de aportar elementos para un mejor manejo.

<sup>1</sup>Fitosanidad- Fitopatología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

Autor de correspondencia: [ramirez.karen@colpos.mx](mailto:ramirez.karen@colpos.mx)



## MATERIALES Y METODOS

**Cría de insectos.** La investigación se realizó el Campo Experimental Tecomán del INIFAP -Km. 35 Carretera Colima-Manzanillo, Tecomán, Colima-. En dicho sitio se estableció una cría masiva de *D. citri* sobre plantas de naranja dulce (*Citrus sinensis*) var. Valencia y limón mexicano (*C. aurantifolia*) var. Colimex. Estos insectos provinieron de una cría establecida desde 2009 en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, con material colectado de Cazonos de Herrera, Veracruz. En Tecomán, se mantuvieron los adultos de *D. citri* sobre brotes para la obtención de huevos durante una semana, posteriormente se retiraron los adultos y las plantas infestadas se mantuvieron en las jaulas a una temperatura de  $27 \pm 3^{\circ}\text{C}$  y 12:12 de fotoperiodo, hasta alcanzar la emergencia de los adultos. Los hospederos (naranja dulce y limón mexicano de 18 meses de edad), se obtuvieron de viveros comerciales certificados. Estas plantas se propagaron en portainjertos, la naranja dulce sobre limón Volkameriana (*C. volkameriana*) y las de limón mexicano en limón Macrofila (*C. macrophylla*).

**Ciclo y tablas de vida.** La supervivencia de *D. citri* en ambos cítricos se determinó a través de tablas de vida de cohorte (Badii *et al.*, 2000). Para ello se consideraron 4 tratamientos, que consistieron en dos tipos de cítrico (naranja y limón) y dos condiciones (enfermo y sano). Para ello se utilizaron cuatro plantas sanas y cuatro enfermas de naranja dulce var. Valencia y otras de limón mexicano var. Colimex con las mismas condiciones. En cada planta se seleccionaron y aislaron dos brotes tiernos (recipiente cilíndrico de plástico de 150 mL de capacidad) con un orificio lateral de  $2 \times 2 \text{ cm}^2$  cubierto con tela de organza para permitir la ventilación. En cada recipiente se introdujeron 20 psílicos adultos (3 a 6 d de edad), en una proporción de 1:1 machos:hembras y con 2 h en ayuno previo. Las plantas se dispusieron al azar en diferentes jaulas cubiertas con malla antiáfidos. Con esto se obtuvo una cohorte de 100 huevos (48h de edad) por cada brote. Estos brotes se aislaron nuevamente como fue indicado, para evitar infestaciones secundarias. Cada 24 horas se revisaron los brotes bajo microscopio estereoscópico para cuantificar el número de individuos vivos o muertos. El registro culminó cuando el 95% de ninfas alcanzó el estado adulto en las plantas sanas.

**Tablas de fecundidad de *D. citri*.** La fecundidad se registró diariamente el número de huevos depositados por pareja (hembra y macho), la fertilidad se calculó con la proporción de insectos emergidos en las pruebas anteriores, para lo cual se realizaron 30 réplicas por hospedero. Cada pareja se transfirió diariamente y hasta su muerte, a un brote nuevo y aislado de forma individual. Los ensayos se realizaron en condiciones controladas a  $27\pm 3^{\circ}\text{C}$ , 70% de HR y 12 h de fotoperiodo. Con base en estos registros se obtuvieron los parámetros: tasa neta de reproducción ( $R_0$ ), tiempo de generación (T), tasa intrínseca de incremento ( $r_m$ ), tiempo de duplicación (d) y tasa infinita de crecimiento ( $\lambda$ ). Estos parámetros se analizaron con el método de Jackknife en SAS (Maia *et al.*, 2000). El análisis de supervivencia por planta hospedera se realizó con las prueba no paramétrica de Logrank (Méndez *et. al.* 1984).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

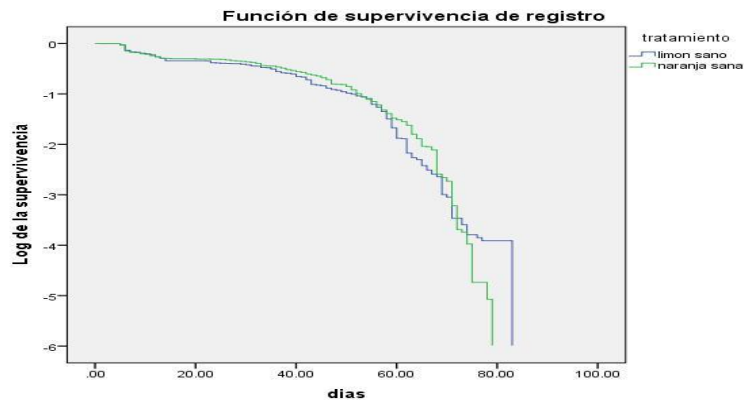
El tiempo de desarrollo de *D. citri* sobre *Citrus sinensis* y *C. aurantifolia* fue similar (Cuadro 1). Ambos hospederos resultaron favorables para el desarrollo del psílido puesto que la esperanza de vida ( $e_x$ ) no difirió entre ambos hospederos (Cuadro 2 y 3) y la tasa de mortalidad específica ( $q_x$ ) mantuvo valores bajos en todos los estadios. Estos valores coinciden con lo obtenido por otros autores (Tsai y Liu, 2000; Pérez *et al.*, 2011) quienes mostraron que la duración del ciclo de vida del vector en *C. paradisi*, *C. jambhir*, *C. aurantium* y entre *M. paniculata* y *C. aurantifol*; sin embargo, Hodkinson (2009) menciona que la baja calidad de nutrientes, especialmente nitrógeno y aminoácidos puede aletargar el desarrollo de las ninfas.

**Cuadro 1. Duración del ciclo biológico de *D. citri* criadas en dos hospederos cítricos.**

Hospedero	Huevo	Ninfa I	Ninfa II	Ninfa III	Ninfa IV	Ninfa V	Total
<i>C. sinensis</i>	2.15±0.01	1.99±0.05	2.83±0.09	1.98±0.06	2.27±0.06	4.57±0.07	15.79±
<i>C. aurantifolia</i>	3.00±0.00	1.86±0.06	1.73±0.05	2.28±0.07	2.18±0.07	3.92±0.06	14.87±

De igual manera las curvas de supervivencia de las cohortes de *D. citri* en *C. aurantifolia* y *C. sinensis*, realizadas con la prueba de Log Rank (Mantel-Cox), no mostraron diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ) (Figura 1), aunque a partir de los 60 días se empezó a mostrar ligera tendencia a favor de los insectos criados en limón. De acuerdo con los parámetros biológicos

(Cuadros 2 y 3) se infiere que el porcentaje de mortalidad mantuvo valores bajos en todos los estadios ninfales, excepto en el primero y en la etapa adulta (55 y 45 días), lo cual indica que el 60% de la población, en ambos hospederos, concluye satisfactoriamente su ciclo. Los resultados encontrados coinciden con la supervivencia (50%) reportada por otros autores (Liu y Tsai, 2000; Nava et al. 2010; Baños *et al.* 2012) en estudios similares en *M. paniculata*. Por tanto se infiere que en iguales condiciones, el psílido puede desarrollarse favorablemente en uno u otro hospedero.



**Figura 1. Curvas de supervivencia (Log Rank [Mantel-Cox]) en de *D. citri* en limón Mexicano y naranja Valencia.**

**Cuadro 2. Tabla de vida de una cohorte (n=800) de *Diaphorina citri* sobre plantas de limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*).**

Edad	$l_x$	$d_x$	$q_x$	$L_x$	$T_x$	$e_x$
0	800	18	0.02	791.00	4724.50	5.91
15	567	0	0.00	567.00	2608.00	4.60
30	524	39	0.07	504.50	954.50	1.82
45	345	46	0.13	322.00	450.00	1.30
60	120	51	0.43	94.50	1420.00	11.83
75	18	18	1.00	9.00	1745.50	96.97

En las tasas de reproducción y el tiempo de generación en ambos hospederos, calculadas a partir de la elaboración de las tablas de fertilidad, se muestran en el Cuadro 4. Claramente se observa que la tasa intrínseca de incremento natural y, por ende la tasa finita de incremento ( $\lambda$ ) son ligeramente mayores en naranja. La misma tendencia se aprecia respecto a la tasa neta

de reproducción ( $R_0$ ) lo cual indica que la población criada en naranja se multiplica 214.80 veces en cada generación, cuya duración es de 42.46 días.

**Cuadro 3. Tabla de vida de una cohorte (n=800) de *Diaphorina citri* sobre plantas de naranja Valencia (*Citrus sinensis*).**

Edad (días)	$l_x$	$d_x$	$q_x$	$L_x$	$T_x$	$e_x$
0	800	34	0.04	783.00	5001.00	6.25
15	635	5	0.01	632.50	2830.50	4.46
30	556	55	0.10	528.50	1004.00	1.81
45	385	88	0.23	341.00	475.50	1.24
60	147	47	0.32	123.50	1492.00	10.15
75	20	20	1.00	10.00	1881.00	94.05

Es pertinente indicar que si bien el tiempo generacional en limón es similar al de naranja, la tasa intrínseca de crecimiento natural y de reproducción neta pudiera traducirse en una tasa de incremento natural menor en este hospedero.

**Cuadro 4. Tasas de reproducción y tiempo de generación de colonias de *Diaphorina citri* criadas en diferentes hospederos cítricos.**

Hospedero	$rm$	$\lambda$	$R_0$	$T$	$d$
<i>Citrus sinensis</i>	0.13	1.13	214.80	42.46	5.48
<i>Citrus aurantifolia</i>	0.11	1.12	135.13	44.32	6.26

### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, por el apoyo y financiamiento para la realización de este proyecto.

### LITERATURA CITADA

- Aubert, B., and X. Hua. 1990. Monitoring flight activity of *Diaphorina citri* on citrus and *Murraya* canopies. Pp. 181-187. In: B. Aubert, S. Tontyaporn, and D. Buangsuwon (eds). 4th International Asia Pacific Conference on Citrus Rehabilitation. Chiang Mai, Thailand.
- Baños H. L., J. Alemán, M. A. Martínez, I. Miranda, H. Rodríguez, M. Suris. 2012. Ciclo y tablas de vida horizontal de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) sobre *Murraya paniculata* L. Rev. Protección Veg 27(2): 95-101.
- Fonseca, O., Valera, N., & Vásquez, C. L. 2010. Registro y ciclo de vida de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en tres hospederos en el estado Lara, Venezuela. Entomotropica, 22(3), 145-152.
- Garnier, M., and J. M. Bové. 2000. Huanglongbing in Cambodia, Laos, and Myanmar. Pp. 378-380. In: J. V. da Graca, R. F. Lee and R. K. Yokomi (eds.) Proceedings of 14th Conference IOCV, IOCV, Riverside, CA.
- Halbert, S.E, and K.L Manjunath. 2004 Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. Florida Entomologist 87(3): 401-402.
- Hodkinson, I. D. 2009. Life cycle variation and adaptation in jumping plant lice (Insecta: Hemiptera: Psylloidea): a global synthesis. Journal of Natural History .43:1-2, 65-179.

- Moran, V. C., and Brown, R. P. 1973. The antennae, host plant chemoreception and probing activity of the citrus psylla *Trioza erytreae* (Del Guercio) (Homoptera: Psyllidae). *Entomological Society of Southern Africa* 36:191-202.
- Nava, D. E., Torres, M. L. G., Rodrigues, M. D. L., Bento, J. M. S., & Parra, J. R. 2007. Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. *Journal of Applied Entomology*, 131(9-10), 709-715.
- Tsai, J. H., and Y. H. Lui. 2000. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. *Journal of Economic Entomology* 96 (6):1721-1725.
- Tsai, J. H., J. J. Wang, and Y. H. Lui. 2002. Seasonal abundance of Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Southern Florida. *Florida Entomologist* 85 (3):446-441.

## DINAMICA DE LA CONCENTRACIÓN BACTERIANA DE *Candidatus Liberibacter asiaticus* Y SU EFECTO EN LA EXPRESIÓN SINTOMÁTICA E HISTOLÓGICA EN CÍTRICOS

Fabiola **Esquivel Chávez**<sup>1</sup>, Gustavo **Mora Aguilera**<sup>1</sup>, Guadalupe **Valdovinos Ponce**<sup>1</sup>, M. Alejandra **Gutiérrez Espinosa**<sup>2</sup>, Joaquín **Velázquez Monreal**<sup>3</sup>, Emiliano **Loeza Kuk**<sup>4</sup>

### INTRODUCCIÓN

Los síntomas inducidos por *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) en cítricos son variables y pueden ser similares a los causados por deficiencias nutrimentales y otros patógenos sistémicos. Sin embargo, dependiendo de la especie citrícola y de la cronicidad de la infección, los síntomas pueden conferir indicios de CLas, por ejemplo, brotes con crecimiento secundario amarillentos y hojas con un patrón asimétrico de áreas amarillas y verdes sin límites definidos, dando la apariencia de un moteado. Sin embargo, la presencia del patógeno debe confirmarse con métodos moleculares dado que éste no es cultivable (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Histológicamente, CLas induce la acumulación masiva de almidón en las células parenquimatosas; esta acumulación es excesiva en cítricos agrios (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012), probablemente como resultado de la degeneración y colapso del floema inducido por la hiperplasia en las células parenquimatosas del floema. En un estudio previo en el que se analizó el efecto de CLas en cítricos dulces y agrios a partir de índices en relación asintomático:sintomático con respecto al área y anchura del floema, y acumulación de almidón, sugirieron que Limón mexicano (1:63.8, 1:2.5, y 1:1.9) es más vulnerable a la infección de CLas (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). CLas infecta todas las especies de cítricos, pero cada especie presenta diferencias en la expresión sintomática (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012; Velázquez *et al.*, 2012). Se tienen reportes que indican la relación inversa entre los síntomas que se presentan en el hospedante y la concentración bacteriana (Folimonova *et al.*, 2009; Stover *et al.*, 2001).

<sup>1</sup>Fitopatología. <sup>2</sup>Fruticultura. Colegio de Posgraduados. C.P. 56230. Montecillo Estado de México; <sup>3</sup>INIFAP Tecomán-Colima. C.P. 2810; <sup>4</sup>INIFAP Mocochoá-Yucatán. C.P. 67413.

Autor de correspondencia: **fecia08@gmail.com**

Lo que se contrapone con lo reportado por Flores-Sánchez *et al.* (2015), quienes describieron que la concentración de CLas está directamente relacionada con la severidad de la enfermedad. Esta relación pudiera asociarse también con las alteraciones inducidas a nivel celular. En las especies cítricas que se cultivan comercialmente, el portainjerto es un componente importante debido a que confiere características agronómicas favorables, así como resistencia o tolerancia a diferentes condiciones bióticas y abióticas (Castle, 2010). La naranja trifoliada (*P. trifoliata* L. Raf.), comúnmente utilizada como patrón, y algunos de sus híbridos, no inducen síntomas distintivos de CLas. Albrecht y Bowman (2011), observaron mayores rendimientos de las plantas de naranja trifoliada y US-897 cultivadas en invernadero y campo, por lo que reportaron tolerancia de este genotipo a CLas. Estos mismos autores (Albrecht y Bowman, 2012), evaluaron el comportamiento a 18 meses después de la inoculación de CLas en ocho portainjertos Carrizo, US-897, US-942, US-802, US-812, Benecke naranja trifoliada, limón Volkameriano y mandarina Cleopatra. Estos autores los clasificaron como: a) Tolerantes a Carrizo, US-897 y US-942; b) Moderadamente tolerante a US-802, US-812 y limón Volkameriano; y c) Susceptible la mandarina Cleopatra.

A partir del efecto a nivel histológico que induce CLas en el floema, se hipotetizó que se reduce la movilidad bacteriana hacia los flujos de crecimiento en las plantas, afectando directamente el inóculo potencial para el vector. Razón por la cual se propuso cuantificar la concentración bacteriana en diferentes secciones de la planta. Así mismo, se consideró que el patrón puede influir en los efectos de translocación de la bacteria. Aunque poco se sabe sobre los cambios de expresión sintomática en función de la combinación injerto-portainjerto, por lo que los objetivos de la presente investigación fueron evaluar el efecto de la combinación injerto-portainjerto en la expresión de síntomas y la concentración bacteriana en cítricos agrios y dulces, y evaluar la dinámica temporal de la concentración bacteriana y su efecto a nivel histológico en plantas de cítricos injertadas en tres patrones.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Evaluación del efecto de la combinación injerto-portainjerto.** A nivel de invernadero Se establecieron dos ensayos en INIFAP Campus Experimental Tecomán. En el primer ensayo, el 10 de abril 2012, se injerto limón mexicano (Lm) y limón persa (Lp) sobre *Citrus*



*macrophylla* y *C. volkameriana*, y naranja dulce (Nd) sobre *C. volkameriana* de los cuales se establecieron 5 repeticiones y un testigo por cada combinación injerto-portainjerto. CLas se inoculó mediante injerto de púa proveniente de tejido enfermo colectado en campo de plantas de limón mexicano. Las evaluaciones se iniciaron en abril 2014 a los 24 meses después de la inoculación, cada 30 días por nueve meses. De cada planta se colectaron dos muestras, la primera de la parte del inóculo y la segunda dirigida a la especie citrícola (copa).

En el segundo ensayo, del 21 de abril del 2013, se injertó limón mexicano (Lm) sobre *C. macrophylla*, *C. volkameriana* y *C. aurantium*. Se consideraron siete plantas por combinación injerto-portainjerto y un testigo. La inoculación fue similar a la descrita previamente. Las evaluaciones se iniciaron en abril 2014 a los 12 meses después de la inoculación. La evaluación y colecta de material vegetal se realizó cada 30 días con un total de nueve muestreos. De cada planta se seleccionaron tres ramas y de cada rama se marcaron las regiones proximal y distal para la colecta de una hoja por región. También se determinó la concentración bacteriana mediante PCR cuantitativa (q-PCR). En ambos experimentos se confirmó la presencia de CLas en el inóculo y mediante secuenciación se verificó la transmisión al injerto.

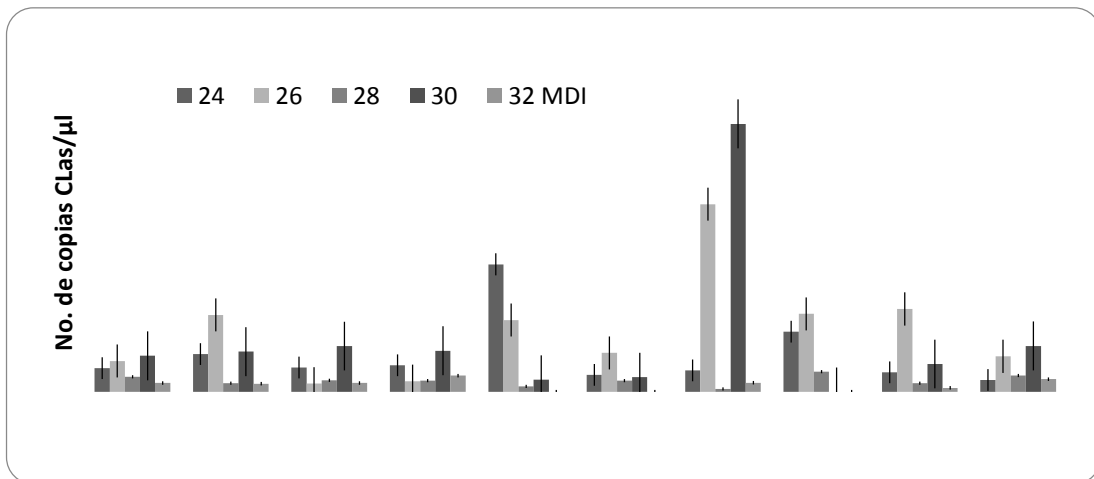
**Análisis histológico.** Las muestras recolectadas se procesaron de acuerdo con la metodología descrita por López *et al.*, 2005.

**Cuantificación de la concentración de CLas mediante q-PCR.** De cada muestra se colectaron dos hojas para extracción de ADN a partir de la nervadura central, se procesaron nueve colectas de cada experimento. La extracción de ácidos nucleicos totales se realizó por el método de CTAB según Freitas-Astúa *et al.* (2003). La cuantificación de la bacteria se realizó por el método descrito por Li (2006), adaptado por SENASICA-CNRF (Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

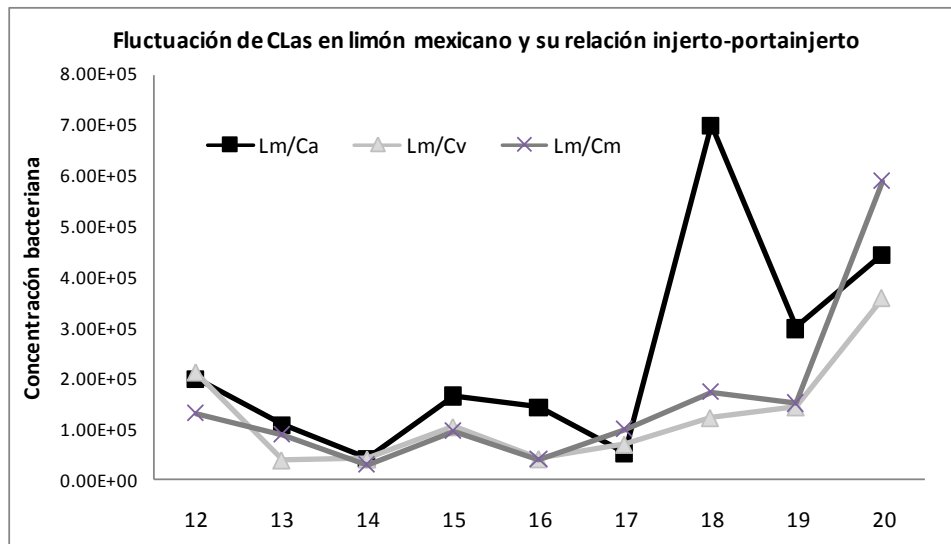
**Ensayo 1.** Los tres cítricos presentaron variaciones en la expresión sintomática visual. Los síntomas observados fueron aclaramiento de nervaduras, moteado leve, moteado blancuzco, moteado asimétrico y clorosis. La severidad de síntomas fue mayor en plantas de

Lm injertadas sobre *C. macrophylla*, así mismo, se registró la más alta concentración de CLas en esta combinación (Fig. 1). En Lm/*C. volkameriana*, Lp y Nd en las diferentes combinaciones mostraron síntomas moderados a leves en 32 meses evaluados. A nivel histológico, las células parenquimatosas del floema de la nervadura central de las hojas de Lm/*C. macrophylla* y *C. volkameriana*; Lp/*C. macrophylla* y *C. volkameriana*; Nd/*C. volkameriana* presentaron hiperplasia y la consecuente desorganización del sistema vascular. A diferencia del Lm/*C. volkameriana*, el Lm/*C. macrophylla* presentó un incremento significativo en la hiperplasia del floema, estimado con la anchura del floema ( $X=131.82 \mu\text{m}$ ) con respecto al tejido Sano ( $X=64.04 \mu\text{m}$ ) mostrando concordancia con la severidad visual de los síntomas. El limón mexicano fue el cítrico más afectado por CLas en este ensayo.



**Ensayo 2.** El Lm/*C. aurantium* presentó punteado clorótico, moteado asimétrico, moteado blancuzco y aclaramiento de nervaduras. En Lm/*C. volkameriana* presentó moteado asimétrico, aclaramiento de nervaduras y clorosis; en Lm/*C. macrophylla* se observaron síntomas de punteado clorótico, moteado asimétrico, clorosis, abscisión foliar, muerte de ramas y cuatro plantas muertas, por lo que la severidad en síntomas fue mayor en Lm/*C. macrophylla* coincidiendo con lo reportado por Velázquez *et al.*, 2012, contrastando con los resultados moleculares donde se encontró mayor concentración de CLas en la mayoría de las ramas de Lm/*C. aurantium* (Fig. 2), en especial en la parte basal de las ramas evaluadas. Estos resultados son de los 12 meses de cronicidad de la enfermedad hasta los 20 meses después de la inoculación.

**Figura 1. Cuantificación temporal de CLAs, de los 24 meses hasta los 32 meses después de la inoculación en limón persa (LP), l. mexicano (LM) y naranja dulce (ND) y su relación injerto/portainjerto.**



**Figura 2. Cuantificación temporal de CLAs, de los 12 meses hasta los 20 meses después de la inoculación en limón mexicano (Lm) y su relación injerto/portainjerto. Lm/Ca= *C. aurantium*; Lm/Cv= *C. volkameriana*; Lm/Cm= *C. macrophylla*.**

A pesar de que CLAs se distribuye de manera heterogénea en la planta (Ananthkrishnan *et al.*, 2013; Folimonova *et al.*, 2009), la comparación de la concentración de la bacteria en las diferentes combinaciones de Lm injertado sobre tres especies de patrón reveló niveles similares de CLAs, lo que indica que no hay una estricta correlación entre la concentración bacteriana y la severidad de los síntomas. La combinación más susceptible fue Lm sobre *C. macrophylla* ya que presentó las concentraciones más bajas de CLAs en al menos cinco diferentes fechas de evaluación, pero en contraste, se observaron los síntomas más severos y fue la única combinación que presentó muerte plantas.

## LITERATURA CITADA

- Albrecht, U. and Bowman, K.D. (2012). Tolerance of trifoliolate citrus rootstock hybrids to *Candidatus liberibacter asiaticus*. *Scientia Horticulturae* 147:71–80.
- Ananthkrishnan, G., Choudhary, N., Roy, A., Sengoda, V. G., Postnikova, E., Hartung, J. S., Stone, A. L., Damsteegt, V. D., Schneider, W. L., Munyaneza, J. E., and Brlansky, R. H. 2013. Development of primers and probes for genus and species specific detection of ‘*Candidatus Liberibacter species*’ by real-time PCR. *Plant Disease* 97:1235-1243.
- Esquivel-Chávez F., Valdovinos-Ponce G., Mora-Aguilera G., Gómez-Jaimes R., Velázquez-Monreal J. J., Manzanilla-Ramírez M. Á., Flores-Sánchez J. L., López-Arroyo J. I. 2012. Análisis Histológico Foliar

- de Cítricos Agrios y Naranja Dulce con Síntomas Ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46: 769-782.
- Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, López-Arroyo JI, Domínguez-Monge S, Acevedo-Sánchez G y Robles-García P. 2015. Pérdidas en Producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón Persa en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 195-210.
- Folimonova S.Y., C. J. Robertson, S. M. Gamsey, S. Gowda, and W.O. Dawson. 2009. Examination of the responses of different genotypes of citrus to huanglongbing (citrus greening) under different conditions. *Phytopathology* 99:1346-1354.
- Freitas-Astúa J., E. C. Locali, R. Antoniollo, V. Rodríguez, E. W. Kitajima, and M. A. Machado. 2003. Detection of Citrus leprosis virus in citrus stems, fruits and the mite vector. *Virus Review Research* 8:190-196.
- Li W., J. S. Hartung, and L. Levy. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 66:104-115.
- López C., L., G. J. Márquez, y S. G. Murguía. 2005. Técnicas para el Estudio del Desarrollo en Angiospermas. Editorial Las Prensas de Ciencias. Facultad de Ciencias UNAM. 178 p.
- Stover E., K. Bowman, G. McCollum, R. Niedz, R. Shatters, Jr. and D. Hall. 2001. Breeding citrus for HLB resistance at the USDA/ARS, U. S. Horticultural Research Laboratory, pp34-45
- Velázquez-Monreal J. J., Manzanilla-Ramírez M. A., Manzo-Sánchez G., Robles-González M. M., Orozco-Santos M., Carrillo-Medrano S. H. 2012. Reacción del limón mexicano a *Candidatus Liberibacter asiaticus* mediante inoculación por injerto. In: Memorias de congreso Nacional de Fitopatología. Agosto, 2012.

## DISTRIBUCIÓN DE LA CARGA DE INÓCULO REGIONAL DE *Candidatus Liberibacter asiaticus* EN *Diaphorina citri* EN TRES ESCENARIOS EPIDEMIOLÓGICOS

Alejandra **De la Rosa-Anaya**<sup>1</sup>, Gustavo **Mora-Aguilera**<sup>1</sup>, Emiliano **Loeza-Kuk**<sup>2</sup>, D.  
Leobardo **Ochoa-Martínez**<sup>1</sup>, Verónica **Martínez-Bustamante**<sup>1</sup>, J. Luis **Flores-Sánchez**<sup>1</sup>

### INTRODUCCIÓN

El Huanglongbing (HLB) es una enfermedad de los cítricos causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) que coloniza los tubos cribosos del floema y provoca su obstrucción, y la muerte de los árboles. La enfermedad se transmite, principalmente, de árbol en árbol por el insecto vector *Diaphorina citri* (Bové, 2006). En México la bacteria se detectó, por primera vez, en julio del 2009 en la localidad del Cuyo, Yucatán. En diciembre del mismo año se reportó en Nayarit y Jalisco. A partir de esas fechas se ha detectado en 16 estados del país (SENASICA, 2015). Mora-Aguilera *et al.* (2013) definieron dos escenarios epidémicos de HLB, con base en la severidad: el Pacífico donde se observa la mayor intensidad y la Península de Yucatán, que a pesar de ser la región donde se detectó por primera vez, se mantiene con baja intensidad.

Yang *et al.* (2006) sugieren que *Diaphorina citri* se dispersó del continente asiático hacia otros continentes, principalmente a países tropicales y subtropicales. En América, se detectó en la década de los 1940's en Brasil, posteriormente en Estados Unidos, México, Belice, Costa Rica, el Caribe y América del Sur (Grafton *et al.*, 2013). En México, el insecto se detectó en el año 2002 y, a la fecha, se encuentra disperso en todo el país (López *et al.*, 2013). Fagen *et al.* (2012) observaron variación en la cantidad de bacteria (CLas) en el interior del insecto (*D. citri*) e indican que la variación de CLas está involucrada en la transmisión y dispersión de la enfermedad. Así mismo, Mora *et al.* (2013) mencionan que la cantidad del inóculo tiene implicación en el comportamiento temporal (velocidad epidémica) y espacial (distancia de dispersión) de una epidemia.

<sup>1</sup>Fitosanidad- Fitopatología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

Autor de correspondencia: [morag@colpos.mx](mailto:morag@colpos.mx)

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) es un método de detección preciso, sensible y rápida, que adicionalmente permite cuantificar el número de copias de la

bacteria (CLas) presente en una cantidad de muestra conocida (Li *et al.*, 2006). Ante la ausencia de cura para el HLB, la única opción para mantener la productividad de los árboles enfermos es la aplicación de tratamientos para reducir los síntomas y el manejo intensivo del vector (Coy *et al.*, 2015). Una de las estrategias para contener esta enfermedad es el manejo regional de poblaciones del insecto (Torres-Pacheco *et al.*, 2013); sin embargo, el control del vector es costoso y difícil (Yang *et al.*, 2006). Existen estudios de la distribución, hábitat y tasas de crecimiento poblacional de *D. citri*, y algunos, como el de Coy *et al.* (2015), sobre la capacidad o cantidad de bacteria que los insectos pueden portar y que está relacionada directamente con su eficiencia para transmitir la enfermedad. Aunque el vector se encuentra distribuido en todo el país no se presentan los mismos escenarios epidémicos.

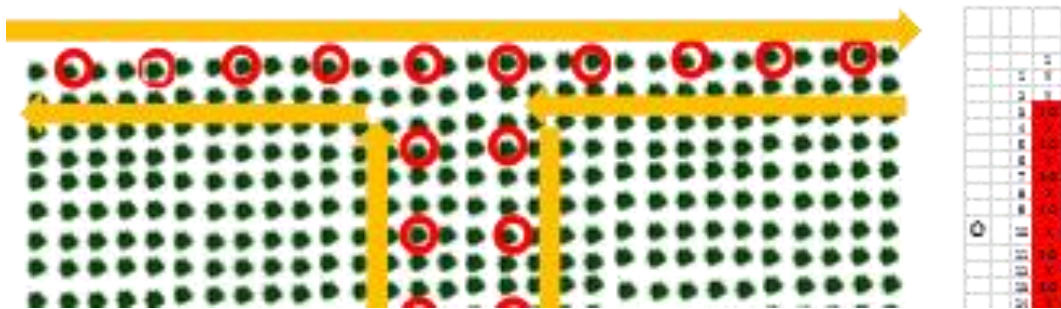
El presente trabajo tuvo como objetivo medir la cantidad de bacteria (CLas) en el interior de *D. citri* en tres regiones de México (Pacífico, Centro-Golfo y Península de Yucatán), bajo tres escenarios epidémicos (alta, media y baja severidad e incidencia) y varias especies cítricas de México; así como, el tipo de distribución de la bacteria en el vector en huertos. Las hipótesis establecen que la carga de inóculo de CLas en *D. citri* está directamente relacionada con el tiempo de infección, y por tanto, con la incidencia y severidad de HLB. También se espera que en los huertos con mayor tiempo de infección el comportamiento espacial de la carga de inóculo sea homogéneo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La colecta del insecto vector fue del 28 de enero al 30 de abril del 2015, periodo de brotación vegetativa, en los estados de Campeche, Colima, Michoacán, Puebla, Quintana Roo, Yucatán y Veracruz. La selección de los sitios de muestreo consideró los antecedentes históricos de huertas enfermas confirmadas mediante diagnóstico, la presencia del insecto y la especie cítrica predominante en cada región: limón mexicano (*Citrus aurantifolia*), limón (*Citrus latifolia*), naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y toronjo (*Citrus paradisi*).

Los muestreos en campo para la colecta de insectos se realizaron mediante dos metodologías. Para medir la carga bacteriana por regiones la colecta siguió un esquema en “T” (Figura 1a), el cual consideró el efecto borde de los huertos por la llegada de vectores y

efecto aleatorio hacia el interior del huerto. El tamaño mínimo de muestra fue de 10 insectos colectados de manera dirigida en 20 árboles por huerto, una muestra cada 2 o 3 árboles, en función del tamaño del huerto, para abarcar la mayor superficie: 10 ubicados en uno de los lados de la huerta aledaño a una carretera, camino rural y terracería, y 10 hacia el interior del huerto. Para medir la distribución de la carga de inóculo intraparcelario se utilizó un esquema en “H” (Figura 1b), en el que las muestras se obtuvieron de árboles intercalados, una muestra cada 2 o 3 árboles: 10 árboles en la periferia de cada uno de los lados, así como otros ubicados en el interior del huerto; el número de muestras colectadas en el interior varió en función del tamaño de la huerta. Al igual que en el esquema anterior, el tamaño mínimo de muestra fue de 10 insectos pero colectados de cada árbol. Los insectos que se colectaron se colocaron en frascos de plástico con alcohol al 90%.



**Figura 1. Esquemas de muestreo. A) Esquema en “T” del muestreo regional. B) Esquema en “H” del muestreo intraparcelario.**

**Extracción y dilución de ADN.** El ADN se obtuvo de 10 insectos de cada muestra. La extracción de ADN se realizó después secar los insectos para retirar el alcohol. Se utilizó el Kit de extracción para sangre y tejido Axygen®. El ADN extraído se cuantificó con un espectrofotómetro (NanoDrop 2000®, Thermo Fisher Scientific). Las muestras de ADN se ajustaron a una concentración de 20 ng/μl. Para realizar las curvas de calibración se realizaron diluciones seriadas (1/10) hasta alcanzar una concentración de 10<sup>-5</sup> ng/μl. La curva de calibración se efectuó con seis diluciones (de 10<sup>0</sup>, a 10<sup>-5</sup> ng/μl).

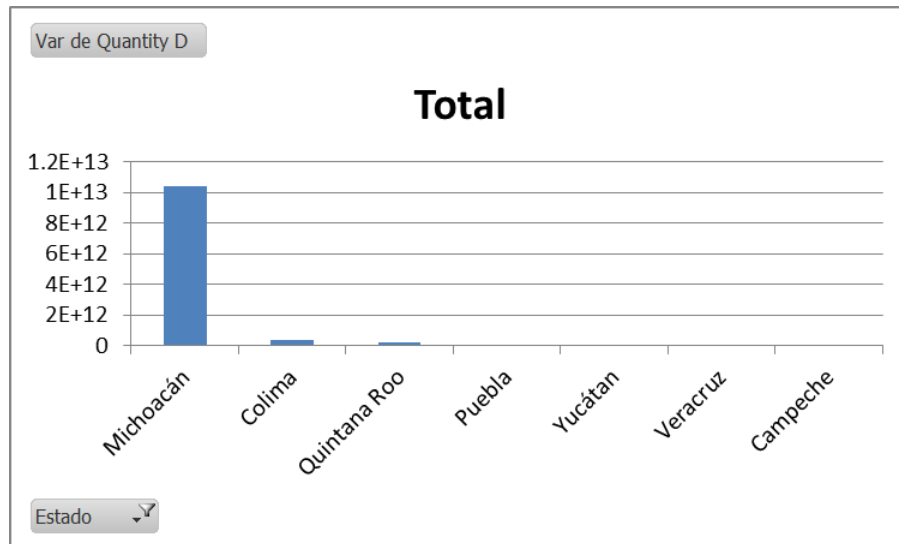


**PCR en tiempo real.** Se cuantificó la carga bacteriana con la técnica molecular de qPCR con los primers HLBp (5'-GCG TTA TCC CGT AGA AAA AGG TAG-3'), HLBas (5'-TCG AGC GCG TAT GCA ATA CG- 3') y la sonda tipo Taqman (5'- AGA CGG GTG AGT AAC GCG) (Teixeira *et al.*, 2008). El método de curva estándar de Li *et al.* (2008) y el supermix SsoAdvanced™ (BIO-RAD). La reacción se efectuó en un termociclador Step One (Applied Biosystems) y el programa de temociclaje consistió en desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, 40 ciclos que consistieron en 95°C por 5 s, posteriormente de 59 °C por 40 s y 59 °C por 35 s. Se seleccionó el valor (cuantificación) de las muestras cuyos Cts (ciclo de temociclaje en el cual se rebasó el umbral de fluorescencia aceptado por el equipo) se encontraron dentro del intervalo [8, 35]. Muestras con Cts mayores a 35 se consideraron sin confirmar o bien negativas según los estándares del equipo. Los valores numéricos requeridos para la aprobación fueron la eficiencia del experimento, superior al 80% y menor a 120%; la mejor precisión fue cuando el valor era cercano a 100%. El valor de r<sup>2</sup> debió aproximarse lo más posible a 1, (0.99 lo ideal); el límite inferior aceptable fue 0.95.

Los datos se analizaron mediante un ANOVA y prueba de comparación de medias Tukey (p=0.05) para determinar la carga de inóculo de CLas por región. Los tratamientos fueron la cantidad de copias de la bacteria y las repeticiones el número de muestras tomadas en cada región. Los análisis se realizaron en SAS 9.0®. El comportamiento espacial de positivos CLas, fue analizado con mapas geoestadísticos.

## RESULTADOS Y DISCUSION

**Parcelarios.** Los resultados sugieren que en la Región Centro-Golfo y en la Península de Yucatán la carga de inóculo de CLas en el vector es baja, por tanto puede explicar un proceso de dispersión reducido y la condición de la enfermedad con menor intensidad (Mora *et al.*, 2013). En el Pacífico se observó el resultado opuesto (Figura 2). Coy *et al.* (2015) también encontraron dos niveles contrastantes de carga de inóculo en el vector en el sur de Florida. Se observó que existe una relación directa de la carga de inóculo con el estatus epidémico de la enfermedad en cada entidad federativa. En aquellas entidades en condición endémica como Colima y Michoacán presentaron mayor concentración de CLas en el vector.

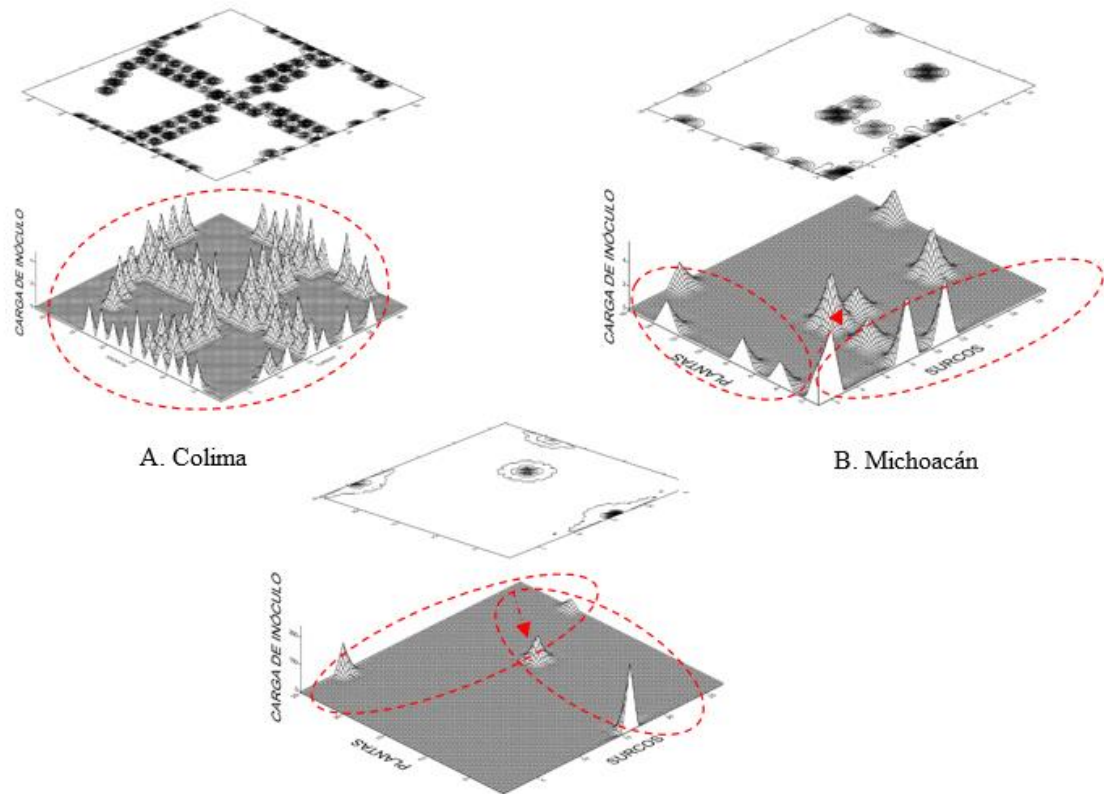


**Figura 2. Carga de Inóculo por Estado**

La carga bacteriana en el vector fue baja donde existen huertos con reducida presencia de la enfermedad, lo cual sugiere una condición de focos iniciales y alto riesgo de dispersión sin un manejo adecuado del vector.

**Dispersión Intraparcelaria:** Se observó un patrón espacial parcelario de concentración de CLas en el vector en función de la cronicidad de la infección en árboles de cítricos dulces y agrios. Para el caso de Colima existe una distribución homogénea de la carga de inóculo la cual está relacionada con la endemicidad de la enfermedad. Mientras que la dispersión intraparcelaria de CLas en Michoacán y Veracruz se encuentra bajo un proceso activo, el cual avanza desde los bordes hacia el interior de las parcelas. Los resultados de Puebla sugieren que la carga de inóculo es baja, considerando los resultados negativos de las muestras colectadas (Figura 3).

Los resultados de la carga de inóculo regional e intraparcelaria del presente trabajo explican una de las posibles causas de la presencia de diferentes escenarios epidemiológicos en México. Mora *et al.* (2013) mencionan que la disponibilidad del inóculo tiene implicación en el comportamiento temporal (velocidad epidémica) y espacial (distancia de dispersión) de la epidemia.



**Figura 3. Mapas parcelarios de la distribución de la carga de inóculo en el vector *D. citri* en huertos contrastantes de Colima, Michoacán, Puebla y Veracruz.**

altas concentraciones del inóculo, son criterios para definir las acciones y áreas regionales hacia dónde dirigir medidas de prevención y control del HLB, específicas para el manejo de *D. citri*.

### LITERATURA CITADA

- Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging , century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88(1):7-37.
- Coy, M., Stelinski, L., and Alfred, L. 2015. Great variability in the infection rate of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in field populations of *Diaphorina citri* ( Hemiptera : Liviidae ) in Florida. *Florida Entomologist* 98:356-357.
- Fagen, J. R., A. Giongo, C. T. Brown, A. G. Richardson, K. A. Gano, and E. W Triplett. 2012. Characterization of the relative abundance of the citrus pathogen *Ca. Liberibacter asiaticus* in the microbiome of its insect vector, *Diaphorina citri*, using high throughput 16S rRNA sequencing. *The Open Microbiology Journal* 6:29-33.
- Grafton, E. E., L. L. Stelinski, and P.A Stansly. 2013. Biology and management of asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. *Annual Review of Entomology*. 58:413-32.
- Li W., D. Li, E. Twieg, J. S. Hartung, and L. Levy. 2008. Optimized quantification of unculturable *Candidatus Liberibacter* spp. in host plants using real-time PCR. *Plant Disease* 92: 854-861.

- Li, W., J. S. Hartung, and L. Levy. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *Journal of microbiological methods* 66:104-115.
- López, J., I. López, P. Robles, and M. Márquez. 2013. Geographic distribution of habitat, development, and population growth rates of the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in México. *Journal of Insect Science* 13:1-17.
- Mora-Aguilera, G., Robles-García, P., López-Arroyo, J. I., Velázquez Monreal, J., Flores Sánchez, J., Acevedo-Sánchez, G., Domínguez-Monge, S., y González-Gómez, R. 2013. Situación actual y perspectivas del manejo del HLB de los cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31:S6-12.
- SENASICA, 2015. Campañas y Programas Fitosanitarios. Disponible en <http://www.senasica.gob.mx/?id=4608> (Consulta en línea, mayo de 2015).
- Teixeira, D. C., N. Wulff, E. C. Martins, E. W. Kitajima, R. Bassanezi, A. J. Ayres, S. Eveillard, C. Saillard, and J. M. Bové. (2008). A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches' broom phytoplasma (16SrIX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the state of São Paulo, Brazil. *Phytopathology* 98:977-984.
- Torres-Pacheco, J. I. López-Arroyo, J. A. Aguirre-Gómez, R. G. Guevara-González, R. Yáñez-López, M. I. Hernández-Zul, and J. A. Quijano-Carranza. 2013. Potential distribution in México of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) vector of Huanglongbing pathogen. *Florida Entomologist* 96(1):36-47.
- Yang, Y., M. Huang, G. Andrew, C. Beattie, Y. Xia, G. Ouyang, and J. Xiong. 2006. Distribution, biology, ecology and control of the psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama, a major pest of citrus: A status report for China. *International Journal of Pest Management* 52(4): 343 – 352.

## IMPLICACIÓN DEL MANEJO AGRONÓMICO Y CRONICIDAD EN EL IMPACTO PRODUCTIVO DEL HUANGLONGBING EN MICHOACÁN

Jorge L. Flores-Sánchez<sup>1</sup>, Gustavo Mora-Aguilera<sup>1\*</sup>, Bernardo Reyes-González<sup>2</sup>,  
Emiliano Loeza-Kuk<sup>3</sup>, J. I. López-Arroyo<sup>4</sup>, José J. Velázquez-Monreal<sup>5</sup>, Ma. A.  
Gutiérrez-Espinosa<sup>6</sup>, Renato Beozzo Bassanezi<sup>7</sup>.

### INTRODUCCIÓN

El Huanglongbing (HLB) de los cítricos es la enfermedad de mayor impacto socio-económico que afecta la citricultura mundial (Bové, 2006; Bassanezi *et al.*, 2009, 2011; Flores-Sánchez *et al.*, 2015; Robles-González *et al.*, 2013). En México, el HLB se asocia a la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), la cual se transmite y dispersa por el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri* Kuwayama; Hemiptera: Liviidae) (PAC) (Halbert y Manjunath, 2004; Hall *et al.*, 2013). Derivado del desarrollo epidémico del HLB en México, Mora-Aguilera *et al.* (2013) indican que existen dos escenarios contrastantes: 1) región Pacífico, en la cual se presenta mayor intensidad epidémica y prevalencia en huertos comerciales y 2) regiones de la Península de Yucatán y Golfo de México con menor intensidad y prevalencia en traspatios. Las recientes experiencias en Brasil, y posteriormente extendidas a EUA, Belice, y México, indican que la estrategia que presenta mayor eficiencia en el manejo del HLB es el enfoque de control regional del PAC, por su durabilidad y reducción en costos de aplicación, en complemento a la erradicación de inóculo primario y al uso de material vegetal certificado (Bassanezi *et al.*, 2013); sin embargo, en regiones cítricas donde estas acciones no fueron implementadas con pertinencia y el escenario epidémico del HLB es endémico, la erradicación es una opción inviable (Belasque *et al.*, 2009).

<sup>1</sup>Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco Edo. de México.

<sup>2</sup>Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Michoacán-DGSV, Uruapan, Michoacán.

<sup>3</sup>INIFAP-Centro de Investigación Regional Sureste. Mocochoá, Yucatán.

<sup>4</sup>INIFAP-CE General Terán, Nuevo León.

<sup>5</sup>INIFAP-CE Tecomán, Colima.

<sup>6</sup>Instituto de Fruticultura. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco Edo. de México.

<sup>7</sup>FUNDECITRUS. Araraquara, Sao Paulo, Brasil.

\*Autor de correspondencia: [morag@colpos.mx](mailto:morag@colpos.mx)

En estas regiones, tales como Colima y Michoacán, se requiere una estrategia de manejo integrado del cultivo, la cual se base en nutrición, riego, altas densidades de plantación, plantaciones de ciclo corto y control regional del PAC mediante ingredientes químicos y biológicos (Manzanilla *et al.*, 2012).

En Florida, en naranja dulce, se demostró que el control del PAC, especialmente cuando se combina con nutrición foliar, podría incrementar significativamente la producción en huertas con alta incidencia del HLB (Stansly *et al.*, 2014); sin embargo, este componente de manejo no se utilizó en los estudios que estiman pérdidas en producción por efecto del HLB, ya que estiman la producción en relación a la severidad de la enfermedad en los árboles evaluados. En Brasil se indican pérdidas en producción de naranja dulce cv. Valencia de 41 a 100 % (Bassanezi *et al.*, 2009, 2011); en México, el efecto del HLB reduce la producción de limón persa en 17% (Flores-Sánchez *et al.*, 2015) y en limón mexicano en 62% (Robles-González *et al.*, 2013). En todos los casos indicados implementaron un enfoque parcelario sin considerar la cronicidad de la enfermedad, carga bacteriana y manejo local, por lo que la información que generaron se considera que subestima los efectos del problema; por lo anterior, en el presente estudio el objetivo fue evaluar las implicaciones del manejo agronómico y la cronicidad de la enfermedad en el impacto productivo del HLB, en limón mexicano en el estado de Michoacán.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Selección de sitios de estudio.** La selección de huertos se realizó a partir de un muestreo regional en la zona citrícola del Valle de Apatzingán, el cual consideró los municipios de Tepalcatepec, Buenavista, Aguililla, Apatzingán, Parácuaro, Múgica, la Huacana y Gabriel Zamora. Con el fin de determinar el nivel de tecnificación de los huertos, se evaluaron las variables del sistema epidemiológico: superficie del huerto, nivel de nutrición, edad de plantas, brotación, vigor de árboles, presencia de plagas y enfermedades, y cronicidad del HLB en los huertos. En total se seleccionaron 46 huertos, 23 con alta tecnificación (AT) y 23 con baja tecnificación (BT) distribuidos en los municipios mencionados (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Huertos seleccionados en los municipios cítricos de Michoacán por nivel de tecnificación.**

Municipio	Huertos con AT	Huertos con BT	Huertos totales
Buenvista	5	5	10
Apatzingán	5	5	10
Tepalcatepec	5	5	10
Múgica	2	2	4
Parácuaro	3	3	6
La Huacana	1	1	2
Aguililla	1	1	2
G. Zamora	1	1	2
<b>TOTAL</b>	<b>23</b>	<b>23</b>	<b>46</b>

**Selección de árboles a evaluar.** Para estimar la cronicidad de infección del HLB, en cada huerto se midió la severidad de 100 árboles mediante una escala arbitraria con clases 0=0, 1=25, 2=50, 3=75, 4=100, porcentaje de copa con síntomas de HLB (Flores-Sánchez *et al.*, 2015). A partir de esta evaluación se seleccionaron en total 15 árboles por huerto, tres por clase de severidad, para estimación de la producción.

**Variables medidas.** En cada árbol seleccionado se pesó y contó el número de frutos con madurez de cosecha, colectados para estimar la producción total. Adicionalmente, se seleccionó una muestra aleatoria de 20 frutos para medir las variables morfológicas: peso, diámetro ecuatorial, diámetro polar, grosor de cáscara, volumen de jugo y organolépticas: ph y grados brix (Flores-Sánchez *et al.*, 2015). El porcentaje de pérdida por variable evaluada se calculó con base en la siguiente fórmula:

$$perd = 100 - (pest * 100)/ptotal \dots \dots \dots [1]$$

Donde: *perd*: es el porcentaje de pérdida; *pest*: es el valor obtenido en árboles enfermos, y *ptotal*: es el valor obtenido en árboles sanos, para cada variable evaluada.

**Análisis molecular.** Con el fin de cuantificar la concentración de CLas y determinar su relación con la cronicidad y pérdida productiva, en cada árbol se colectaron ocho hojas, dos por punto cardinal del dosel, a las cuales se realizó la extracción de ácidos nucleicos totales con el método CTAB (Doyle y Doyle, 1987) y la cuantificación de CLas por qPCR con el método TaqMan® (DGSV-CNRF, 2008; Li *et al.*, 2006).

**Análisis de datos.** El análisis estadístico fue bajo un diseño de parcelas divididas en donde la parcela grande fue el manejo del huerto y la parcela chica la cronicidad de las plantas



seleccionadas. Los datos de cada variable se analizaron con un ANOVA y prueba de comparación de medias (Tukey  $P<0.05$ ); adicionalmente, se generaron modelos correlativos en función de la cronicidad del HLB. Los datos de concentración de CLas fueron analizados con modelos correlativos en función de la cronicidad del HLB y producción de árboles evaluados. Todos los análisis se realizaron en SAS® 9.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio la definición del nivel de tecnificación se determinó en consideración de las prácticas agronómicas y culturales que los productores realizan comúnmente en sus huertos (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Características agronómicas evaluadas para definir el nivel de tecnificación de los huertos seleccionados.**

Prácticas Agronómicas	Nivel de Tecnificación	
	Bajo	Alto
Riego	Rodado	Microaspersión
Poda	No	Si
Control de Maleza	Si	No
Nivel de nutrición	Baja	Alta
Vigor	Bajo	Alto
Población <i>D. citri</i>	Alta	Baja
Control de Plagas	No	Si

A partir del porcentaje de pérdidas de la producción obtenida (kg/árbol), se encontraron diferencias significativas (Tukey,  $P<0.05$ ) por nivel de tecnificación de los huertos BT= 40% y AT= 7% (Figura 1A) y por cronicidad 0=0 25=21, 50=36.3, 75=53.2 y 100=62.3% de reducción de la producción (Figura 1B).

En la Figura 1 se ilustra como el nivel de tecnificación predispone la pérdida productiva, la cual no es generalizada en todos los árboles, ésta depende directamente de la cronicidad del HLB en el huerto. Aparentemente las prácticas de riego, poda, fertilización y control del vector compensan el efecto de CLas sobre la producción en huertos con AT, sin inhibir su efecto (7%), mientras que en huertos con BT la infección sistémica y crónica de CLas induce

un efecto fisiológico sobre los árboles, los cuales sin prácticas agronómicas adecuadas exhiben el mayor impacto productivo (62%).

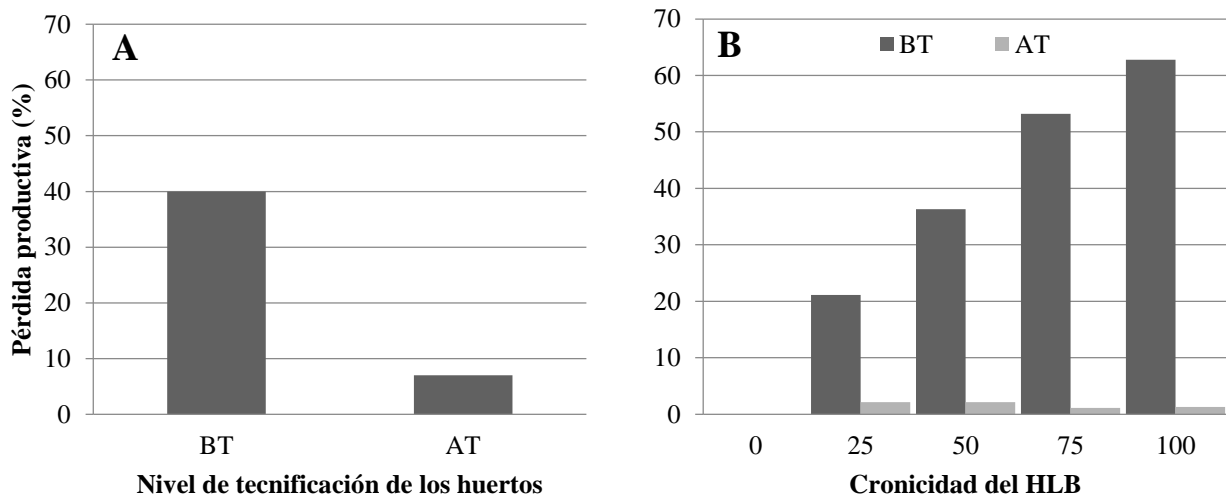


Figura 1. Pérdida productiva (%) por nivel de tecnificación de los huertos (A) y cronicidad del HLB (B).

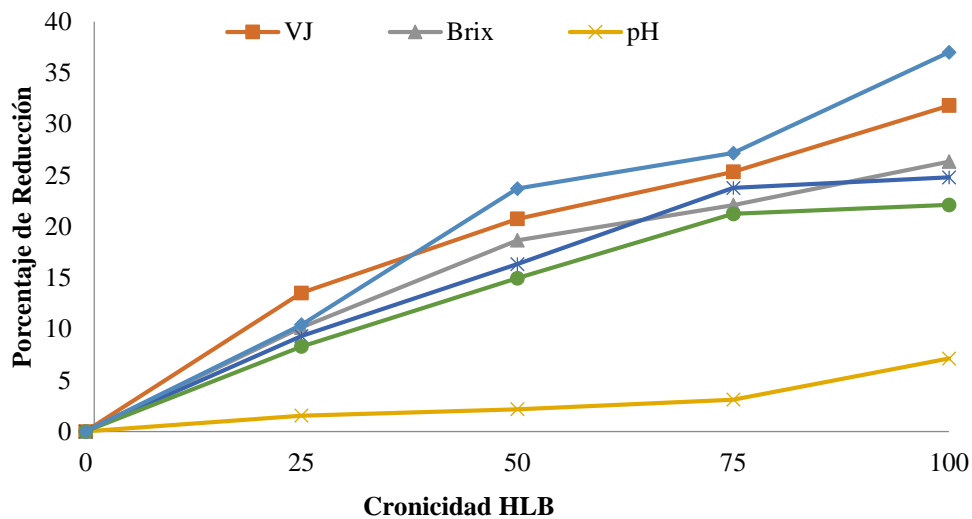


Figura 2. Correlación de porcentaje de reducción de variables organolépticas y morfológicas con severidad del HLB en huertos evaluados con Baja Tecnificación (BT). VJ= volumen de jugo; Brix= grados brix; DP= diámetro polar; DE= diámetro ecuatorial y GC= grosor de cáscara.

Las variables morfológicas y organolépticas evaluadas presentaron una relación similar en función de la cronicidad del HLB ( $R^2=0.87-0.93$ ) y en asociación a huertos con BT. El porcentaje de reducción varió de 22 a 37% en las variables morfológicas; mientras que en las

variables organolépticas osciló de 7 a 26%, en todos los casos el efecto más alto se encontró en árboles con severidades del 100% (Figura 2).

Lo anterior sugiere que el efecto de CLas sobre la producción de limón mexicano depende del periodo de infección (cronicidad) y directamente del nivel de tecnificación de los huertos. Esta información es de gran relevancia ya que evidencia que el HLB bajo las condiciones del Pacífico Mexicano puede ser manejado con prácticas agronómicas, las cuales compensan su impacto y sugiere una coexistencia con la cadena productiva limón mexicano.

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al financiamiento del proyecto DGSV-CESAVEMICH y a la beca de estudios doctorales otorgada por el CONACYT.

### LITERATURA CITADA

- Bassanezi, R. B., Montesino, L. H. and Stuchi, E. S. 2009. Effects of Huanglongbing on Fruit Quality of Sweet Orange Cultivars in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 125:565-572.
- Bassanezi, R. B., Montesino, L. H., Godoy, G. M. C., Filho, A. B., Amorin, L. 2011. Yield loss caused by huanglongbing in different sweet orange cultivars in Sao Paulo, Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 130(4), 577-586.
- Bassanezi, R. B., Montesino, L. H., Gimenes-Fernandes, N., Yamamoto, P. T., Gottwald, T. R., Amorim, L., Bergamin, Filho, A. 2013. Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of huanglongbing in young sweet orange plantings. *Plant Disease* 97, 789-796.
- Belasque, J. J., Filho, B. A., Bassanezi, B. R., Barbosa, J. C., Fernandes G. N., Yamamoto, T. P., Lopes, A. S., Machado, M. A., Pereira Leite, J. R. Ayres, J. A. & Massari, C. A. 2009. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. *Tropical Plant Pathology*. 34(3): 137-145.
- Bové, M. J. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88, 7-37.
- DGSV-CNRFF. (Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria). 2008. Protocolo de Diagnóstico de *Candidatus Liberibacter* spp. mediante la Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real. DGSV. 17p.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- Flores-Sánchez, J. L., Mora-Aguilera, G., Loeza-Kuk, E., Domínguez-Monge, S., Acevedo-Sánchez, G., López-Arroyo, J. I. y Robles-García, P. 2015. Pérdidas en Producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón Persa, en Yucatán México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 195-210.
- Halbert SE and Manjunath KL. 2004. Asian citrus psyllid (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist* 87: 330-53.
- Hall DG, Richardson ML, Ammar E-D and Halbert SE. 2013. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. *Entomol. Exp. App.* 146: 207-223.
- Li W, Hartung JS and Levy L. 2006. Quantitative Real-Time PCR for Detection and Identification of *Candidatus Liberibacter* Species Associated with Citrus Huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods*. 66:104-115.
- Manzanilla-Ramírez, M. A., Robles-Gonzalez, M. M., Velázquez-Monreal, J. J., Orozco-Santos, M. y Carrillo-Medrano, S. H. 2012. Experiencias y perspectivas del Huanglongbing en Limón Mexicano. En *Memorias del 3º Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing*. P:406-414. 9-11, Diciembre. Veracruz, México.

- Mora-Aguilera, G., Robles-García, P., López Arroyo, J. I., Velázquez Monreal, J., Flores-Sánchez, J., Acevedo – Sánchez, G., Domínguez-Monge, S. y González-Gómez, R. 2013a. Situación actual y perspectivas del manejo del HLB de los cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. 31 (Suplemento) S6-S12 p.
- Robles, G. M. M., Velázquez, M. J. J., Manzanilla, R. M. A., Orozco, S. M., Medina, U. V. M., López, A. J. I. & Flores, V. R. 2013. Síntomas del huanglongbing (HLB) en limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) y su dispersión en el estado de Colima, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 19: 15-31.
- Stansly, P. A., Arevalo, H. A., Qureshi, J. A., Jones, M. M., Hendricks, K., Roberts, P. D. and Roka, F. M. 2014. Vector control and foliar nutrition to maintain economic sustainability of bearing citrus in Florida groves affected by Huanglongbing. *Pest Management Science* 70: 415-426.

## EVALUACIÓN DE AISLAMIENTOS MODERADOS DE *Citrus tristeza virus* PARA SU USO EN UN PROGRAMA DE PROTECCIÓN CRUZADA EN MÉXICO

Santiago Domínguez Monge<sup>1</sup>, Gustavo Mora Aguilera<sup>1</sup>, Emiliano Loeza Kuk<sup>2</sup>, Ma. A. Gutiérrez Espinosa<sup>3</sup>, Daniel L. Ochoa Martínez<sup>1</sup>, Vicente Febres<sup>4</sup>

### INTRODUCCIÓN

El *Citrus tristeza virus* (CTV) (familia *Closteroviridae*, género *Closterovirus*) es el agente causal de la tristeza de los cítricos, considerada una de las enfermedades más destructivas en el cultivo de los cítricos (Bar-Joseph *et al.*, 1989). El CTV induce el desarrollo de tres síntomas principales: declinamiento, picado de tallo y amarillamiento de plántulas (Moreno *et al.*, 2008).

A nivel nacional se han realizado trabajos sobre caracterización molecular del CTV en donde se indica la predominancia de aislamientos de tipo moderado; pero con cambios estructurales en su población aun con la presencia de *Toxoptera citricida* (Rivas-Valencia *et al.*, 2010). En este sentido, varios estudios se han realizado para identificar rápidamente aislamientos en relación a su patogenicidad (Herrera-Isidró *et al.*, 2009). Sin embargo, en la mayoría de ellos no se realiza la caracterización biológica completa del conjunto de variantes genómicas. Para estudios de protección cruzada, es necesario considerar que el CTV es un virus altamente variable por lo que es fundamental determinar la prevalencia regional de aislamientos a través de medios moleculares y biológicos. En este contexto, el objetivo de este estudio fue caracterizar aislamientos de CTV provenientes de focos previos y posteriores al ingreso de *T. citricida* en los estados de la Península de Yucatán, Veracruz y Tamaulipas, basados sobre la caracterización biológica de aislamientos moderados derivados de la caracterización molecular con el gen p25.

<sup>1</sup>Fitosanidad- Fitopatología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

<sup>2</sup>INIFAP-Mocochá, Yucatán. <sup>3</sup>Fruticultura-COLPOS. <sup>4</sup>UF-USA.

Autor de correspondencia: [morag@colpos.mx](mailto:morag@colpos.mx)

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Aislamientos del virus.** Los aislamientos de CTV fueron colectados de la Península de Yucatán (entre 2011 y 2015) y de la colección de aislamientos de Veracruz y Tamaulipas del COLPOS.

### **Caracterización molecular de aislamientos del CTV**

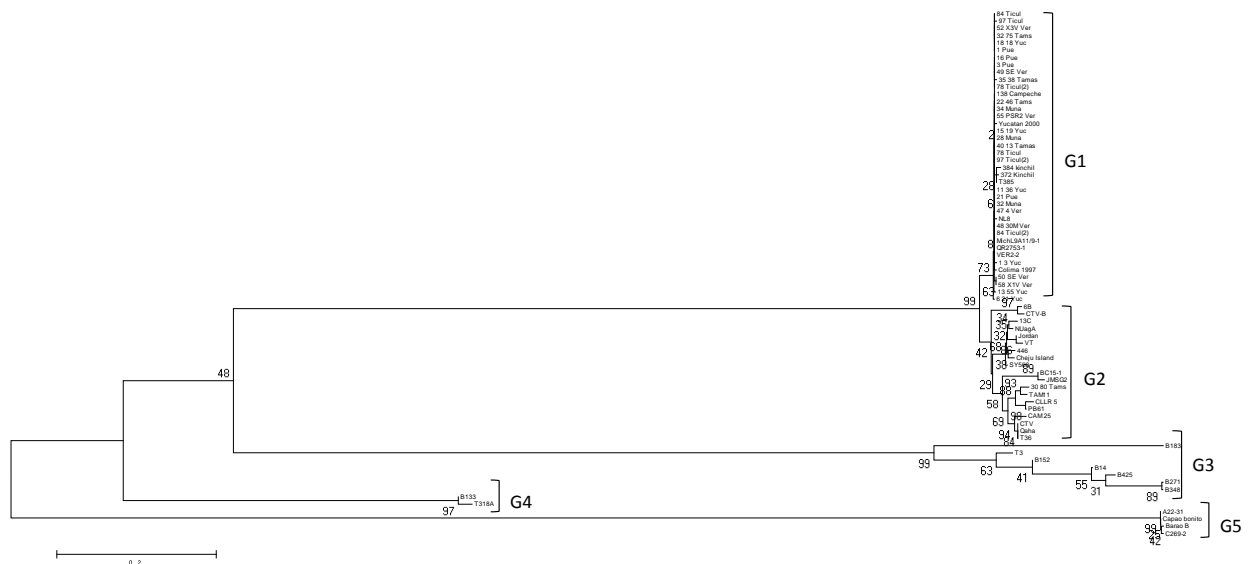
*Extracción del RNA total, amplificación por RT-PCR, Secuenciación del gen p25 y Alineamiento de secuencias y análisis filogenético.* El RNA viral se obtuvo con el método del bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB). El RNA final fue suspendido en 30 µL de agua libre de RNAsas. La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) se realizó en dos pasos para la amplificación de un fragmento de 672 pb del gen p25 que codifica la capa proteica (CP). Los productos amplificados se observaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio e irradiado con luz ultravioleta. Aquellos fragmentos amplificados (p25) de CTV fueron sometidos a secuenciación. Por lo que se purificó y secuenció el producto de RT-PCR con MacroGen Inc (Korea). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las publicadas en el GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)). El alineamiento múltiple de las secuencias de los aislamientos de CTV fue realizado con el programa MEGA 6.05. Adicionalmente, se incluyeron secuencias de CTV de diferentes regiones de México y otros países reportadas en el GenBank. Para construir los árboles filogenéticos y estimar la distancia genética, se usó el método Clustal W con la prueba *Neighbour-Joining*.

**Caracterización biológica de aislamientos del CTV.** De acuerdo a la homología entre secuencias, se seleccionaron ocho aislamientos representativos del grupo filogenético moderado. Cada aislamiento fue inoculado sobre plantas de limón mexicano, naranjo agrio, toronja “Duncan” y naranja dulce / naranjo agrio, las cuales fueron mantenidas a temperaturas de 18 a 24 °C en el invernadero de la Estación Nacional de Cuarentena, Epidemiología y Saneamiento Vegetal (ENECUSaV). Para esto, se estableció un diseño experimental en bloques generalizados con tres repeticiones donde se inoculó por medio de injerto cada aislamiento (2-3 yemas) en las plantas indicadoras. Se monitoreó mensualmente la ocurrencia e intensidad de síntomas (reducción del crecimiento, acortamiento de entrenudos, reducción de unidades clorofila, amarillamiento, aclaramiento de nervadura y

acucharado de hoja) por seis meses. Para categorizar la ocurrencia de síntomas, se usó una escala arbitraria de 0 a 3, basada en evaluación visual de síntomas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Caracterización molecular de aislamientos de CTV.** El análisis filogenético de las secuencias obtenidas mostró una clara separación de variantes en cinco grupos bien definidos: 1) aislamientos moderados asintomáticos de la Península de Yucatán, Veracruz y Tamaulipas y 2-5) aislamientos severos sintomáticos tomados del GenBank. Todos los aislamientos del grupo 1 fueron monofiléticos respecto al gen p25. Las ramificaciones de los grupos de aislamientos fueron soportadas por valores de bootstrap altos (Fig. 1).



**Figura 1.** Reconstrucción filogenética de una fracción (672 pb) de la región p25 de la capa proteica del virus utilizando el método del vecino próximo con 1000 repeticiones.

### Caracterización biológica de aislamientos de CTV

**Reducción del crecimiento, acortamiento de entrenudos y Reducción de la clorofila.** Se observaron diferencias ( $P \leq 0.05$ ) en la dinámica de crecimiento de los brotes (Cuadro 1) y en la longitud intermodal (Cuadro 2) entre las plantas control (no inoculadas) y las inoculadas con los aislamientos de CTV. Mientras que en la reducción de unidades clorofila, no hubo diferencias ( $P \leq 0.05$ ).



**Cuadro 1. Longitud promedio del brote (cm) de plantas indicadoras inoculadas con aislamientos moderados de CTV pertenecientes a un grupo filogenético.**

Aislamiento	Limón mexicano	N. dulce	N. dulce / N. agrio	Toronja
Control	9.88 abc	13.58 ab	20.02 bc	10.44 ab
T1	5.3 c	15.46 a	17.23 cd	8.55 bcd
T2	7.71 abc	13.19 abc	18.2 cd	<b>7.96 cd</b>
T3	12.62 ab	<b>9.80 cd</b>	23.57 ab	9.94 abc
T4	7.51 bc	13.53 abc	<b>13.9 d</b>	<b>6.62 d</b>
T5	9.32 abc	13.45 abc	20.54 bc	11.46 a
T6	8.64 abc	10.22 bcd	19.08 bc	<b>8.12 cd</b>
T7	11.68 abc	<b>7.7 d</b>	19.06 bc	<b>6.64 d</b>
T8	11.83 ab	10.55 bcd	21.88 abc	<b>8.21 cd</b>

a, b, c, d – Prueba de Tukey con nivel de significancia de  $P \leq 0.05$ . Letras diferentes son estadísticamente diferentes en el crecimiento del brote entre la misma planta indicadora inoculada con aislamientos del grupo 1 (columna).

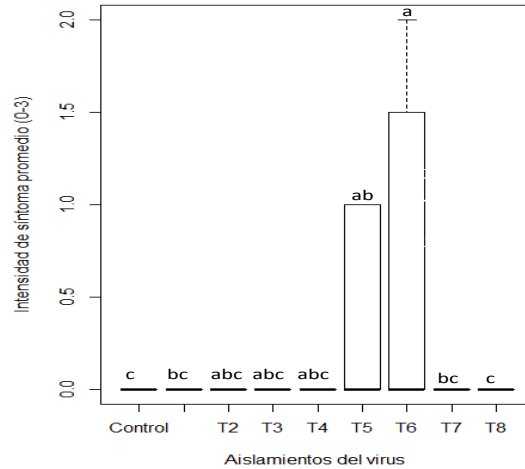
La naranja dulce y la toronja mostraron reducción de crecimiento para la mayoría de los aislamientos evaluados, calculado a partir del número de valores estadísticamente diferentes con relación al control (Cuadro 1). Los aislamientos que afectaron la dinámica de crecimiento de la mayoría de las especies de cítricos evaluadas fueron los de los aislamientos T4 y T7, correspondientes a los dos aislamientos de Veracruz (Cuadro 1). La reacción más intensa de acortamiento de entrenudos se observó en naranja dulce, naranja dulce/naranja agrio y en toronja. Los aislamientos T4 y T6 (Veracruz), T7 (Tamaulipas) y T8 (Quintana Roo), tuvieron un impacto significativo en la longitud promedio intermodal de la mayoría de especies evaluadas (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Longitud promedio internodal (cm) de plantas indicadoras inoculadas con aislamientos moderados de CTV pertenecientes a un grupo filogenético.**

Aislamiento	Limón mexicano	N. dulce	N. dulce / N. agrio	Toronja
Control	1.04 b	1.77 bc	2.65 a	1.51 ab
T1	1.08 ab	1.90 abc	<b>2.31 bc</b>	1.32 bc
T2	1.07 ab	2.21 a	2.43 ab	1.59 ab
T3	1.28 a	1.68 bc	2.5 ab	1.54 ab
T4	0.93 b	1.62 bc	<b>1.98 c</b>	1.65 a
T5	1.25 a	1.67 bc	2.44 ab	1.54 ab
T6	1.12 ab	1.91 ab	2.54 ab	<b>1.17 c</b>
T7	1.30 a	<b>1.25 d</b>	2.41 ab	1.47 abc
T8	1.25 a	1.53 cd	<b>2.36 b</b>	1.51 ab

a, b, c, d – Prueba de Tukey con nivel de significancia de  $P \leq 0.05$ . Letras diferentes son estadísticamente diferentes en la longitud internodal entre la misma planta indicadora inoculada con aislamientos del grupo 1 (columna).

**Síntomas de acucharado de hoja.** Durante el experimento, el síntoma de acucharado de hoja en limón mexicano fue registrado en todo el periodo. La mayor intensidad promedio de síntomas fue registrada en las plantas inoculadas con el aislamiento T6 (Fig. 2).



**Figura 2.** Valores promedio de síntomas de acucharado de hoja sobre plantas de limón mexicano sin inocular (control) e inoculadas con aislamientos de *Citrus tristeza virus* moderados del grupo filogenético G1. a, b, c - Prueba de Tukey con nivel de significancia de  $P \leq 0.05$ . Letras diferentes son estadísticamente diferentes en síntomas observados entre plantas control e inoculadas.

Estos resultados muestran claramente que las características fenotípicas de la enfermedad no se asocian únicamente con el gen p25. Por lo que, este tipo de estudios justifica la conveniencia de usar este acervo de aislamientos de CTV identificados molecular y biológicamente para estudios futuros de diagnóstico, trazabilidad y monitoreo, así como para efecto de evaluarles su capacidad protectora dentro de un programa de protección cruzada para México.

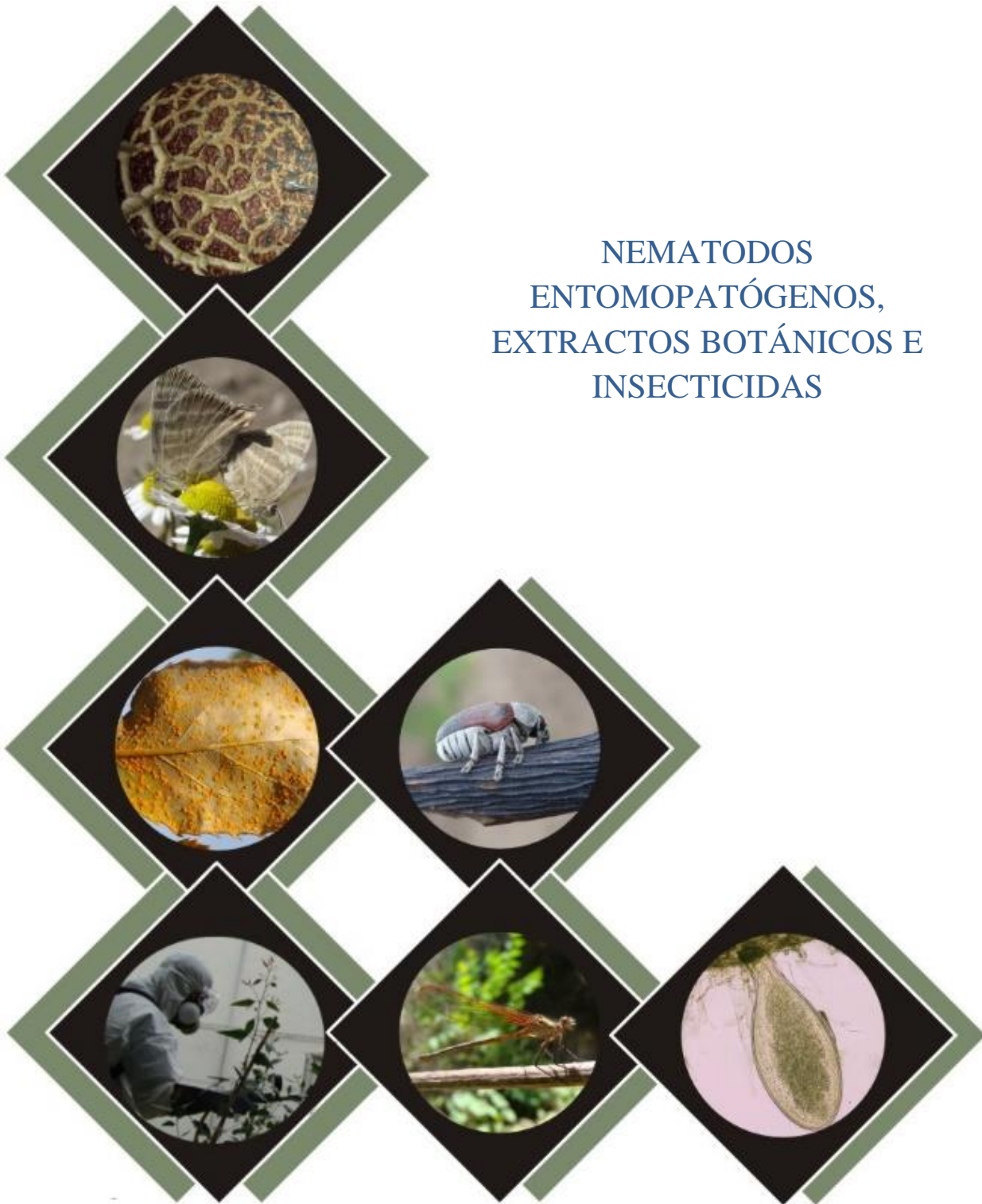
### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada. Este trabajo fue financiado por SENASICA-DGSV (Proyecto: PM09-4002).

### LITERATURA CITADA

- Bar-Joseph, M., Marcus R., Lee, R.F. 1989. The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. Annual Review Phytopathology **27**: 291-316.
- Herrera-Isidró L, Ochoa-Sánchez J. C., Rivera-Bustamante R, Martínez-Soriano J.P. 2009. Sequence diversity on four ORFs of Citrus tristeza virus correlates with pathogenicity. Virology Journal; **6**:116.
- Moreno, P., Ambros, S., Albiachi-Martí, M.R., Guerri, J., Peña, L. 2008. *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. Molecular Plant Pathology **9**(2): 251-268.
- Rivas, V. P., Loeza, K. E., Mora, A. G., Ruiz, G. N., Ochoa, M. D., Gutiérrez, E. A., Febres, V. 2010. Análisis espacio-temporal de aislamientos del Citrus tristeza virus de Yucatán y Tamaulipas. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas **1**: 493-507.

NEMATODOS  
ENTOMOPATÓGENOS,  
EXTRACTOS BOTÁNICOS E  
INSECTICIDAS



## CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE NINFAS DE MOSCA PINTA (HEMIPTERA: CERCOPIDAE) EN EL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR.

P.F Grifaldo-Alcántara,<sup>1</sup>; R Alatorre-Rosas<sup>1</sup>; J. A Villanueva-Jiménez<sup>2</sup>; F. Hernández-Rosas<sup>3</sup>; I. Cid del Prado-Vera<sup>1</sup> y P.S Stock<sup>4</sup>.

### INTRODUCCIÓN

La mosca pinta de los géneros *Aeneolamia* spp. y *Prosapia* spp. son los más abundantes y representativos en las zonas de abastecimiento de los Ingenios comprendidos en la vertiente del Golfo de México. Estos organismos constituyen uno de los principales problemas fitosanitarios de la caña de azúcar y están presentes en cerca del 60% de los ingenios en México (CONADESUCA 2011).

En la última década ha habido esfuerzos dirigidos a la búsqueda de agentes microbianos nativos como los nematodos entomopatógenos (NEP's) los cuales se encuentran parasitando en forma natural a la mosca pinta (Poinar Jr. y Linares, 1985 y Hernández *et al.*, 2007). Estos organismos tienen la capacidad para buscar, invadir y matar a sus hospederos en 24 a 48 hr (Ferrer *et al.*, 2004; Leite *et al.*, 2005; Batista y Auad, 2010). Por lo tanto se considera importante la búsqueda e identificación de cepas nativas de NEP's. Así entonces nuestros objetivos son la obtención, identificación y caracterización de NEP's obtenidos de suelos cañeros, como la realización de pruebas en campo para valorar la infección de los nematodos obtenidos hacía ninfas de mosca pinta en microparcels.

<sup>1</sup>Fitosanidad- Entomología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

<sup>2</sup> Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz.

<sup>3</sup> Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba.

<sup>4</sup> Universidad de Arizona, USA. Departamento de Entomología.

Autor de correspondencia: [fgrifaldo80@gmail.com](mailto:fgrifaldo80@gmail.com)

## MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestras de suelo: Se realizó la toma de muestras de 1 kg de suelo en ciertos ingenios cañeros del estado de Veracruz, México cuya presencia de salivazo fue alta dentro del cultivo elegido como positivo. Las muestras se colectaron en 9 puntos distribuidos en una hectárea; éstas fueron guardadas en bolsas de plástico y etiquetadas con los datos correspondientes al sitio muestreado y mantenidas a 5°C hasta su procesamiento.

Identificación de nematodos: Para la identificación de los NEP's obtenidos en el cultivo de caña de azúcar; estos fueron propagados en larvas de *G. mellonella* para la obtención de los diferentes estadios filiformes y así iniciar con la realización de preparaciones para microscopia de luz, microscopia de barrido y pruebas moleculares para la extracción de ADN y la amplificación de primers específicos (Spiridonov *et al.*, 2004, Stock *et al.*, 2001).

Pruebas de efectividad biológica: Se emplearon dos aislamientos (tratamientos) que fueron obtenidos en esta investigación; *Heterorhabditis indica* (CPVG13) y una cepa del género *Steinernema* sp. (CPVC13), así como un tratamiento como testigo (agua). Los dos aislamientos fueron propagados en *G. mellonella*, se determinó la concentración y se almacenaron en placas de papel filtro (25 x 27 cm) de poro mediano humedecido con 20-22 ml en concentraciones de  $1 \times 10^7$  IJ/ml, y se almacenaron en bolsas de plástico (ziploc®).

Condiciones de campo: Se realizaron dos aplicaciones de NEP's en los años 2014 y 2015 en dosis de  $6.6 \times 10^7$  IJ/m<sup>2</sup> (Leite *et al.*, 2005) para las dos fases. Los sitios fueron elegidos mediante monitoreo previo en parcelas de los Ingenios Constancia y Potrero, donde su elección fue a través de la detección de altas infestaciones de la plaga del salivazo.

Fase 1 (2014): En los sitios seleccionados para los dos ingenios, se marcaron tres surcos de 10 metros lineales, considerando 3 m de cada orilla y 4 m de centro. En la parte central de los 10 m, se contabilizó previamente la presencia de un número mayor a 10 ninfas de mosca pinta; conteo que se realizó previamente y fue elegido como sitio propicio para realizar las evaluaciones. Las dimensiones fueron marcadas con cuatro puntos en los extremos así como en la parte central siendo las dimensiones de aplicación y a evaluar.

Fase 2 (2015): Se eligieron dos localidades en el ingenio Potrero. Para cada uno de los sitios las dimensiones de aplicación fue de 1800 m<sup>2</sup>, con 9 puntos distribuidos al azar por

sitio. En cada una de las localidades se realizó la aplicación de 80 L de agua para el control y 80 L con el nematodo *Steinernema* sp. en una suspensión de  $6.6 \times 10^7$  IJ/m<sup>2</sup> (Leite *et al.*, 2005), para ambos casos se adicionó un dispersante Nufilm (0.03%). Cada uno de los puntos fue elegido por la contabilización directa de más de 10 ninfas de mosca pinta. Una vez ubicados los puntos estos fueron delimitados dentro del área de aplicación.

Aplicación de NEPs: Para las aplicaciones se contó con mochilas manuales de presión con la finalidad de no mezclar los tratamientos así como evitar la contaminación del control (agua+Nufilm). Ya en las parcelas seleccionadas, los nematodos de cada uno de los tratamientos fue vertido por separado en botes de plástico permitiendo la dispersión y liberación de los JI del papel filtro. La suspensión se vació en las mochilas manuales y éstas fueron aforadas a una capacidad de 15 litros de agua para su aplicación. Los NEP's se aplicaron a 80 libras de presión, usando una boquilla de abanico y manteniendo una aplicación homogénea dentro del cultivo de caña de azúcar.

Evaluación: Para la Fase 1 se contó con 3 tratamientos con 4 repeticiones por sitio; el tratamiento 1 (T1) para el aislamiento *Steinernema* sp., T2 para el aislamiento de *Heterorhabditis* sp. y T0 para el control, las evaluaciones se realizaron a partir del 3er día después de la aplicación. Para el caso de la Fase 2 las evaluaciones se realizaron in situ al 4º día de la aplicación, realizándose 4 evaluaciones consecutivas (una por día). Observando el aumento o disminución de la plaga en los sitios marcados, así como la producción de saliva de las mismas. Para las dos fases, terminadas las evaluaciones, muestras de ninfas fueron colectadas y llevadas al laboratorio determinando así la mortalidad efectuada por nematodos hacía las ninfas de mosca pinta.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Trampeo e identificación de NEP's: En 19 sitios muestreados, pertenecientes a 9 municipios y 5 ingenios cañeros, se logró encontrar 4 cepas de NEP's. Tres cepas del género *Steinernema* sp. presentes en el Ingenio Constancia, Localidad Estrella, Tezonapa y una cepa del género *Heterorhabditis* perteneciente al Ingenio la Gloria, Municipio Úrsulo Galván, Veracruz, México. De acuerdo a estudios realizados sobre la biología de cada uno de los



aislamientos, tales como morfología, morfometría y análisis molecular mediante PCR con primers generales y específicos se determinó que las tres cepas del Ingenio Constanca pertenecen al género *Steinernema* y podría tratarse de una nueva especie, con un alto parecido morfológico a *S. abbasi* y *S. bifurcatum*; así como una cercanía molecular con *S. riobrave* y *S. ralatorei* (Grifaldo-Alcántara *et al.*, 2013). Mientras que la otra cepa pertenece al género y especie *Heterorhabditis indica*.

Evaluación de la efectividad de los NEP's: Para la Fase 1 los resultados indican que no hubo diferencias de efecto entre tratamientos, ni existe diferencias entre Ingenios y sitios. Teniendo un promedio de mortalidad con *H. indica* de 73.6% y con *Steinernema* sp 62.06%. En la Fase 2 hubo una reducción significativa de la plaga, así como una disminución ligeramente en la producción de la saliva, donde se observó un aumento del 80% de la población en relación al tratamiento. De igual manera se observó un aumento de la saliva y una emergencia normal de las fases adultas para el testigo.

## AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por la beca otorgada para la realización de esta investigación y a los ingenios Constanca y Potrero por su apoyo e interés para las diferentes fases de campo realizadas.

## LITERATURA CITADA

- Cabanillas, H.E. y J.R. Raulston. 1994. Evaluation of the spatial pattern of *Steinernema riobrave* in corn plots. *Journal of Nematology*. 26: 5-31.
- CONADESUCA, 2011. Diagnóstico del Campo Cañero, Capítulo: Plagas y Enfermedades. Estado de atención en los ingenios.
- Batista, E.S.P.; Auad, A.M. Application methods of entomopathogenic nematodes for control of *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae). *Biocontrol Science and Technology*, v.20, p.1079-1085, 2010.
- Ferrer, Francisco; Arias Miguel; Trelles Alfredo; Palencia Gustavo; Navarro José M. y Colmenares Rafael. 2004. Posibilidades del uso de nematodos entomopatógenos para el control de *Aeneolamia varia* en caña de azúcar. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* No. 72 p.39-43.
- Flores C., S. 1994. Las plagas de la caña de azúcar en México. Ed. Silverio Flores Cáceres, México, D.F., 350 p.
- Grifaldo-Alcántara, P. Fabián, Alatorre-Rosas, Raquel, Segura-León, Obdulia, Rosas-Hernández, Francisco y Guzmán-Franco, Ariel. *Steinernema ralatorei* Grifaldo n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) aislado de áreas cañeras de Veracruz México. 2013. En revisión.
- Hernández-Rosas, F., Ventura Benítez, N. I.; Pérez-Fernández, M. R. y N. Real Luna. 2007. Manejo sustentable del agroecosistema caña de azúcar: Caso barrenador del tallo en Paso del Macho, Veracruz. XXX Congreso Nacional de Control Biológico-Simposio del IOBC, Mérida, Yucatán.



- Leite, L. G., L. A. Machado, R. M. Goulart, F. M. Tavares, E. A. Batista Filho. 2005. Screening of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) and the efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the sugarcane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae). Neotropical Entomology. 34(5): 785-790.
- Poinar G.O. Jr y Linares Blas. 1985. *Hexamermis dactylocercus* sp. n. (Mermithidae: Nematoda), a parasite of *Aeneolamia varia* (Cercopidae: Homoptera) in Venezuela. Revue Nématol., 8 (2): 109-112.
- Spiridonov, Sergie E., Alex P. Reid, Kasia Podrucka, Sergie A. Subbotin y Maurice Moens. 2004. Phylogenetic relationships within the genus *Steinernema* (Nematoda: Rhabditida) as inferred from analyses of sequences of the ITS1-5.8S-ITS2 region of rDNA and morphological features. Nematology, Vol. 6: 4, 547-566.
- Stock, S. Patricia., James, F Campbell, y Steven, A. Nadler. 2001. Phylogeny of *Steinernema* Travassos, 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) Inferred From Ribosomal DNA Sequences and Morphological Characters. Journal of Parasitology 87:4, 877-889.

**DIVERSIDAD ESPECÍFICA DE *Metarhizium spp.* (Ascomycota: Hypocreales) Y SU RELACIÓN CON DIFERENTES HÁBITATS Y ETAPAS FENOLÓGICAS DEL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR**  
**Hernández-Domínguez Carmela<sup>1</sup>, Guzmán-Franco Ariel W<sup>1\*</sup>, Alatorre-Rosas Raquel<sup>1</sup>, Carrillo-Benítez María Guadalupe<sup>1</sup>, Rodríguez-Leyva Esteban<sup>1</sup>, Villanueva-Jiménez Juan Antonio<sup>2</sup>**

## INTRODUCCIÓN

Los hongos entomopatógenos se encuentran prácticamente en todos en los agroecosistemas. El estudio de su ecología y diversidad genética es importante, ya que esto proporcionaría las bases para el desarrollo de estrategias más eficientes de control biológico de insectos mediante entomopatógenos. Uno de los géneros más estudiados es *Metarhizium*, hongo del orden hipocreales cuyas especies pueden infectar a más de 700 especies de insectos. Este hongo ha sido capaz de adaptarse a distintos ambientes, por lo que su distribución es considerada como cosmopolita. Existen diversas especies dentro de este género, y muchas de ellas han sido reportadas con una interacción muy estrecha y específica con insectos así como con raíces de árboles y pastos (Meyling y Eilenberg, 2007; Quezada-Moraga *et al.* (2007). Autores como Wyrebek *et al.* (2011) han sugerido que diferentes nichos ecológicos puede contener una diversidad de especies de *Metarhizium* diferente. Esto sugiere que es necesaria una investigación más detallada de la diversidad específica y ecología de *Metarhizium* en nichos específicos. Tomando el cultivo de la caña de azúcar como nicho específico y modelo de estudio, el presente estudio está orientado a determinar la diversidad específica y genética de *Metarhizium spp.*, en cuatro fechas diferentes, cada una representado una etapa fenológica diferente, del ciclo del cultivo de caña de azúcar, y comparar estos resultados con los obtenidos en cultivos y plantas silvestres aledañas.

<sup>1</sup>Fitosanidad- Entomología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

<sup>2</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, 91690 Veracruz, México  
Autor de correspondencia: [gariel@colpos.mx](mailto:gariel@colpos.mx)

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras fueron tomadas en Acatlán de Pérez Figueroa, Oaxaca en cuatro fechas diferentes del ciclo de producción de caña de azúcar. El primer muestreo se realizó en octubre del 2014. Se tomaron 50 muestras de 600 gramos de suelo cada uno, 28 muestras de suelo fueron colectadas muy cercanas a la raíz de las plantas de caña, 15 muestras cercanas a la raíz de árboles de limón y siete muestras en raíz de pastos. Todas las muestras se tomaron a una profundidad de 10 a 15 cm. Otras 50 muestras de hoja se tomaron de la base de las plantas de caña, arboles de limón y pasto circundante. Las muestras de hoja fueron tomadas de la misma planta cuya zona radicular fue muestreada para coleccionar suelo. Las muestras de suelo se colocaron en bolsas de plástico, y las hojas se colocaron en bolsas de papel destreza. Todas las muestras fueron etiquetadas y transportadas en hieleras al laboratorio de Patología de Insectos del Colegio de Posgraduados.

Los siguientes tres muestreos se realizaron en febrero, junio y octubre del 2015. En cada una se tomaron 30 muestras de suelo repartidas en raíces de plantas de caña, arboles de limón y pastos, con un mismo número de muestras de hoja recolectadas de las mismas plantas cuyas raíces fueron muestreadas.

**Aislamiento de *Metarhizium spp*:** Para el aislamiento de hongos de muestras de suelo, se utilizó el método de Zimmerman (1986) y el método de dilución y extensión en placas con medio selectivo (Fernández *et al.*, 2010). Para el aislamiento de hongos de hojas se utilizó solo el método de medio selectivo. Para esto, trozos de tejido de 1.5 x 1.5 cm fueron colocados en matraces de 250 mL volumen conteniendo 90 mL de Tween 80 al 0.03% estéril y agitados a 200 rpm por 3 minutos. De la suspensión resultante, se tomaron 100 µL y estos fueron extendidos en 3 placas con medio CTC y 1 de DOD e incubados a 25 °C± 2°C. La identificación de las colonias de *Metarhizium* a género fue realizada de acuerdo a Humbert (1997). De cada aislamiento, se produjo un cultivo monospórico el cual se preservó a -80 °C en glicerol al 10%. Únicamente cultivos monospóricos fueron utilizados en los estudios posteriores de taxonomía molecular y diversidad genética.

**Extracción de ADN:** La extracción de ADN se realizó de acuerdo Rehner S. A. (Comunicación personal). Para esto se utilizó micelio fresco desarrollado sobre círculos de papel filtro estéril, los cuales se colocaron sobre placas de ADS. El micelio fue colocado en

tubos tipo Eppendorf de 2 mL conteniendo buffer de lisis. El ADN del micelio fue liberado en el buffer con la ayuda de un homogenizador Fast Prep FP120, y precipitado por aumento de temperatura y centrifugación a 16,000 rpm por 5 min. El sobrenadante fue diluido en agua destilada estéril en relación 1:5 0 1:10, y almacenado a -20°C.

**Taxonomía molecular:** La región intron del gen EF-1 $\alpha$  próxima a la terminación 5' de cada muestra fue amplificada y secuenciada mediante los primer EF1T y EF2T (Rehner and Buckley, 2005). Las condiciones de reacción de PCR utilizadas fueron las mismas descritas por Kepler y Rehner (2013) y realizadas en un termociclador My Cycler Thermocycler™. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados en el Systematic Mycology and Microbiology Laboratory del USDA. Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa BioEdit v7.0.9 Hall (1999), y analizadas mediante máxima parsimonia con el programa Mega 5.1. Tamura *et al.* (2011). Las secuencias de aislamiento fueron analizadas y comparadas con secuencias de la colección ARSEF, para su colocación filogenética en alguna de la especies reportadas para el género *Metarhizium*.

**Diversidad genética:** La diversidad genética se determinara mediante microsatélites. Esta sección aún no se realiza, pero se hará mediante la metodología propuesta por Oulevey *et al.* (2009). La diversidad de microsatélites detectada, así como el tamaño de cada uno, presentes en todos los aislamientos analizados serán realizadas en un secuenciador.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Sesenta y cuatro aislamientos han sido encontrados hasta el momento, de los cuales 33 fueron obtenidos de suelo con medio selectivo y 27 con *G. mellonella*. Los 33 primeros se derivan de 9 muestras de suelo obtenidas en el segundo y tercer muestreo, mientras que los 27 obtenidos con *G. mellonella* se derivan de 14 muestras de suelo obtenidas en los tres primeros muestreos (Cuadro 1). Esto confirma los resultados obtenidos por (Hernández-Domínguez et al. en proceso de publicación) que el método de *G. mellonella* es mucho más sensible que el de medio selectivo. Tres aislamientos de hoja de caña fueron obtenidos en el primer muestreo y un aislamiento en el tercer muestreo con el método de medio selectivo. Los muestreos donde se obtuvieron aislamientos de hojas, coinciden con fechas de mayor

humedad relativa en el ambiente. En el suelo del cultivo de caña de azúcar es donde se encontró la mayor cantidad de aislamientos de *Metarhizium* seguido de limón y finalmente pastos. Nuevamente, la mayor cantidad de aislamientos se obtuvo en los muestreos con mayor humedad en el suelo.

El análisis filogenético realizado con aislamientos del primer muestreo, indica la prevalencia de *M. anisopliae* s.s. en suelos de caña, limón y pastos. Mientras que *M. pingshaensis* se asoció a hoja de caña. Estos resultados son aun preliminares, ya que faltan los resultados de los otros tres muestreos para tener conclusiones más confiables.

**Cuadro 1. Resultados del muestreo de suelo y hoja en cuatro muestreos.**

Muestreo	Aislamientos de suelo				Aislamientos de hoja	
	Medios selectivos		<i>Galleria mellonella</i>		Muestras	Aislamientos
	Muestras	Aislamientos	Muestras	Aislamientos		
1	0	0	4	12	1	3
2	3	17	7	12	0	0
3	6	16	3	3	1	1
4	*	*	*	*	*	*
Total		33		27		4

\*Datos pendientes de obtener

## AGRADECIMIENTOS

CHD agradece a CONACyT por la beca otorgada para sus estudios de doctorado. Los autores agradecen Fabián Vázquez Moreno por su colaboración en el proceso de obtención de los aislamientos. Agradecemos al Colegio de Postgraduados el apoyo económico para la realización de este trabajo.

## LITERATURA CITADA

- Fernández, K. K. E., A. C. Keyser, E. N. D Rangel, N. R. Foster, W. D. Robert. 2010. CTC Medium: A novel dodine-free selective médium for isolating entomopathogenic fungus, specially *Metarhizium acridum*, from soil. *Biological control*, 54: 197-205.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids 510 Symp Ser* 41:95-98.
- Humbert, R.A. (1997). Fungi-Identification. In: *Manual of techniques in insect Pathology* (L. Lacey, ed.), pp.153-185. Academic Press, London.

- Kepler, R. A and S. A. Rehner. 2013. Genome- assisted development of nuclear intergenic sequence markers for entomopathogenic fungi of the *Metarhizium anisopliae* species complex. *Molecular Ecology Resources*. 13 (12).
- Meyling, N. V., J. Eilenberg. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biol Control* 43:145 –155.
- Oulevey, C., F. Widmer, R. Kolliker, J. Enkerli. 2009. An optimized microsatellite marker set for detection of *Metarhizium anisopliae* genotype diversity on field and regional scales. *Mycological research*, 113: 1016-1024.
- Quezada-Moraga, E., Navas-Cortes A. J, Maranhao A. A. E, Ortiz-Urquiza A, Santiago-Alvarez C. 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycological research*, 3: 947 – 966.
- Rehner, S. A., and E. Buckley. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1 $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97:84–98.
- Tamura K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731 –2739.
- Wyrebek, M., C. Huber, K. R. Sasan y J. M. Bidochka. 2011. Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. *Microbiology* 157: 2904–2911.
- Zimmerman, G. 1986. The Galleria bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Appl. Ent.* 102: 213-215.

## EVALUACIÓN DE VASOS PARA BIOENSAYO CON LARVAS DE *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) CON DOS INSECTICIDAS

Nelson E. **López Zerón**<sup>1</sup>, J. C. **Rodríguez Maciel**<sup>2</sup>, Ángel **Lagunes Tejeda**<sup>2</sup>, Adriana E. **Flores Suarez**<sup>3</sup>, Gonzalo **Silva Aguayo**<sup>4</sup>, Mateo **Vargas Hernández**<sup>5</sup>.

### INTRODUCCIÓN

El mosquito *Aedes aegypti* es el vector más eficiente de fiebre por dengue, fiebre hemorrágico por dengue y virus de chikungunya; en el caso de las primeras dos enfermedades de acuerdo a la Secretaría de Salud, los casos confirmados y sospechosos han disminuido en México (Flores *et al.* 2006); sin embargo en relación al Chikungunya los casos han aumentado, por esta razón se considera al mosquito y a las enfermedades que transmite como un problema de salud pública, en el que se gastan grandes cantidades de recursos económicos y humanos, ya que se monitorea y se informa semanalmente sobre su epidemiología a través del Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de Dengue (Garza-Robledo *et al.*, 2011).

Debido a los numerosos casos de resistencia de esta especie, que se han presentado en México, a los diferentes insecticidas utilizados en larvas y adultos, constantemente se siguen realizando estudios para monitorear el estado de la resistencia, dichos estudios se realizan de acuerdo a los diseños de bioensayo dictados por la Organización Mundial de la Salud (Chino-Cantor *et al.*, 2014). En el caso de los bioensayos diseñados para larvas, los protocolos indican que se deben realizar en larvas de curto instar temprano o tercer instar tardío, agregando un número de veinte larvas con 100 mL de agua en un vaso, el insecticida se diluye en un mL de agua y se agrega (WHO, 2005). La Organización Mundial de la Salud (WHO, 2005), indica que pueden usar vasos desechables, tazones o vasos de vidrio, de 120 mL o de mayor capacidad, y que el material no debe provocar contaminación en el bioensayo; sin embargo al usar vidrio los costos son mayores por lo que es necesario determinar qué tipo de vasos no interfieren en el resultado del bioensayo (Darriet *et al.*, 2005).

<sup>1</sup>Fitosanidad- Fitopatología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

Autor de correspondencia: **morag@colpos.mx**



Este estudio tiene el objetivo de evaluar diferentes materiales de vasos, para determinar si tiene algún efecto en los resultados de bioensayos realizados en la colonia New Orleans del mosquito *Aedes aegypti* con dos insecticidas de diferente grupo toxicológico y formulación, spinosad y *Bacillus thuringiensis* var. israelensis.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el laboratorio del área de toxicología del Postgrado en Fitosanidad, Especialidad de Entomología y Acarología, Campus Montecillo del Colegio de Posgraduados, ubicado en el Km. 36.5 de la carretera México-Texcoco, Montecillo, Estado de México. Se utilizó la colonia New Orleans proporcionada por la Universidad de Nuevo León; la cual es una colonia susceptible certificada.

Se utilizaron dos insecticidas de uso urbano: el primero es spinosad Natular EC CLARKE® (Roselle, Illinois, USA), 20.6% en una formulación de concentrado emulsionable, 230 g i.a L<sup>-1</sup>; el segundo fue *Bacillus thuringiensis* var. israelensis VectoBac®WDG (Libertyville, IL, USA), 34.7% en una formulación de gránulos hidrosolubles, 347 g kg<sup>-1</sup>, 3000 unidades toxicas internacionales (UTI mg<sup>-1</sup>).

Los insectos se mantuvieron en la cámara de cría del Área de Toxicología del Colegio de Posgraduados Campus Montecillo. Las larvas permanecieron en charolas de 12 litros de capacidad y alimentadas con croqueta para hámster de laboratorio Rodent Lab Chow®5001 pulverizada y mezclada con levadura de cerveza en proporción 3 a 1, en agua a razón de diez gotas diarias; en una cámara bioclimática Thermo Scientific Modelo TFFU2065FWA, a 27°C de temperatura y con un fotoperiodo de 12:12. En el caso de los adultos en jaulas entomológicas de tela de organza con un dimensión de 60x60x45 cm a 27°C±2 y HR de 75%±5 y el mismo fotoperiodo que las larvas; alimentados con solución de agua con azúcar al 10%, así como las hembras se alimentaron de la sangre de hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) que fue introducido e inmovilizado por lapsos de veinte minutos al día.

Se utilizaron cinco tipos de vaso, el primero de cristal, que es un vaso de precipitado graduado; el segundo de poliestireno expandido (EPS) conocido como unicel; el tercero de poliestireno (PS), es el vaso desechable más utilizado; el cuarto de politereftalato de etileno

(PET), es un vaso más resistente que el anterior y comúnmente se ofrece como alternativa a uno de cristal y finalmente el de acero inoxidable.

Los bioensayos se realizaron con larvas, de acuerdo al procedimiento estandarizado de la Organización Mundial de la Salud (2005); para lo cual se ocuparon larvas de cuarto instar temprano, se colocaron 20 larvas en 100 mL de agua en un vaso; posteriormente se agregó el insecticida en un mL de agua, se hicieron cinco replicas por dosis y por cada uno de los tipos de vasos para los dos insecticidas (Hertlein *et al.* 2010; Rodríguez *et al.* 2001). La ventana biológica se realizó con dosis de 0.01% y disminuyendo logarítmicamente hasta 12 dosis, con el objetivo de encontrar los porcentajes de mortalidad de 0 a 100%, posteriormente se eligieron nueve dosis intermedias. La mortalidad se determinó a las 24 horas, se calculó la Concentración Letal (CL)<sub>50</sub> y la CL<sub>95</sub> (Hertlein *et al.* 2010). En el caso de los vasos de poliestireno, poliestireno expandido y politereftalato de etileno, únicamente se utilizaron una vez, posteriormente fueron desechados; en el caso de vidrio y acero inoxidable, éstos se lavaban para ser usados nuevamente.

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el procedimiento PROC PROBIT (Análisis Probit) mediante el programa SAS system para Windows ver 9.0 y los resultados se llevaron a partes por millón (ppm) o mg l<sup>-1</sup> de CL<sub>50</sub> y CL<sub>95</sub> y sus límites fiduciales, de los tres insecticidas; así mismo la mortalidad en los tratamientos se corrigió con la ecuación de Abbott (Abbott ,1925).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que para el caso del insecticida spinosad las CL<sub>50</sub> en todos los tipos de vasos son similares, éstos valores son parecidos a los documentados por (Romi *et al.*, 2006), quienes probaron este insecticida en una colonia susceptible de laboratorio. Si se comparan las pendientes obtenidas en cada bioensayo, podemos observar que sus LC%95 se traslapan en todos los tipos de vasos; sin embargo comparando las CL<sub>50</sub> éstas también son similares, sobre todo en el caso de los materiales desechables, pero esto no ocurre en el caso del cristal y acero inoxidable, ya que sus CL<sub>50</sub> no se traslapan con los otros materiales (Cuadro 1). Éstos resultados también se observan de la misma manera con el insecticida *Bacillus thuringiensis* var. israelensis, en la que las CL<sub>50</sub> con sus LC%95 con los vasos de cristal y AI tampoco se traslapan con las obtenidas en los otros materiales.

**Cuadro 1. Toxicidad en mg L<sup>-1</sup> de insecticidas en larvas de *Aedes aegypti* colonia New Orleans, con bioensayos en cinco tipos de vaso.**

Insecticida	Vaso	<sup>c</sup> N	<sup>b</sup> LC95%	<sup>a</sup> b±EE	<sup>b</sup> CL50 LC%95	<sup>i</sup> RR <sub>50</sub>	CL95 LC95%	RR <sub>95</sub>	<sup>j</sup> Pr>χ <sup>2</sup>
Spirosad	PS <sup>a</sup>	700	1.62 (1.42-1.82)	0.10	0.032 (0.027-0.037)	1	0.33 (0.24-0.48)	1	0.14
	EPS <sup>b</sup>	800	2.19 (1.80-2.58)	0.19	0.033 (0.025-0.044)	1.03	0.18 (0.12-0.36)	0.	0.07
	PET <sup>c</sup>	700	1.98 (1.74-2.22)	0.12	0.034 (0.029-0.039)	1.06	0.23 (0.17-0.31)	0.	0.23
	Cristal	800	1.99 (1.63-2.34)	0.18	0.011 (0.0087-0.014)	0.34	0.074 (0.047-0.14)	0.	0.046
	AI <sup>d</sup>	900	1.33 (0.67-1.69)	0.18	0.0064 (0.0043-0.0092)	0.2	0.10 (0.058-0.30)	0.	0.67
<i>B. thuringiensis</i> var. israelensis	PS	800	3.66 (3.04-4.28)	0.31	0.0088 (0.0080-0.0097)	1	0.024 (0.020-0.031)	1	0.31
	EPS	600	4.37 (2.59-6.15)	0.90	0.0089 (0.007-0.012)	1.011	0.021 (0.014-0.086)	0.	0.0001
	PET	800	2.59 (1.94-3.25)	0.33	0.0094 (0.0076-0.012)	1.068	0.040 (0.026-0.088)	1.	0.0024
	Cristal	800	3.09 (2.69-3.49)	0.20	0.0099 (0.0091-0.010)	1.12	0.033 (0.029-0.040)	1.	0.32
	AI	800	3.24 (2.59-3.88)	0.32	0.011 (0.010-0.013)	1.25	0.037 (0.029-0.052)	1.	0.57

<sup>a</sup>PS: Poliestireno; <sup>b</sup>EPS: Poliestireno expandido; <sup>c</sup>PET: Politereftalato de etileno; <sup>d</sup>AI: Acero inoxidable; <sup>e</sup>N: número de eventos; <sup>f</sup>b: pendiente con límites de confianza al 95%; <sup>a</sup>b±EE: Error estándar de la pendiente; <sup>b</sup>CL: concentración letal; <sup>i</sup>RR: Respuesta relativa, CL entre la CL con el vaso de poliestireno; <sup>j</sup>Pr>χ<sup>2</sup>: Probabilidad de Ji-cuadrada.

Se puede observar que el material con el que está hecho el vaso, tiene un efecto en el bioensayo, por ejemplo en los materiales que son desechables tiene en común que son derivados del petróleo, las CL obtenidas con éstos son muy similares, no así los vasos de materiales que son muy diferentes. Cabe mencionar que también el agua tiene que ver en los resultados, por ejemplo (Darriet *et al.*, 2005), compararon todos los estudios que se han realizado con spinosad en diferentes especies de mosquito, y se observan que las CL son variables dependiendo el tipo de agua que se utiliza, ya que puede ser destilada, desionizada o filtrada.

Sin embargo antes de elegir un vaso a utilizar también se debe tomar en cuenta que tanto el cristal como el AI, implican que deben ser lavados, y si no se realiza esto adecuadamente, puede causar un efecto de contaminación en el bioensayo.

## AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT: por haber financiado económicamente este proyecto.

## LITERATURA CITADA

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, 18: 265-267.
- Chino-Cantor, A., Sánchez-Arroyo, H., Ortega-Arenas, L.D., Castro-Hernández, E. 2014. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) in Guerrero, México. *Southwestern Entomologist*, 39(3), pp.601–612.
- Darriet, F., Duchon, S. & Hougard, J.M. 2005. Spinosad: a new larvicide against insecticide-resistant mosquito larvae. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21(4), pp.495–496.
- Flores, A.E., Grajales, J.S., Salas, I.F., Garcia, G.P., Becerra, M.H.L., Lozano, S., Brogdon, W.G., Black, W.C., Beaty, B. 2006. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22(4), pp.672–677.
- Garza-Robledo, A.A., Martínez-Perales, J.F., Rodríguez-Castro, V.A., Quiroz-Martínez, H. 2011. Effectiveness of Spinosad and Temephos for the Control of Mosquito Larvae At A Tire Dump In Allende, Nuevo Leon, Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 27(4), pp.404–407.
- Hertlein, M.B., Mavrotas, C., Jousseume, C., Lysandrou, M., Thompson, G.D., Jany, W., Ritchie, S.A. 2010. A review of spinosad as a natural product for larval mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 26(1), pp.67–87.
- Rodríguez, M.M., Bisset, J., de Fernandez, D.M., Lauzán, L., Soca, A. 2001. Detection of Insecticide Resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba and Venezuela. *Journal of Medical Entomology*, 38(5), pp.623–628.
- Romi, R., Proietti, S., Di Luca, M., Cristofaro, M. 2006. Laboratory evaluation of the bioinsecticide spinosad for mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22(1), pp.93–96.
- WHO. 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Available at: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO\\_CDS\\_WHOPES\\_GCDPP\\_2005.13.pdf?ua=1](http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf?ua=1) [Accessed February 24, 2015].

REPELENCIA DE ADULTOS DE MOSCA BLANCA *Trialeurodes vaporariorum* (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE) CON EXTRACTOS CRUDOS Y ACEITE ESENCIAL DE CLAVO *Syzygium aromaticum* (MYRTACEAE) EN LABORATORIO

Eduardo **Aguilar Astudillo**<sup>1</sup>, Cesáreo **Rodríguez Hernández**<sup>1</sup>, Hiram **Bravo Mojica**<sup>1</sup>, R. Marcos **Soto Hernández**<sup>2</sup>, Néstor **Bautista Martínez**<sup>1</sup>, Francisco **Guevara Hernández**<sup>3</sup>

## INTRODUCCIÓN

El uso indiscriminado de plaguicidas organosintéticos ha favorecido el desarrollo de poblaciones de insectos resistentes, impacto ambiental, en enemigos naturales de las plagas, además de afectar la salud humana (Mareggiani, 2001; Gregor *et al.*, 2008). Esta problemática, aún más compleja, ha impulsado la búsqueda de alternativas de manejo de plagas y una de ella es la utilización de extractos vegetales. Esto permite manejar las plagas, proteger los cultivos y obtener mayor rendimiento y calidad en la producción sin poner en riesgo la salud del hombre y su entorno (Rodríguez, 2004). En este sentido, el clavo aromático *Syzygium aromaticum* (Myrtaceae) presenta compuestos secundarios (acetato de eugenol,  $\beta$ -cariofileno y eugenol entre otros) con actividad biológica antibacteriana, antifúngica, antivírica e insecticida (Guan *et al.*, 2007). El efecto insecticida se reporta contra piojos (Yang *et al.*, 2004) y mosquitos (Trongtokit *et al.*, 2005), además de un efecto fumigante (Park y Shin, 2005). Sin embargo, son pocos los trabajos sobre el uso de extractos crudos de clavo (Vázquez, 2002); bajo esta expectativa se planteó cuantificar la repelencia de cuatro extractos y el aceite esencial de *S. aromaticum*, a diferentes concentraciones y en diversos tiempos, en hojas de tomate infestadas con adultos de moca blanca *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae), uno de los insectos plaga de mayor importancia económica en los agroecosistemas.

<sup>1</sup>Fitosanidad- Entomología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

<sup>2</sup>Botánica, Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Agronómicas, Campus V, Universidad Autónoma de Chiapas. Villaflores, Chiapas, México.

Autor de correspondencia: [aguilare@colpos.mx](mailto:aguilare@colpos.mx)

## MATERIALES Y METODO

En el otoño de 2013, se llevó a cabo la extracción de aceite esencial y la elaboración de extractos crudos diclorometanólico, etanólico, hexánico y metanólico de clavo en el laboratorio de Fitoquímica del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Montecillo, Texcoco, Edo. de México. En el año 2014 y principios del 2015 se realizaron los bioensayos para determinar el efecto del aceite esencial y extractos crudos sobre *T. vaporariorum*, en el laboratorio de Entomología de la Facultad de Ciencias Agronómicas Campus V. Para esto se utilizaron adultos de mosca blanca de 2d de edad expuestos a siete concentraciones de 1.0 a 0.000001% de aceite esencial y de los extractos crudos, en comparación con los testigos Tween y absoluto (agua), utilizando la metodología de Ortega y Schuster (2000) con modificaciones; para ello, se utilizaron vasos de plástico transparente de 1 L cubiertos con tela de organza en la parte superior y en el interior un frasco gotero de 10 mL con agua destilada donde se colocó una hoja de tomate previamente tratada por 5 seg con la concentración de aceite o extracto crudo. Enseguida se introdujeron por un orificio y con un aspirador manual 20 adultos de mosca blanca sin sexar y en ayuno de 1 h. Se replicaron cuatro veces por tratamiento en un diseño completamente al azar en condiciones de laboratorio y los datos se obtuvieron cada media hora por 3 h consecutivas, luego a las 12, 24, 48 y 72 h. La toma de datos se inicio cuando la población de adultos alcanzó un comportamiento normal dentro de la unidad experimental; es decir, cuando se encontraron más del 88% de moscas blancas posadas en el testigo absoluto, lo cual ocurrió a las 3 h de iniciado el experimento. Luego se contaron los adultos posados a diferentes tiempos y a los no posados se les consideró como repelidos, considerando al testigo absoluto como 100% de población posada. Debido a que los datos no cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad, se realizó la prueba de Kruskal Wallis, y el análisis de los promedios de rangos con un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ , utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2013 (Di Rienzo *et al.*, 2013).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración del 1.0% tuvo el mayor efecto de repelencia, sin llegar a la repelencia total, registrándose valores de repelencia de 91.93, 86.14, 90.0 y 91.14% en los

extractos crudos diclorometanólico, etanólico y hexánico, y aceite esencial respectivamente (Cuadro 1). Con el extracto crudo metanólico la repelencia fue menor de 66.02% y en los testigos con agua y Tween 80% la repelencia fue de 6.59 y 7.73% respectivamente. Los cuatro extractos crudos y el aceite esencial repelen a más del 64% de los adultos en las 72 h que duró el experimento a la concentración de 0.000001%. Esto indica que aún en concentraciones menores es significativa esta eficiencia, lo cual resulta económico para ser considerado en el manejo integrado biorracional de esta plaga.

En el extracto crudo metanólico no hay diferencia significativa entre las concentraciones lo que indica que la concentración de 0.000001% puede repeler de 55 a 66.02%, y que concentraciones mayores a ésta, hasta 1%, no incrementan sustancialmente la efectividad. En los demás tratamientos la concentración alta, al 1%, ocasionó la máxima repelencia significativa, pero al comparar el rango de repelencia, que parece similar, en las siete concentraciones se observa que el extracto crudo etanólico y el aceite esencial tienen la menor efectividad con 48.64-86.14 y 65.8-91.14% a diferencia de los extractos crudos diclorometanólico y hexánico que provocan mejor repelencia con 78.75-91.93 y 70.23-90%. Estos resultados demuestran que no hay diferencia en la efectividad para causar repelencia en adultos de mosca blanca entre los extractos crudos y aceite esencial de clavo; no obstante, el extracto crudo etanólico y el aceite esencial están permitidos en la normas de agricultura orgánica, debido a que los demás extraen compuestos menos polares y más persistentes en el ambiente.

**Cuadro 1. Repelencia (%), con sus rangos y significancia, de adultos de mosca blanca *T. vaporariorum* con la aplicación de extractos crudos y aceite esencial de clavo *Z. aromaticum*.**

Tratamiento (%)	Aceite esencial	Diclorometanólico	Etanólico	Hexánico	Metanólico
1.0	91.14 (310.91) E	91.93 (307.73) E	86.14 (328.19) D	90.00 (309.31) E	65.45 (260.92) B
0.1	80.45 (235.98) CD	88.98 (288.55) DE	67.05 (251.53) C	81.14 (241.64) BCD	57.95 (229.52) B
0.01	80.91 (242.27) CD	84.66 (253.68) CD	61.48 (225.18) BC	86.82 (285.18) DE	63.98 (253.57) B
0.001	74.89 (213.01) BC	79.55 (212.80) BC	48.64 (177.43) B	80.68 (247.55) CD	55.00 (213.50) B
0.0001	85.00 (277.05) DE	79.32 (210.86) BC	68.30 (254.57) C	75.34 (203.18) BC	66.02 (260.25) B
0.00001	65.80 (173.65) B	81.93 (222.30) BC	59.43 (212.98) BC	70.23 (193.88) B	56.02 (217.76) B
0.000001	81.02 (243.77) CD	78.75 (201.59) B	64.89 (237.32) C	75.00 (210.78) BC	65.57 (258.98) B
Agua	6.70 (42.10) A	3.86 (38.64) A	7.39 (50.48) A	6.59 (48.42) A	6.59 (42.86) A
Tween 80%	7.95 (47.76) A	5.45 (50.36) A	6.48 (48.82) A	6.48 (46.57) A	7.73 (49.14) A

Los promedios con la misma literal estadísticamente son iguales.



Los resultados obtenidos con las concentraciones de extracto crudo y aceite esencial de clavo utilizados en el presente trabajo, son muy parecidos a las aplicaciones de aceite esencial de hojas de clavo a la concentración de  $0.0023 \mu\text{L mL}^{-1}$  de aire alcanzó 90% de mortalidad; a la concentración de  $0.00093 \mu\text{L mL}^{-1}$  de aire de aceite esencial de botones florales se obtuvo 32% y con aceite de hoja logro 58% de mortalidad de adultos, a la concentración de  $0.00047 \mu\text{L mL}^{-1}$  aire de aceite esencial de hojas logro 17% de mortalidad de adultos de mosca blanca las 24 h (Won-II *et al.* 2003).

Phasomkusolsil y Soonwera (2011), indican que la  $ED_{50} < 0.045 \text{ mg/cm}^2$  causa alta repelencia contra *A. aegypti*, y con una  $ED_{50} < 0.003 \text{ mg L}^{-1}$  causa repelencia a *C. quinquefasciatus*, además mencionan que el porcentaje de repelencia incrementa cuando incrementa la concentración del aceite esencial. La aplicación de aceite esencial de clavo sobre ninfas de primer y cuarto instar y adultos de la cucaracha americana se obtuvo para ninfas una  $LC_{50}$  a las 24 h de  $0.0001$  y  $0.0077 \mu\text{L/cm}^2$  y para adultos la  $LC_{50}$  a las 24 h fue de  $1.5375 \mu\text{L/cm}^2$  (Sharawi *et al.* 2013). Fayemiwo *et al.* (2014) encontraron una  $LC_{50}$  de  $92.56 \text{ mg L}^{-1}$  de aceite esencial de clavo para *Aedes aegypti* y de  $124.42 \text{ mg L}^{-1}$  para *Culex quinquefasciatus* en 24 h de exposición.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo no coinciden con Viteri *et al.* (2014) quienes encontraron que las concentraciones de 13.5, 43.6 y  $141.10 \mu\text{L kg}^{-1}$  no causaron efecto repelente sobre adultos del gorgojo del frijol *Achantoscelides obtectus*, pero mencionan que se redujo la pérdida de peso del frijol a consecuencia del aceite esencial, lo que significa mayor costo fisiológico para el gorgojo. Mondal y Khalequzzaman (2006) reportaron que la aplicación de aceite esencial de clavo en adultos de *T. castaneum* tiene efecto fumigante y calcularon una  $LD_{50}$  de  $0.120 \text{ mg/cm}^2$ , y para las larvas de 10, 14 y 18 días la  $LD_{50}$  fueron de 0.214, 0.163 y  $0.131 \text{ mg/cm}^2$  respectivamente. Kafle y Shih (2013) consideran que el aceite esencial de clavo no tiene efecto repelente en las hormigas rojas *Solenopsis invicta* porque no incrementa la repelencia al incrementar los rangos de aplicación.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Investigación y Posgrado de la Universidad Autónoma de Chiapas y al Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) de la Secretaría de Educación Pública por el financiamiento de los estudios doctorales.

## LITERATURA CITADA

- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., González L., Tablada M., Robledo C. W. 2013. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL Consultado enero 2015. Disponible en línea <http://www.infostat.com.ar>.
- Fayemiwo, K. A., M. Adebayo A.; O. Princewill O. and S. Hezekiah A. 2014. Larvicidal efficacies and chemical composition of essential oils of *Pinus sylvestris* and *Syzygium aromaticum* against mosquitoes. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4(1):30-34.
- Gregor J. D., Dominique E., Ogusuku E. y Furlong M. J. 2008. Uso de insecticidas: Contexto y consecuencias ecológicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 1726- 634. P. 74.
- Guan, W., S. Li, R. Yan., S. Tang and C. Quan. 2007. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chemistry* 101(4):1558-1564.
- Kafle L. and C. J. Shih. 2013. Toxicity and repellency of compounds from clove (*Syzygium aromaticum*) to red imposted fire ants *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology* 106(1):131-135.
- Mareggiani, G. 2001. Manejo de insectos plagas mediante sustancias semioquímicas de origen vegetal. *Revista Manejo Integrado de Plagas* 60:22-30.
- Ortega A. L. D. and D. J. Schuster. 2000. Repellency to silverleaf whitefly adults. Gulf Coast Research y Education Center, University of Florida. Bradenton, FL, USA. 2p.
- Park, I. K. and Shin S. C. 2005. Fumigant activity of plants essential oils and components from garlic (*Allium sativum*) and clove oil bud (*Eugenia caryophyllata*) oils against the Japanese termite (*Reticulitermes speratus*). *Journal Agric. Food Chem.* 53:4388-4392.
- Phasomkusolsil S. and M. Soonwera. 2011. Comparative mosquito repellency of essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison) and *Culex quinquefasciatus* (Say). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. S113-S118.
- Rodríguez H., C. 2004. Plantas atrayentes de insectos plaga. In: Ciencias Ambientales y Agricultura. Tornero C. M., J. F. López O. y A. Aragón (eds). Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, Puebla, México. pp.203-234.
- Sharawi S. E.; S. M. Abd.Alla; S. M. Omara and K, M, Al-Ghandi. 2013. Surface contact toxicity of clove and rosemary oils against American cockroach, *Periplaneta americana* (L.). *African Entomology* 21(2):324-332.
- Trongtokit Y., Rongsriyan Y., Komalamisra N. and Apiwathnasorn C. 2005. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. *Phytotherapy Research* 19(4):303-309.
- Vázquez, M. L. L. 2002. Avances del control biológico de *Bemisia tabaci* en la región neotropical. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 66:82-95.
- Viteri J., L. O., L. R. A. Faroni, E. E. Oliveira, M. A. Pimentel and G. N. Silva. 2014. Potential use de clove and cinnamon essential oils to control the vean weevil, *Acanthoscelides obtectus* Say, in small storge units. *Industrial Crops and Products* 56:27-34.
- Won-Il, C.; Eun-Hee L., Byeoung-Ryeol C., Hyung-Man P. and Young-Joon A. 2003. Toxicity of plant essential oils to *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology* 96(5):1479-1484.
- Yang, Y. C., Lee, H. S., Clark, J. M., and Ahn, Y. J. 2004. Insecticidal activity of plant essential oils against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Journal of Medical Entomology* 41:699-704.

## REPELENCIA DE EXTRACTOS VEGETALES CRUDOS A NINFAS DE *Meccus pallidipennis* (HEMIPTERA: REDUVIIDAE) EN PRUEBAS DE CONFINAMIENTO EN LABORATORIO

Javiera Estefany **Barrientos Gutiérrez**<sup>1</sup>, José Lino **Zumaquero Ríos**<sup>2</sup>, Cesáreo **Rodríguez Hernández**<sup>1</sup> Jesús **Romero Nápoles**<sup>1</sup>, Jesús Fco. **López Olguín**<sup>3</sup>, Arturo **Huerta de la Peña**<sup>4</sup>.

### INTRODUCCIÓN

La chinche besucona *Meccus pallidipennis* es uno de los insectos vectores involucrados en la transmisión del parásito *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatidae) responsable de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, en poblaciones humanas en México (Martínez-Ibarra y Novelo-López, 2004). Se estima que en México pueden existir 1,768 376 personas infectadas con dicho parásito, y que esta cifra aumenta aproximadamente en 69 000 infectados por año, siendo transmitido en más de un 90% de los casos por insectos. La mayor parte de la población infectada se ubica en áreas rurales o en zonas periféricas a las ciudades (Ramsey *et al.*, 2003). En México se ha ubicado a *M. pallidipennis*, en los estados de Colima, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Veracruz y Zacatecas (Zarate y Zarate, 1985; Galvão *et al.*, 2003). Se ha identificado a *M. pallidipennis* generalmente como un vector peridomiciliario (Salazar-Schettino *et al.*, 2010), aunque existen reportes de la presencia de estos insectos dentro de los domicilios.

El control habitual de estos redúvidos es con piretroides; sin embargo, ciertas poblaciones han demostrado niveles significativos de resistencia (Coelho *et al.*, 2006), por esto es necesario buscar alternativas para el manejo de dichos organismos. Las evaluaciones con productos de origen vegetal, aunque limitadas, han mostrado resultados satisfactorios contra triatominos.

<sup>1</sup>Fitosanidad- Entomología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

<sup>2</sup>Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Biología, Laboratorio de Parásitos y Vectores.

<sup>3</sup> Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Instituto de Ciencias (ICUAP).

<sup>4</sup> Colegio de Postgraduados, Campus Puebla.

Autor de correspondencia: . biosfera50@yahoo.com

Entre las especies vegetales evaluadas como potenciales repelentes se incluye al árbol de guanábana *Annona muricata* (Annonaceae), mamey *Mammea americana* (Calophyllaceae) (Parra-Henao *et al.*, 2007), árbol del paraíso *Melia azedarach* (Parra-Henao *et al.*, 2007; Valladares *et al.*, 1999) y pirúl *Schinus molle* (Anacardiaceae) (Ferrero *et al.*, 2006).

El objetivo de este trabajo fue seleccionar dentro de las especies vegetales epazote de monte *Chenopodium graveolens* (Amaranthaceae), marrubio *Marrubium vulgare* (Lamiaceae), zoapatle *Montanoa tomentosa* (Asteraceae) y pirúl *S. molle* (Anacardiaceae), una que genere actividad repelente  $\geq 70\%$ , en ninfas de primer instar de *M. pallidipennis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Elaboración de extractos.** La colecta del material vegetal se realizó en el Valle de Tepeaca, Puebla. Algunos ejemplares se depositaron en el Herbario del Colegio de Postgraduados, Montecillo mientras que otros se destinaron para las extracciones en el Instituto de ciencias ICUAP, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Los extractos se obtuvieron macerando a temperatura ambiente el material vegetal previamente seco y triturado en sombra; se emplearon 130 g de la planta por 1 L de solvente (etanol 99.5°, Golden Bell®), la maceración se llevó a cabo en un vaso de precipitado, por 48 h posteriormente se filtró y se concentró en rotavapor (SEV®, modelo A402-2 Analógico) a 240 rpm, manteniendo una presión y temperatura reducida ( $<40^{\circ}\text{C}$ ). Una vez concentrados, se conservaron en frascos ámbar rotulados.

**Repelencia en ninfas.** Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de sitios y vectores de la Facultad de Biología de la BUAP. Las evaluaciones se basaron en la metodología de Arias y Schmeda- Hirschmann (1988), modificando el contenedor y tipo/número de refugios empleados. La unidad experimental fue un recipiente rectangular oscuro (30 x 12 x 15 cm), con tapa, dentro del cual se colocaron dos refugios separados, uno de los cuales se colocó impregnado con cada uno de los productos a diferentes concentraciones (100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 y 0.00001%) y empleando 500  $\mu\text{L}$  por tratamiento y otro blanco impregnado con el solvente cada una con 5 repeticiones. Los refugios se dejaron secar a temperatura ambiente, y posteriormente se colocó en este sistema, un grupo de 10 ninfas de primer instar por cada repetición. Se cuantificaron los individuos

que ingresaron en los refugios tratados con el extracto a cada concentración en diferentes tiempos (35 min, 2 y 24 h). La primera observación, de 35 min se estableció así considerando el tiempo promedio en que un grupo de 10 chinches tarda en refugiarse dentro del sistema de evaluación (caja y refugios). En todos los bioensayos las ninfas se seleccionaron de la misma edad (con más de 24 h de emergencia). Así mismo, se tomó la propuesta de Werdin *et al.* (2008), para determinar la repelencia:  $PR = NB/NT$  Dónde: PR= Proporción de repelencia, NB= Número de organismos en el blanco y NT= Número total de organismos en el sistema.

Cada proporción de repelencia (PR), se trasladó a porcentaje, los resultados se sometieron a análisis en el programa estadístico Statgraphics Centurión (Statpoint Technologies, 2005), se realizó un ANOVA para determinar diferencias significativas entre los grupos, previa verificación de la varianza y normalidad. Finalmente, se realizó una prueba LSD para establecer los rangos de las medias.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existieron diferencias significativas entre los extractos a los tres tiempos evaluados. Los extractos de *S. molle* sobresalieron en los valores de repelencia, principalmente en las concentraciones de 100 y 10, llegando la primera concentración a tener un efecto superior al 90% de repelencia en las tres observaciones realizadas, esto es 94, 96 y 92% a los 35 min, 2 y 24 h, respectivamente; mientras que la concentración del 10% obtuvo efectos del 84, 86 y 82% de repelencia a las chinches, a los tiempos previamente señalados.

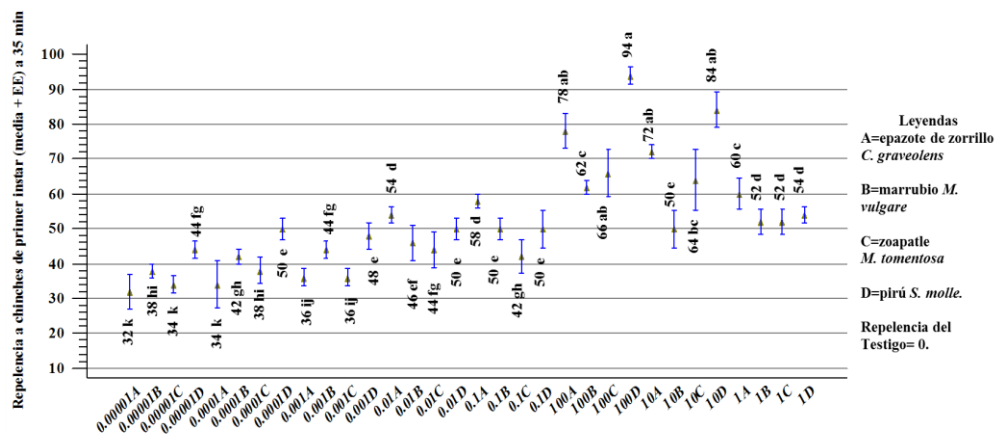


Figura 1. Repelencia de chinches de primer instar *M. pallidipennis* a extractos vegetales etanólicos crudos a 35 min

El efecto repelente de estos extractos se ha reportado previamente sobre algunos insectos, en *Blatella germánica* (Blattodea: Blattidae) se produjo un efecto repelente significativo y mortalidad utilizando extractos etílicos y de éter de petróleo, así como hojas y frutos de *S. molle* (Ferrero *et al.*, 2007). En *Blatta orientalis*, se identificó actividad repelente importante por el extracto hexánico de hojas del pirúl (Deveci *et al.*, 2010). Específicamente en redúvidos se encuentran las investigaciones realizadas en *Triatoma infestans*, evaluando extractos hexánicos de las hojas y frutos de *S. molle*, que tuvieron un efecto repelente e insecticida en ninfas del primer instar y huevos de este insecto (Ferrero *et al.*, 2006). Igualmente en el presente estudio se obtuvieron resultados significativos (<70%) en repelencia a ninfas de primer instar de *M. pallidipennis* al aplicar el extracto de hojas en los refugios.

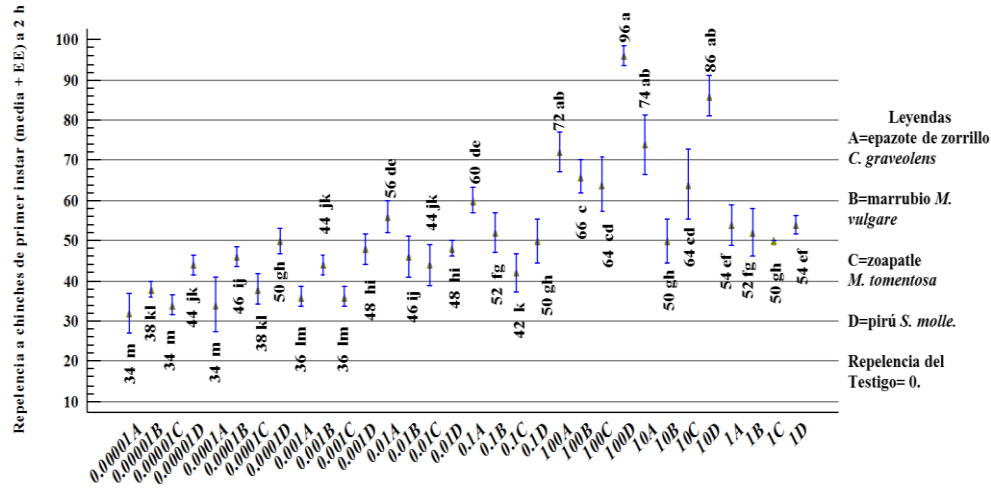


Figura 2. Repelencia de chinches de primer instar *M. pallidipennis* a extractos vegetales etanólicos crudos a 2 h

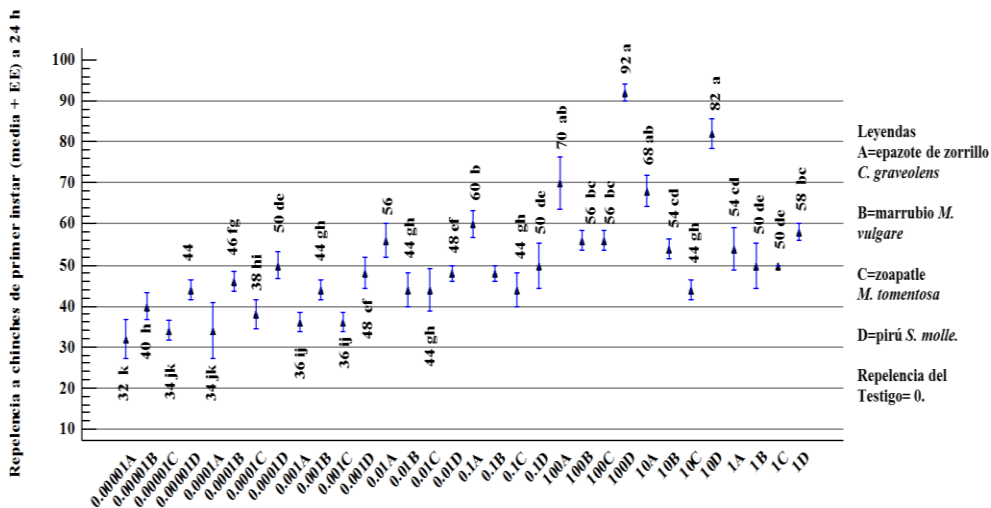


Figura 3. Repelencia de chinches de primer instar *M. pallidipennis* a extractos vegetales etanólicos crudos a 24 h

El epazote de monte *C. graveolens* mostró un efecto repelente de más del 70%; a la concentración del 100 y 10%, a los 35 minutos obtuvo 78% y 72% de repelencia, respectivamente. A 2 horas, también se presentó repelencia significativa, de más del 70% a las concentraciones del 10 y 100%. A las 24 h únicamente se presentó una repelencia del 70% en su concentración del 100%. En general, existen reportes del efecto del epazote común *C. ambrosoides*, mientras que la especie empleada en este estudio ha sido poco estudiada en el manejo de insectos, conociéndose su empleo tradicional en el estado de Hidalgo, en donde se amarra en los postes de los graneros para repeler hormigas (Villavicencio-Nieto, 2010).

Los menores porcentajes en repelencia los generaron los extractos de zoapatle *M. tomentosa* y marrubio *M. vulgare*; ambos tuvieron una repelencia menor a 70% en los diferentes tiempos y concentraciones consideradas. Sólo la concentración 100% a 35 min del zoapatle *M. tomentosa* obtuvo una repelencia del 66%. *M. tomentosa* se ha evaluado en gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), obteniendo actividad insecticida contra larvas (Rodríguez *et al.*, 1982). El marrubio se ha probado en el mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), hallando capacidad ovicida del aceite esencial, por ello se le ha señalado como promisorio para el control de este díptero (Salama *et al.*, 2012).. La mejor repelencia del marrubio *M. vulgare* se obtuvo a las 2 h, la cual fue del 66% a la mayor concentración evaluada. Debido a la importancia de *M. pallidipennis* como vector de la tripanosomiasis, las investigaciones relacionadas con su manejo y alternativas para el mismo, son relevantes, puesto que dicho insecto, constituye un problema de salud. Al menos dos de las especies seleccionadas para este trabajo mostraron actividad repelente a más del 70%, en sus extractos etanólicos crudos.

### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca proporcionada para la primera autora J. Estefany Barrientos. Al Dr. Alejandro Martínez Ibarra por proporcionar algunos de los adultos y huevos para iniciar la colonia de *M. pallidipennis*

### LITERATURA CITADA

Arias A., R. and G. Schmeda-Hirschmann. 1988. The effects of *Melia azedarach* on *Triatoma infestans* bugs. *Fitoterapia*59:148-149.



- Coelho A., M., J.E, Paula and L.S, Espíndola. 2006. Insecticidal activity of Cerrado plant extracts on *Rhodnius milesi* Carcavallo, Rocha, Galvão & Jurberg (Hemiptera: Reduviidae), under laboratory conditions. *Neotropical Entomol.* 35:133-138.
- Deveci O., A Sukan., N, Tuzum and E.E.H. Kocabas. 2010. Chemical composition, repellent and antimicrobial activity of *Schinus molle* L. *Journal of Medicinal Plants Research.*4 (21): 2211-2216.
- Ferrero A., A., G.J.O. Werdin, and C.C. Sanchez. 2006. Biological activity of *Schinus molle* on *Triatoma infestans*. *Fitoterapia* 77: 381–383.
- Ferrero A., A., C.S. Chopa., J.O.W, González., and R.A, Alzogaray. 2007. Repellence and Toxicity of *Schinus molle* extracts on *Blattella germanica*. *Fitoterapia* 78(4): 311-314.
- Galvão C., R.U. Carcavallo., D.S. Rocha and J. Jurberg. 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa.* 202: 1-36.
- Martínez-Ibarra J.A and Novelo-López, M. 2004. Blood meals to molt, feeding time and post feeding defecation delay of *Meccus pallidipennis* (Stal, 1872) (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *Folia Entomológica Mexicana.* 43 (3): 313-319.
- Parra-Henao, G., P.C.M, García y T.J.M. Cotes. 2007. Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Rhodnius prolixus* y *Rhodnius pallescens*. *Boletín de Mariología y Salud ambiental XLVII:* 125-137.
- Ramsey J., M., R. Ordoñez., L.A. Tello, J.L. Pohls., V, Sánchez y A.T. Peterson. 2003. Actualidades sobre la epidemiología de la Enfermedad de Chagas en México; iniciativa para la vigilancia y el control de la Enfermedad de Chagas, en la República Mexicana. Instituto Nacional de Salud Pública de México, Salud Pública de México. Cuernavaca, Mexico. 142 p.
- Rodríguez H., C., A, Lagunes T., R. Domínguez R. y L. Bermúdez V. 1982. Búsqueda de plantas nativas del Estado de México con propiedades tóxicas contra el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith, y mosquito casero, *Culex quinquefasciatus* Say. *Revista Chapingo* 3738: 3539.
- Salama M. M., E.E. Taher and M.M. El-Bahy, M.M. 2012. Molluscicidal and mosquitocidal activities of the essential oils of *Thymus capitatus* and *Marrubium vulgare*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.*54(5): 281-286.
- Salazar-Schettino, P.M., M. I. Bucio-Torres., J.A, Martínez-Ibarra., M.C. Monroy-Escobar., A. Rodas-Retana., Y. Guevara-Gómez., M.O. Vences-Blanco., A.L. Ruiz- Hernández., E. Torres-Gutiérrez., G.E. Rojas-Wastavino y M. Cabrera-Bravo. 2010. Revisión de 13 especies de la familia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) vectores de la enfermedad de Chagas, en México. *J. Selva Andina Res Soc.* 1(1):57-81.
- Valladares G. R., D. Ferreyra., M.T. Defago., M.C. Carpinella. and S. Palacios. 1999. Effects of *Melia azedarach* on *Triatoma infestans*. *Fitoterapia.* 70, pp. 421-424.
- Villavicencio-Nieto M., B. Pérez- Escandón y Gordillo- Martínez, A. 2010. Plantas tradicionalmente usadas como plaguicidas en el estado de Hidalgo, México. *Polibotánica* 193-238.
- Werdin J.O., A.P, MurraY. and A.A Ferrero. 2008 Bioactividad de aceites esenciales de *Schinus molle* var. *areira* (Anacardiaceae) en ninfas II de *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *Bol San Veg. Plagas-* 34: 367-375.
- Zarate L. G. and R.G. Zarate. 1985. A checklist of the Triatomine (Hemiptera: Reduviidae) of Mexico. *Int J. Entomol.* 27: 102-127.

## DISMINUCIÓN DE LA POBLACIÓN DEL PICUDO *Anthonomus eugenii* Cano Y PROTECCIÓN DE FRUTOS DE *Capsicum annuum* L. CON HOMEOPATÍA

Sabino H. **Martínez Tomás**<sup>12\*</sup>, Cesáreo **Rodríguez-Hernández**<sup>2</sup>, Gustavo **Ramírez-Valverde**<sup>2</sup>, Jesús **Romero-Nápoles**<sup>2</sup>, Felipe de J. **Ruiz-Espinoza**<sup>2</sup>, Rafael **Perez-Pacheco**<sup>1</sup>.

### INTRODUCCIÓN

El adulto de *Anthonomus eugenii* causa daño a los frutos de chile *Capsicum annuum*, por lo que es importante la implementación de alternativas biorracionales para combatir este insecto, entre de ellas se encuentra la homeopatía. La aplicación de dinamizaciones de plagas podrían inferir en los mecanismos de resistencia inherentes de la planta, haciendo posible que está active los mecanismos que le confieren mayor resistencia al ataque de las mismas (Narváez-Martínez *et al.*, 2014). Por lo que en la presente investigación se evaluó el efecto de 5 dinamizaciones homeopáticas (6, 10, 50, 100 y 200CH) de productos homeopáticos elaborados a partir de *A. eugenii*, con dos métodos de preparación de homeopáticos; Tintura madre (Ø) y Trituración (T), y cuatro testigos (agua, agua sucusionada, insecticida Actara y testigo sin aplicación), utilizando dos poblaciones del picudo (provenientes de campo e invernadero), para determinar el efecto en la disminución de la población de *A. eugenii* y en la protección de frutos de chile de agua ante esta plaga en condiciones de invernadero.

### MATERIALES Y MÉTODO

Esta investigación se realizó de enero 2014 a diciembre 2015 en tres invernaderos tipo microtúnel en el municipio de Zimatlán de Álvarez, Oaxaca de Juárez, México. **Elaboración de productos homeopáticos.** Las 10 dinamizaciones las elaboró el Dr. Felipe de Jesús Ruiz Espinoza de la UACH, utilizando cinco (6, 10, 50, 100 y 200CH) con el método de Tintura madre (Comunicación personal) y cinco (6, 10, 50, 100 y 200CH) con el método de Trituración (Martínez *et al.*, 2014).

<sup>1</sup>Fitosanidad- Fitopatología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

<sup>2</sup>CRUAN Centro Regional Universitario del Anáhuac. Programa de Agricultura Orgánica. Universidad Autónoma Chapingo.

Autor de correspondencia: [sabinoh@colpos.mx](mailto:sabinoh@colpos.mx)

**Elaboración de productos homeopáticos.** Las 10 dinamizaciones las elaboró el Dr. Felipe de Jesús Ruiz Espinoza de la UACH, utilizando cinco (6, 10, 50, 100 y 200CH) con el método de Tintura madre (Comunicación personal) y cinco (6, 10, 50, 100 y 200CH) con el método de Trituración (Martínez *et al.*, 2014). Con tintura madre, se elaboran las mismas diez dinamizaciones, pero ahora cinco con población de picudo de campo y cinco de invernadero, para ello se colectaron 35 picudos adultos, ocho larvas, cuatro pupas, huevos en botones florales y 14.04 g de frutos y hojas dañadas, y de este material se utilizaron 0.05 g para elaborar homeopáticos.

**Experimentos.** Los experimentos se realizaron en microtúneles independientes, el primero para evaluar los dos métodos de elaboración del homeopático (Tintura y Trituración) y el segundo para evaluar las dos poblaciones de picudos (campo e invernadero); en cada uno se sembraron plantas de chile de agua en dos camas de 0.80 m de largo por 40 m de largo dentro del túnel, dejando un pasillo de 0.50 m de ancho, sembrando en cada cama 2 hileras de plantas de chile. En el primer microtúnel, se sembraron 111 plantas por hilera, de ellas 3 plantas como testigo sin aplicación entre los tratamientos y 15 plantas al final de cada hilera para un total de 444 plantas y en el segundo 70 plantas por hilera, dando un total de 280 plantas. Cada hilera se consideró como un bloque, donde se aplicaron 14 tratamientos; 10 dinamizaciones de picudo; cinco (6, 10, 50, 100 y 200CH) con el método de Tintura y cinco (6, 10, 50, 100 y 200CH) con el método de Trituración y cuatro testigos (testigo sin aplicación, agua, agua sucusionada e insecticida Actara 25WG (Thiametoxan). Para el segundo como testigo sin aplicación no se intercalaron plantas y se incluyó como tratamiento. La unidad experimental fue una planta de chile y se utilizaron cinco plantas (repeticiones) por tratamiento. Se adicionaron 0.03 mL del preparado homeopático en 1 L<sup>-1</sup> de agua de pozo (primer microtúnel) y agua embotella e-pura (segundo microtúnel), en un envase plástico de 1.5 L<sup>-1</sup>, se sucusionó por 2 min y el líquido se asperjó a las plantas con un aspersor manual de 1 L, hasta que el líquido escurriera en las hojas, repitiendo cada 8 d desde el trasplante hasta la cosecha. Dentro del microtúnel, cuando las plantas de chile presentaron flores y botones, en el primero se realizaron dos liberaciones de picudos adultos (50 y 80) a lo largo del túnel durante el ciclo del cultivo y en el segundo, 23 adultos (8 machos y 15 hembras) a lo largo del túnel, por 12 d. Cuando los frutos de chile llegaron a la madurez comercial, se cosecharon y se les realizó un corte circular en la parte basal de éstos con un cúter y con el

auxilio de pinzas entomológicas se cuantificaron larvas, pupas y adultos de *A. eugenii* para obtener el número total de picudos por fruto y por planta, y el porcentaje de frutos sin picudo.

**Análisis estadístico.** Los experimentos se establecieron bajo un diseño experimental de bloques al azar, donde a los datos se le realizaron las pruebas de los supuestos (prueba de normalidad de los errores con la prueba Shapiro-Wilks y de homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene), cuando éstas se cumplieron se procedió a realizar el análisis de varianza y la comparación de promedios de Tukey o Fisher ( $p \leq 0.05$ ); y cuando alguno de los supuestos no se cumplió, se realizó el análisis no paramétrico con la prueba de Friedman y las comparaciones múltiples de rangos para esta misma prueba. Para comparación de datos de dos métodos y de dos poblaciones de picudo, se analizaron mediante una prueba *t* de Student suponiendo varianzas desiguales ( $p > 0.05$ ). Para tales análisis de datos, se utilizó el programa InfoStat versión 2014, (Balzarini *et al.*, 2008).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Comparación de métodos de elaboración del homeopático.** Los tratamientos con Insecticida, Agua, Picudo T 200CH y Picudo T 100CH mostraron significativamente los menores promedios (0.96, 2.04, 3.84 y 4.11) de picudos por fruto, en comparación a 5.77 de agua sucusionada, lo cual denota mayor efecto del insecticida y que el efecto del agua de pozo utilizada en los tratamientos, por muestreos realizados en pozos cercanos al río Atoyac, indican que las aguas subterráneas que se extraen en las proximidades del mismo presentaron fracciones contaminantes arriba de los límites permisibles en aguas para consumo humano (Navarro *et al.*, 2002) y por insecticidas químicos aplicados en ese terreno en los últimos 30 años, y que tiene efecto en la población del picudo. En el número de picudos por planta los tratamientos Insecticida, Picudo T 200CH y Agua, disminuyeron significativamente al mismo nivel las poblaciones de *A. eugenii* al obtener promedios de 0.07, 0.51 y 0.49, respectivamente, en comparación a 0.85 de agua sucusionada. En frutos sin picudo, al finalizar el ciclo del cultivo de chile, los tratamientos Insecticida, Picudo T 200CH y Agua protegieron significativamente a los frutos del ataque de *A. eugenii*, registrándose 92.53, 59.30 y 58.02% de frutos sin insectos, respectivamente, en comparación con 28.26% de la agua sucusionada. Con el tratamiento Picudo 200CH, aunque no se encontró significancia

con los dos métodos, se obtuvieron los menores promedios con el de Trituración en picudos por frutos ( $\bar{O}$ =4.29 y T=3.13) y en protección de frutos ( $\bar{O}$ =59.97% y T=46.84%), en cambio en picudos por planta se registró significancia en los promedios ( $\bar{O}$ =4.29 y T=3.13), cabe resaltar que lo importante es tener frutos limpios sin plaga. El método de trituración es mejor que el de tintura, pues el preparado homeopático elaborado mediante trituración del picudo a la 200CH disminuye significativamente la infestación por fruto y por planta y además protege la cosecha.

**Comparación de poblaciones de picudo.** Después de la aplicación de Insecticida y Picudo de campo T 6CH a las plantas de *C. annuum* se registraron 0.00 y 0.10 insectos totales de *A. eugenii* en frutos, siendo significativamente diferentes al testigo con agua, donde se contabilizaron 0.58 insectos. En el tratamiento Picudo invernadero T 200CH; aunque no se encontró significancia, se notó su efecto con el promedio de 0.08 picudos por fruto. En picudos por planta, los tratamientos insecticida y Picudo campo T 6CH mostraron significativamente los menores promedios con 0.00 y 0.03, en contraste con el testigo con agua que tuvo en promedio 0.15 insectos por planta. Respecto a frutos sin picudo los tratamientos significativos con mayor protección fueron insecticida, Picudo invernadero T 200CH, Picudo campo T 6CH, Agua agitada y Picudo campo T 100CH con promedios de 100, 100, 96.67, 95.56 y 94.23%, en comparación al testigo con agua, donde se protegieron 84.15% de frutos. Con el tratamiento Picudo de campo 6CH, aunque no se mostró diferencia significativa en las tres variables con las dos poblaciones de picudo, se obtuvieron los menores promedios con el homeopático preparado con la población de insectos de campo en picudos por frutos (invernadero=0.48 y campo T=0.16), en picudos por planta (invernadero=0.12 y campo T=0.05) y lo más importante, se registró mayor promedio en protección de frutos (campo=95.83 e invernadero=90.78%). El mejor tratamiento para disminuir la población del picudo y proteger los frutos de chile es el homeopático preparado con población de insectos de campo, triturado, a la 6CH, por ende la mejor población para elaborar productos homeopáticos contra picudo del chile es la obtenida de campo, no de invernadero. Los preparados homeopáticos elaborados con el picudo del chile disminuyen significativamente la población de esta plaga y protegen también de manera significativa al fruto de chile, cuando se elaboran con el método de trituración, a diferencia del método de dilución o tintura, y con población de campo, que cuando se efectúan con población de

invernadero. Con el tratamiento Picudo campo 6CH se tuvo 20 y 17.24% de reducción en la población de *A. eugenii* cuando se compararon los promedios de picudos por fruto y por planta con el promedio del testigo agua, de igual manera con la dinamización 6CH del áfido preparada con el método de trituración y con población de campo (huerta orgánica). Se registró el 14% de reducción de la población juvenil de *Dysaphis plantaginea* Pass. comparado con el testigo agua, en plántulas de manzana en laboratorio (Wyss *et al.*, 2010). Aunque todavía no se ha demostrado que la dinamización picudo campo T 6CH presenta nanopartículas del material original, Chikramane, *et al.*, 2010, ha demostrado que en dinamizaciones 30C y 200C de medicamentos se han encontrado tales nanopartículas.

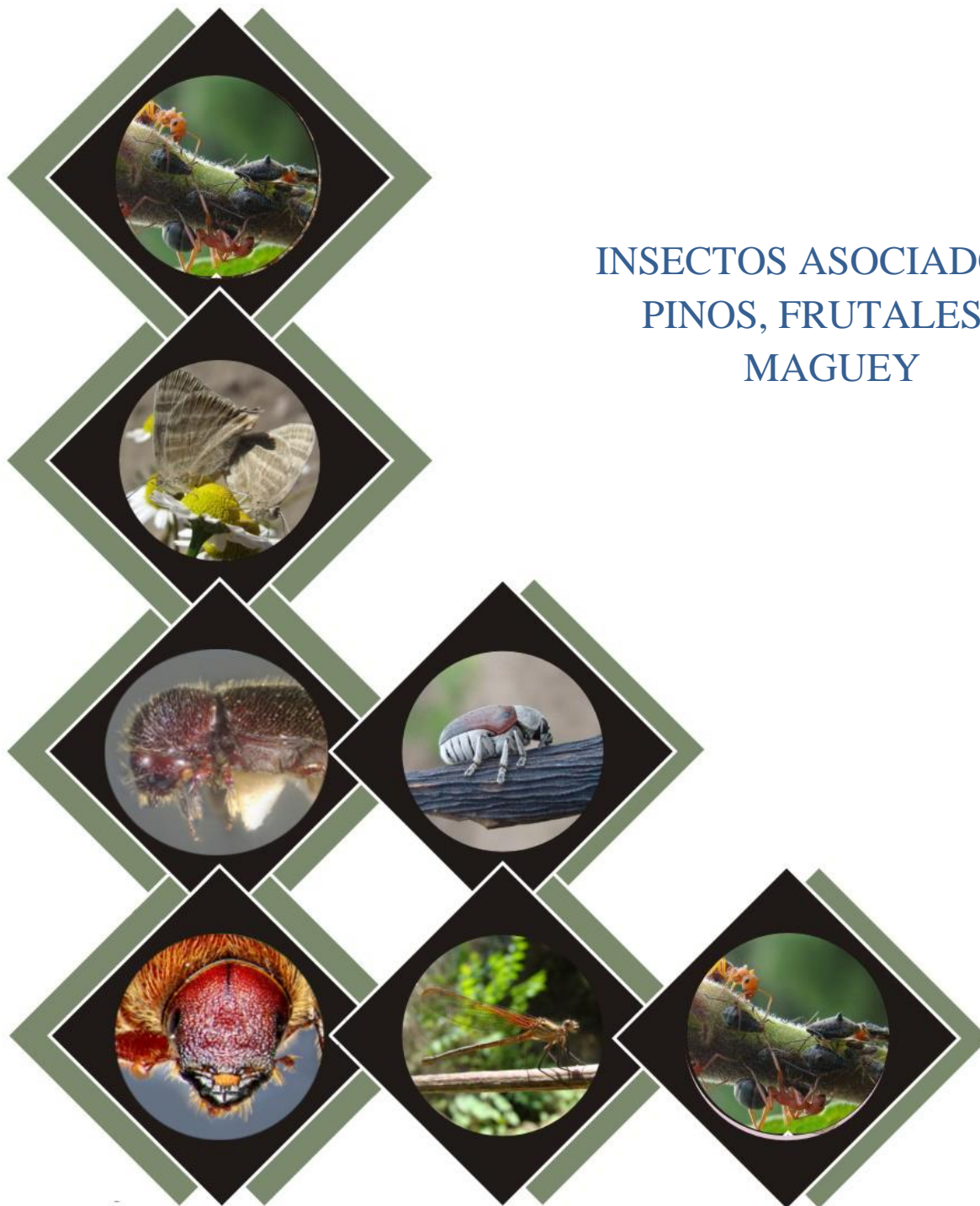
### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, al Instituto Politécnico Nacional y al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo por el apoyo brindado para esta investigación. Al señor Jaime Román Ramírez Caballero por su apoyo en actividades del presente estudio.

### LITERATURA CITADA

- Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Casanoves F., Di Rienzo J.A. y Robledo C.W. 2008. Infostat Manual del Usuario, Versión 2008. edn, Brujas, Córdoba, Argentina.
- Chikramane, P.S., Suresh, A.K., Bellare, J.R. and Kane, S.G. 2010. Extreme homeopathic dilutions retain starting materials: A nanoparticulate perspective. *Homeopathy*. 99: 231-242.
- Martínez T., S. H., C. Rodríguez H., G. Ramírez V., J. Romero N., F. de J. Ruiz E. y R. Pérez P. 2015. Aplicación de dinamizados homeopáticos de *Anthonomus eugenii* en plantas de *Capsicum annum* en un invernadero tipo túnel. *Entomol Mex.* 1: 365-370.
- Narváez-Martínez, E.C., Toro P., H.A., León-Guevara, J.A. and Bacca, T. 2014. Evaluation of homeopathic *Neoleucinodes elegantalis* Guenée (Lepidoptera: Crambidae) growing lulo. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 12: 115-123.
- Navarro, M., S., A. Bautista B., y S.I. Belmonte J. 2002. Río Atoyac y su relación con el acuífero alimentador de fuentes de agua "potable" en la ciudad de Oaxaca. *In: Memoria Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales*. Guanajuato, Gto., México. 17-pp: 9.
- Wyss, E., Tamm, L., Siebenwirth, J., and Baumgartner, S. 2010. Homeopathic preparations to control the rosy apple aphid (*Dysaphis plantaginea* Pass.). *ScientificWorldJournal*. 10: 38-48.





## INSECTOS ASOCIADOS A PINOS, FRUTALES Y MAGUEY



## EL GÉNERO *Pityophthorus* SPP. (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE: SCOLYTINAE) EN BOSQUES TEMPLADOS DE PINO EN JALISCO

Sara G. **Díaz-Ramos**<sup>1</sup>, Armando **Equihua Martínez**<sup>1</sup>, Thomas **Atkinson H.**<sup>2</sup>, Jorge M. **Valdez Carrasco**<sup>1</sup>, Antonio **Rodríguez Rivas**<sup>3</sup>, Obdulia L. **Segura León**<sup>1</sup>

### INTRODUCCIÓN

El género *Pityophthorus* tiene 385 especies y forma parte del gran grupo de los descortezadores. Su mayor distribución se encuentra en la región Nearctica y Neotropical (Hulcr, *et al.*, 2015). En México hay 131 especies, de las que 26 están en Jalisco, y de ellas 10 se asocian a pino (Bright, 1981, Wood 1982; Burgos-Solorio y Equihua, 2007). Estos descortezadores afectan ramitas de coníferas y latifoliadas; se desarrollan bajo corteza y médulas (Brighth, 1981; Cibrián, *et al.*, 1995). Los daños ocasionados por *Pityophthorus* son aislados, porque arriban en arboles débiles que fueron afectados por incendios, nevadas, sequías o ataques por descortezadores primarios (Cibrián, *et al.*, 1995, Hernández, y Nicolás, 2009). Para la identificación de estas especies, Bright (1981) realizó una separación de 48 grupos para el género *Pityophthorus* y facilitar así su identificación. En México los reportes taxonómicos de *Pityophthorus* son escasos. Por tal motivo el presenta trabajo plantea estudiar morfológicamente las especies en el estado de Jalisco y generar una clave dicotómica para las especies asociadas a Pino.

### MATERIALES Y MÉTODOS

**Trabajo de campo.** Se llevó acabo en el estado Jalisco, en 5 regiones con bosques templados de pino. Se colectó en 10 municipios en 2014 y 2015; para la captura de los *Pityophthorus* se identificó al hospedero y se colectaron ramitas de pino que presentaban amarillamiento y muerte, así como entradas del descortezador. El material colectado fue llevado al laboratorio y depositado en cajas de cría para esperar emergencia de adultos.

<sup>1</sup>Fitosanidad- Fitopatología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

<sup>2</sup>Universidad de Texas en Austin, Sistemática de insectos; 3.Universidad de Guadalajara Manejo Forestal.

Autor de correspondencia: [saragdiuz@hotmail.com](mailto:saragdiuz@hotmail.com)

**Trabajo en laboratorio.** Las especies fueron identificadas con las claves dicotómicas de Bright (1981) y Wood (1982). Las características morfológicas que se tomaron en cuenta fueron, ornamentaciones del pronoto, frente y declive. Se realizó una clave taxonómica con imágenes de referencia y mapas de distribución de las especies identificadas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del muestreo directo realizado en el estado de Jalisco, se identificaron 17 especies (Tabla. 1), de las que destacan 9 como nuevos registros para el estado. De las especies reportadas por Bright (1981), Wood (1982), Burgos-Solorio & Equihua (2007), no aparecieron dos especies; esto puede deberse a condiciones climáticas, o a que el material vegetal colectado no era el hospedero.

Estas 19 especies asociadas a pinos representan a 13 grupos de los 48 mencionados por Bright (1981). Se agregaron 4 especies para la clave dicotómica, debido a la distribución que presentan en México.

**Cuadro 1. Listado de las especies identificadas asociadas a pinos en Jalisco**

Especies
<i>Pityophthorus aztecus</i> Bright
<i>P. schwerdtfegeri</i> (Schedl)
<i>P. cacuminatus</i> Blandfor
<i>P. confusus</i> LeConte
<i>P. annectens</i> LeConte
<i>P. sapineus</i> Bright
<i>P. scabridus</i> (Schedl)
<i>P. cuspidatus</i> Blackman
<i>P. schwarzi</i> Blackman
<i>P. obtusipennis</i> Blandford
<i>P. oclusus</i> Bright
<i>P. spadix</i> Blackman
<i>P. impexus</i> (Schedl)
<i>P. bassetti</i> Blackman
<i>P. solatus</i> Wood
<i>P. segnis subopacus</i> Blackman
<i>P. cristatus</i> Wood

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada a la estudiante Díaz Ramos para la realización de estudios de Maestría.

**LITERATURA CITADA**

- Burgos-Solorio, A.; Equihua, M. A. 2007. Platypodidae y Scolytidae (Coleoptera de Jalisco, México). *Dugesiana*. 12 (4): 59-82
- Bright, D. E. 1981. Taxonomic Monograph of the Genus *Pityophthorus* Eichhoff in North and Central America (Coleoptera: Scolytidae). *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, No 118. pp 378
- Cibrián, T. D; Méndez, M. J. T.; Campos B. R.; Yates III, H. O.; Flores L. J. 1995. *Insectos Forestales de México*. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Hernández, R. J y Nicolás R. M. C. 2009. Caracterización de Plantaciones de Árboles de Navidad de *Pinus ayacahuite* var. *Veitchii* Shaw Establecidas en San Miguel y Santo Romas Ajusco, D.F. Tesis de Licenciatura. Ingeniero Forestal. Universidad Autónoma de Chapingo. pp. 142
- Hulcr, J., Atkinson T.H., Cognato, A. I., Jordal, B. J., McKenna, D.D. 2015. Morphology, Taxonomy, and Phylogenetics of Bark Beetles. Vega, F. E.; Hofstetter, R. W. 2015. *Bark Beetle Biology and Ecology of Native and Invasive Species*. pp620. United States: Elsevier
- Wood, S. L. 1982. The Bark and Ambrosia Beetles of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae), a Taxonomic Monograph. *Great Basin Naturalist Memoirs*, 6. pp. 1359

## PRESENCIA DE LOS ESTADOS DE DESARROLLO DE *Conotrachelus crataegi* CON RESPECTO A LA FENOLOGIA DEL TEJOCOTE EN SAN ANDRES CALPAN, PUEBLA.

Ana Lilia **Chacón Aguayo**<sup>1</sup>, Julio **Sánchez Escudero**<sup>1</sup>, Armando **Equihua Martínez**<sup>1</sup>, Arturo **Huerta de la Peña**<sup>2</sup>, Alejandro **Pérez Panduro**<sup>1</sup>, Carlos **Castillejos Cruz**<sup>3</sup>, Samuel **Ramírez Alarcón**<sup>4</sup>.

### INTRODUCCIÓN

El género *Conotrachelus* Dejean 1835, incluye cerca de 1100 especies en el mundo, principalmente en Estados Unidos y Canadá, considerándose el género más diversos en las Américas. Los adultos están asociados con diversas plantas, en su mayoría leñosas, algunos géneros están asociados a hojarasca y sus larvas se desarrollan en restos de vegetales que están en suelo (Salas y Romero, 2012; Anderson, 2002; Kissinger 1964). Sin embargo, la especie *C. crataegi* Walsh o “gorgojo del membrillo”, es barrenador de la semilla del fruto de tejocote *Crataegus mexicana* Moc & Sessé. Este insecto plaga afecta de manera importante al fruto de tejocote, dañando por completo la pulpa, dejándolo inservible para su comercialización y consumo (Núñez *et al.*, 2012). En algunos casos se reporta que el daño puede oscilar entre 40 y 100%, debido a que provocan la caída prematura de los frutos, y aquellos que quedan no presentan calidad comercial, esta situación es común sin la aplicación oportuna de métodos de control (Huerta *et al.*, 2015). El municipio de San Andrés Calpan, Puebla, es el principal productor nacional de Tejocote, que tiene importancia cultural en México en las festividades decembrinas y de día de muertos (Borys & Leszczyńska-Borys, 1994). Pero también es de importancia económica para la agroindustria, debido a que contiene altos niveles de pectina, materia prima que se emplea en la elaboración de productos procesados como jugos, mermeladas, jaleas, entre otros (CESAVEP, 2013). El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de los diferentes estados de desarrollo de *C. crataegi* a lo largo del desarrollo fenológico de *C. mexicana* en campo.

<sup>1</sup> Programa de Fitosanidad. Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados Carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco. <sup>2</sup> Programa de Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional. Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla Km 125.5 San Pedro Cholula. <sup>3</sup> Departamento de Biología FES Zaragoza, México, D.F. <sup>4</sup> Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo Km. 38.5 Carretera México Texcoco, C.P. 56230  
Autor de correspondencia: [zamudio.adriana@colpos.mx](mailto:zamudio.adriana@colpos.mx)

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el municipio de San Andrés Calpan, ubicado en la parte centro-oeste del Estado de Puebla -19° 06'36" N y 98° 23'54" O- (INAFED, 2010). Los muestreos se realizaron quincenalmente durante el periodo de julio de 2013 a julio de 2015 en 12 huertos de tejocote del grupo "Compañía Izta-Popo".

**Búsqueda de larvas de *C. crataegi*.** La detección se realizó de julio de 2013 a julio de 2014, y entre ambos periodos se revisaron 9900 frutos de tejocote. Los frutos se abrieron con ayuda de tijeras manuales para detectar la presencia de larvas de *C. crataegi*. El material biológico que se obtuvo se hirvió durante 2 min para posteriormente conservarlo en alcohol al 70%.

**Búsqueda de pupas.** Entre enero y abril de 2014 y 2015 se realizaron 14 muestreos en suelo para detectar pupas de *C. crataegi*. Para ello se realizaron cuatro hoyos (20 cm de profundidad por 50 cm de ancho) por árbol en cada huerto muestreado, correspondiendo a los cuatro puntos cardinales. El suelo removido se cernió en un tamiz y así se obtuvieron pupas, algunas larvas de último instar y los primeros adultos.

**Búsqueda de adultos.** Entre mayo y julio de 2014 y 2015 se revisó follaje de *C. mexicana*. Al inicio de cada muestreo se observaron ramas y frutos para detectar adultos de éstos curculiónidos y posteriormente se utilizó el método tradicional de muestreo para su captura (González, 1991; González *et al.*, 2002). Lo cual se basa en colocar una manta de tela debajo de la copa de un árbol y sacudirlo para coleccionar adultos y fijarlos en alcohol al 70%.

**Obtención de huevos de *C. crataegi*.** Debido a la dificultad para observar huevos ovipositados por *C. crataegi* en campo, se confinaron 20 parejas de adultos en condiciones de laboratorio (24° C ± 2 y 65 ± 5% HR). Los huevos obtenidos se colocaron sobre una capa de algodón humedecido en cajas Petri de plástico (4 cm de diámetro y 1.5 cm de alto), los cuales se observaron para determinar su tiempo de desarrollo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las primeras larvas se observaron en fruto en los meses de julio a diciembre de 2013 y de igual manera durante julio a diciembre de 2014. Posteriormente continuaron sus registros en suelo hasta

mediados de abril en 2014 y finales de abril en 2015. Originalmente estos muestreos estuvieron dirigidos a la colecta de pupas presentes entre los meses de enero a marzo 2014 y de enero a finales de abril de 2015; sin embargo, durante este tipo de muestreo fue posible coleccionar tres estados de desarrollo de *C. crataegi*: larvas en su último instar, pupas y los primeros adultos, que durante 2014 se encontraron durante la segunda semana de febrero y posteriormente la última semana de marzo.

Al inicio del periodo de lluvias, los adultos se encontraron en follaje durante mayo a julio en 2014 y 2015, dejando en evidencia el daño inicial causado a frutos por la oviposición de las hembras. Estos resultados coinciden con Núñez y colaboradores (2012), quienes mencionan la emergencia de los adultos durante la primera semana de mayo para que posteriormente las hembras perforan el fruto y coloquen sus huevos. Los resultados observados en condiciones de laboratorio con huevos de *C. crataegi*, mostraron una duración de ese estado entre 5 y 7 días en el interior del fruto, coincidiendo con lo reportado por Huerta y colaboradores (2015), que describen la duración del estado de huevo como muy corta con un rango de tres a cinco días en el interior del fruto.

Los frutos de tejocote no siempre correspondieron en maduración con respecto al desarrollo de la larva de *C. crataegi*. Se observó durante la maduración del fruto (septiembre a diciembre), que mucho de este fruto presentaba el daño causado por la larva del barrenador, pero ésta no se encontró en el interior, lo que indica que la larva abandona el fruto antes de que éste alcance la maduración, por lo tanto la presencia de larvas en fruto y suelo se traslapan en esa época. Los estados que presentaron un mayor traslape fueron larvas, pupas y adultos encontrados en suelo, la explicación es que la larva una vez que cae del fruto al suelo, pasa cerca de 5 meses en hibernación en el suelo; sin embargo las pupas y primeros adultos en suelo, son resultado del temprano abandono de frutos que aún no estaban maduros en su totalidad.

Los resultados de esta investigación sugieren que las diferentes etapas de desarrollo de *C. crataegi* que se traslapan, se encuentran con mayor susceptibilidad para ser controladas en campo. El manejo durante esta época en la que el árbol de *C. mexicana* se encuentra en reposo o en el inicio de brotación vegetativa y floración, puede apoyarse en el control cultural, exponiendo al insecto a condiciones no favorables como radiación solar directa, cambios de temperatura, depredadores como aves, pequeños mamíferos u otros insectos, así como el control químico, como un manejo preventivo con la aplicación en follaje de productos autorizados, una vez que los primeros adultos emergen del suelo, con la finalidad de evitar su presencia en fruto y daño provocado al iniciar la oviposición.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de estudios de doctorado (No. de Registro: 175488) del primer autor. A los integrantes del Consejo Académico por el apoyo y observaciones brindadas, así como a los productores de tejocote del grupo “Compañía Izta-Popo” del municipio de San Andrés Calpan, Puebla, México.

## LITERATURA CITADA

- Anderson, R. S. 2002. Curculionidae Latreille 1802. In: R.H. Arnett; M. C. Thomas; P.E. Skelley and J.H. Frank. (Eds.). American Beetles: Polyphaga Scarabaeoidea Through Curculionoidea. Vol. 2 Crc Press LLC, 2000 N.W. Corporate Blvd. Boca Raton, Florida.
- Borys, M.W. and Lesczyńska-Borys, H. 1994. Tejocote (*Crataegus* spp.) planta para solares, macetas e interiores. Revista Chapingo Serie Horticultura 1:95-107
- CESAVEP 2013. Centro de Sanidad Vegetal del Estado de Puebla. En línea: [http://www.cesavep.org/campanias/MFF/mff\\_obj.html](http://www.cesavep.org/campanias/MFF/mff_obj.html). Consultado el 12 de Septiembre de 2013.
- Huerta de la Peña, A.; Rosas, A. M. L.; Morales, J. J.; Pérez, M. A.; López-Olguín, J.F.; Ricardo, H. L.; Núñez, T. R. 2015. El barrenador del fruto del tejocote *Conotrachelus crataegi* Walsh. Colegio de Postgraduados. 31 p.
- Kissinger, D. G. 1964. Curculionidae of America north of Mexico. A key to genera. Taxonomic Publications, South Lancaster. 143 pp.
- Núñez, T. R., Regalado, L. J., Casiano. V. M. A. 2012. Manual del Cultivo del Tejocote (*Crataegus Mexicana*) en Puebla. Colegio de Postgraduados. 51 p.
- Salas-Araiza, M.D. y Romero-Nápoles, J. 2012. Especies de *Conotrachelus* (Coleoptera: Curculionidae: Molytinae) asociadas a guayaba y descripción de una nueva especie. Revista Colombiana de Entomología. 38 (1):124-127 Pp.



## BARRENADORES DE LA SEMILLA DEL AGUACATE (*Persea americana* Mill.) EN LA REGIÓN ESTE DEL ESTADO DE HIDALGO

Areli **Ortega-Licona**<sup>1\*</sup>, Armando **Equihua-Martínez**<sup>1</sup>, Álvaro **Castañeda-Vildózola**<sup>2</sup>, Julio **Sánchez-Ecudero**<sup>1</sup>, Edith G. **Estrada-Venegas**<sup>1</sup>.

### INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill.) pertenece a las plantas angiospermas más antiguas (Galindo-Tovar y Arzate-Fernández, 1999); pertenece a la familia de las lauráceas, junto con la canela, el laurel, y el alcanfor, dentro de las más importantes; esto por su utilización culinaria y medicinal en el mundo (Storey, et al., 1986). En México en cultivo se encuentra distribuido casi en todo el país; la aportación anual del cultivo es de \$20, 715,986.37 miles de pesos (SIAP, 2014a); el estado de Hidalgo ocupa el décimo quinto lugar con una producción de 3,040.30 ton anuales (SIAP, 2014b). En Hidalgo, la producción de aguacate es poco significativa debido a que la producción es seriamente afectada por plagas de régimen legal como *Heilipus lauri* y *Conotrachelus perseae*; en un estudio reciente realizado por Castañeda-Vildózola, (2013) se reportaron a ambas especies compartiendo el mismo nicho ecológico; por lo que se inició el presente estudio para determinar la distribución de ambas especies en el sitio de estudio.

### MATERIALES Y MÉTODOS

**Ubicación del sitio:** El muestreo se realizó de abril 2014 a agosto de 2015 en localidades del municipio de Acaxochitlán, Hidalgo (20°9' 28" N y 98° 12' 5" O; 2,260 msnm). Adicionalmente se realizaron colectas de material de otras localidades con cultivos de aguacate para conocer la distribución y/ presencia de las plagas estudiadas.

<sup>1</sup>Fitosanidad- Entomología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas. El Cerrillo Piedras Blancas Municipio de Toluca, Estado de México; 50200.

Autor de correspondencia: [ortega.areli@colpos.mx](mailto:ortega.areli@colpos.mx)

**Obtención del material biológico y cría de insectos:** la recolecta se enfocó en dos variedades disponibles de aguacate: Hass y criollo. En cada árbol se ubicaron cuatro puntos cardinales y se tomaron de 4 a 5 frutos por punto cardinal (=16 a 20 frutos por árbol), los cuales se trasladaron al

laboratorio de Fitosanidad forestal del Colegio de Postgraduados campus Montecillo. Los frutos se colocaron individualmente en frascos transparentes de 20 centímetros (cm) de diámetro y 15 cm de alto; al fondo de cada frasco se puso 2 cm de tierra como sustrato. Los frascos se cubrieron con tela tul con ligas para evitar que los insectos que emergieran pudieran escapar.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo la siguiente distribución (Cuadro 1.), en donde también se muestra la distribución del hospedero. El 80% del total de árboles muestreados en la región de estudio predomina la variedad criolla, el 20% está conformado por variedades mejoradas (Hass) ya que la superficie sembrada en las localidades de estudio no supera más de una hectárea del cultivo como establecimiento de huertos comerciales.

**Cuadro 1.** Presencia de *H. lauri* y *C. perseae* en la región de estudio y distribución de variedades de aguacate en la zona de estudio.

Estado	Localidad	msnm	presencia			
			<i>H. lauri</i>	<i>C. perseae</i>	Hass	Criollo
Hidalgo	San Juan Acaxochitán	1660	*	*	&	&
	San Francisco Acaxochitlán	1780	*	*	&	&
	Santa Catarina Acaxochitán	2100	*	*	&	&
	Tochtla Acaxochitlán, Hidalgo	1840	*	*		&
	San Pedrito Agua Blanca	1850	*			&
	Potrero de Monroy Agua Blanca	1800	*			&
Puebla	Chiagtla Naupan	1880	*	*	&	&
	Tlachpanaloya Naupan	1640	*	*	&	&
	Chachahuantla Naupan	1813	*	*	&	&
Veracruz	El chiflon Zacualpan	1680	*			&
	Tlachiquillo Zacualpan	1740	*	*		&
	Zacualpan	670	*			&

msnm: metros sobre nivel del mar.

\* Distribución de los insectos estudiados en la región.

& Distribución del cultivo.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento otorgado para la realización de este estudio.

**LITERATURA CITADA**

- Castañeda-Vildozola, A., Franco-Mora, O., Pérez-López, D., Nava-Díaz, C., Vâldez-Carrasco, J., & Vargas-Rojas, L. (2013). Association of *Heilipus lauri* Boheman and *Conotrachelus perseae* Barber (Coleoptera : Curculionidae) on Avocado in Mexico. *BioOne*, 67(2), 116–118. doi: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1649/0010-065X-67.2.116>
- Galindo-Tovar, M. E., & Arzate-Fernández, A. M. (1999). Consideraciones sobre el origen y primera dispersión del aguacate (*Persea americana*, Lauracea). *Cuadernos de Biodiversidad*, 11-15.
- SIAP. (2014a). Cierre de la producción agrícola por cultivo. *Producción Agrícola*. Retrieved September 14, 2015, Obtenido de: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>
- SIAP. (2014b). Cierre de la producción agrícola por estado. *Producción Agrícola*. Retrieved September 14, 2015, Obtenido de: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
- Storey, W. B., Bergh, B., & Zentmyer, G. A. (1986). The origin, indigenous range, and dissemination of the avocado. *California Avocado Society 1986 Yearbook*, 70, 127-133.

## BIOLOGÍA E IDENTIFICACIÓN DE CHICHARRITAS (HEMIPTERA: CICADELLIDAE) EN AGUACATE EN ESTADO DE MORELOS

Rosa M. de G. **Quezada Daniel**<sup>1</sup> Néstor **Bautista Martínez**; **Error! Marcador no definido.** Jorge **Valdez Carrasco**<sup>Error! Marcador no definido.</sup>, María G. **González Santarosa**<sup>2</sup>, **Ciro L. Turcios Palomo**<sup>3</sup>,  
Angel **Lagunes Tejeda**<sup>1</sup>

### INTRODUCCIÓN

El aguacate es el tercer producto agrícola de importancia económica en México. A nivel mundial, México es el principal productor y exportador de aguacate al aportar el 31.3 % a la producción mundial y el 47% a las exportaciones (FAOSTAT, 2014). Este fruto representa una fuente importante de ingresos económicos y es un gran generador de empleos (Téliz y Marroquín, 2007). El estado de Michoacán ocupa el primer lugar en la producción de esta fruta, le siguen Jalisco, Estado de México, Nayarit y Morelos (SIAP, 2014). Aunque el estado de Morelos solo aporta el 2% de la producción nacional (SIAP, 2014), su cultivo representa una actividad importante en el impulso de la búsqueda de nuevos y selectos mercados.

La producción de aguacate a nivel nacional presenta problemas fitosanitarios, la mayoría asociadas a plagas insectiles. Las chicharritas son consideradas plagas secundarias en aguacate (González et al., 2000) que además de causar daño directo a la planta al alimentarse, representan un riesgo, ya que poseen la capacidad de transmitir fitopatógenos (Backus, 1985; Nielson, 1968).

Las chicharritas pertenecen a la familia Cicadellidae, grupo abundante y diverso que abarca 20,000 especies descritas (Dietrich, 2005). La chicharrita *Idona minuenda* (Triapitsyn, 2000) es la única especie reportada como plaga secundaria de aguacate (González et al., 2000). En México, a pesar de ser el aguacate de gran importancia económica, son escasos los estudios relacionados a chicharritas y, con la finalidad de contribuir al conocimiento de estas especies, se planteó como objetivo realizar la identificación de especies chicharritas asociadas al aguacate y caracterizar los daños que causa en hojas y brotes de aguacate.

<sup>1</sup>Colegio de Posgraduados, Campus Montecillos, Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillos, Texcoco, Estado de México, CP 56230

<sup>2</sup>Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo, Estado de México, CP 56230

<sup>3</sup>Helm de México, S.A. Protón No. 2 Col. Parque Ind. Naucalpan Naucalpan, Estado de México, CP 53489

Autor de correspondencia:

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Sitio de estudio.** Para este estudio se colectaron chicharritas en 6 huertas ubicadas en el municipio de Tetela del Volcán, Morelos. La primera huerta se localiza en la localidad San Miguel (N 18° 50'27.204" W 98° 44'46.895", 1962 msnm). La segunda huerta en la localidad de Potrero de León (N 18° 51'5.320" W 98°44'11.615", 2089 msnm); la tercera huerta está en la localidad de El calabazo (N 18° 52'5.3252" W 98°44'5.244", 2195 msnm); la cuarta huerta en localidad de Xochicalco (N 18°53'26.628" W 98°44'21.66", 2089 msnm); la quinta huerta se ubica la localidad de Tlamimilulpan (N 18°55'21.216" W 98°44'40.731", 2423 msnm); la sexta huerta en la localidad de Coaco Chico (N 18°55'7.896" W 98°42'16.379", 2598 msnm). Las huertas tenían árboles de 5 a 8 años de edad, con una altura de 2 a 3 m.

**Colecta de especímenes y determinación.** El método de colecta fue directo, con un aspirador bucal y aspiradora de gasolina. La aspiración se realizó en fruto, hojas, brotes, ramas y tronco. Los ejemplares se preservaron en alcohol 70%. Para la identificación de especies se utilizó la genitalia del macho, la cual se maceró en KOH al 10%, a 80°C por 3 minutos y se deshidrató en alcoholes 70%, 90% y 100%, se aclaró en xilol y se montó en laminillas con bálsamo de Canadá.

Para la identificación de las muestras se siguió las claves taxonómicas propuestas por Guillette (1898), Young (1952), DeLong (1952,1954), Ruppel & DeLong (1952, 1953), Dietrich (2005). El material fue corroborado por el Dr. Dmitriev, especialista de la Universidad de Illinois en Urbana Champaign. EUA. Ejemplares de cada una de las especies identificadas fueron montados, etiquetados y depositados en la Colección entomológica del Colegio de Posgraduados (CEAM).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el estudio se identificó a cinco especies asociadas al cultivo del aguacate, todas ubicadas dentro de la subfamilia Typhlocybae, representada por 3 tribus y 4 géneros. De las cuales se colectaron 5527 individuos.

La especie con mayor presencia fue *J. krausi* con 50.10 % del total de individuos colectados de tiflocibinaes, seguido por *Idona minuenda* con 25.27% y *E. deskina* con 18.87%.

Tribu	Género	Especie	No de individuos	Presencia
<b>Dikraneurini</b>	<i>Idona</i>	<i>minuenda</i>	1,388	Oct 14- Oct15
	<i>Alconeura</i> ( <i>Hyliodea</i> )	<i>candida</i> (Ruppel & DeLong 1952).	36	marzo 15
<b>Jorumini</b>	<i>Joruma</i>	<i>krausi</i> (Ruppel & DeLong 1953)	2,769	Junio 15-agosto15
<b>Empoascini</b>	<i>Empoasca</i>	<i>angustella</i> (DeLong 1952)	291	Mayo 15-junio 15
		<i>deskina</i> (DeLong & Guevara 1954)	1043	Mayo 15-junio 15

**Cuadro1. Diversidad de especies de cicadélidos de la subfamilia Typhlocybinae asociadas a aguacate.**

Las chicharritas poseen un aparato bucal compuesto por estructuras tubulares (estiletos) que les permite perforar y succionar la savia de los tejidos vegetales; con ello ocasionan dos tipos de daños directos, denominados “hoppenbug” y “stippling”, a causa de su mecanismo de alimentación (Backus 1985); ambos daños están relacionados con la presencia de tiflocibines, daños que pudieron detectarse en árboles de aguacate con presencia de chicharritas. Sin embargo, en altas densidades, como se presentó *J. krausi* y ambas empoascas (Cuadro 1), los cicadélidos son una plaga potencial (Catalano, 2010) al presentar daños que disminuyen en el vigor y rendimiento de los cultivos (Chelliah & Basheer, 1965).

Por otra parte, la importancia de la familia Cicadellidae radica en su capacidad para la transmisión de agentes fitopatógenos (Ammar & Nault, 2002), lo que representa una amenaza para la agricultura. Aún cuando los tiflocibines es un grupo diverso de cicadélidos pequeños y frágiles, incluye a numerosas especies descritas como vectores de los géneros *Empoasca*, *Erythroneura* y *Typhlocyba* (Triplehorn & Johnson, 2005). Las especies identificadas en el trabajo no se han descrito como vectores en ningún cultivo.

Se reporta por primera vez a: *J. krausi*, *E. deskina*, *E. angustella* y *A. candida* como nuevo registro para aguacate. La especie de *Idona minuenda* ya ha sido reportada como plaga secundaria del aguacate (González *et al.*, 2000). La identificación de cicadélidos a nivel de especie se considera como primer aspecto para poder continuar con el desarrollo de estudios posteriores que nos permitan establecer medidas de prevención y control.

## AGRADECIMIENTO

A D. Dmitriev (INHS, USA), por la corroboración del material determinado. El autor principal agradece el financiamiento de los estudios de posgrado al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

## LITERATURA CITADA

- Ammar, E. D., and L. R. Nault. 2002. Virus transmission by leafhoppers, planthoppers and treehoppers (Auchenorrhyncha, Homoptera). *Advances in botanical Research*. Vol 36. Elsevier Science 141-167.
- Backus, A. E. 1985. Anatomical and sensory mechanism of planthopper and leafhopper feeding behavior. Pp. 163-194. En Nault L y Rodríguez J (Eds). *The leafhoppers and planthoppers*. John Wiley y sons. New York.
- Backus, A. E., M. S. Serrano, and C. M. Ranger. 2005. Mechanism of hopperburn: an overview of insect taxonomy, behavior and physiology. *Annual Review Entomology* 50: 125-151.
- Catalano, M. I., M.E Brentassi, S.L. Paradell, A.M.M. Remes de Lenicov. 2010. First record of the genus *Zygina* a Neotropical región on *Populus spp.*: Taxonomic and biological characteristics. *Journal of Insect Science*. II: 88
- Chelliah, S, and M. Basheer. (1965). Biological studies of *Peregrinus maidis* (Ashmead) (Araeopidae: Homoptera) on sorghum. *Indian J Entomol* 27:466-471.
- DeLong, D. M. 1952. Studies the genus *Empoasca* (Homoptera, Cicadellidae). XII. New species of Mexican *Empoasca*. *Ohio Jour. Sci.* 52(3): 165-168.
- DeLong, D. M., and J. C. Guevara. 1954. Studies of the genus *Empoasca*. XII. Seven new species of Mexican *Empoasca* (Homoptera: Cicadellidae). *Ohio Jour. Sci.* 54(2):79-82
- Dietrich, C.H. 2005. Keys to the families of Cicadomorpha and subfamilies and tribes of Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha). *Fla Entomol.* 88: 502-517.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT) 2014. Producción Mundial del aguacate. Disponible en: [http:// faostat3.fao.org/download/Q/QC/S](http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/S)
- González, H.H., R. Johansen N., L. Gazca C., A. Equihua M., A. Salinas C., E. Estrada V., F. Durán A. y A.R. Valle P. 2000. Plagas del aguacate. pp 117-136. In: D. Téliz O. (Ed). *El aguacate y su manejo integrado*, Mundi-Prensa Librps. México.
- Guillette C.P. 1898. American Leafhopper of the subfamily Typhlocybinae. *Proc. U.S. Nat. Mus.* 20 (1138):709-773.
- Ruppel, R.F., & D. M. DeLong .1952. The Hyloidea of Mexico (Homoptera: Cicadellidae) *Bull. Brooklyn Entomol. Soc.* 47:107-112.
- Ruppel, R.F., & D. M. DeLong. 1953. Four new species of *Joruma* From México (Homoptera: Cicadellidae). *Ohio Jour. Sci.* 53(6):340-342-
- SAGARPA-SIAP (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación-Sistema de Información Agrícola y Pecuaria. 2014. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx>
- Téliz, O. D, y F. J. Marroquin P. 2007. Importancia Histórica u Socioeconómica del aguacate. 3-28. In: *El aguacate y su manejo integrado*. Téliz D. y Mora A. (coordinadores). Segunda Edición. Editorial Mundi- Prensa. México D.F. 321 p.
- Triplehorn, C.A., & N. F. Johnson. 2005. *Borrer and DeLong's introduction to the study of insects*. 7ed. Ed. Cengage Learning. P.864
- Young, D.A. 1952. A reclassification of Western Hemisphere Typhlocybinae (Homoptera: Cicadellidae). *Univ. Kansa Sci. Bull.* 35(1:1):3-217.



## HORMIGAS ASOCIADAS A ESCAMAS (HEMIPTERA: COCCOIDEA) EN FRUTALES DE GUERRERO

Hernández-Ruiz Artemio<sup>2</sup>, González-Hernández Héctor<sup>1</sup>, Romero-Nápoles Jesús<sup>1</sup>, Solís-Aguilar Juan Fernando<sup>2</sup>, Lomelí-Flores José Refugio<sup>1</sup> y Rodríguez-Leyva Esteban<sup>1</sup>

### INTRODUCCIÓN

En el mundo se han descrito aproximadamente 8,000 especies de insectos escamas, agrupadas en 32 familias pertenecientes a la superfamilia Coccoidea. Los cocoideos succionan savia del árbol, causando retraso en el crecimiento, clorosis y deformación del follaje y frutos; además, los ataques severos de estos organismos pueden secar completamente ramas o el árbol completo (Miller y Ben-Dov, 2013). Por otro lado, se reportan alrededor 13,000 especies de hormigas a nivel mundial y de éstas, 973 especies se encuentran en México. Las hormigas han colonizado diversos hábitats terrestres, que incluyen una variada alimentación como semillas, hongos, néctar, tejido vegetal y carne. Otra fuente de alimento la obtienen de asociaciones con insectos como las escamas o los áfidos. Esto dificulta el manejo de estas plagas en árboles frutales, ya que interfieren con su control natural y biológico, también contribuyen a su dispersión y les procuran la remoción de secreciones para evitar contaminación fúngica, aumentando con ello la tasa de natalidad en la colonia de los insectos escama (Delabie y Fernández, 2003; Vásquez, 2015).

La fruticultura es una actividad de gran impacto económico y social en muchas regiones. En el estado de Guerrero se ocupan más de 170 mil hectáreas entre el cultivo del cocotero, café, mango, limón, aguacate y plátano (SIAP, 2014). Ante la importancia económica de la actividad frutícola para Guerrero, la vulnerabilidad de ésta al ataque por cocoideos plagas y la relación mutualista que estas presentan con las hormigas, el presente trabajo planteó identificar las especies de hormigas asociadas a las escamas plagas de varias especies de frutales cultivadas en el Estado de Guerrero.

<sup>1</sup>Fitosanidad- Fitopatología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El área de estudio incluyó algunos municipios del estado de Guerrero con zonas agrícolas en donde una o varias especies de frutales tienen impacto económico, o bien, que éstas sean endémicas de cierta área. El periodo de recolecta fue en Primavera-Verano de 2014 y 2015, tratando de cubrir la mayor superficie, sistemas de producción y especies de frutales. En huertos comerciales se seleccionaron de 5 a 10 árboles infestados por predio, mientras que en predios no comerciales como huertos de traspatio y áreas urbanas, se revisaron minuciosamente todos los árboles del sitio. En todos los muestreos se cortaron hojas, brotes, frutos o ramas con presencia de insectos escama. Este material se colocó individualmente en bolsas de tela de organza de 90 x 50 cm con su respectiva etiqueta. El material se trasladó al Laboratorio de Plagas de Frutales del Colegio de Postgraduados para su procesamiento.

Las muestras se revisaron bajo microscopio estereoscópico, se separaron las escamas de las partes vegetativas con ayuda de una pinza entomológica y se colocaron en frascos etiquetados con alcohol al 70% para su preservación. La recolecta de hormigas se hizo de manera directa de los árboles con ayuda de un pincel (No. 0) de cerdas de pelo de camello. Para esto se realizó una inspección ocular alrededor del árbol de un tiempo no menor a 10 min, dirigida a las ramas y brotes infestados con colonia de escamas. Se consideró que existía una asociación simbiótica cuando las hormigas mostraban un comportamiento de protección y/o cuidado con la colonia de cocoideos. Los individuos de las hormigas recolectadas se colocaron en frascos etiquetados con alcohol al 70% para su conservación. Los insectos escama se montaron con la metodología propuesta por Kosztarab (1963). La identificación de las escamas a familia se realizó mediante la ayuda de un microscopio compuesto y siguiendo las claves interactivas disponibles en la red (USDA, 2013). Las hormigas se montaron en triángulos en alfileres y mediante las claves propuestas por Mackay y Mackay (1989) y Mackay (2003) se identificaron a especie, parte de este material se depositara en la colección de insectos del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, México.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Durante el periodo de recolectas se revisaron más de 30 especies de frutales y sólo en 16 se encontraron hormigas asociadas a las escamas. En los cítricos se presentaron con mayor frecuencia hormigas y escamas, seguido del mango var Manila (Cuadro 1). Debido a los hábitos alimentarios de las escamas, las partes vegetativas de los frutales donde se recolectó la mayor diversidad de hormigas

fueron los brotes y hojas. Al comparar lo encontrado por Vásquez (2015), en este estudio se tienen cuatro nuevos registros de hormigas para el país como son; *Brachymyrmex longicornis* Forel, 1907, *Brachymyrmex longicornis* var. *immunis* Forel, 1908, *Camponotus mucronatus* Emery, 1890 y *Wasmannia auropunctata* subsp. *brevispinosa* Borgmeier, 1928. Las especies *Tapinoma melanocephalum* Fabricius, 1793, *Camponotus rectangularis rubroniger* Forel, 1899, *Dorymyrmex smithi* Cole, 1936 y *Trachymyrmex arizonensis* Wheeler, W.M, 1933 son nuevos registros para Guerrero. Siete de las especies antes mencionadas presentaron asociaciones con escamas de la familia Coccidae, tres en Pseudococcidae y una en Diaspididae. La asociación hormiga-cocoideos ocurrió en alrededor del 30% de las colonias encontradas (80 muestras), lo que demuestra la importancia de considerar el rol de las hormigas dentro de un manejo integrado de plagas en frutales, tal como lo recomienda Ripa *et al.*, (2008). Sin embargo, ejemplares de las 13 diferentes especies, subespecies de hormigas encontradas, se recolectaron en los huertos de traspatio, zonas urbanas y en policultivos en donde no se realiza ningún tipo de manejo químico, lo que resulta convincente de acuerdo con Altieri (1995), quien establece que en estos nichos ecológicos existe poco disturbio por el hombre y por ende se encuentra una mayor diversidad biológica y equilibrio entre las especies. Existen tres familias de cocoideos asociadas a hormigas, siendo Coccidae la que presentó el mayor porcentaje de asociación (30%) con una diversidad de 10 especies de total, seguido por Pseudococcidae con 20% (seis especies) y Diaspididae con 9% (tres especies).

Estos resultados coinciden con lo analizado por Delabie y Fernández (2003), quienes reportan que las familias pertenecientes a la superfamilia Coccoidea, solamente en Coccidae y Pseudococcidae son comunes las interacciones trofobioticas con hormigas. Mientras que en Diaspididae son raras y cuestionables por falta de documentación, además que estos insectos son incapaces de liberar mielecilla y los desechos en su mayoría los emplean para la formación de su escudo protector. La especie de hormiga Azteca velox es la que mostró una mayor dispersión en el estado, encontrándose principalmente en huertas comerciales de mango var Manila. Esta hormiga se recolectó en la mayoría de especies frutícolas y se asocia a las familias Coccidae, Pseudococcidae y Diaspididae, debido a que no se tiene un manejo para esta especie de hormigas en los huertos, ha propiciado las condiciones para que existan numerosas colonias en un predio y se vea como una plaga emergente.

## AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar los estudios de doctorado. Del mismo modo a la M.C. Karla Yolanda Flores Maldonado (UAT-FIC) y a James C. Trager Ph.D. (Missouri Botanical Garden, St. Louis), por la identificación y corroboración de las especies de hormigas.

## LITERATURA CITADA

- Altieri, A. M. 1999. Agroecología: Bases Científicas Para Una Agricultura Sustentable. Primera Edición. Nordan-Comunidad. Montevideo. 338 p.
- Delabie J.H.C y Fernández F. Relaciones entre hormigas y «Homópteros» (Hemiptera: Sternorrhyncha y Auchenorrhyncha) In: Fernández F. (ed.). 2003. Introducción a las Hormigas de la región Neotropical. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia. pp: 181-192.
- Kosztarab, M. 1963. The armored scale insect of Ohio (Homoptera: Coccoidea: Diaspididae). Bull. Ohio, Biol. Survey, Ohio St. Univ. 2(2): 120 p.
- MacKay, W. P., and E. E. MacKay. 1989. Clave de los géneros de hormigas en México (Hymenoptera: Formicidae. II Simposio Nacional de Insectos Sociales [México]. pp: 1-82.
- Mackay, W.P. 2003. The ants of the new world. En: <http://www.utep.edu/LEB/antgenera.htm>. Fecha de consulta: 22/09/2015.
- Miller, D.R., and Ben-Dov, Y. 2013. Escalenet: database of the scale insects of the world. En: <http://www.sel.barc.usda.gov/scalenet/scalenet.htm>. Fecha de consulta: 25/10/13.
- Ripa, R., Larral, P., Rodríguez, F y Luppichini, P. 2008. Importancia y manejo de hormigas en al MIP: En Manejo de plagas en paltos y cítricos. pp: 272-282.
- SIAP. 2014. Cierre de la producción agrícola por estado. En: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado>. Fecha de consulta: 15/10/15.
- USDA Agricultural Research Service. 2013. Claves de identificación y descripciones de las escamas y cochinillas. En: <http://www.sel.barc.usda.gov/ScaleKeys/Scale>. Fecha de consulta: 14/11/13.
- Vásquez, B.M. 2015. Taxonomía de Formicidae (Hymenoptera) para México. Métodos en Ecología y Sistemática. 10(1): 53p.

Cuadro 1. Especies de frutales (hospederos), hormigas, familia de escama y sitios donde se realizaron las recolectas en el Estado de Guerrero.

HOSPEDERO	MUNICIPIO/LOCALIDAD	COORDENADAS	ESPECIE DE HORMIGA	FAMILIA ESCAMA
<i>Annona muricata</i>	Cocula/Colonia Obregón	18°16'03"N, 99°38'49" W	<i>Crematogaster crinosa</i> Mayr, 1862	Coccidae
	Petatlan/ Ocote de Cadena	17°36'49"N, 101°13'41"W	<i>Cephalotes umbraculatus</i> Fabricius, 1804.	Coccidae
	Petatlan/ Ocote de Cadena	17°36'49"N, 101°13'41"W	<i>Camponotus novogranadenis</i> Mayr, 1870.	Coccidae
<i>Averrhoa carambola</i>	Petatlan/ La Barranca	17°36'33"N, 101°12'29"W	<i>Azteca velox</i> Forel, 1899.	Coccidae
	Petatlan/ La Barranca	17°36'33"N, 101°12'29"W	<i>A. velox</i>	Coccidae
<i>Citrus limon</i>	San Marcos/ La Maquina	16°46'15"N, 99°11'43"W	<i>Brachymyrmex longicornis</i> var. <i>immunis</i> Forel, 1908†.	Coccidae
<i>Citrus paradisi</i>	Tetipac/ Palos Verdes	18°37'50"N, 99°36'39"W	<i>Cr. crinosa</i>	Coccidae
	Petatlan/ La Barranca	17°36'33"N, 101°12'29"W	<i>Camponotus mucronatus</i> Emery, 1890†, <i>Ce. umbraculatus</i> ,	Coccidae
Petatlan/ La Barranca	17°36'33"N, 101°12'29"W	<i>Tapinoma melanocephalum</i> Fabricius, 1793¶ y <i>A. velox</i>	Coccidae	
<i>Citrus reticulata</i>	Petatlan/ La Barranca	17°36'33"N, 101°12'29"W	<i>Br. longicornis</i> var. <i>immunis</i>	Coccidae
<i>Citrus sinensis</i>	Petatlan/ La Barranca	17°36'33"N, 101°12'29"W	<i>Azteca velox</i> Forel, 1899.	Coccidae
<i>Coffea arabica</i>	Petatlan/ Ocote de Cadena	17°36'49"N, 101°13'41"W	<i>Brachymyrmex longicornis</i> Forel, 1907†.	Coccidae
<i>Mangifera indica</i> Var Manila	Tecpan de Galeana/ El Llano	17°16'20"N, 100°53'49"W	<i>A. velox</i>	Coccidae
	Petatlan/ Colonia el Olivo	17°32'52"N, 101°16'32"W	<i>Camponotus rectangularis rubroniger</i> Forel, 1899¶	Coccidae
	Petatlan/ Colonia el Olivo	17°32'52"N, 101°16'32"W	<i>T. melanocephalum</i>	Coccidae
<i>Morinda citrifolia</i>	Petatlan/ La Barranca	17°36'33"N, 101°12'29"W	<i>A. velox</i>	Coccidae
	Petatlan/ Ocote de Cadena	17°36'49"N, 101°13'41"W	<i>Wasmannia auropunctata</i> subsp. <i>brevispinosa</i> Borgmeier, 1928†.	Coccidae
<i>Psidium guajava</i>	Chilpancingo/ Col. Centro	17°32'45"N, 99°29'58"W	<i>Br. longicornis</i> var. <i>immunis</i>	Coccidae
	Petatlan/ Ocote de Cadena	17°36'49"N, 101°13'41"W	<i>Ca. novogranadensis</i> Mayr, 1870.	Coccidae
	Florencio Villareal/ La Vainilla	16°43'15"N, 99°09'18"W	<i>A. velox</i> y <i>Cr. crinosa</i>	Coccidae
<i>Spondias purpurea</i>	Petatlan/ La Barranca	17°36'33"N, 101°12'29"W	<i>A. velox</i>	Coccidae
	Petatlan/ Colonia el Olivo	17°32'52"N, 101°16'32"W	<i>Cr. crinosa</i>	Coccidae
<i>Averrhoa carambola</i>	Petatlan/ La Barranca	17°36'33"N, 101°12'29"W	<i>A. velox</i>	Diaspididae
<i>Citrus limetta</i>	Petatlan/ Ocote de Cadena	17°36'49"N, 101°13'41"W	<i>A. velox</i>	Diaspididae
<i>Citrus limon</i>	San Marcos/ Las Lomitas	16°46'33"N, 99°11'43"W	<i>Dorymyrmex smithi</i> Cole, 1936¶.	Diaspididae
<i>Citrus paradisi</i>	Petatlan/ La Remonta	17°34'38"N, 101°16'54"W	<i>A. velox</i> Forel	Diaspididae
	Florencio Villareal/ La Vainilla	16°43'15"N, 99°09'18"W	<i>Cr. crinosa</i>	Diaspididae
<i>Citrus sinensis</i> Var Valencia	Cocula/Colonia Obregón	18°16'03"N, 99°38'49"W	<i>A. velox</i>	Diaspididae
<i>Citrus sinensis</i>	Petatlan/ La Barranca	17°36'33"N, 101°12'29"W	<i>A. velox</i>	Diaspididae
<i>Cocos nucifera</i>	Petatlan/ La Barranca	17°36'33"N, 101°12'29"W	<i>Cr. crinosa</i>	Diaspididae
<i>Mangifera indica</i> Var Manila	San Jerónimo/ El Toro	17°09'25"N, 100°28'31"W	<i>A. velox</i>	Diaspididae
<i>Psidium guajava</i>	Florencio Villareal/ La Vainilla	18°37'50"N, 99°36'39"W	<i>Cr. crinosa</i>	Diaspididae
<i>Ananas comosus</i>	Petatlan/ Ocote de Cadena	17°36'49"N, 101°13'41"W	<i>Trachymyrmex arizonensis</i> Wheeler, W.M, 1933¶.	Pseudococcidae
<i>Carica papaya</i> Var Maradol	Florencio Villareal/ El Llano	16°43'15"N, 99°09'18"W	<i>D. smithi</i>	Pseudococcidae
<i>Citrus paradisi</i>	Petatlan/ La Barranca	17°36'33"N, 101°12'29"W	<i>Ca. mucronatus</i> , <i>Ce. umbraculatus</i> y <i>A. velox</i>	Pseudococcidae
<i>Tamarindus indica</i>	Florencio Villareal/ La Vainilla	17°36'49"N, 101°13'41"W	<i>Camponotus rectangularis willowisi</i> Wheeler, W.M, 1933.	Pseudococcidae

† Nuevo registro para México

¶ Nuevo registro para Guerrero

## PROCEDIMIENTO PARA LA FIJACIÓN DEL COLOR EN EL GUSANO ROJO DE MAGUEY

Enhé Millán-Mercado<sup>1</sup>, Celina Llanderal-Cazáres<sup>1</sup>, Jorge Valdez-Carrasco<sup>1</sup>

### INTRODUCCIÓN

*Comadia redtenbacheri* Hammerschmidt, es conocido en su etapa juvenil como gusano rojo del maguey y en varios estados del centro de México es utilizado como alimento por los habitantes de zonas rurales, también se ha llegado a comercializar a precios altos en las zonas urbanas para la industria de restaurantes y licores (Hernández- Livera *et al.*, 2005). La larva madura presenta una coloración rojo intenso en los últimos instares que son los que se consumen intensivamente (Ramos- Elorduy, 2006). El gusano rojo es un producto que tiene una gran importancia en la industria mezcalera de exportación, por ejemplo, el mercado chino solicita que tenga al menos 20 gusanos por botella (Encabo, 2000). La fuente de abastecimiento principal de larvas de *C. redtenbacheri* es la colecta silvestre y la sobreexplotación de éstas ha llegado a poner en riesgo su reproducción (Yen, 2009; Llanderal-Cázares *et al.*, 2007). Sin embargo, las larvas incluidas en las botellas pierden su coloración natural al ser expuestas a diferentes concentraciones de alcohol sin un procedimiento previo de fijación, lo que demerita su aspecto físico, además de que en ocasiones hay un degradación de los tejidos que al quedar como residuos en el fondo de las botellas desmerece la calidad y aceptación del producto, lo que ha causado restricciones de diversos países para su exportación (Anónimo, 2011). El valor de exportación del mezcal ha llegado a ser de 97 millones de dólares, productos de la venta de 4.8 millones de litros en Estados Unidos, Inglaterra, España, Italia, Taiwán y Turquía, entre otros. Esta actividad genera alrededor de 30 mil empleos, de los cuales 5,270 son directos. Oaxaca es el principal exportador al generar el 54 % del total nacional, el segundo lugar lo ocupa Zacatecas con 45.3% de la producción, mientras que Durango y Guerrero producen el 0.3% restante.

<sup>1</sup>Fitosanidad- Fitopatología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

Autor de correspondencia: (jvaldez@colpos.mx)

Los mezcales más demandados en el extranjero es el joven abocado con gusano, joven con gusano, reposado y reposado con gusano, que en conjunto representan el 93 % del mezcal exportado (SRE, 2014).

Es importante conocer un procedimiento de fijación que reduzca o evite las modificaciones *post mortem* y garantice la integridad de las estructuras morfológicas, así como la coloración de la larva en almacenamiento, para su posterior comercialización a nivel nacional e internacional. El objetivo de este trabajo fue evaluar la conservación y textura mediante diferentes métodos para la preservación de las larvas en distintos grados de alcohol, para lo cual se requirió previamente conocer la histología de larvas completamente desarrolladas, con objeto de tener una referencia de la estructura de los diferentes órganos y tejidos en individuos sanos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material biológico.** Para la realización de este trabajo el material fue adquirido en la localidad de San Juan Tianguistongo, municipio de Hueypoxtla, situada a 2500 metros de altitud en el Estado de México, dicho material fue entregado el 12 de noviembre del 2014 al Colegio de Posgraduados, campus Montecillo, en el laboratorio de Fisiología de Insectos. Cada larva se midió y se realizó una selección cuantitativa y cualitativa, considerando origen de la muestra, color, consistencia, movilidad e instar de los ejemplares, posición y tipo de lesiones presentes en el cuerpo basados en el procedimiento para el control del establecimiento de pie de cría (Zetina *et al.* 2011). Para este experimento se requirió un total de 360 ejemplares, de los cuales se seleccionaron los que se encontraban en sexto y séptimo instar, usualmente estos son utilizados para comercialización en alimentos y bebidas.

Se realizaron cinco tratamientos: 1) Mezcal solo, de la marca comercial Gusano Rojo<sup>®</sup>, 2) Alcohol 70% (técnica utilizada para preservar insectos (Patin, 1964), 3) Serie ascendente de alcoholes (se utilizó alcohol de caña y los cambios se realizaron cada siete días), 4) Vinagre blanco-alcohol 40% (se empleó vinagre blanco La Costeña<sup>®</sup> donde permanecieron por un periodo de 24 h, se retiraron y se conservaron en alcohol 40% para posteriormente ser pasados a mezcal), 5) Congelación. Cada uno cuenta con un testigo. Todos los tratamientos se colocaron en frascos de vidrio Gerber<sup>®</sup> de 100 mL.



**Preparación de las larvas.** Se distribuyeron 36 larvas por tratamiento, divididas en tres grupos de 12 individuos, los cuales fue sacrificado mediante inmersión en agua a 80 °C por cinco minutos, colocados en los frascos correspondientes al tratamiento previamente preparado y rotulado para su almacenamiento. Como excepción, el tratamiento de larvas congeladas se almacenó en bolsas de plástico Ziploc® (16.5 cm x14.9 cm), que se mantuvieron en el congelador de un refrigerado Mabe. Se evaluaron las variables de color y consistencia de las larvas en cada uno de los tratamientos durante un periodo de ocho meses.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las larvas fueron revisadas periódicamente para observar el comportamiento en los diversos tratamientos, que se muestran en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Efectos de los tratamientos en larvas de *Comadia redtenbacheri*.

Tratamiento	Color (%) /Consistencia		
	Rojo	Rosa	Blanco
Mezcal solo	0.0	0.0	100/R
Alcohol 70 %	0.0	41.66/R	58.33/R
Serie ascendentes de alcoholes	0.0	0.0	100/R
Vinagre -alcohol 40%	0.0	0.0	100/E
Congelación	0.0	100/E	0.0

Parámetros utilizados para la evaluación de la variable de consistencia: (E) Excelente, larvas turgentes, (R) Regular, con poca firmeza, y (M) Mala, con flacidez

**Color.** Las larvas se comportaron de una forma similar en los tratamientos, con pérdida paulatina de la pigmentación en los primeros dos meses. En ninguno de los tratamientos se conservó el color rojo característico de las larvas de esta especie, sin embargo en menos de la mitad de las larvas incluidas en alcohol 70 y en la totalidad de los individuos congelados conservaron un tono rosado. En los tratamientos de mezcal solo y la serie ascendente de alcohol, el color se perdió totalmente y se mantuvo en poco menos de la mitad de los individuos en alcohol 70%. En todos los casos el testigo, presentó pérdida de color

**Consistencia.** La turgencia de las larvas se mantuvo completamente en los tratamientos de vinagre y congelación, mientras que en las incluidas en Mezcal, las series ascendentes y

alcohol 70%, se presentó flacidez del cuerpo. En el caso de los insectos, la inclusión en alcohol 70 % es usada para la preservación de tejidos para distintos estudios entomológicos (Pantin, 1964), pero la conservación con fines de consumo humano de los insectos como alimento, no ha sido desarrollada. En el caso concreto de la inclusión de las larvas en mezcal, la falta de procedimientos para la conservación de éstas, ha propiciado problemas en la exportación de ésta bebida.

Con base en este trabajo se recomienda el proceso de congelación de larvas que previamente fueron sometidas a un proceso de fijación de tejido, mediante la inmersión en agua caliente para su inclusión en botellas de mezcal de manera que incremente la calidad del producto y la vida de almacenamiento. Es necesario continuar las pruebas para lograr una coloración similar a la que presentan las larvas cuando están completamente desarrolladas.

### AGRADECIMIENTO

Esta investigación se llevó a cabo con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), como parte del proyecto 166898 “Biología de *Comadia redtenbacheri* Hamm”.

### LITERATURA CITADA

- Anónimo. El gusano de mezcal mexicano causa polémica en exposición. En línea: [http://mexico.cnn.com/historias-extraordinarias/2011/05/07el-gusano-mexicano-causa-polémica-en-exposición en Canadá.](http://mexico.cnn.com/historias-extraordinarias/2011/05/07el-gusano-mexicano-causa-polémica-en-exposición-en-Canadá)
- Encabo J., E. 2000. Mezcal, bebida de los dioses. En línea: [http://www.afuegolento.com/noticias/39firmas/encabo/1610/-44K.](http://www.afuegolento.com/noticias/39firmas/encabo/1610/-44K)
- Hernández-Livera, A., C. Llanderal-Cázares, L. E. Castillo-Márquez, J. Valdez-Carrasco y R. Nieto-Hernández. 2005. Identificación de instares larvales de *Comadia redtenbacheri* (Hamm) (Lepidoptera: Cossidae). *Agrociencia* 39: 539-544.
- Llanderal-Cázares, C., Nieto-Hernández R., Almanza-Valenzuela I., y Ortega-Álvarez C. 2007. Biología y comportamiento de *Comadia redtenbacheri* (Hamm) (Lepidoptera: Cossidae). *Entomología Mexicana* 6:252-255.
- Pantin C.F.A .1664. Técnicas Microscópicas para Zoólogos. Editorial Academia. 18 p.
- Ramos-Elorduy, J. 2006. Threatened edible insects in Hidalgo, and some measures to preserve them. *Journal of Ethnobiology* 2:1-10.
- Yen, A. L. 2009. Entomophagy and insect conservation: some thoughts for digestion. *Journal for Insect Conservation* 13:667-670.
- Zetina, D. A. C. Llanderal-Cázares y H. M. De los Santos-Posadas. 2011. Logistic regression analysis to predict parasitism in larvae of *Comadia redtenbacheri* Hammerschmidt (Lepidoptera: Cossidae). *Entomotopica* 26: 1-6.
- SRE. 2014. Secretaría de Relaciones Exteriores en Serbia. En línea: <http://embamex.sre.gob.mx/serbia/index.php/sr?start=15>

## DIETA ARTIFICIAL PARA EL GUSANO ROJO DEL MAGUEY

Manuel **Jiménez Vásquez**<sup>1\*</sup>, Celina **Llanderal Cázares**<sup>1</sup>, Alejandro **Pérez Panduro**<sup>1</sup>

### INTRODUCCIÓN

El gusano rojo del maguey *Comadia redtenbacheri* (Hammerschmidt), un insecto que tiene importancia económica y alimenticia, está siendo sobreexplotado debido a su alto valor comercial, disminuyendo drásticamente las poblaciones tanto de magueyes como del insecto, lo que ha motivado el interés de proteger y conservar este recurso natural presente en México, a través de unidades controladas de producción. Sin embargo, no existe información verídica del ciclo biológico completo del insecto y la mayoría de estudios se han enfocado a la fase de larva bajo condiciones de laboratorio e invernadero (Llanderal *et al.*, 2010).

El hospedante natural del gusano rojo es el maguey pulquero *Agave salmiana* Otto ex Salm., en el que se alimenta hasta completar su estado larvario (Granados, 1993), tiene diferentes usos que tiene, entre ellos la sobreexplotación del gusano rojo, por lo que es necesario usar estrategias que preserven ambas especies por métodos controlados, que permitan realizar el aprovechamiento de este recurso presente en México de manera sustentable (Llanderal *et al.*, 2007).

La cría de *C. redtenbacheri*, en dietas artificiales es una alternativa viable en la cual el insecto puede llegar a desarrollarse total o parcialmente. El estudio de la fase larval de *C. redtenbacheri*, como el de otros barrenadores, es complicado por la dificultad para realizar las observaciones directas, lo que se simplificaría si se contara con una dieta artificial que permita documentar su comportamiento durante el desarrollo. Por tal motivo, el presente trabajo tiene como objetivo determinar la formulación de una dieta merídica que permita el establecimiento y la cría de la fase larvaria de *C. redtenbacheri*.

<sup>1</sup>Fitosanidad- Fitopatología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

\*Autor de correspondencia: [manuel.jimenez@colpos.mx](mailto:manuel.jimenez@colpos.mx)

## MATERIALES Y METODOS

El experimento se realizó en el laboratorio de Fisiología de Insectos del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, estado de México, con larvas colectadas en los municipios de Hueyoxtla y Pozos Hidalgo, y de San Juan Teotihuacan Estado de México. Para la evaluación se usaron larvas de tercer a quinto instar, en la evaluación de su comportamiento en diferentes dietas artificiales se usó de unidad experimental frascos gerber con tres repeticiones por dieta y en cada frasco se utilizaron 25 larvas. La variable peso se midió al inicio del ensayo y cada mes, durante el cada cambio de dieta.

Para realizar las observaciones sobre la cría y reproducción del gusano rojo del maguey en condiciones de laboratorio, se inició con tres dietas, la primera indicada para la cría de *Acentrocneme hesperiaris* (Llanderal y López, 1994), la segunda para la cría de *Spodoptera frugiperda* (Smith), y en tercer lugar una dieta comercial para *Spodoptera frugiperda*, elaborada por la empresa Southland Products Inc®. Se tomó como referencia la dieta tres, para generar las dietas cuatro a la doce. Con esto se generaron 12 tipos de dietas, ya sea quitando o adicionando nuevos ingredientes y descartando las dietas que no favorecen el crecimiento de las larvas. Las cantidades e ingredientes utilizados en todas las dietas elaboradas en esta investigación están basados en lo reportado por Cohen (2003).

Procedimiento para la preparación de la dieta 12, la cual ha permitido el mejor desarrollo de larvas del gusano rojo del maguey hasta la fecha.

1. Para obtener el maguey liofilizado, se corta el rizoma en pedazos pequeños, que se introducen en ultracongelador, a las 24 horas se liofilizan y una vez que se obtiene un secado al 100%, se muelen en un molino eléctrico, hasta obtener la harina.
2. Los ingredientes maíz y soya, son molidos en un molino manual hasta dejar los productos en forma de harina.
3. Se mezcla en 300 mililitros de agua destilada, la harina de soya, germen de trigo, maíz molido, maguey liofilizado, sal mineral, sacarosa y propionato de calcio.
4. El agar se disuelve en 700 mililitros de agua destilada, calentando hasta el punto de ebullición. Posteriormente se deja enfriar aproximadamente 5 minutos y se agrega a la mezcla anterior, al mismo tiempo que el ácido sórbico y el metil paraben.

5. Por separado se disuelve en un recipiente de vidrio el ácido sorbico en 7 ml de alcohol etílico. Se acerca la solución al fuego por 5 a 6 segundos, se retira y agita; se repite la operación varias veces hasta que el ácido sorbico se disuelve completamente y se agrega a la primera mezcla. Se agrega a la mezcla cuando la temperatura de ésta baja a 40 °C, junto con la mezcla de vitaminas y la aureomicina.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Las larvas colocadas en las dos primeras dietas en un inicio tuvieron un incremento en peso durante el primer mes, pero en el segundo cambio de dieta las larvas comenzaron a morir paulatinamente, por lo que estas dietas se descartaron. En el caso de la dieta tres, el incremento de peso se mantuvo constante mes tras mes, aunque cierto porcentaje de larvas fueron muriendo con el paso del tiempo, por lo que ésta se tomó como referencia para formular las dietas cuatro a la doce.

La dieta cuatro se elaboró con todos los ingredientes de la dieta comercial, a partir de un certificado de análisis de esta dieta, mostrando nuevamente resultados favorables, aunque el crecimiento del peso de larvas era muy poco e incluso se presentaba cierto porcentaje de mortalidad al paso de los meses. Se modificaron las cantidades de ingredientes, al mismo tiempo que se decidió trabajar una quinta y sexta dieta con la finalidad de mejorar la consistencia. En la dieta cinco se agregó el ingrediente celulosa con la finalidad de obtener una dieta más sólida y así permitir a las larvas realizar sus galerías, pero se descartó, ya que las larvas no digerían la celulosa. En la dieta seis se incorporó el ingrediente maíz y se observaron resultados favorables, debido a la buena consistencia pues se redujo la mortalidad de larvas, se notó un incremento de peso y se observó la construcción de galerías; En la dieta siete se incorporó el ingrediente aceite de maíz y colesterol, ya que estos ingredientes son recomendados en otras dietas de insectos (Cohen, 2003), aunque los resultados no fueron satisfactorios, por lo cual fue descartada. En la dieta ocho se añadió fibra de maguey fresco, el cual modifico la consistencia de la dieta por la cantidad de humedad que éste tenía, aunque se notó una ligera mejoría en las larvas, en la dieta nueve se agregó el ingrediente inulina, uno de los compuestos presentes en el rizoma del maguey de acuerdo con Vargas (2009), pero los resultados no fueron favorables. En la dieta diez se incorporó el ingrediente manzana

en forma de puré y se notaron ligeros cambios que favorecieron el crecimiento del peso de larvas. En la dieta once se agregó harina de rizoma de maguey liofilizado, que permitió una mejor consistencia de la dieta, y mejor alimentación de las larvas. Para el caso de la dieta doce, la cual se está utilizando hasta la fecha, se incorporaron ingredientes de las dietas que mostraron una ligera mejoría en la alimentación de las larvas, como el maíz molido, el puré de manzana y el maguey liofilizado. Singh (1977) menciona que aunque no sea su alimento natural, las dietas formuladas y procesadas por el hombre han sido utilizadas para la cría de una gran cantidad de especies de insectos.

La dieta doce ha mostrado las mejores características para la cría de larvas del gusano rojo del maguey en sus diferentes instares en condiciones de confinamiento. Es importante considerar que la dieta debe ser blanda para los primeros instares y de mayor consistencia a medida que avanza el estado larval.

### AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, a través de la beca para estudios de doctorado y el financiamiento por parte del Proyecto 166898 (Biología de *Comadia redtenbacheri* Hamm.).

### LITERATURA CITADA

- Cohen, A.C. 2003. Insect Diets. Science and Technology. Rearing Institute, LLC Tucson, Arizona. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 324 pp.
- Granados, D. S. 1993. Los agaves en México. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 252 p.
- Llanderal C., C. y M. S. López Arellano. 1994. Cría del gusano blanco del maguey *Acentrocne me hesperiaris* (Lepidoptera: Megathymidae) en una dieta artificial. *Agrociencia* 5:45-52.
- Llanderal-Cázares, C., H. M. De los Santos-Posadas, I. Almanza-Valenzuela, R. Nieto-Hernández y C. Castillejos C. 2010. Establecimiento del gusano rojo en plantas de maguey en invernadero. *Acta Zoológica Mexicana* 26:25-31.
- Llanderal-Cázares, C., R. Nieto-Hernández, I. Almanza-Valenzuela y C. Ortega-Álvarez. 2007. Biología y comportamiento de *Comadia redtenbacheri* (Hamm.) (Lepidoptera: Cossidae). *Entomología Mexicana* 6:252-255.
- Singh, P. 1977. Artificial Diets for Insects, Mites, and Spiders. IFI/Plenum Press, New York. USA. 594 p.
- Vargas V., C. G. 2009. Obtención de Insumos de interés industrial a partir de las fructanas del agave mezcalero potosino (*Agave salmiana*). Tesis de Grado. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional IPN-Michoacán. México.

## FORMICIDAE (INSECTA: HYMENOPTERA) DE LA RBEC “EL CIELO”, TAMAULIPAS, MÉXICO

Karla Yolanda **Flores-Maldonado**<sup>1</sup>, Jesús **Romero-Nápoles**<sup>1</sup>, Héctor **González-Hernández**<sup>1</sup>, Hiram **Bravo-Mojica**<sup>1</sup>, Armando **Equihua-Martínez**<sup>1</sup>, Miguel **Vázquez-Bolaños**<sup>2</sup>.

### INTRODUCCIÓN

La RBC “El Cielo” forma parte de la zona de transición mexicana, con una definida zona altitudinal, con elementos de afinidad neártica en sus partes más altas y elementos neotropicales en las bajas, debido a la heterogeneidad de ecosistemas presentes en la RBEC es considerada como una reserva de la UNESCO (Sánchez-Ramos et al., 2005). La Reserva se encuentra comprendida en la Región I del sistema de CONABIO, la clasificación se fundamentó en la riqueza de especies, el nivel de endemismos y especies en riesgo así como el grado de aislamiento del sitio (CONABIO, 2010). Considerando lo teorizado por Murdoch et al., (1972) la riqueza de especies vegetales conlleva a una de insectos herbívoros, dando pie a otra de depredadores e insectos parasitoides, formándose una red trófica donde las simbiosis, en específico los mutualismos, direccionan dispersiones de semillas de un sitio a otro (por ejemplo), modificando el paisaje vegetal, marcan los avanzando las investigaciones hacia los complejos análisis de redes ecológicas (Dormann et al., 2008).

La colonización de zonas ecológicamente frágiles, la expansión de la frontera agraria, la explotación de materias primas y fuentes energéticas, así como en algunos casos un número excesivo de visitantes, representan amenazas crecientes en las áreas naturales protegidas (Brenner, 2006; Nelson & Serafin, 1997) que propician fragmentación forestal, contaminación ambiental, reducción territorial, así como la pérdida de diversidad. En la RBEC “El Cielo” la problemática no es del todo diferente, un plan de manejo obsoleto y disfuncional ha establecido una problemática ecológica y socioeconómica regional, donde es vital el realizar trabajos de investigación multinivel (SEDESOL Tamaulipas, 2011).

<sup>1</sup>: Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados campus Montecillo.

<sup>2</sup>: Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara.

Autor para correspondencia: **kf0471@hotmail.com**



La Mirmecofauna es altamente sensible a la fragmentación de los hábitats (Flores-Maldonado et al., 1999; Jusino & Phillips, 1992 ), considerando lo expuesto con anterioridad, los efectos negativos en la vegetación son inevitables, por eso es prioritario el realizar el estudio de la mirmecofauna presente, estableciendo inventarios pertinentes, antes que la modificación de los factores bióticos y abióticos alteren la estructura de la biodiversidad y se pierda el primer eslabón para la comprensión de los procesos ecológicos.

Las hormigas son un taxón exitoso que domina una gran variedad de hábitats (Hölldobler y Wilson, 1990). Estos insectos, dentro de la RBEC, intervienen en múltiples funciones ecológicas, que van desde herbívoras (micófagas), depredadoras, polinizadoras, granívoras; siendo no solo notables en su riqueza de especies, si no en el número de individuos por unidad de área (abundancia) y en consecuencia su impacto en el ecosistema. Algunas investigaciones taxonómicas se han realizado en Tamaulipas en función a la diversidad de hormigas, sobresaliendo el trabajo de Rodríguez (1986), Rojas-Fernández (2001) donde el más reciente es de Ríos Casanova (2014) que ha identificando 45 géneros divididos en 115 especies y para el sitio Phillips et al. (2005). El objetivo principal de la investigación es Sistemática de Formicidae cimentada en colecta, identificación y descripción de la mirmecofauna muestreada en la RBEC “El Cielo” en función a dos gradientes, el altitudinal y el estacional. La investigación inició en su fase de campo en agosto del 2013 y concluyó en agosto del 2014, su fase de gabinete de diciembre 2014 a diciembre del 2015.

## **MATERIALES Y MÉTODO**

La reserva de la biósfera “El Cielo” (RBC) se ubica al sur del estado de Tamaulipas, México; tiene una extensión de 144,530 ha, de las cuales 36,538 ha están delimitadas como zonas núcleo -medio ambientes sin perturbaciones- (Sánchez-Ramos et al.,1990), de las cuales la sección más amplia y con vegetación primaria se encuentra ubicada en la RBEC (CONABIO, 2010) Se muestrearon: vegetación riparia, selva baja tropical, bosque mesófilo de montaña, bosque de encino pino, bosque de pino, matorral xerófilo, muestreados simultáneamente en las cuatro estaciones anuales iniciando de agosto 2013 y concluyendo en agosto 2014.

Con la finalidad de obtener un inventario de especies lo más integral posible, se muestrearon suelo, sotobosque y árboles. Se implementaron técnicas de colecta directa e indirecta, para el primer tipo se utilizaron colecta manual y redeo por golpeo, para el segundo trampas pitfall, terrestres y aéreas cebadas con atún, miel y agua con jabón (Ipser et al, 2004; Kaspari, 2000; Flores y González, 2005) y sacos mini winkler por cada sitio (Agosti & Alonso, 2000). La identificación del material biológico se llevó a cabo con las claves taxonómicas de Santschi (1923), Creighton (1950), Borgmeier (1959), Brown (1976), Kugler & Brown (1982), Trager (1984), Ward (1985), Mackay & Mackay (1989), Mackay y Vinson (1989), Hölldobler y Wilson (1990), Kuggler (1994), Wilson (2003), Longino (2002, 2003), Fisher & Cover (2007).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

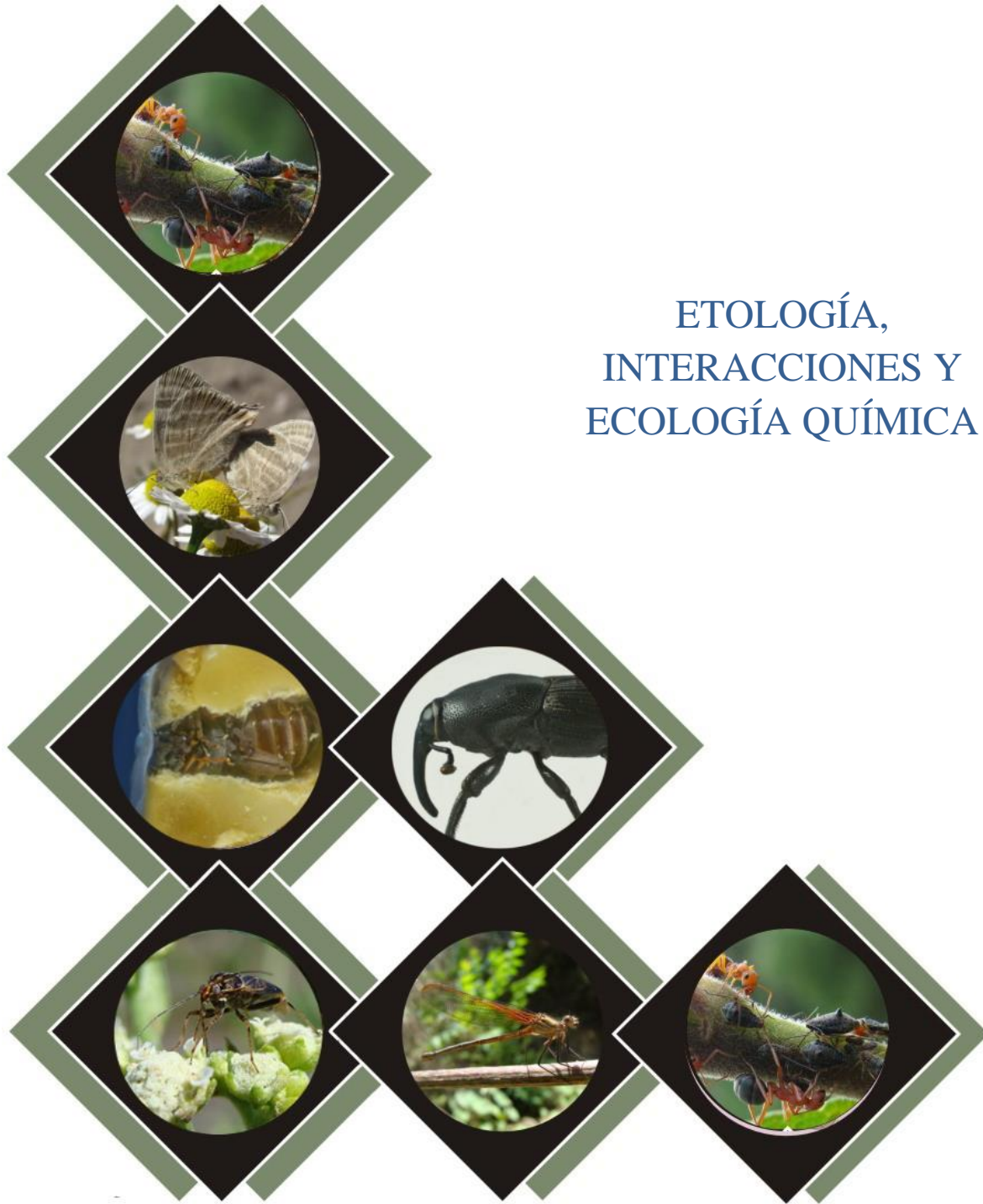
Los resultados preliminares muestran que para el BMM se han colectado 9,000 individuos de Formicidae, distribuidos en ocho subfamilias: Myrmicinae, Pseudomyrmecinae, Ecitoninae, Formicinae, Dolichoderinae, Ponerinae, Ectatomminae y Cerapachinae distribuidos en 21 géneros y 43 especies, resultados que divergen de los obtenidos por Phillips et al (2005) para el sitio, quienes colectaron 33 especies, con muy pocas 2 especies catalogadas como morfoespecies (Olivier y Beatti, 1996). Los géneros más diversos con al menos cinco especies son *Camponotus*, *Crematogaster*, *Pheidole*, *Pseudomyrmex* que de acuerdo a Wilson (2000) son los más diversos y cosmopolitas.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a **CONACyT** por la beca de doctorado otorgada a Karla Yolanda Flores Maldonado, así como a la **Facultad de Ingeniería y Ciencias de la Universidad Autónoma de Tamaulipas** por el préstamo de equipo e implementos de campo, y a los asistentes de campo cuya participación hizo posible la colecta de material biológico durante la fase de campo: Lidia Guzmán Díaz, Leticia Guadalupe Mellado Ortiz, Luis Álvarez, Luis Martínez, Ricardo Martínez y Amado Escalona Segura.

## LITERATURA CITADA

- Agosti, D. & L. E. Alonso. 2000. The ALL protocol: a standard protocol for the collection of ground dwelling ants, pp. 204-206 En : Agosti, D., Majer, J. Alonso, L.E. and T. Schultz [eds.], *Ants: Standard Methods for Measuring and Monitoring Biodiversity*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- CONABIO. 2010. El Bosque Mesófilo de Montaña en México: Amenazas y Oportunidades para su Conservación y Manejo Sostenible. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México D.F., México, 197 pp.
- Creighton, W. S. 1950. The ants of North America. Bull. Mus. Compar. Zool. Harvard College. Cambridge, Mass.
- Fisher, B. L. and S. P. Cover. 2007. *Ants of North America: A guide to the genera*. Berkeley. Los Angeles, California.
- Flores-Maldonado, K.Y. & H. H. González. 2005. Mirmecofauna en árboles de Mango, EN: Sánchez, R.G., Reyes, C.P. & M. R. Dirzo, (Eds.) *Historia Natural de la Reserva de la Biosfera "El Cielo"*, Tamaulipas, México, (pp, 483- 488) Universidad Autónoma de Tamaulipas.
- Hölldobler, B. and E. Wilson. 1990. *The Ants*. The Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge. 732 p
- Ipsler, M. R., Brinkman, M.A., Gardner, W.A. & H. B. Peeler. 2004. A survey of ground dwelling ants (Hymenoptera:Formicidae) in Georgia, Florida *Entomologist*, 87(3):253-2660.
- Kaspary, M. 2000. Do imported fire ants impact canopy arthropods? Evidence from simple arboreal pitfall traps. *The Southwestern Naturalist* 45(2):118-122.
- Kugler, C. 1994. Revision of the ant genus Roger (Hymenoptera: Formicidae) with descriptions of the sting apparatus. *Journal of Hymenoptera Research*, 3:17-89.
- Kugler, C. and W. Brown. 1982. Revisionary and other studies on the ant genus Ectatomma, including the descriptions of two new species. *Search: Agriculture*. Ithaca, N. Y.: Cornell Univ. Agr. Exp. Sta. No. 24: 8 pp.
- Longino, T. J. & R. R. Snelling. 2002. A taxonomic revision of the Procryptocerus (Hymenoptera: Formicidae) of Central America. *Contribution in Sciences*, 495: 1-30.
- Longino, T. J. 2003. The Crematogaster (Hymenoptera, Formicidae, Myrmicinae) of Costa Rica. *Zootaxa* 151: 1-150.
- Mackay, W. P. and Vinson, S. B. 1989. A guide to species identification of New World Ants (Hymenoptera:Formicidae). *Sociobiology* 15: 109-150.
- Murdoch, W., Evans, F. and C. Peterson. 1972. Diversity and pattern in plants and insects. *Ecology* 53:819-829.
- Phillips, A. S., Sánchez-Ramos, G. and R. Jusino-Atresino. 2005. Hormigas indicadoras de disturbio. En. Sánchez-Ramos, G., P. Reyes Castillo y R. Dirzo (eds). 2005. *Historia Natural de la Reserva de la Biosfera El Cielo*, Tamaulipas, México. Universidad Autónoma de Tamaulipas. Impreso en Hong Kong. 732 pp.
- Ríos-Casanova, L. 2014. Biodiversidad de hormigas en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85:392-398.
- Rodríguez G. J. A. 1986. Hormigas (Hymenoptera: Formicidae) de Nuevo León. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencia. Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Texcoco de Mora. Edo. de México. 107 pp.
- Rojas-Fernández, P. 2001. Las hormigas del suelo en México: diversidad, distribución e importancia (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Zoologica Mexicana* (nueva serie) 1:189-238.
- Ward, P. S. 1985. The Nearctic species of the genus *Pseudomyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). *Quaestiones Entomologicae* 21:209-246.



ETOLOGÍA,  
INTERACCIONES Y  
ECOLOGÍA QUÍMICA

## EVIDENCIA DE UNA FEROMONA DE AGREGACIÓN EN *Sphenophorus incurrens* GYLLENHAL (COLEOPTERA: DRYOPHTHORIDAE).

Carlos P. **Illescas Riquelme**<sup>1\*</sup>, Cesar **Ruiz Montiel**<sup>2</sup>, María C.M. **Llanderal Cázares**<sup>1</sup>, Héctor **González Hernández**<sup>1</sup>, Raquel **Alatorre Rosas**<sup>1</sup>, Leopoldo **Cruz-López**<sup>3</sup>, Julio C. **Rojas León**<sup>3</sup>.

### INTRODUCCIÓN

*Sphenophorus incurrens* Gyllenhal (Coleoptera: Dryophthoridae) es un insecto que se alimenta principalmente de plantas de la familia Poaceae y es de origen neotropical (Vaurie 1954). En México, este picudo es una plaga emergente de caña de azúcar, arroz y pasto kikuyo (van Zwaluwenburg 1926, Flores 1994, Ordaz-González et al. 2014). Algunos años anteriores este picudo se consideraba una plaga de menor importancia principalmente a que su población era reducida y sus daños se restringían a pequeñas áreas cañeras (van Zwaluwenburg 1926, Flores 1994). Sin embargo, actualmente *S. incurrens* adquirió relevancia al elevar sus poblaciones y provocar pérdidas económicas importantes en varios estados cañeros de México (Pérez-De La O et al. 2014, Ruiz-Montiel et al. 2015).

El daño principal de este insecto es causado por la larva, la cual se alimenta del rizoma y partes bajas de los tallos, lo que provoca galerías que permiten la entrada a patógenos oportunistas que llegan a causar la muerte de la planta. Hasta el momento no existe un método de control efectivo para este insecto por lo que diferentes técnicas necesitan ser evaluadas. Una de estas posibilidades para el control es el uso de semioquímicos que alteren el comportamiento de los insectos y puedan usarse para el monitoreo y control de la plaga (ej. trampeo masivo) (Wyatt 2014).

<sup>1</sup>Fitosanidad- Entomología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230,

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Forestales, Parque Ecológico El Haya, Antigua Carretera Xalapa-Coatepec, AP 551, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México.

<sup>3</sup>Departamento de Entomología Tropical, El Colegio de la Frontera Sur, Tapachula, Chiapas, México.

Autor de correspondencia: [entoillescas@gmail.com](mailto:entoillescas@gmail.com)

Con el presente estudio se evidenció la presencia de una feromona de agregación en *S. incurres* y se comprobó la respuesta fisiológica y comportamental en ambos sexos de esta especie.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material biológico.** Se colectaron adultos de *S. incurrens* en plantaciones de caña en la localidad de Potrero, municipio de Atoyac, Veracruz. Los insectos fueron llevados al laboratorio y posteriormente sexados. Se utilizaron trozos de caña de azúcar para alimentar y mantener a los insectos hasta el inicio de los experimentos.

**Respuesta conductual de *S. incurrens* a volátiles de conespecíficos y caña de azúcar.** Las respuestas de hembras y machos de *S. incurrens* a volátiles de conespecíficos y caña de azúcar fue evaluado mediante un olfatómetro de tubo de “Y” siguiendo el método propuesto por Montiel et al. (2003). Una hembra o un macho de picudo se insertaban en la base del olfatómetro y se le proporcionaban 5 minutos para caminar a algunos de los brazos. De no presentarse actividad se contabilizaba como una no respuesta. Por cada par de olores se probaron 40 picudos de cada sexo. Los tratamientos fueron los siguientes. 1) machos+caña vs aire limpio, 2) hembras+caña vs aire limpio, 3) machos+caña vs caña, 4) hembras+caña vs caña y 5) machos+caña vs hembras+caña.

**Captura de volátiles.** Los volátiles emitidos por ambos sexos de *S. incurrens* fueron capturados por la técnica de aireación dinámica. Los tratamientos fueron 100 hembras + 100 g de caña de azúcar, 100 machos + 100 g de caña de azúcar y 100 g de caña de azúcar. Los tratamientos fueron puestos por separado en tubos de cristal para aireación dinámica. El flujo de aire se mantuvo durante una duración de 120 h. Los volátiles se capturaron en una trampa de vidrio que contenía 50 mg de absorbente Porapak Q. Al terminar la captura los volátiles fueron lavados del absorbente con 400 µL de cloruro de metileno y el extracto se concentró con N<sub>2</sub> antes del análisis.

**Análisis de cromatografía de gases y detección electroantenográfica (GC-EAD).** Los análisis en el GC-EAD se llevaron a cabo para identificar los compuestos electroantenográficamente activos de los extractos, se utilizó un cromatógrafo Shimadzu GC-2010.



El electroantenograma se realizó con una antena de un picudo, una por espécimen en cada corrida. La base y la punta de la antena fueron fijadas a los polos del sensor con gel conductiva. Las señales fueron grabadas usando el software del GC-EAD. Los extractos fueron evaluados en hembras y machos, utilizando 5 antenas por sexo.

**Análisis químico.** Los extractos fueron analizados con el espectrómetro de masas. El gas acarreador fue helio. Los compuestos antenalmente activos fueron identificados por comparación de los tiempos de retención y que concordaran con el espectro de masas del estándar disponible.

**Respuestas conductuales de *S. incurrens* al compuesto activo.** La actividad biológica del compuesto identificado fue evaluada en el olfatómetro en “Y” descrito anteriormente. Se realizaron diluciones seriales del compuesto con cloruro de metileno para hacer 1, 10, y 100 ng/ $\mu$ L. Una alícuota estándar de 1  $\mu$ L de cada concentración fue pipeteada en un trozo de papel filtro y posteriormente se introdujo en una de las cámaras de olor del olfatómetro. En la otra cámara únicamente un trozo de papel filtro cargado con 1  $\mu$ L del solvente (control) fue introducido. Igualmente, cada cámara de olor contenía 50 g de caña. Cuando las fuentes de olor estaban en las cámaras, un picudo hembra o macho fue puesto en la base del olfatómetro dándole 5 min para caminar hacia uno de los brazos de la “Y”. La posición de cada fuente de olor fue cambiada en cada replica. Todas las concentraciones fueron replicadas 40 veces por cada sexo.

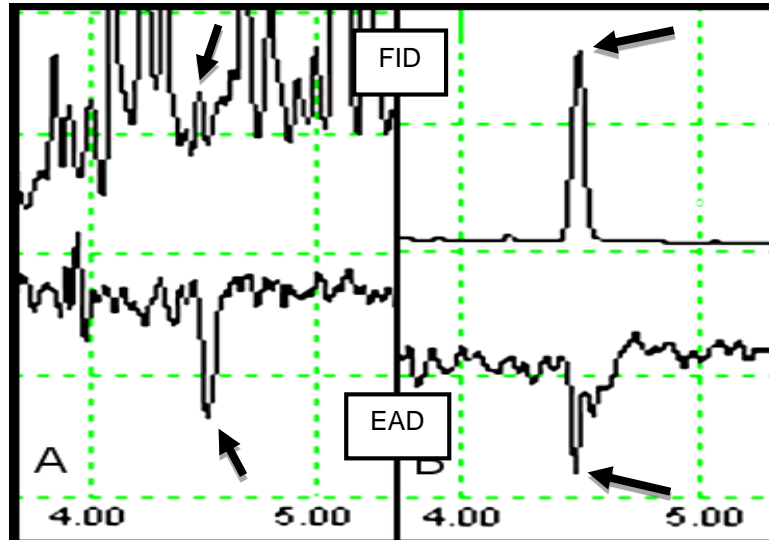
**Análisis estadístico.** Las respuestas conductuales de *S. incurrens* a los volátiles y al compuesto sintético se analizaron por una prueba de “G” con corrección de Williams.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En general se aprecian evidencias que ambos sexos tienen cierta tendencia a ser atraídos a volátiles de machos conespecíficos aunque con algunas inconsistencias. La presencia de una feromona de agregación en machos de se ha reportado en 17 especies de Rhynchophorinae (Ambrogi et al. 2009). Los análisis de los extractos de *S. incurrens* en el GC-EAD, muestran un compuesto específico del macho que eliciten una respuesta antenal en ambos sexos (Figura 1.) La presencia de un único compuesto feromonal liberado por



machos se ha reportado en otras especies de Rynchophorinae incluyendo *Dynamis borassi* (F.), *Sphenophorus levis* Vaurie, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Sitophilus oryzae* (L.), and four species of *Rhynchophorus* (Ambrogi et al. 2009).



**Figura 1.** Respuesta simultánea del detector de ionización de flama (FID) y detección electroantenográfica (EAD) exponiendo la antena de un macho de *S. incurrens* a volátiles de (A) machos conespecíficos y (B) y 10 ng del compuesto sintético.

**Respuesta conductual de *S. incurrens* a al compuesto feromonal sintético.** Se apreció la tendencia de atracción del compuesto sintético a ambos sexos de *S. incurrens* a la cantidad de 100 100 ng/ $\mu$ L.

## LITERATURA CITADA

- Ambrogi, B. G., D. M. Vidal, and P. H. G. Zarkin. 2009. Feromônios de agregação em Curculionidae (Insecta: Coleoptera) e sua implicação taxonômica. *Química Nova*. 32: 2151-2158.
- Flores, S. 1994. Las Plagas de la Caña de Azúcar en México.
- Ordaz-González, E. L., A. Equihua-Martínez, I. León-García, R. W. Jones, A. Aragón, R. Hernández, and S. Vergara-Pineda. 2014. Species of *Sphenophorus* (Coleoptera: Dryophthoridae) associated whit golf courses in México. *Florida Entomol.* 97: 857-860.
- Pérez-De La O, B., V. López-Martínez, D. Jiménez-García, and R. Jones. 2014. Determination of spatial distribution of *Sphenophorus incurrens* (Coleoptera: Curculionidae) using GIS in Morelos, Mexico. *Florida Entomol.* 97: 285-287.
- Ruiz-Montiel, C., C. P. Illescas-Riquelme, U. Altamirano-Hernández, and R. W. Jones. 2015. Nuevos registros de picudos (Coleoptera: Curculionidae) afectando caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en Veracruz, México. *Southwest. Entomol.* 40: 427-432.
- van Zwaluwenburg, R. H. 1926. Insect enemies of sugarcane in western Mexico. *J. Econ. Entomol.* 19: 664-669.
- Wyatt, T. D. 2014. *Pheromones and Animal Behavior: Chemical Signals and Signature Mixes*. Second Edition. Cambridge University Press. Cambridge, UK.

RESPUESTA OLFATIVA DEL PARASITOIDE *Tamarixia triozae*  
(HYMENOPERA: EULOPHIDAE) INFLUENCIADO POR SU ORIGEN DE  
CRÍA Y SU APRENDIZAJE ASOCIATIVO

Salvador **Hernández-Moreno**<sup>1</sup>, Alejandro **Pérez-Panduro**<sup>1</sup>, J. R. **Lomeli-Flores**<sup>1</sup>,  
Esteban **Rodríguez-Leyva**<sup>1</sup>, Juan **Cibrián Tovar**<sup>1</sup>, Graciela M. **Bueno Aguilar**<sup>2</sup>.

### INTRODUCCION

El parasitoide *Tamarixia triozae* Burks (Hymenoptera: Eulophidae) es el enemigo natural más destacado del psilido *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae), causante de importantes pérdidas económicas en cultivos de solanáceas como chile, jitomate, tomate y papa (Garzón-Tiznado, 2003). Para el control biológico de esta plaga, *T. triozae* (tamarixia) es criado comercialmente sobre jitomate y se le usa tanto en ese cultivo como en el de las otras solanáceas, lo que implica un cambio de hospedera. La bibliografía muestra que en algunos sistemas hospedera-fitófago-parasitoide, el cambio de hospedera modifica la eficiencia del parasitoide para buscar a sus huéspedes, así como a su aceptación (Nordlund et al. 1988; Alborn et al. 1997; Pare y Tumlinson, 1997; Rose et al. 1996), lo cual se refleja cambios en la eficiencia del control de la plaga.

Desde su nacimiento los parasitoides reconocen los volátiles de la planta hospedera en la cual se desarrollaron como inmaduros, los volátiles del subsistema planta-hospedera juegan un papel importante, ya que son las señales que les “avisan” de la presencia de huéspedes (plagas) sobre las plantas (Nordlund et al. 1988; Rose et al. 1996; Alborn et al. 1997; Pare y Tumlinson, 1997). En este estudio se evaluó la respuesta preferencial de *T. triozae* a plantas de jitomate y chile atacadas por *B. cockerelli* con el objetivo de explorar formas para optimizar el control biológico del psilido.

<sup>1</sup>Fitosanidad- Fitopatología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México- Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

Autor de correspondencia: [radamantiz69@yahoo.com.mx](mailto:radamantiz69@yahoo.com.mx)

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se mantuvo una producción constante de plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* cultivar “Rio grande”) y de chile jalapeño (*Capsicum annuum* cultivar “Real”). Sobre cada hospedera se mantuvo una cría de *B. cockerelli* y de su parasitoide, *T. triozae*. Las crías se mantuvieron con la metodología descrita por Rojas et al. (2015).

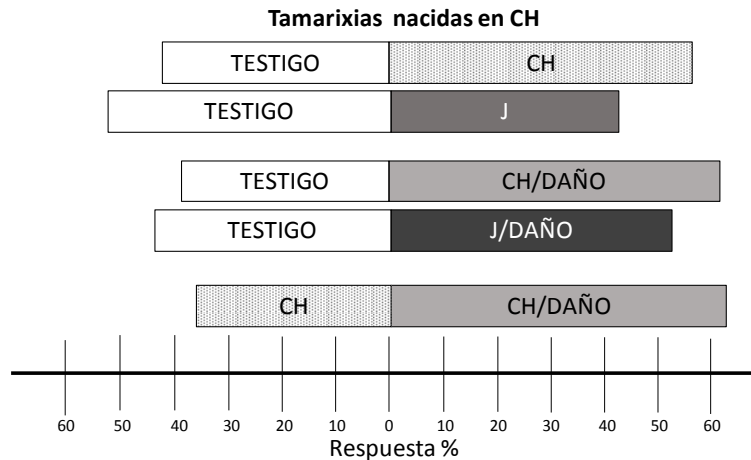
Para evaluar la respuesta de *T. triozae*, se utilizó un olfatómetro de dos vías en “Y” con 10 cm de largo para cada brazo y 14 cm de largo en el cuerpo de salida. En los brazos del olfatómetro se conectaron mangueras (3/16 “I.D. Malgene 180 pvc, Non-toxic), que a su vez conectaron a dos cámaras de cristal (25x37cm), las cuales alojaron a las plantas prueba. Se utilizó un flujo de aire purificado de 234.4 ml/min para cada brazo y una intensidad de luz de 1767 luxes. Los experimentos se realizaron en una temperatura de 26±2°C y humedad relativa de 60-70%.

Se respondieron las siguientes preguntas: 1) ¿Cuál es el factor de atracción (preferencia innata) para tamarixia (la planta hospedera o el daño)? 2) ¿la experiencia de las hembras de tamarixia modifica su preferencia innata? 3) ¿La experiencia en una hospedera alterna modifica su atracción innata? Para contestarlas se realizó una serie de experimentos de elección, para los cuales se usaron cuatro tipos de hembras de tamarixia (unidad experimentales), definidas por la combinación de dos características: origen (chile o en jitomate) y experiencia previa de ovipositar (sin experiencia y con experiencia). Los tratamientos fueron: plantas de chile o jitomate con y sin daño (el daño fue el ocasionado por 192 psilidos de cuarto estadio ninfal y 5 adultos colocados sobre cada planta 15 días antes de la respectiva prueba). La preferencia se definió por la elección de cada hembra por alguno de los brazos del olfatómetro en un lapso menor o igual a 300s. La comparación estadística se hizo mediante una prueba de Chi cuadrada con una  $\alpha=0.05$ . En total se realizaron 13 experimentos con 60 repeticiones para uno.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respecto a la pregunta de cuál es el factor de atracción (preferencia innata) para tamarixia (la planta hospedera o el daño), se obtuvo que las tamarixias nacidas en chile no distinguieron

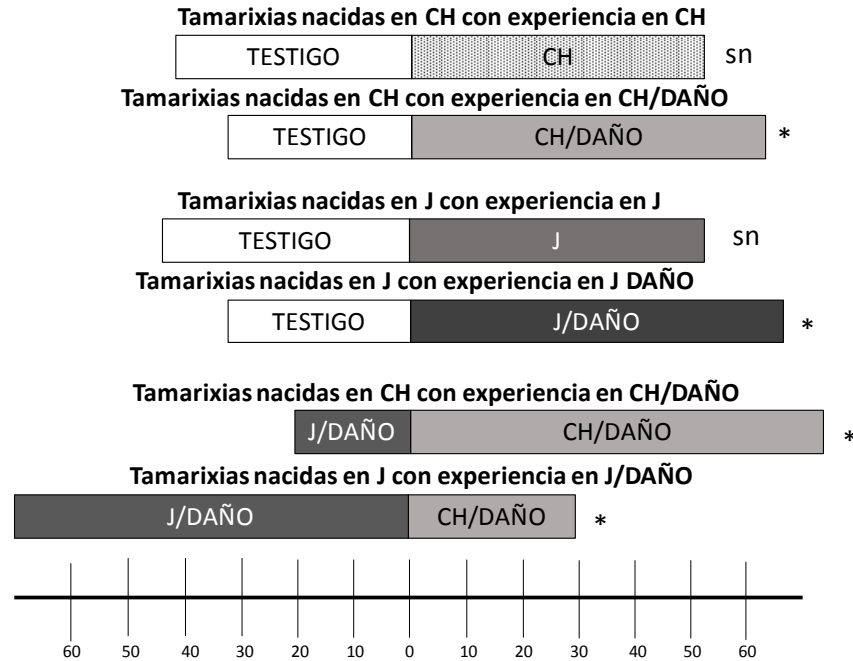
entre testigo (maceta), planta hospedera (chile o jitomate), ni planta con daño (chile o jitomate con daño de psílicos) ( $P \geq 0.08581$ ) (Figura 1). Lo que implica que los volátiles liberados tanto de la planta como de la planta con daño son un factor de atracción para hembras de tamarixia de chile.



**Figura 1. Respuestas de las hembras de tamarixia nacidas en chile a contrastes de estímulos olfatorios. Testigo: maceta, CH: planta de chile, CH/DAÑO: planta de chile con daño, J: jitomate, J/DAÑO: planta de jitomate con daño.**

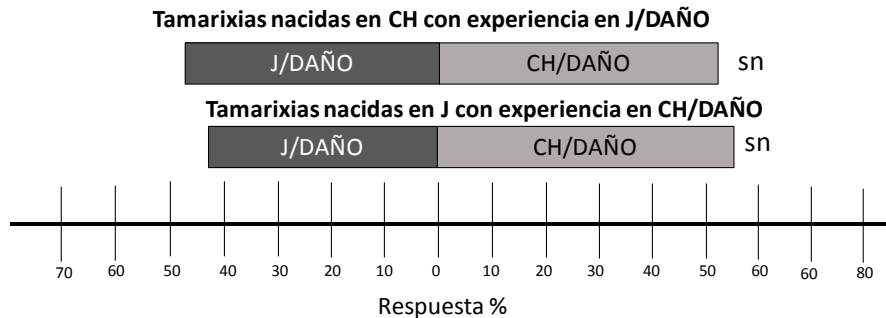
Sobre la pregunta de si la experiencia de las hembras de tamarixia modifica su preferencia innata se encontró que la experiencia en la plantas sin psílicos no afectó la conducta innata de tamarixias de chile ni de jitomate (no distinguen entre testigo o planta hospedera) ( $P > 0.4496$ ); sin embargo, la experiencia en hospederas con daño sí modificó su conducta innata ( $X^2 = 0.01729028$ ;  $gl = 1$ ;  $P = 0.0172$ ) en chile y ( $X^2 = 0.0279918$ ;  $gl = 1$ ;  $P = 0.0279$ ) en jitomate haciendo que busquen plantas con daño. Esto implica que la experiencia en plantas con daño es un factor relevante para definir su preferencia posterior.

Adicionalmente se encontró que las tamarixias con experiencia en su planta de origen con daño eligieron su planta donde nacieron ( $X^2 = 0.00023055$ ;  $gl = 1$ ;  $P < 0.0001$ , en caso de chile y, ( $X^2 = 0.01635122$ ;  $gl = 1$ ;  $P = 0.0163$  en caso de jitomate (Figura 2). Similares resultados consigna Ojeda-Camacho et al. 2001 con *Aphidius ervi*, el cual innatamente prefiere el sistema trigo-*S. avenae*, pero la experiencia en el sistema alfafa-*Acyrtosiphon pisum*, le induce un cambio de preferencia por este sistema.



**Figura 2.** Respuesta de las hembras de tamarixia nacidas en chile o jitomate con experiencia. Testigo: maceta, CH: planta de chile, CH/DAÑO: planta de chile con daño, J: jitomate; J/DAÑO, planta de jitomate con daño, Indicada por ns: no significativa, \*:  $P < 0.05$ .

Sobre la pregunta de si la experiencia en una hospedera alterna modifica su atracción innata se observó que, la experiencia no modificó tal preferencia: hembras de ambos orígenes (chile o jitomate) con experiencia en una hospedera distinta tuvieron la misma preferencia en la elección: entre plantas de chile o jitomate con daño Figura 3.



**Figura 3.** Respuesta de hembras de tamarixia de chile o jitomate con experiencia en plantas con daño. Testigo: maceta, CH/DAÑO: planta de chile con daño, J/DAÑO: planta de jitomate con daño, indicada por ns: no significativa, \*:  $P < 0.05$ .

## AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece el apoyo a CONACYT por la beca otorgada para estudios de posgrado.

## LITERATURA CITADA

- Alborn H., T., T. Turlings C., T., H. Jones., G. Stenhagen., J., H. Loughrin, and J. H. Tumlinson. 1997. An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science*. 276:945-948.
- Nordlund D., A., W.J. Lewis and M.A. Altieri. 1988. Influences of plant produced allelo- chemicals on the host and prey selection behavior of entomophagous insects, pp. 65-90.
- Pare P., W. and J. H. Tumlinson. 1997. Induced synthesis of plant volatiles. *Nature* 385: 30-31.
- Rojas P., R. 2010. Biología de *Tamarixia triozae* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitoide de *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Psyllidae). Tesis de Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco.
- Ojeda-Camacho M., L. Rodriguez, and H. Niemeyer. 2001. Evaluacion olfatométrica del parasitoide *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae), de diferentes proveniencias y niveles de experiencia de oviposicion, frente a volatiles de plantas y de complejos planta-hospedero. *Revista Chilena de Entomología*, 28, 63-70.
- Prevost G., and W. J., Lewis. 1990. Heritable differences in the response of the Braconid wasp *Microplitis croceipes* to volatile allelochemicals. *J. Insect Behav.* 3, 277-287.
- Garzón-Tiznado J. A. 2003. El pulgón saltador o la Paratrioza, una amenaza para la horticultura de Sinaloa. Pp. 79-89. In. Memoria del taller sobre *Paratrioza cockerelli* Sulc. como plaga y vector de fitoplasmas en hortalizas. Culiacán, Sinaloa, México

## CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS SENSILAS ANTENALES DE *Rhyssomatus nigerrimus* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

Elsy María **Delgado García**<sup>1</sup>, Juan **Cibrián Tovar**<sup>1</sup>, Antonio Palemón **Terán Vargas**<sup>2</sup>,  
Carlos Alberto **Blanco Montero**<sup>3</sup>, Juan Manuel **González Camacho**<sup>1</sup>, Ausencio **Azuara  
Domínguez**<sup>4</sup>

### INTRODUCCIÓN

La presencia del picudo *Rhyssomatus nigerrimus* en el cultivo de la soya, *Glycine max* L., se registró en el 2012 en Tamaulipas, San Luis Potosí y Chiapas (López-Guillén *et al.*, 2012). Este picudo puede encontrarse en plantas como *Acacia spp.*, *Amaranthus spp.*; *Baccharis salicifolia*; *Ficus spp.*; *Ipomoea spp.*; *I. heredaceae*; *Mimosa spp.*; *Prosopis spp.* y *Prunus persicae* (Salas-Araiza *et al.*, 2001), además de *Leucaena leucocephala* (Lam.), *Ipomea purpurea* (L.) y de granos en desarrollo de sorgo *Sorghum bicolor* (L.) Moench (Terán-Vargas y López-Guillén, 2014). Esto indica que pueden adaptarse a un amplio rango de hospederos. Se ha demostrado que las antenas de los insectos desempeñan un papel importante en el proceso de elección de hospederos (Lopes *et al.*, 2002). En ellas se encuentran pequeños órganos sensoriales conocidos como sensilas, las cuales se encargan de responder a diversos estímulos (Onagbola *et al.*, 2008; Mahmoud, *et al.*, 2012). La descripción morfológica de las sensillas nos permite entender el funcionamiento del sistema olfatorio dentro de un estudio de ecología química del insecto. Por lo que, el objetivo de la presente investigación fue describir la morfología de las antenas y los tipos de sensilas antenales presentes en machos y hembras del picudo *Rhyssomatus nigerrimus*.

<sup>1</sup>Fitosanidad- Entomología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Las Huastecas, Ciudad Cuauhtémoc, Tamaulipas, 89610, México.

<sup>3</sup>USDA-APHIS, Biotechnology Regulatory Services, 4700 River Rd., Riverdale, MD 20737, USA.

<sup>4</sup>Instituto Tecnológico de Cd. Victoria. Tamaulipas, 87010, México.

Autor de correspondencia: [zamudio.adriana@colpos.mx](mailto:zamudio.adriana@colpos.mx)



## MATERIALES Y MÉTODOS

**Recolecta de insectos.** Los adultos de *R. nigerrimus* fueron recolectados en el cultivar de soya Huasteca 200 en el Campo Experimental “Las Huastecas” del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (22.57287N, -98.17787O), durante el ciclo Primavera-Verano del 2014. Para ello, se sacudió el follaje y los adultos encontrados se confinaron en un recipiente de plástico de 0.5 l y trasladaron al Laboratorio de Entomología del C. E. “Las Huastecas” donde se separaron por sexo (Ambrogi y Zarbin, 2008; Cazado *et al.*, 2014).

**Microscopía Electrónica de Barrido.** Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados siguiendo el protocolo para coleópteros de Harrison (2012). Se procesaron las cabezas y antenas de diez machos y diez hembras. Los ejemplares se secaron a punto crítico (Samdri® 780, TOUSIMIS Research Corporation, Rockville, USA) y las estructuras procesadas se colocaron en los porta muestras y se llevaron a una ionizadora de metales (JFC-1100, JEOL LTD, Tokio, Japón) para el recubrimiento con oro. El microscopio electrónico de barrido (JSM-6390, JEOL LTD, Tokio, Japón) se empleó para observar las antenas de los adultos de *R. nigerrimus*. Las imágenes se procesaron en el programa de cómputo ImageTool V. 3.0 (Wilcox *et al.*, 2002) para medir la longitud y ancho de las cabezas, antenas, antenómeros y sensilas. En el presente trabajo se clarificaron con base en la nomenclatura de Snodgrass (1935), Schneider (1964), Zacharuk (1980), Chapman (1982) y Shields (2010).

**Análisis estadístico de datos.** Los promedios ( $M$ )  $\pm$  error estándar de la media (EE) de la longitud y ancho de las antenas, antenómeros y de cada tipo de sensila se analizaron mediante una prueba estadística de t para muestras independientes a fin de determinar diferencias entre hembras y machos de *Rhysomatus nigerrimus*. Cuando los datos no presentaron una distribución normal se empleó la prueba estadística de Mann-Whitney (M-W) (SAS Institute, 1999).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Estructura general de la antena de *R. nigerrimus*.** La antena de *R. nigerrimus* está conformada por un escapo, un pedicelo y un flagelo o funículo. El flagelo está compuesto de

nueve flagelómeros, Los últimos tres segmentos están fuertemente unidos y con divisiones poco visibles entre ellos, formando la maza antenal Fig. 1 (Morrone, 2000). El número de flagelómeros puede variar entre insectos, lo que puede utilizarse para clasificar a los picudos a nivel de subfamilia (O'Brien y Wibmer, 1982; Wibmer y O'Brien, 1986; Keil, 1999; Marvaldi y Lanteri, 2005).

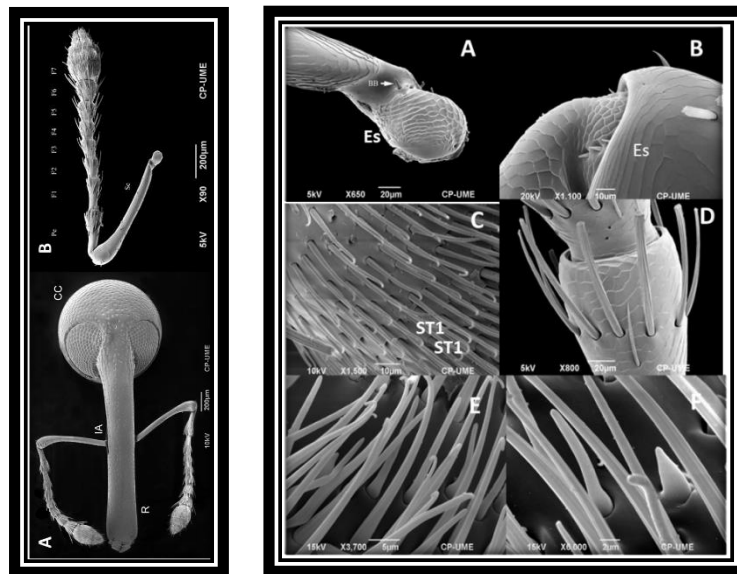


Fig.1 A. Vista general de la cabeza de la hembra de *R. nigerrimus*. La cabeza del macho es similar en forma y morfología, pero difieren ligeramente en la inserción antenal. R: Rostrum; IA: Inserción antenal; CC: cápsula cefálica. B. vista dorsal de la antena de la hembra. La antena del macho es similar en forma y difiere en la longitud. Es, Escapo; Pe, pedicelo; f1, flagelómero 1; f2, flagelómero 2; f3, flagelómero 3; f4, flagelómero 4; f5, flagelómero 5; f6, flagelómero 6 y f7, club antenal o mazo (3 segmentos flagelares). Fig. 2. Tipología de sensilas antenales de *Rhysomatus nigerrimus*. A. Setas de Böhm (BB), base del escapo (Es), unión con la cabeza; B. Setas de Böhm (BB), unión entre el escapo (Es) y el pedicelo (Pe); C. Sensila tricoidea tipo 1; D. Sensila aplanada estriada 1 (SPE1), sensila tricoidea 2 (ST2); E y F. Sensila basicónica 1 (SB1) y sensila basicónica 2 (SB2).

La longitud y ancho de los segmentos antenales (escapo, pedicelo y flagelómeros) de ambos sexos de *R. nigerrimus* se presentan en el Cuadro 1. Con base en la morfología y características de la superficie de las sensilas, se lograron caracterizar 9 tipos de sensilas (Fig.2): una propioreceptora denominada Böhm Bristles o setas Böhm (BB), dos sensilas tricoideas (ST1, ST2), dos sensilas basicónicas (SB1, SB2), tres sensilas planas estriadas (SPE1, SPE2, SPE3) y una sensila falciforme (SF). Las características morfológicas se describen en el Cuadro 2. Los resultados de este estudio de morfología externa de las sensillas antenales de *R. nigerrimus*, concuerdan con los resultados obtenidos en otros estudios realizados con curculiónidos (Smith *et al.*, 1976; Yan *et al.*, 2011). Cabe destacar que las

senilas espatuladas no son muy comunes en curculiónidos (Yan *et al.*, 2011). La discriminación de hospederos se relaciona con la morfología antenal (Lopes *et al.*, 2002; Ansebo *et al.*, 2005; Vogt, 2005). La descripción morfológica de las sensillas antenales de los machos y de las hembras de *R. nigerrimus* es un punto de referencia para realizar más estudios sobre el funcionamiento del sistema sensorial del insecto.

**Cuadro 1. Promedios de longitud y ancho  $M \pm EE$  ( $\mu\text{m}$ ) de los segmentos antenales de adultos de machos y hembras de *Rhyssomatus nigerrimus* (n=20).**

S	Es	Pe	Flagelómero						Maza antenal	
			1	2	3	4	5	6		
L	M	649.7±12.8§	241.2±2§	148.1±1.3§	112.8±1.9§	109.5±1.7§	106.7±1§	105.9±6.3§	124.7±1.8	284.9±0.7§
	H	711.0±25.2§	255.4±1.3§	190.7±1.0§	126.6±1.3§	121.1±1.3§	111.7±1§	117.9±0.7§	128±0.9	306±0.5§
A	M	77.6±33.0	67.3±3.1	59±1.9	79.9±1.2	87.8±1	92.8±7	103.1±1.9	117.2±3.1	203.9±1.9§
	H	81.1±25.5	69.8±2.4	63±2.7	79.3±1.7	88.3±1.4	94±2.7	103.1±1.5	122±0.6	198±0.6§

L=Longitud; A=Ancho; M=macho; H=hembra; S=sexo; Es=Escapo; Pe=pedicelo; f1= flagelómero 1; f2= flagelómero 2; f3= flagelómero 3; f4= flagelómero 4; f5= flagelómero 5; f6= flagelómero 6 y f7= club antenal. (\*) Indica diferencia estadística significativa entre sexos. (§) Indica diferencia estadística altamente significativa entre sexos.

**Cuadro 2. Tipos de sensilas en las antenas de machos y hembras de *Rhyssomatus nigerrimus* ( $\mu\text{m}$ ).**

Tipo de sensila	Sexo	n	Características morfológicas de las sensilas					
			Longitud ( $\mu\text{m}$ )	Ancho ( $\mu\text{m}$ )	Ápice	Superficie	Forma	Socket
BB	M	240	6.8 ± 0.1**	1.8 ± 0.04**	Recto	Lisa	Recta	Estrecho
	H	240	9.4 ± 0.2**	2.5 ± 0.05**	Recto	Lisa	Recta	Estrecho
ST1	M	180	29.1 ± 0.4**	2.01 ± 0.06*	Curvo	EL	Recta	Estrecho
	H	180	25.7 ± 0.4**	2.2 ± 0.03*	Curvo	EL	Recta	Estrecho
ST2	M	200	33.2 ± 0.3	2 ± 0.04**	Agudo	EL	Recta	Estrecho
	H	220	32.6 ± 0.4	2.5 ± 0.0**	Agudo	EL	Recta	Estrecho
SB1	M	200	13.9 ± 0.1**	1.4 ± 0.03**	Redondeada	LELA	Recta	Estrecho
	H	150	11.9 ± 0.2**	2.6 ± 0.04**	Redondeada	LELA	Recta	Estrecho
SB2	M	170	5.4 ± 0.1	2.7 ± 0.04**	Agudo	Lisa	Recta	Estrecho
	H	182	7.8 ± 0.5	2.5 ± 0.1**	Agudo	Lisa	Recta	Estrecho
SAE1	M	260	58.9 ± 1.1	4.2 ± 0.1**	Plana	EL	Aplanada	Estrecho
	H	280	57.2 ± 0.7	5.5 ± 0.1**	Plana	EL	Aplanada	Estrecho
SAE2	M	80	97.6 ± 1.9**	4.7 ± 0.1**	Plana	EL	Aplanada	Estrecho
	H	80	82.4 ± 1.1**	5.6 ± 0.1**	Plana	EL	Aplanada	Estrecho
SAE3	M	120	35.8 ± 0.5**	3.4 ± 0.1	Redondeada	EL	Aplanada	Estrecho
	H	120	25.7 ± 0.3**	2.7 ± 0.03	Redondeada	EL	Aplanada	Estrecho
SF	M	60	27.9 ± 1.1**	3.7 ± 0.2**	Agudo	Lisa	Aplanada	Estrecho
	H	60	16.7 ± 0.5**	2.2 ± 0.1**	Agudo	Lisa	Aplanada	Estrecho

Medidas: resultados de longitud y ancho ( $M \pm EE$ ); (\*) Indica diferencia estadística significativa (columnas); (\*\*) Indica diferencia estadística altamente significativa (columna). EL Estrias longitudinales; LELA Lisa con estrias longitudinales hacia el ápice

## AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por la beca otorgada (204128) para la realización de los estudios de doctorado. Al Campo Experimental “Las Huastecas” del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por permitirnos realizar las colectas de picudo para la realización de esta investigación.

## LITERATURA CITADA

- Ansebo, L., R. Ignell, J. Löqvist, and B.S. Hansson. 2005. Responses to sex pheromone and plant odours by olfactory receptor neurons housed in sensilla auricillica of the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Insect Physiol.* 51: 1066-1074.
- Ambrogio, B. G., and P.H.G. Zarbin. 2008. Aggregation pheromone in *Sternechus subsignatus* (Coleoptera: Curculionidae): Olfactory behaviour and temporal pattern of emission. *J. Appl. Entomol.* 132: 54-58.
- Cazado, L. E., C. W. O'Brien, A. S. Casmuz, G. A. Gastaminza, and M. G. Murúa. 2014. Sexual Dimorphism of *Rhyssomatus subtilis* (Coleoptera: Curculionidae). *Fla. Entomol.* 97: 1812-1815.
- Chapman, R. F. 1982. *The Insects. Structure and Function*, 3rd ed. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts, pp. 736-755.
- Chi, D. F., G. L. Wang, J. W. Liu, Q. Y. Wu, and Y. P. Zhu. 2009. Antennal morphology and sensilla of Asian multicolored ladybird beetles, *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae). *Entomol. News* 120: 137-152.
- Harrison, J.G. 2012. Cleaning and preparing adult beetles (Coleoptera) for light and scanning electron microscopy. *African Entomol.* 20: 395-401.
- Hu, F., G. N. Zhang, and J. J. Wang. 2009. Scanning electron microscopy studies of antennal sensilla of bruchid beetles, *Callosobruchus chinensis* (L.) and *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Micron* 3: 320-326.
- Keil, T. A. 1999. Morphology and development of the peripheral olfactory organs. In Hansson, Bill S. *Insect Olfaction* (1st ed.). Springer, Berlin, Germany pp. 5-48.
- Mahmoud, E. A., F. M. Hussein, and S. M. El-Naggar. 2012. Ultrastructure alterations in the red palm weevil antennal sensilla induced by gamma Irradiation. En Prof. Feriz Adrovic (Ed.), *Gamma Radiation* pp. 229-248.
- Morrone, J. J. 2000. Mexican weevils (Coleoptera: Curculionoidea): a preliminary key to families and subfamilies. *Acta Zool. Mex. (n.s.)* 80: 131-141.
- Lopes O., E. N. Barata, H. Mustaparta, and J. Araujo. 2002. Fine structure of antennal sensilla basiconica and their detection of plant volatiles in the eucalyptus woodborer, *Phoracantha semipunctata* Fabricius (Coleoptera: Cerambycidae). *Arth. Struct. Dev.* 31: 1-13.
- López-Guillén G., A. P. Terán-Vargas J. Gómez Ruiz J. San-Juan Lara G. H., Rosado-Neto C. W. O'Brien L. Cruz-López L. A. Rodríguez-Del-Bosque y R. Alatorre-Rosas. 2012b. First record of *Rhyssomatus nigerrimus* (Curculionidae: Molytinae: Cleogonini) infestations in soybeans in Mexico. *Florida Entomologist*, 95(2):524-528.
- O'Brien, C. W., and G. J. Wibmer. 1982. Annotated checklist of the weevils (Curculionidae sensu lato) of North America, Central America, and the West Indies (Coleoptera: Curculionoidea). *Mem. Am. Entomol. Inst. (Gainesville)* 34: 1-382.
- Onagbola, E. O., W. L. Meyer, D. R. Boina, and L. L. Stelinski. 2008. Morphological characterization of the antennal sensilla of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), with reference to their probable functions. *Micron* 39: 1184-91.
- Schneider, D. 1964. *Insect antennae*. *Annu. Rev. Entomol.* 9: 103-122.
- Shields, V. D. C. 2010. High resolution ultrastructural investigation of insect sensory organs using field emission scanning electron microscopy, In: *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education A*. Méndez-Vilas and J. Díaz (Eds.). pp. 321-328.
- Smith, C. M., J. L. Frazier, L. B. Coons, and W. E. Knight. 1976. Antennal sensilla of the clover head weevil *Hypera meles* (F.) (Coleoptera: Curculionidae). *Int. J. Insect. Morphol. Embryol.* 5: 349-355.
- Snodgrass, R.E. 1935. *Principles of Insect Morphology*. McGraw-Hill Book Company, inc. pp. 510-610.

- Terán-Vargas, A.P., San Juan L.J., López-Guillén G. 2011. El picudo mexicano de la vaina de la soya (*Rhyssomatus nigerrimus* Fahraeus): una nueva plaga. En la Memoria de VI Reunión Nacional de Innovación agrícola. León, Guanajuato p. 298.
- Terán-Vargas, A. P., y G. López-Guillén. 2014. El picudo de la soya *Rhyssomatus nigerrimus*, Fahraeus 1837 (Coleoptera: Curculionidae). Folleto Técnico No. MX-0-310304-47-03-14-09-38 ISBN: 978-607-37-0297-3 Campo experimental Las Huastecas. CIRNE-INIFAP pp 2-3.
- Vogt, R. G. 2005. Molecular basis of pheromone detection in insects. In: Gilbert, L.I., Latro K., Gill, S. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, Pharmacology and Molecular Biology. Endocrinology* 3: 753–804.
- Wibmer, G. J., and O'brien, C. W. 1986. Annotated checklist of the weevils (Curculionidae sensu lato) of South America (Coleoptera: Curculionoidea). *Mem. Am. Entomol. Inst. (Gainesville)*. 39: 1–563.
- Wilcox, C. D., S. B. Dove, W. D. McDavid and D. B. Greer. 2002. Image tool for Windows Version 3.0. The University of Texas Health Science Center in San Antonio, San Antonio, Texas, USA.
- Yan, S. C., Z. J. Meng, L. Peng, and D. Liu. 2011. Antennal sensilla of the pine weevil *Pissodes nitidus* Roel. (Coleoptera: Curculionidae). *Microscopy Res. Tech.* 74: 389–396.
- Zacharuk, R. Y. 1980. Ultrastructure and function of insect chemosensilla. *Annu. Rev. Entomol.* 25: 27–47.

RESPUESTA CONDUCTUAL DE *Catolaccus huteri* (HYMENOPTERA:  
PTEROMALIDAE) A SEÑALES VISUALES FORMA Y COLOR

Nadia S. **Gómez-Domínguez**<sup>1</sup>, J. R. **Lomeli-Flores**<sup>1</sup>, Julio S. **Bernal**<sup>2</sup>, Esteban **Rodríguez-Leyva**<sup>1</sup>, Juan **Cibrian-Tova**<sup>1</sup> y Rene **Arzuffi**<sup>3</sup>

## INTRODUCCIÓN

La selección de hábitat es la primera etapa de la búsqueda del huésped por los parasitoides, los cuales pueden decidir cancelar o utilizar uno de los posibles hábitats disponible y continuar el proceso hasta la parasitación del huésped. Esta primera etapa está influenciado por un fuerte componente hereditario, sin embargo la experiencia acumulada del organismos puede afectar la selección del mismo (Vinson 1998). En una amplia variedad de organismos la experiencia innata tiene un marcado efecto sobre la decisión de los individuos al convertirse en adultos (Davis y Sellos 2004), y por otro lado la experiencia que gana un individuo en la etapa adulta (aprendizaje) puede ayudarle a seleccionar el hábitat más rentable. Es por ello que la experiencia previa de una hembra puede modificar o afectar la respuesta de selección del huésped por el parasitoide en el proceso de búsqueda (Vinson, 1998). La información sobre el aprendizaje en los parasitoides (himenópteros), se encuentra poco estudiada (Wäckers y Lewis, 1994), la mayoría de los estudios se han realizado con énfasis en las señales químicas, mientras que las investigaciones sobre formas, colores y tamaños se han estudiado en menor medida (Wardle y Borden 1990; Wäckers y Lewis 1999). Se ha propuesto que las señales visuales y el aprendizaje son importantes en el proceso de búsqueda para los parasitoides sobre todo en especies generalistas (Stireman 2002), debido a que les permite hacer frente a la variabilidad de las señales a las cuales se enfrentan durante el proceso de búsqueda.

<sup>1</sup>Fitosanidad- Fitopatología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

<sup>2</sup>Department of Entomology, Texas A&M University, TAMU 2475, College Station, TX.

<sup>3</sup>Interacciones Planta Insecto, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, IPN.

Autor de correspondencia: **salome.gomez@yahoo.com.mx**

La familia Pteromalidae (Insecta: Hymenoptera) agrupa principalmente parasitoides de plagas de importancia económica, algunas de las cuales son huéspedes crípticos que se desarrollan en el interior de frutos, minas o tallos. *Catolaccus hunteri* Crawford (Hymenoptera: Pteromalidae) es un ectoparasitoide solitario, de al menos 17 especies de Curculionidae y dos especies de Bruchidae (Rodríguez-Leyva *et al.* 2000).

Se reporta como un posible agente de control biológico del picudo del chile *Anthonomus eugenii* Cano (Schuster 2007). la plaga más importante de este cultivo en USA, México, Centroamérica (Riley and Schuster 1992; Rodríguez-Leyva *et al.* 2007) y recientemente detectado en Holanda e Italia y erradicado el primer país (EPPO 2011, Speranza *et al.*, 2014). Aunque existe interés biológico en el parasitoide *C. hunteri*, se desconocen los mecanismos de localización y aceptación de sus huéspedes. Este parasitoide ataca huéspedes crípticos, larvas de ultimo instar en semillas para el caso de Bruchidae y larvas de 3er instar de *A. eugenii* en frutos de chile. Se asume que utiliza señales físicas, químicas y mecánicas provenientes del huésped o de su entorno como se ha señalado para otros parasitoides (Mbata *et al.* 2005; Onagbola and Fadamiro 2011). Schuster (2012) indicó una respuesta innata de este parasitoide hacia la señale visual color, pero hasta el momento no se tiene certeza sobre la influencia de la forma de los objetos en los procesos de búsqueda y localización de huéspedes. El presente trabajo se llevó a cabo para entender si la sensibilización a una señal visual influye en el proceso de búsqueda del hábitat por el parasitoide.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para determinar la capacidad de asociación de *C. hunteri* a las combinación de señales visuales. Se colocaron 20 hembras del parasitoide de 11 días de edad individualmente en una caja Petri (10x 10x 2cm) donde se llevó acabo un periodo de adiestramiento, ofreciéndole a cada hembra una lámina de Parafilm M ® con 16 figuras semicirculares amarillas que contenían dos larvas de 4to instar de *C. maculatus* cada una, por un periodo de 12 h durante 7 días, con un periodo de no exposición de 12h. Posterior a este entrenamiento se dejó en ayuno a la hembra por 48h y se procedió a examinar su comportamiento en una prueba elección.



La prueba se realizó por un periodo de 20 min en una arena similar a la utilizada en la sesión de entrenamiento que contenía 8 figuras circular-amarilla y 8 oval-roja (respuesta de atracción innata) ambas vacías, durante dicho periodo se realizaron y registraron las siguientes observaciones: (i) Primera, segunda y tercera elección de figuras, (ii) Tiempo de permanecía en cada elección, (iii) Intentos de picadura por cada elección, y (iv) Número de picaduras certeras por elección; se realizaron 8 repeticiones con 20 unidades experimentales cada una. Las elecciones, tiempo de permanencia por elección, intentos de picadura en cada elección y picaduras certeras por elección, se analizaron por separado mediante una ANOVA en rangos y prueba de comparación de medias (Tukey  $\alpha=0.05$ ) los análisis se realizaron con el paquete Statistix 9.1

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se esperaba obtener una respuesta de aprendizaje asociativo por parte de las hembras del parasitoide durante el proceso de búsqueda del hábitat del huésped, es decir, esperábamos que las hembras respondieran hacia la señal circular-amarilla a la cual fueron sensibilizados (entrenado). Sin embargo esto no sucedió en su mayoría, aproximadamente el 97.8 % de las hembras a prueba en el bioensayo su respuesta de atracción (primer elección) fue a la combinación oval-rojo (atracción innata), prevaleciendo en la mayoría de los casos la misma atracción se observó en la segunda elección (70%) y en la tercera (89.7%). Esta misma tendencia se observó para las demás variables observadas, número de intentos de picadura y picaduras certeras.

La teoría propuesta para estos resultados es que este parasitoide generalista, se encuentra ampliamente distribuido en las zonas donde el cultivo del chile en México se cultiva, incluso el parasitoide más abundante reportado como parasitoide del picudo del chile en México y USA (Schuster, 2007, Leyva et al. 200), y al ser parasitoide el 3er estado larval de *A. eugenni*, la atracción a la combinación rojo-oval se encuentra muy relacionada con los chiles que al ser abortados del fruto, comienzan a madurar rápidamente (por la producción de etileno), tornándose rojos, lo cual puede ser una respuesta de atracción muy fuerte como se observó en los resultados de atracción innata, esto puede estar relacionado evolutivamente con la relación planta-fitófago.

## AGRADECIMIENTOS

La autora agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca completa para realizar estudios de doctorado.

## LITERATURA CITADA

- Davis, J. M. and Stamps, J. A. 2004. The effect of natal experience on habitat preferences. *Trends Ecol. Evol.* 19: 411-416. .
- EPPO. 2011. EPPO-PQR database on quarantine pests (available online) version 2011-11-25. <http://www.eppo.org>.
- Mbata, G.N., Thomas, A. and H. F. Fadamiro. 2005. Parasitism by *Pteromalus cerealellae* (Hymenoptera: Pteromalidae) o the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* (Coleopteran: Bruchidae) host density, temperature effects, and host finding ability. *Biol. Control* 3: 286-292.
- Riley, D. G., and D. J. Shuster. 1992. The occurrence of *Catolaccus hunteri*, a parasitoid of *Anthonomus eugenii*, in insecticide treated bell pepper. *Southwest. Entomol.* 17:71-72.
- Rodríguez-Leyva, E., J. L. Leyva, V. Gómez, N. M. Bárcenas and G. W. Elzen. 2000. Biology of *Catolaccus hunteri* (Hymenoptera: Pteromalidae), parasitoid of pepper weevil and boll weevil. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 93: 862-868.
- Schuster D. J. 2012. Response of *Catolaccus hunteri* (Hymenoptera: Pteromalidae) to colored sticky traps in the laboratory. *Fla. Entomol.* 95: 501-502.
- Stireman, J. O., III. 2002. Learning in the generalist tachinid parasitoid *Exorista mella* Walker (Diptera: Tachinidae). *J. Insect Behav.* 15: 689-706.
- Turlings, T. C. J., Wäckers, F. L., Vet, L. E. M., Lewis, W. J. and Tumlinson, J. H. 1993. Learning of host-finding cues by hymenopterous parasitoids. In: *Insect Learning: Ecological and Evolutionary Perspectives* (Ed. by D. R. Papaj & A. C. Lewis), pp. 51e78. New York: Chapman & Hall.
- Vinson S.B. 1984. How parasitoids locate their hosts: a case of insect espionage. In: Lewis T (ed) *Insect communication*. Royal Entomological Society of London, London, pp 325–348.
- Vinson, S. B. 1998. The general host selection behavior of parasitoid Hymenoptera and a comparison of initial strategies utilized by larvaphagous and oophagous species. *Biol. Control.* 11: 79-96.
- Wäckers, F. L. and Lewis, W. J. 1994. Olfactory and visual learning and their combined influence on host site location by the parasitoid *Microplitis croceipes* (Cresson). *Biol. Control.* 4: 105- 112.
- Wardle, A. R. and Borden, J. H. 1990. Learning of host microhabitat form by *Exeristes roborator* (F.) (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Journal of Insect Behavior*, 3: 251-263.

## TOXICIDAD DE IMIDACLOPRID Y FLONICAMID SOBRE *Dicyphus hesperus* (HEMIPTERA: MIRIDAE)

Reyna Vargas Abasolo<sup>1\*</sup>, J. R. Lomeli-Flores<sup>1</sup>, Esteban Rodríguez-Leyva<sup>1</sup>, Alfonso Torres Ruíz<sup>2</sup>

### INTRODUCCIÓN

El principal método de combate de plagas en invernadero es el uso de insecticidas sistémicos (Nauen *et al.* 2002; Gharalari *et al.* 2009), este tipo de insecticidas con este modo de acción permanecen activos en la planta durante más tiempo que los de contacto (Nakahira *et al.* 2011). Imidacloprid y flonicamid son dos insecticidas de acción sistémica que más se utilizan en este método de cultivo ya que han demostrado ser eficaces para el control de insectos chupadores. Sin embargo, aplicaciones continuas e inadecuadas podrían generar la resistencia de plagas (Nauen y Denholm, 2005), por ello, es necesaria la implementación de otras tácticas de control, como es el uso de enemigos naturales.

La aplicación conjunta de insecticidas y enemigos naturales en el manejo de plagas en invernadero cada vez es más común (Lemes *et al.*, 2010). Diversos estudios han demostrado que los enemigos naturales son vulnerables a la aplicación de muchos plaguicidas, ya que estos pueden disminuir las poblaciones de insectos benéficos y afectar su establecimiento en cultivos agrícolas (Mizell y Sconyere, 1992; Dong-Soon *et al.* 2006; Araya *et al.* 2010).

En la búsqueda de enemigos naturales para ser usados como agentes de control biológico, se ha reportado a *Dicyphus hesperus* Knight (Hemiptera: Miridae), un depredador generalista zoofitófago que ha demostrado tener potencial para el control de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae), *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) y *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) en jitomate en invernadero (McGregor *et al.* 1999; Shipp y Wang, 2006); además, Gillespie *et al.* (2001), observaron que todas las etapas de desarrollo de este mrido se alimentan de ninfas del psílido de la papa *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae).

<sup>1</sup>Fitosanidad-Entomología y Acarología. Colegio de Posgraduados campus Montecillos. Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Edo. de México, C.P. 56230, Texcoco, Edo. de México.

<sup>2</sup>Koppert México, S.A. de C.V., Circuito el Marqués Norte #82, Parque Industrial El Marqués, 76246 Santiago de Querétaro, Querétaro.

Autor de correspondencia: reynavargas.a@gmail.com

Debido a que *D. hesperus* tiene hábitos fitófagos, los insecticidas empleados para el control de plagas podrían causar efectos negativos sobre este, no obstante, no se han reportado estudios donde se demuestre el efecto de los mismos sobre este enemigo natural. Por ello, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto residual de dos insecticidas sobre *D. hesperus* en ensayos de invernadero.

## MATERIALES Y MÉTODOS

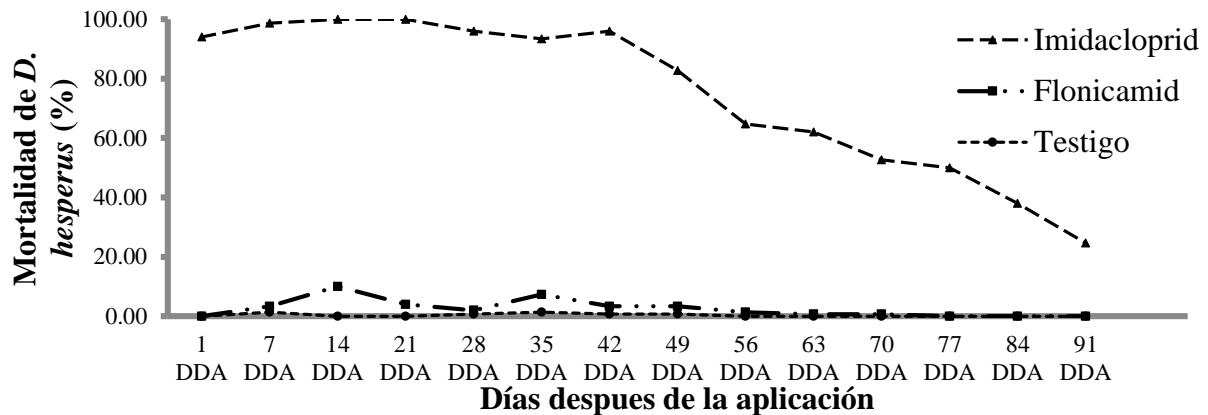
Se evaluaron dos formulaciones comerciales de insecticidas de acción sistémica de diferente grupo toxicológico: imidacloprid 350 gL<sup>-1</sup>, (CONFIDOR, Cía Bayer de México) perteneciente al grupo de los Neonicotinoides, y flonicamid 500 g L<sup>-1</sup>, (BELEAF GS, FMC Agroquímica de México S. de R. L. de C.V.) del grupo de las Piridinocarboxamidas. Para ello, se emplearon hembras de *D. hesperus* de 2 a 10 d de edad alimentadas con huevos de *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). De cada insecticida se utilizó la dosis media recomendada por el fabricante: 870 mLha<sup>-1</sup> de imidacloprid y 250 gha<sup>-1</sup> de flonicamid. Para preparar las soluciones se tomó como base 400 L de agua.

Para la realización del bioensayo se utilizó plántula de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) de 40 días de edad, libre de insecticidas. Las charolas de germinación con la plántula se sumergieron hasta la raíz en la solución de insecticida por 10 s. Cuatro días después, la plántula se trasplantó en macetas de plástico (19 cm de diámetro x 20 cm de altura) con sustrato de arena de tezontle y peat moss (Growing Mix<sup>®</sup>), en una proporción de 2:1 (V:V). La unidad experimental consistió de una planta de jitomate previamente tratada, la cual se colocó dentro de una jaula de organza (35 cm de largo x 30 cm de ancho x 60 cm de alto) en donde se liberaron 15 hembras del mío y huevos de *E. kuehniella* sobre una tira de cinta adhesiva. Las jaulas se colocaron al azar en un invernadero. Se realizaron 10 repeticiones por tratamiento incluyendo al testigo al que se le aplicó agua corriente. La mortandad se observó después de 24 h. Posteriormente dos veces por semana se retiraron los míos y se liberaron nuevos insectos. Este procedimiento se repitió hasta que la mortalidad fue < 25%, porcentaje que se clasifica como inofensivo de acuerdo con la IOBC para ensayos en invernadero (Hassan, 1992). Los resultados de mortalidad entre tratamientos se analizaron mediante una prueba de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia de P = 0.05. Debido a

que se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, para la comparación de medias se realizó una prueba de Bonferroni.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto residual de imidacloprid en plantas de jitomate en condiciones de invernadero (hasta causar mortalidad < 25%) fue de 91 d. En la Figura 1 se presenta gráficamente su evolución en el tiempo. Flonicamid no fue diferente a testigo ( $\chi^2=27.68$ ;  $df=2$ ;  $P<0.0001$ ), en este tratamiento se registró una mortalidad menor de 10% desde la primer semana de aplicación del producto, por lo que este insecticida fue inofensivo para el mívrido. De acuerdo con la IOBC para ensayos en invernadero, imidacloprid se ubicó en la categoría 4 (altamente nocivo) y flonicamid en la categoría 1 (inofensivo).



**Figura 1.** Mortalidad acumulada de *D. hesperus* en plantas de jitomate en condiciones de invernadero.

La toxicidad residual de plaguicidas puede estar influenciada por el método de aplicación que se emplee, se ha reportado que los insecticidas sistémicos permanecen activos en la planta durante más tiempo que los de contacto (Nakahira *et al.* 2011). En este estudio imidacloprid se aplicó vía sistémica y fue inofensivo al mívrido hasta después de 90 d. Al respecto, Figuls *et al.* (1999) estudiaron el efecto de la toxicidad residual de imidacloprid sobre dos mívridos zoofitófagos al aplicarlo vía foliar y reportaron que este insecticida fue inofensivo hasta 30 días después de la aplicación del tratamiento. Por otra parte, la velocidad de disipación de los insecticidas está influenciada por factores como: humedad, temperatura, luz, volatilización, tipo de suelo y por la actividad metabólica de la planta. Narvaéz *et al.* (2012), mencionan que la radiación UV interfiere en el proceso de degradación de ciertos plaguicidas, como es el caso de los neonicotinoides (Maienfisch *et al.*, 2001). En este estudio,

el efecto residual de imidacloprid se puede deber a que las plantas se encontraban bajo invernadero confinadas en jaulas, por lo que la cubierta plástica pudo interferir en la transmisión de los rayos uv.

En plantas tratadas con flonicamid no se encontraron efectos adversos en los míridos, una explicación que se da es que este insecticida tiene efecto anti alimentario en los insectos, por lo que necesita de mayor tiempo para manifestar su actividad, además la baja mortalidad que ocasionó, se puede deber a que este producto es selectivo para ciertas plagas de insectos chupadores, Colomer *et al.* (2011) reportaron que este insecticida es selectivo principalmente para áfidos y moscas blancas, al aplicarlo foliar y a través del riego. Al respecto, Morita *et al.* (2007) reportó que *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) inhibió su alimentación inmediatamente después de ser expuesto a flonicamid, esta actividad de anti alimentación no era recuperable hasta ocasionar la muerte del insecto.

Los resultados de este estudio indican que imidacloprid no es compatible con *D. hesperus*, por ello, no se recomienda hacer liberaciones de este depredador antes de 91 días de que se aplique dicho insecticida. Flonicamid no tiene impacto negativo sobre este mírido, por lo que puede ser considerado para aplicarlo en combinación con este depredador.

## AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados, a Koppert México y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría.

## LITERATURA CITADA

- Araya J., E., M. Araya and A. Guerrero M. 2010. Effects of some insecticides applied in sublethal concentrations on the survival and longevity of *Aphidius ervi* (Haliday) (Hymenoptera: Aphidiidae) adults. Chilean Journal of Agricultural Research 70 (2): 221-227.
- Colomer I., P. Aguado, P. Medina, M. Heredia R., A. Feredes, E. Belda, J., and Viñuela, E. 2011. Field trial measuring the compatibility of methoxyfenozide and flonicamid with *Orius laevigatus* Fieber (Hemiptera: Anthocoridae) and *Amblyseius swirskii* (Athias-Henriot) (Acari: Phytoseiidae) in a commercial pepper greenhouse Pest Management Science 67: 1237-1244.
- Dong-Soon K., J. Brooks D., and H. Rield. 2006. Lethal and sublethal effects of abamectin, spinosad, methoxyfenozide and acetamiprid on the predaceous plant bug *Deraeocoris brevis* in the laboratory. BioControl 51: 465-484.

- Figuls M., C. Castañé, and R. Gabarra. 1999. Residual toxicity of some insecticides on the predatory bugs *Dicyphus tamaninii* and *Macrolophus caliginosus*. *Biocontrol* 44: 89-98.
- Gharalari A., H., C. Nansen, D. Lawson S., J. Gilley, E. Munyaneza, J., and K. Vaughn. 2009. Mortality, repellency, and residual effects of insecticides for control of adult *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Psyllidae). *Journal Economic Entomology* 102(3): 1032-1038.
- Gillespie D., A. Sánchez, R. McGregor, and D. Quiring. 2001. *Dicyphus hesperus* – life history, biology and application in tomato greenhouses. Pacific agri-food research centre, agassiz. Agriculture and agri-food of Canada. Reporte técnico # 166.
- Lemes F., F., L. Bacci, and M. Sena F. 2010. Impact and selectivity of insecticides to predators and parasitoids. *EntomoBrasilis* 3(1): 01-10.
- Hassan S., A. 1992. Guideline for the evaluation of side effects of plant protection product on *Trichogramma cacaoeciae*. IOBC/WPRS Working Group: Pestic and Bene Organism Bulletin, 3: 18-39.
- Maienfisch P., M. Angst, F. Brandl, W. Fischer, D. Hofer, H. Kayser, W. Kobel, A. Rindlisbacher, R. Senn, A. Steinemann and H. Widmer. 2001. Chemistry and biology of thiamethoxam; a second generation neonicotinoid. *Pest Management Science* 57: 906-913.
- McGregor R., D. Gillespie, R. Quiring, D. Foisy M. 1999. Potential use of *Dicyphus hesperus* Knight (Heteroptera: Miridae) for biological control of pests of greenhouse tomatoes. *Biol Control* 16: 104-110.
- Mizell R., F., and C. Sconyers M. 1992. Toxicity of imidacloprid to selected arthropod predators in the laboratory. *Fla Entomol* 75: 277-280.
- Morita M., T. Ueda, T. Yoneda, T. Koyanagi, and T. Haga. 2007. Flonicamid, a novel insecticide with a rapid inhibitory effect on aphid feeding. *Pest Management Science* 63: 969-973.
- Nakahira K., R. Kashitant, M. Tomoda, R. Kodama, K. Ito, S. Yamanaka, M. Momoshita, R. Nauen, N. Stumpf, and A. Elber. 2002. Toxicological and mechanistic studies on neonicotinoid cross resistance in Q-type *Bemisia Tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pest Management Science* 58: 868-875.
- Nauen R., and I. Denholm. 2005. Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: current status and future prospects. *Arch Ins Biochem Physiol* 58: 200-215.
- Shipp J., L., and K. Wang. 2006. Evaluation of *Dicyphus Hesperus* (Heteroptera: Miridae) for biological control of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) on greenhouse tomato. *Journal Economic Entomology* 99(2): 414-220.



## INTERACCIÓN DE *Dicyphus hesperus* (HEMIPTERA: MIRIDAE) EN LA ACTIVIDAD DE *Tamarixia triozae* (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE) SOBRE EL PSÍLIDO DE LA PAPA

María de L. **Ramírez-Ahuja**<sup>1\*</sup>, Esteban **Rodríguez-Leyva**<sup>1</sup>, J. R. **Lomeli-Flores**<sup>1</sup> y Alfonso **Torres-Ruíz**<sup>2</sup>.

### INTRODUCCIÓN

La importancia de *Bactericera cockerelli* Sulc (Hemiptera: Triozidae) como plaga de solanáceas en Centroamérica, México, EE.UU. y Nueva Zelanda (Hansen *et al.* 2008; Workman y Whiteman, 2009) no solo es por el daño directo a sus hospederas, sino por su papel como vector de enfermedades. Para su control tradicionalmente se emplean medidas culturales y químicas pero no han sido suficientes y este insecto ha ocasionado la pérdida de grandes superficies de tomate y papa, por esta razón se piensa que la inclusión de algún enemigo natural podría hacer más sustentable y eficiente su manejo (Butler y Trumble 2012; Cerón-González *et al.* 2014; Rojas *et al.* 2015; Calvo *et al.* 2016).

Aunque existen varios enemigos naturales de *B. cockerelli* (Butler y Trumble 2012); *Tamarixia triozae* Burks (Hymenoptera: Eulophidae) sobresale por varios de sus atributos biológicos como ciclo de vida corto y alta capacidad reproductiva, además elimina ninfas por parasitación y alimentación (Cerón-González *et al.* 2014; Rojas *et al.* 2015). Por otro lado, se ha reportado que el depredador generalista *Dicyphus hesperus* Knight (Hemiptera: Miridae) también puede alimentarse de *B. cockerelli* (Gillespie *et al.* 2001; Calvo *et al.* 2016). Como no existe información previa sobre la interacción de *T. triozae* y *B. cockerelli*, el objetivo de este trabajo fue determinar si *D. hesperus* depreda ninfas de *B. cockerelli* parasitadas por *T. triozae* en pruebas de no-elección y elección.

<sup>1</sup>Fitosanidad- Fitopatología. Colegio de Postgraduados Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Tel: (595) 952 02 29 Fax: (595) 952 02 30.

<sup>2</sup>Koppert México, S.A. de C.V. Circuito el Marqués Norte 82, Parque Industrial El Marqués, C.P. 76246 El Marqués, Querétaro, México.

\*Autor de correspondencia: . [lulu.ahuja@hotmail.com](mailto:lulu.ahuja@hotmail.com)

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material biológico.** Se utilizaron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. var. 'Floradade') de 90-95 días de edad. Los ejemplares de *B. cockerelli* y *T. triozae* se obtuvieron de unas crías que se mantienen en el Colegio de Postgraduados desde el 2010, de acuerdo con la metodología descrita por Rojas *et al.* (2015). Los especímenes de *Dicyphus hesperus* fueron proporcionados por la empresa Koppert México de una cría experimental que se mantiene desde el 2014. Los experimentos se realizaron en arenas de observación, que consistieron de cajas Petri de 4.5 cm de diámetro, con 3 orificios laterales cubiertos con organza para permitir ventilación. En la caja Petri se colocó un disco foliar de tomate sobre papel húmedo y después los insectos de acuerdo a los tratamientos respectivos. En todos los ensayos se utilizaron hembras adultas de *D. hesperus* de 5 a 9 días de edad, y previo a su uso se mantuvieron sin presa por 24 h en la planta de tomate.

### **Prueba de elección y no elección de *Dicyphus hesperus* sobre ninfas parasitadas**

**Prueba de no elección.** En cada unidad se colocaron los tratamientos que consistieron de 10 ninfas de *B. cockerelli* de 4to ínstar parasitadas por *T. triozae* con alguno de los siguientes estados de desarrollo: a) huevo (2 horas después de parasitación), b) larva madura [4 días después de parasitación (ddp)] y c) pupa madura (8 ddp). Para establecer los dos últimos tratamientos fue necesario recortar el área foliar donde se encontraban fijos y, posteriormente acomodarlos sobre los discos de hoja de cada unidad experimental. Los datos se analizaron usando la prueba de "t".

**Prueba de elección de *D. hesperus*.** Cada unidad experimental estuvo formada por 30 ninfas de *B. cockerelli*, 20 de ellas parasitadas por *T. triozae* y 10 sin parasitar, las ninfas parasitadas fueron 10 ninfas de 4to ínstar parasitadas con larva madura de *T. triozae* y 10 ninfas parasitadas con pupa madura de *T. triozae*. Los datos se analizaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (aproximación a  $X^2$ ), y separación de medias mediante el método de Bonferroni. Todas las unidades experimentales se mantuvieron en cámara de cría ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $60\pm 10\%$  HR y 16:8 L: O) por 24 h, y en todas las pruebas se realizaron 30 repeticiones con su testigo. La variable respuesta fue el número de ninfas consumidas por

unidad, esto se determinó mediante observación directa, usando un microscopio estereoscópico a las 24 h de establecidas las unidades experimentales.

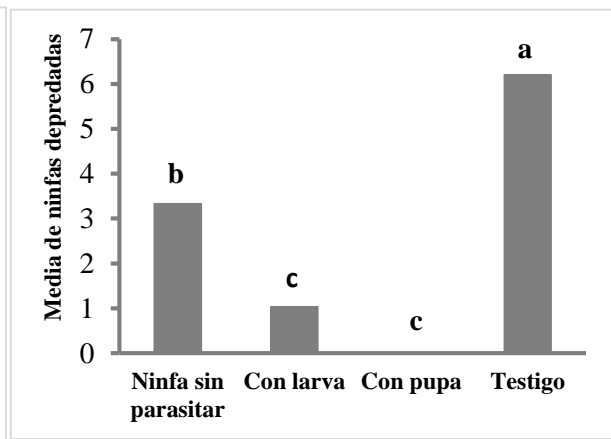
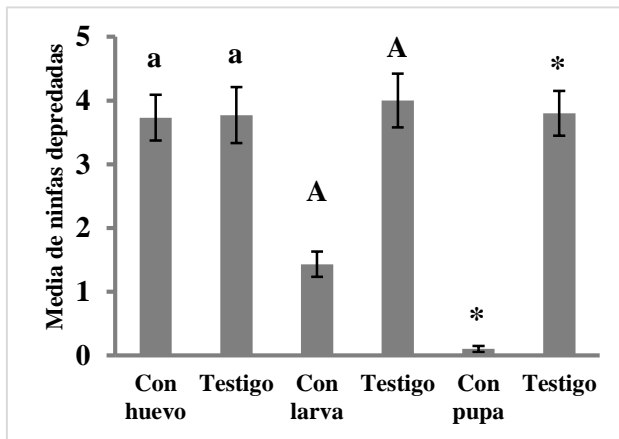
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la prueba de no-elección *D. hesperus* se alimentó en la misma proporción de ninfas sin parasitar y ninfas recién parasitadas (estado de huevo de *T. triozae*). En estos dos tratamientos ocurrió la máxima depredación y no hubo diferencias estadísticas entre ellos ( $p=0.9541$ ). No obstante, *D. hesperus* disminuyó la depredación conforme aumentó el estado de desarrollo de *T. triozae* en las ninfas parasitadas (Fig. 1;  $p<0.0001$ ), es decir se alimentó menos de ninfas parasitadas con larva y pupa madura de *T. triozae*. En la prueba de elección, cuando se le ofreció al depredador ninfas parasitadas con larva, con pupa y ninfas sin parasitar, se confirmó que prefiere a las ninfas sin parasitar (Kruskal-Wallis  $df=3$ ;  $\chi^2=86.68$ ;  $p<0.0001$ ). Además, conforme avanzó el estado de desarrollo de *T. triozae*, *D. hesperus* consumió menos ninfas y no depredó ninfas parasitadas en estado de pupa (Fig. 2).

En la interacción de depredadores con parasitoides puede ocurrir depredación intragremial (McGregor y Gillespie 2005; Labbe *et al.* 2006). Por ejemplo, el uso combinado de algunos míridos como *Macrolophus caliginosus* Wagner, *Nesidiocoris tenuis* Reuter (Hemiptera: Miridae) y *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera: Aphelinidae) es eficaz para el control de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae), aunque el depredador se puede alimentar del parasitoide y puede disminuir su abundancia. Nuestros resultados coinciden con Castañé *et al.* (2004) donde los míridos *M. caliginosus* y *Dicyphus tamaninii* Wagner rechazaron ninfas de *T. vaporariorum* parasitadas con pupa por *Encarsia formosa*. Hernández-Moreno *et al.* (2012) encontraron resultados similares, donde los adultos de *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) discriminaron ninfas de *Maconellicoccus hirsutus* Green (Hemiptera: Pseudococcidae) parasitadas con pupa madura de *Anagyrus kamali*.

*Dicyphus hesperus* se alimentó de ninfas de *B. cockerelli* parasitadas por *T. triozae* en estado de huevo; pero cuando el parasitoide estuvo en estado de larva esta depredación disminuyó, y en el estado de pupa *D. hesperus* evitó la depredación. Esta discriminación

podría explicarse porque el depredador pudiera reconocer estados avanzados de parasitación por su morfología, o porque la cutícula de la ninfa parasitada con pupa se endurece y dificulta la alimentación del depredador (Hoelmer *et al.* 1994). Aunque se necesitan más trabajos de ecología para responder si es posible utilizar juntos a estos dos enemigos naturales en una condición real, los resultados sugieren que podría existir sinergismo al introducir a *D. hesperus* y *T. triozae* en un programa de manejo integrado contra *B. cockerelli* porque *D. hesperus* puede discriminar entre ninfas parasitadas en estado de larva madura y pupa de las ninfas no parasitadas.



**Figura 1.** Ninfas depredadas por *D. hesperus* en prueba de no-elección sobre ninfas de 4to ínstar *B. cockerelli* parasitadas por *T. triozae* con huevo de parasitación), con larva (4 días de parasitación), con pupa (8 días de parasitación) y su testigo (1 sin parasitar). Prueba de “t” a indica  $P > 0.95$ ; indica  $P < 0.0001$  y \*  $P < 0.0001$ .

**Figura 2.** Ninfas depredadas por *D. hesperus* en pruebas de elección sobre ninfas de 4to ínstar de *B. cockerelli* parasitadas por *T. triozae* con larva (4 días de parasitación), con pupa (8 días de parasitación) y ninfas sin parasitar. Comparación de medias por el método de Bonferroni.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca completa de maestría en ciencias al primer autor. Este trabajo estuvo financiado por el proyecto INNOVAPYME-CONACYT No. 223073 asignado a Koppert México S. A. De C. V.

**LITERATURA CITADA**

- Butler, C. D. and J. T. Trumble. 2012. Identification and impact of natural enemies of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) in Southern California. *J. Econ. Entomol.* 105: 1509-1519.
- Calvo, J., A. Torres-Ruíz, J. C. Velázquez-González, E. Rodríguez-Leyva and J. R. Lomeli-Flores. 2016. Evaluation of *Dicyphus hesperus* for biological control of sweetpotato whitefly and potato psyllid on greenhouse tomato. *Biocontrol* submitted July 2015.
- Castañé, C., O. Alomar, M. Goula and R. Gabarra. 2004. Colonization of tomato greenhouses by the predatory mirid bugs *Macrolophus caliginosus* and *Dicyphus tamaninii*. *Biological Control* 30: 591-597.
- Cerón-González, C., J. R. Lomeli-Flores, E. Rodríguez-Leyva y A. Torres-Ruíz. 2014. Fecundidad y alimentación de *Tamarixia triozae* (Hymenoptera: Eulophidae) sobre el psílido de la papa *Bactericera cockerelli*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5: 893-899.
- Gillespie, D., A., Sánchez, R., MacGregor and D. Quiring. 2001. *Dicyphus hesperus* - life history, biology and application in tomato greenhouses. Technical Report # 166 p.
- Hansen, A. K., J. T. Trumble, R. Stouthamer and T. D. Paine, 2008. A new Huanglongbing (HLB) species, "*Candidatus Liberibacter psyllaeus*", found to infect tomato and potato, is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 5862-5865.
- Hernández-Moreno S., H. González-Hernández, J. R. Lomeli-Flores, E. Rodríguez-Leyva y A. Robles. 2012. Efecto de *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera: Coccinellidae) en la actividad parasitoide de *Anagyrus kamali* (Hymenoptera: Encyrtidae) sobre *Maconellicoccus hirsutus* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Revista Colombiana de Entomología* 38: 64-69.
- Hoelmer, K. A., L. S. Osborne and R. K. Koyomi. 1994. Interactions of the whitefly predator *Delphastus pusillus* (Coleoptera: Coccinellidae) with parasitized sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). *Environ. Entomol.* 23: 136-139.
- Labbe, R. M., C. Cloutier and J. Brodeur. 2006. Prey selection by *Dicyphus hesperus* of infected or parasitized greenhouse whitefly. *Biocontrol Sci. Techn.* 16: 485-494.
- McGregor, R. R. and D. R. Gillespie. 2005. Intraguild predation by the generalist predator *Dicyphus hesperus* on the parasitoid *Encarsia formosa*. *Biocontrol Sci. Techn.* 15: 219-227.
- Rojas, P., E. Rodríguez-Leyva, J. R. Lomeli-Flores and T. X. Liu. 2015. Biology and life history of *Tamarixia triozae* (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). *Biocontrol* 60: 27-35.
- Workman, P. J. and S. A. Whiteman. 2009. Importing *Tamarixia triozae* into containment in new Zealand. *New Zealand Plant. Prot.* 62: 412.