

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO FORESTAL

**Biología del Tizón Suizo
y su Relación con el Silicio y la
Nutrición de Árboles de Navidad**

Oscar Javier Salgado Feregrino

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2013

La presente Tesis titulada: Biología del Tizón Suizo y su Relación con el Silicio y la Nutrición de Árboles de Navidad realizada por el alumno: Oscar Javier Salgado Feregrino bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
FORESTAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

Dr. Juan Velázquez Mendoza

DIRECTOR DE TESIS

Dra. María de Jesús Yáñez Morales

ASESOR

Dr. Marcos Jiménez Casas

ASESOR

Dra. Ma. Edna Álvarez Sánchez

ASESOR

Dr. J. A. Gil Vera Castillo

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Junio, 2013.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por el financiamiento de mis estudios de postgrado.

Al **Colegio de Postgraduados**, por permitir realizar mis estudios de postgrado y todas las facilidades recibidas para llevar a buen termino la investigación.

Al **Dr. Juan Velázquez Mendoza**, por creer en mí, brindarme su apoyo incondicional, compartirme su experiencia científica y en especial, por su amistad.

A la **Dra. María de Jesús Yáñez Morales**, por la gran contribución que hizo a mi formación, apoyar siempre en todo momento mis inquietudes y por su certera dirección en el desarrollo de la investigación.

Al **Dr. Marcos Jiménez Casas**, por sus atinados consejos y el apoyo brindado durante mi estancia en Montecillo.

A la **Dra. Ma. Edna Álvarez Sánchez**, por su apoyo y orientación en el desarrollo de las etapas de investigación.

Al **Dr. J A. Gil Vera Castillo**, por sus valiosos comentarios y su amistad.

A la **Universidad Autónoma Chapingo**, por todas las facilidades que recibí en el uso de sus instalaciones y equipo para el desarrollo de la investigación.

A la empresa **Agros Navidad S. A. de C. V.** y a su Director General **Ing. Luciano Zarate Duarte** por todas las facilidades otorgadas para realizar la investigación en sus instalaciones.

A la Sra. **María del Carmen García Arevalo**, quien en todo momento recibí su apoyo.

A la **Universidad Intercultural del Estado de Puebla**, en especial al **M.C. Alibert Sánchez Jiménez**, por las facilidades otorgadas para concluir el proceso de mis estudios de postgrado, y a todos mis compañeros y compañeras docentes y administrativos, y a las y los estudiantes por su apoyo incondicional y compartir esta nueva etapa de mi vida.

A todas las personas que algún día conformaron mi equipo de trabajo en Agros Navidad S. A. de C. V. y Buenavista Floral S. A. de C. V. por confiar en mí, brindarme su apoyo, su amistad y siempre me alentaron a seguir adelante con la meta propuesta, éste documento también es de Ustedes.

A todos mis compañeros y amigos, por compartir buenos y malos momentos.

Con agradecimiento sincero.

Oscar Javier Salgado Feregrino.

DEDICATORIA

A mis Padres: María de la Luz Feregrino Romero y Francisco Javier Salgado Valderrabano[†].

Con quienes comparto este logro.

A mis Hermanos: Dolores, Francisco Javier y Ninfa Concepción. La distancia nos separa, pero siempre estamos juntos.

A mi Esposa: Flor Adriana Gallegos García. Fuerte columna de apoyo. Gracias.

A mis Sobrinos: Mauro Martín Ortíz Salgado y Diego Jesús España Salgado. Empiezan el largo camino de la vida, no se desanimen, éste es un pequeño ejemplo de que pueden lograr cosas grandes.

A mis cuñados: Verónica Montiel Ortíz y José Martín Ortíz Pérez, por compartir sueños en familia.

A mi mejor Amigo: Remy. Eres de otra especie, pero siempre estuviste conmigo, éste también es tu logro.

A mis amigos: Claudio Rivera Lozano, Concepción Aguilar Fabila, Irma Vázquez Sánchez, Agustina Sánchez Parada, Alba Diego de la Calleja, Carmen Romero Austria y Sandra Rivera Gutiérrez, de quiénes en su momento recibí su apoyo incondicional.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
BIOLOGÍA DE TIZÓN SUIZO Y SU RELACIÓN CON EL SILICIO Y LA NUTRICIÓN DE ÁRBOLES DE NAVIDAD.	1
SWISS NEEDLE CAST BIOLOGY AND ITS RELATIONSHIP WITH SILICON AND NUTRITION OF CHRISTMAS TREES.	2
CAPÍTULO 1	3
INTRODUCCIÓN GENERAL.	3
Objetivo general.	3
Objetivos específicos.	5
Hipótesis.	5
CAPÍTULO 2	6
REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1 Tizón Suizo del Follaje <i>Phaeocryptopus gaeumannii</i> (Rhode) Petrak.	6
a) Síntomas y morfología del teleomorfo.	6
b) Anamorfo.	7
c) Distribución.	7
2.2 Árbol de Navidad Douglas-fir: <i>Pseudotsuga menziesii</i> (Mirb.) Franco.	9
2.3 Silicio.	11
2.4. Literatura citada.	12
CAPITULO 3	15
ALGUNOS AVANCES EN LA BIOLOGÍA DE TIZÓN SUIZO EN MÉXICO	15
RESUMEN	15
3.1 INTRODUCCIÓN	16

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.2.1 Área de estudio	18
3.2.2 Muestras	18
3.2.3 Identificación	19
3.2.4 Actividad biológica del hongo	19
3.2.5 Características culturales	20
3.2.6. Caracterización molecular	20
3.2.7 Microscopia Electrónica de Barrido	20
3.2.8 Evaluación de la enfermedad	21
3.2.9 Ascosporas aerotransportadas	21
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
3.3.1 Identificación	23
3.3.2 Caracterización molecular	23
3.3.3 Actividad biológica del hongo	25
3.3.4 Características culturales	26
3.3.5 Daños por la enfermedad	26
3.3.6 Presencia de ascosporas	32
3.4 CONCLUSIONES	37
3.5 LITERATURA CITADA	38
CAPÍTULO 4	41
NUTRIMENTOS Y CRECIMIENTO <i>in vitro</i> DE TIZÓN SUIZO	41
RESUMEN	41
4.1 INTRODUCCIÓN	42
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	44
4.2.1 Fuente de inóculo	44
4.2.2 Crecimiento en MEA y Agar	44
4.2.3 Crecimiento en extracto de papa y medio líquido	45
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
4.3.1 Crecimiento en MEA y Agar	48
4.3.2 Crecimiento en extracto de papa y medio líquido	49

4.4 CONCLUSIONES	52
4.5 LITERATURA CITADA	53
CAPÍTULO 5	54
TIZÓN SUIZO, SILICIO Y NUTRICIÓN EN ÁRBOLES DE NAVIDAD	54
RESUMEN	54
5.1 INTRODUCCIÓN	55
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS	56
5.2.1 Área de estudio	56
5.2.2 Muestreos	58
5.2.3 Evaluación de la enfermedad	58
5.2.4 Análisis vegetal	58
5.3 RESULTADOS	60
5.3.1 Evaluación de la enfermedad	60
5.3.2. Análisis vegetal	60
5.4 DISCUSIÓN	64
5.5 CONCLUSIONES	67
5.6 LITERATURA CITADA	68
CAPITULO 6	70
DISCUSIÓN GENERAL	70
CAPITULO 7	74
CONCLUSIONES GENERALES	74
BIBLIOGRAFÍA GENERAL	75

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO 3. ALGUNOS AVANCES EN LA BIOLOGÍA DE TIZÓN SUIZO EN MÉXICO

<u>No. Cuadro</u>		<u>Página</u>
1	Actividad biológica de <i>P. gaeumannii</i> sobre acículas del primer y segundo tercio de árboles de navidad, <i>P. menziesii</i> .	25
2	Daño en porciento de pseudotecios de <i>P. gaeumannii</i> sobre acículas del primer y segundo tercio de árboles de navidad, <i>P. menziesii</i> .	30
3	Daño en porciento por defoliación de acículas del primer y segundo tercio de árboles de navidad, <i>P. menziesii</i> .	31
4	Presencia de ascosporas en pseudotecios de <i>P. gaeumannii</i> sobre acículas de árboles de navidad <i>P. menziesii</i> .	32

CAPÍTULO 4. NUTRIMENTOS Y CRECIMIENTO *in vitro* DE TIZÓN SUIZO

<u>No. Cuadro</u>		<u>Página</u>
1	Nutrientos utilizados en el experimento de <i>Phaeocryptopus gaeumannii</i> , <i>in vitro</i> en MEA al 2 %.	45
2	Nutrientos utilizados por tratamiento en el experimento en medio líquido con extracto de papa y dextrosa.	47

CAPÍTULO 5. TIZÓN SUIZO, SILICIO Y NUTRICIÓN EN ÁRBOLES DE NAVIDAD

<u>No. Cuadro</u>		<u>Página</u>
1	Tratamientos del experimento factorial 2x2x3 en árboles de navidad.	57
2	Valores medios transformados de la variable “porcentaje de defoliación”.	61

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 3. ALGUNOS AVANCES EN LA BIOLOGÍA DE TIZÓN SUIZO EN MÉXICO

<u>No. Figura</u>		<u>Página</u>
1	A, B, C: Acículas de Douglas-fir (<i>Pseudotsuga menziesii</i>) de un año de edad con pseudotecios de Tizón Suizo (<i>Phaeocryptopus gaeumannii</i>) alineados sobre los estomas. D: Pseudotecios con basal peg emergiendo de estomas. E, F: Diferentes formas de aberturas espontáneas de pseudotecios para liberación de ascosporas (D-F: en microscopio electrónico de barrido). G Y H: Ascas con ascosporas. I: Ascospora (en contraste de fases). J, K: Colonias en MEA 2 %. Valle de Bravo, Edo. de México, Méx. Barras de escala: D = 40 µm, E = 50 µm, F = 80 µm, G = 30 µm, H, I = 10 µm.	24
2	Comportamiento de la defoliación <i>P. menziesii</i> en relación a la incidencia y severidad de <i>P. gaeumannii</i> en acículas de diferentes edades.	31
3	Ascosporas aerotransportadas en lote Ladera de otoño 2011 a verano 2012.	35
4	Ascosporas aerotransportadas en el lote Leños de otoño 2011 a verano 2012.	35
5	Comportamiento de <i>P. gaumannii</i> en acículas de <i>P. menziesii</i> a lo largo del año.	36

CAPÍTULO 4. NUTRIMENTOS Y CRECIMIENTO *in vitro* DE TIZÓN SUIZO

<u>No. Figura</u>		<u>Página</u>
1	Tasa de Crecimiento Relativo Instantáneo de <i>P. gaeumannii</i> en MEA.	48
2	Peso húmedo <i>P. gaeumannii</i> después de 42 días en extracto de papa y dextrosa en medio líquido y el efecto negativo de los tratamientos sobre su crecimiento, en relación al tratamiento Testigo.	50

CAPÍTULO 5. TIZÓN SUIZO, SILICIO Y NUTRICIÓN EN ÁRBOLES DE NAVIDAD

<u>No. Figura</u>		<u>Página</u>
1	Contenido de macronutrientes en acículas de <i>P. menziesii</i> durante el periodo de estudio.	63
2	Contenido de micronutrientes en acículas de <i>P. menziesii</i> durante el periodo de estudio.	63

BIOLOGÍA DE TIZÓN SUIZO Y SU RELACIÓN CON EL SILICIO Y LA NUTRICIÓN DE ÁRBOLES DE NAVIDAD

Oscar Javier Salgado Feregrino

Colegio de Postgraduados, 2013

En México, el Tizón Suizo, *Phaeocryptopus gaeumannii*, reduce la calidad y producción de árboles de navidad, poco se conoce del ciclo biológico. Esta investigación se dividió en tres partes. La primera tuvo como objetivo conocer la biología del hongo a través de un año, para ello se identificó, secuenció, evaluó incidencia, severidad, defoliación, porcentaje de aislamientos, ascosporas en pseudotecios y aerotransportadas. En la segunda parte se estudió *in vitro* la relación del hongo con el silicio y nutrimentos, se registró peso húmedo y seco. En la tercera parte se estudio *in situ* la relación con la dosis nutritiva y evaluó porcentaje de defoliación y concentración nutrimental en acículas. En la primera parte se encontró hasta tres periodos de incremento de incidencia y severidad en los árboles evaluados, la defoliación fue severa y directamente proporcional con la edad de las acículas. En primavera fue la mayor actividad biológica del hongo con el mayor número de aislamientos, cantidad de ascosporas en pseudotecios, y uno de los dos periodos de ascosporas aerotransportadas. En la segunda parte el exceso de macronutrimentos en el medio de cultivo favoreció el crecimiento de *P. gaeumannii*, y los micronutrimentos Cu, Mn y Zn en dosis doble lo redujeron. En la tercera parte no hubo diferencias significativas entre tratamientos en relación a la defoliación. En acículas se encontró deficiencia de P y K, el resto de los nutrimentos se mostraron con niveles normales. El haber determinado actividad continua del hongo en todas las edades de acícula a través del año, y la concentración y balance de la solución nutritiva *in vitro* e *in situ* empleada, pueden ser la base para una estrategia de control integrado que cause inhibición al hongo y permita un crecimiento aceptable del árbol. Palabras clave: Ascosporas aerotransportadas, incidencia, *Phaeocryptopus gaeumannii*, severidad, *Pseudotsuga menziesii*.

SWISS NEEDLE CAST BIOLOGY AND ITS RELATIONSHIP WITH SILICON AND NUTRITION OF CHRISTMAS TREES

Oscar Javier Salgado Feregrino

Colegio de Postgraduados, 2013

In Mexico, the Swiss Needle Cast, *Phaeocryptopus gaeumannii*, reduces the quality and production of Christmas trees, a little is know about its biology cycle. This research was divided on three parts. The first one had the objective to know the biology of the fungus, for this purpose, it was identified, sequenced, to assess incidence, severity and defoliation, the isolates percentage, and ascospore on pseudothecia and airborne were recorded. On the second part the relationship between the fungus with the silicon and nutriments was studied *in vitro*, the fresh and dry weight was recorded. On the third part the relationship with the nutritious dose was studied *in situ*, and the defoliation percentage and nutritious concentration on needles was evaluated. On the first part was found that until three increments of incidence and severity on the evaluated trees. The defoliation was severe and directly proportional with the age of the needles. In spring was the higher biological activity fungus with the higher isolates number, quantity of ascospore on pseudothecia and airborne. On the second part the excess of macronutrients on the medium favored the growth of *P. gaeumannii*, and the micronutrients Cu, Mn and Zn on double dose reduced it. On the third part there was not significant difference among treatments. P and K deficiency was found, the level of the rest of nutriments was normal. Having determined continuos activity of the fungus in all needles age through the year and the concentration and balance of the nutritive solution used, can be the base for a strategy of integrated control to cause inhibition to the fungus and allow an acceptable growth of the tree. Keywords: Airborne ascospore, incidence, *Phaeocryptopus gaeumannii*, *Pseudotsuga menziesii*, severity.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

La importación de árboles de navidad a México tiene decenas de años, en las décadas de los 70 y 80's fueron cantidades cercanas a los 100,000 árboles, de forma progresiva la tendencia de importación aumentó hasta alcanzar la cifra de 1,248,363 árboles en 2008, en 2009 disminuyó a 934,230 árboles y en 2010 tuvo un ligero incremento con 956,724 árboles importados (SENASICA, 2011). Esta situación posiblemente fue originada por la entrada en vigor de la NOM-EM-158-SEMARNAT-2009 y la NOM-013-SEMARNAT-2010 que regulan sanitariamente la importación y restringe el ingreso de árboles de navidad vivos con o sin sustrato de las especies de los géneros *Abies*, *Pinus* y *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco para prevenir la introducción al país de plagas asociadas a éstos (PROFEPA, 2010) y a la vez proteger el incremento en la producción, oferta y diversidad de árboles de navidad por productores mexicanos (CONAFOR, 2009).

Las plantaciones forestales para producción comercial de árbol de navidad en México, son proyectos con desarrollo a largo plazo y de alta inversión económica, hasta \$300,000 ha/turno (Zarate L, comunicación personal, 2010)^[1]. En la actualidad, cultivo de *P. menziesii* como árbol de navidad incrementa paulatinamente y de igual manera la presencia de *Phaeocryptopus gaeumannii* (Rhode) Petrak, Tizón Suizo, lo cual pone en riesgo su rentabilidad, dado que se registran daños hasta en un 25 % de la superficie plantada, además de reducir beneficios, como ecológicos: captura de carbono, producción de oxígeno, infiltración de agua a mantos freáticos, protección a fauna silvestre, control de erosión; sociales: generación de 270,000 jornales/año directos permanentes y 6,000 jornales/año temporales en áreas rurales

^[1] Zarate L. Director General de Agros Navidad S. A. de C. V. (zaratedl@gmail.com)

(Zarate L, comunicación personal, 2010)^[1] y de alta marginación, fomento al desarrollo de infraestructura en las comunidades donde se establecen plantaciones; y económicos: derrama económica en el área de influencia, fomento al desarrollo del mercado de servicios.

El control químico de Tizón Suizo es con el ingrediente activo Clorotalonil, en plantaciones de *P. menziesii*, para producción de madera se recomiendan dos aplicaciones al año, la primera en el mes de mayo y la segunda en agosto, mediante aspersión aérea con dosis de 6.4 L/ha (Johnson, 2003; Stone, 2007a), ó 1.1 kg/ha (Chastagner, 1983b), la dosis empleada en plantaciones de *P. menziesii* para árboles de navidad del Estado de México es de 1.5 g/L con equipo de aspersión manual, aplicaciones cada mes durante el periodo de junio a octubre, lo cual involucra una gran cantidad de agroquímicos (hasta 400 kg por temporada), mano de obra (3000 jornales) e insumos, equipo y su mantenimiento (Zarate L. comunicación personal, 2010). En las aplicaciones iniciales se empleó, además, aceite mineral Saf-T-Side[®] para facilitar el desprendimiento de pseudotecios de las acículas, si bien se obtuvo una respuesta favorable, se descontinuo el uso por su elevado costo, además de que se observaron reacciones alérgicas a nivel de piel en los trabajadores que realizaban las fumigaciones. Otras labores culturales que se realizan son la poda para conservar la arquitectura del árbol y eliminación de malezas durante la temporada de lluvias. Por lo anterior se hace necesario desarrollar alternativas de control a la enfermedad del hongo Tizón Suizo.

El presente proyecto busca al futuro, fundamentar investigaciones aplicadas que generen alternativas integrales de control, en base a los aspectos del ciclo biológico del patógeno, diseñar dosis y fuentes de nutrimentos en su concentración óptima para el árbol y que a la vez inhiban el desarrollo del hongo.

^[1] Zarate L. Director General de Agros Navidad S. A. de C. V. (zaratedl@gmail.com)

OBJETIVO GENERAL

Iniciar el estudio de la biología del Tizón Suizo en plantaciones forestales comerciales de árboles de navidad en México.

Objetivos Específicos

- Conocer la actividad biológica anual de *Phaeocryptopus gaeumannii* (Rhode) Petrak en las condiciones ambientales de México.
- Desarrollar una dosis nutrimental óptima para el cultivo, que controle al patógeno.

Hipótesis

- *Phaeocryptopus gaeumannii* en árboles de navidad (*P. menziesii*) presenta ciclos reproductivos sexuales durante todo el año y no solamente en temporada de lluvias.
- El control del patógeno se realiza con nutrición adecuada del cultivo.

CAPITULO 2

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Tizón Suizo del Follaje *Phaeocryptopus gaeumannii* (Rhode) Petrak

a) Síntomas y morfología del teleomorfo

El Tizón Suizo (Swiss Needle Cast), patógeno de Douglas Fir (*P. menziesii*), es originado por el hongo Ascomycota *P. gaeumannii*; el cual presenta cuerpos fructíferos de color negro pseudotecios, de hasta 80 µm de diámetro, en su interior contiene numerosas ascas ovoides a piriformes, bitunicadas de 40 x 15 µm. Estas ascas contienen en su interior ocho ascosporas fusiformes, hialinas, didymosporas, de 10 - 15 x 3.5 - 5 µm (Dennis, 1978).

Los síntomas que presentan los árboles infectados son acículas cloróticas, pobre retención de acículas y reducción en el crecimiento, en plantaciones severamente afectadas los árboles pueden perder todo el follaje de años anteriores, conservando sólo las acículas con crecimiento del año en curso, y los signos característicos es la presencia de pseudotecios que se localizan en el envés de las acículas (Kimberley, 2011)

El ciclo biológico de tizón suizo ha sido estudiado por varios autores principalmente para las condiciones de la Costa de Oregon en Estados Unidos en el hemisferio norte (Capitano, 1999; Chastagner, 1983a, Hansen *et al.*, 2000; Manter, 2000; Shaw *et al.*, 2011), y en el hemisferio sur en Chile (Osorio, 2007) y en Nueva Zelanda (Stone, 2007b).

b) Anamorfo

Stone (1985) colectó acículas de Douglas-fir ubicados en la costa oeste de Estados Unidos, en el mes de octubre, señala la presencia de fialides no proyectadas más allá del estoma y que al observarlos son fácilmente ignorados, que implican una conidiogénesis detenida y que sugieren la existencia del estado anamorfo del hongo. Sutton (1980) consideró al género *Rhizosphaera* spp. como el anamórfo de *P. gaeumannii*; Winton (2007) en su estudio para determinar la posición sistemática de *P. gaeumannii* empleó análisis filogenéticos de las pequeñas (SSU) y largas (LSU) subunidades y regiones espaciadoras internas ITS de las secuencias de genes nucleares ribosomales (rDNA) y determina que *Rhizosphaera* spp. y *P. gaeumannii* no están relacionados. Por similitud morfológica y de síntomas, *P. gaeumannii* puede ser confundido con el género *Rabdocline* (Myren, 1984). Por lo anterior no se conoce el anamorfo de *P. gaeumannii*.

c) Distribución

En 1925 *P. gaeumannii* fue detectado en Suiza, se dispersó hacia Alemania, Dinamarca, Inglaterra e Irlanda (Boyce, 1940), posteriormente en 1940 se descubrió en seis estados de Estados Unidos: Connecticut, Maine, Massachusetts, New Hampshire, Rhode Island y Vermont, (Boyce, 1940); en 1959 se encontró por primera vez en plantaciones de Nueva Zelanda; en 1970 el patógeno se detectó en plantaciones de árboles de navidad de los estados de Oregon y Washington en Estados Unidos pero no se determinó la magnitud del problema; en 1996 la Swiss Needle Cast Cooperative de Oregon, EE. UU., reportó 53,050 ha con síntomas de Tizón Suizo y para 2010 un total de 159,415 ha infectadas el cual es el daño más severo (Kanaskie, 2010). Actualmente se conoce al hongo en Chile, España, Francia, Italia, México y Turquía (Cibrian, 2009; Osorio, 2007; Stone, 2007b; Temel, 2003; Temel, 2004). No existe claridad en el mecanismo por el cual *P. gaeumannii* se hizo presente en México. Cibrian (2007) ubica la

presencia de la especie en bosques naturales de *P. menziesii* en Chihuahua, Durango, Coahuila, Nuevo León, Querétaro, Puebla, Tlaxcala, Veracruz; además del Distrito Federal y el Estado de México; en éste último se reportó también para plantaciones de árboles de navidad que emplean como especie principal a *P. menziesii* (Cruz, 2007).

El Tizón Suizo es un patógeno que no se ha estudiado ampliamente en México pero es de gran importancia en plantaciones mexicanas de árboles de navidad al generar perdidas del 25% de la superficie plantada. (Zárate L.)^[1]. Su incidencia en los árboles requiere de una inversión alta en agroquímicos como un método de control, por lo cual es importante desarrollar alternativas que permitan reducir el costo económico y ambiental. En el año 2003 se reconoció la presencia de tizón suizo en plantaciones de árboles de navidad en el Estado de México, particularmente el lote “Ladera”, y para 2005 se identificó un aumento notable en la tasa de infección en el lote “Leaños”, para finales de 2006 y principios de 2007 se presentó un evento de defoliación en 12 ha, con densidad de 3500 árboles/ha, 42,000 árboles con un costo en el mercado de \$9’240,000.00, tuvieron defoliaciones de medias a severas, por los niveles de daño que se observaron, la plantación comercial estuvo en riesgo de supervivencia (Zarate L, comunicación personal, 2010). Se efectuó un primer estudio del tizón suizo que abarcó de marzo a septiembre de 2006 (Cruz, 2007) y fue la base para el diseño de medidas de control químico que reducen temporalmente la población del patógeno, sin embargo, se hace presente año con año en diferentes grados de incidencia (Zarate L, comunicación personal, 2010). Es posible que el desconocer las fases de desarrollo del patógeno durante el periodo de octubre a febrero contribuye a expandir la infección al efectuar labores culturales o al distribuir y vender árboles infectados.

^[1] Zarate L. Director General de Agros Navidad S. A. de C. V. (zaratedl@gmail.com)

2.2 Árbol de Navidad Douglas-fir: *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco

El cultivo en vivero inicia con la siembra de semilla, abarca la esterilización de contenedores, preparación de sustratos, riegos y fertilizaciones con dosis total anual de 40-50-20 con fuentes de nutrimentos sulfato de amonio, superfosfato de calcio simple y cloruro de potasio. Posterior a ésta, se realizan trasplantes a contenedores de mayor volumen y se continúan los riegos y fertilizaciones con la misma dosis a lo largo de otro año, al término del cual las plantas están en condiciones de ser enviadas a plantación. En la etapa de vivero las enfermedades más comunes son las generadas por el complejo “Damping off” y *Botrytis* spp. en escala menor, e incluso rara vez, es posible encontrar *Fusarium* spp. o *Phytophthora* spp. las cuales son controladas con fungicidas químicos comerciales (Zarate L, comunicación personal, 2010).

El cultivo en plantación es factible de dividirlo en tres fases: establecimiento de la plantación, mantenimiento de la plantación y cosecha.

El establecimiento de la plantación comprende la preparación del terreno, el cual consiste en un subsuelo, paso de arado y rastreo, para ofrecer mejores condiciones al enraizamiento; continúa con el trazo de la plantación seguida de la apertura de cepa y trasplante con fertilización de fondo y empleo de insecticida granulado, para evitar la incidencia de plagas del suelo en la raíz; posterior a ello, se efectúan uno o dos riegos de auxilio.

El mantenimiento de la plantación incluye la fertilización edáfica anual en el mes de agosto con dosis 250-90-60 con fuentes de nutrimentos urea, superfosfato de calcio triple y cloruro de potasio y foliar con dosis 40-50-20 con fuentes nutrimentales sulfato de amonio, superfosfato de calcio simple y cloruro de potasio, monitoreo mensual para el control de plagas y enfermedades,

control de malezas durante los meses de junio a septiembre, en el mes de junio se realiza cajeteo para favorecer el acumulamiento de agua, una poda de formación durante los meses de mayo a agosto y poda de afinación en los meses de septiembre y octubre, el mantenimiento a brechas cortafuego se realiza en el mes de enero. La cosecha y comercialización engloba toda una serie de actividades de oferta y promoción de los productos a lo largo del año, que por la naturaleza de consumo se divide en menudeo y mayoreo (Zárate, L. comunicación personal, 2010).

Los insectos y enfermedades pueden tener efectos importantes sobre el crecimiento de los árboles de navidad, su apariencia y valor. Follaje faltante o muerto, un tallo torcido o pequeñas escamas blancas en el follaje reducirán el valor del árbol o inclusive pueden hacerlo invendible.

Las primeras plantaciones para la producción de árboles de Navidad en México se establecieron en la década de los setenta, aunque la mayor parte de este agronegocio se desarrolló a finales de la década de los noventa. En la actualidad existen en nuestro país un poco más de 500 proyectos de plantaciones forestales comerciales especializadas en el cultivo de árboles de Navidad, de los cuales 22 % ya está en producción. La superficie plantada actualmente es de aproximadamente 1,750 ha en 14 estados, destacando el Estado de México con 800 ha; el Distrito Federal con 220 ha; Guanajuato con 210 ha, Veracruz con 195 ha; Michoacán 130 ha y Puebla con 100 ha, el resto se distribuyen en Hidalgo, Morelos, Nuevo León, Querétaro, Tamaulipas y otras entidades (CONAFOR, 2009). Las especies que más comúnmente se cultivan en México como árboles de navidad en plantaciones especializadas son Pino ayacahuite (*Pinus ayacahuite* var. *veitchii*), Abeto Douglas (*Pseudotsuga menziesii*; sin. *P. macrolepis*), Pino piñonero (*Pinus cembroides*), Oyamel (*Abies religiosa*), Pino alepo (*Pinus halepensis*) y su ciclo de producción varía entre cinco y ocho años.

2.3 Silicio

El silicio está presente en todas las plantas en cantidades equivalentes a los macronutrientes pero no es considerado un elemento esencial por lo que es omitido de muchas formulaciones nutritivas (Epstein, 1999) sin embargo, en ausencia de silicio las plantas vasculares son más vulnerables a patógenos, insectos fitófagos y herbívoros (Aguirre, 2007).

El silicio en las plantas les proporciona resistencia mecánica al ataque de enfermedades, disminuye la transpiración del cultivo, atenúa o elimina los efectos adversos provocados por el exceso de fósforo, metales pesados, o la salinidad del medio (Epstein, 1999).

Osnaya (1994), menciona que el uso de una solución de silicio en dosis de 100 ppm aplicada de manera foliar en cultivo de rosa contra la germinación de conidios de *Sphaerotheca pannosa* (Wallr. Ex Fr.) Lév. disminuyó el desarrollo del tubo germinativo en proporción directa con la disminución en la germinación de conidios.

2.4. LITERATURA CITADA

- Aguirre C., Chavez T., García P., Raya J.C. 2007. El silicio en los organismos vivos. *Interciencia* 32(8):504-509.
- Boyce J. S. 1940. A needle cast of Douglas-fir associated with *Adelopus gaeumannii*. *Phytopathol* 30:649-654.
- Capitano B. R. 1999. The infection and colonization of Douglas-fir needles by the swiss needle cast pathogen *Phaeocryptopus gaeumannii* (Rhode) Petrak. MS Thesis. Oregon State University. Oregon, USA.
- Chastagner G.A., Byther R.S., 1983a. Infection period of *Phaeocryptopus gaeumannii* on Douglas-fir needles in Western Washington. *Plant Disease* 67:811-813.
- Chastagner G. A. Byther R. S. 1983b. Control of Swiss Needle Cast on Douglas-fir Christmas trees with aerial applications of clorothalonil. *Plant Disease* 67:790-792.
- Cibrián-Tovar D., Alvarado R. D. y García-Díaz S. E. 2007. Enfermedades forestales de México/ Forest Diseases in Mexico. Universidad Autónoma Chapingo, Comisión Nacional Forestal, Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Forest Service, United States Department of Agriculture, Canadian Forest Service y Comisión Forestal de América del Norte. Chapingo, México. 587 p.
- Cibrián-Tovar D. 2009 Estudio de análisis de riesgo de plagas de los insectos y patógenos exóticos que pueden entrar en los árboles de navidad que se importan de Estados Unidos y Canadá a México. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. México D. F. 434 p
- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal). 2009. Plantaciones forestales comerciales. (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales). Disponible en www.conafor.gob.mx/plantacionescomerciales. Fecha de consulta: 8 de abril de 2009.
- Cruz-Juárez J. 2007. Etiología del tizón suizo (*Phaeocryptopus gaeumannii*) en *Pseudotsuga macrolepis* Flous, como árbol de navidad. Tesis de Maestría en Ciencias. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Mexico. 106 p.
- Dennis R. W. G. 1978. British Ascomycetes. J. Cramer. Vaduz, Alemania. 585 p.
- Epstein E. 1999. Silicon. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:641-664.
- Hansen E. M., Stone J.K., Capitano B.R., Rosso P., Sutton W., Winton L., Kanaskie A., Mcwilliams M.G. 2000. Incidence and impact of Swiss needle cast in forest plantations of Douglas-fir in coastal Oregon. *Plant Disease* 84:773-778.

- Johnson G. R., Gartner B.L., Maguire D., Kanaskie A. 2003. Influence of Bravo fungicide applications on wood density and moisture content of Swiss Needle Cast affected Douglas-fir trees. *Forest Ecology and Management* 186:339-348.
- Kanaskie A., McWilliams M. 2010 Swiss Needle Cast Aerial Survey. Oregon Department of Fish and Wildlife. Oregon State Government. Disponible en: http://oregon.gov/ODF/private_forests/fh.shtml#survey_maps__data. Fecha de consulta: 25 de noviembre de 2010.
- Kimberley M.O., Hood I.A., Knowles R.L., 2011. Impact of Swiss needle cast on growth of Douglas-fir. *Phytopathology* 101:583-593.
- Manter D. K., Bond B. J., Kavanagh K. L., Rosso P. H., Filip G. M. 2000. Pseudothecia of Swiss needle cast fungus, *Phaeocryptopus gaumannii*, physically block stomata of Douglas fir, reducing CO₂ assimilation. *New Phytol* 148:481-491.
- Myren, D. T. 1984. Needle cast of Douglas-fir caused by *Rhabdocline pseudotsugae subsp.pseudotsugae* and *Phaeocryptopus gaumannii* in Ontario. *Plant Disease* 68:1099.
- Osnaya-Gonzalez M. M. 1994. Influencia del silicio sobre la cenicilla *Sphaerotheca pannosa* (Wallr. Ex. Fr.) Lév. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 84 p.
- Osorio, O. M. 2007. Detección del hongo defoliador *Phaeocryptopus gaumannii* en plantaciones de *Pseudotsuga menziesii* de Valdivia, Chile. *Bosque* 28(1): 69-74.
- PROFEPA (Procuraduría Federal de Protección al Ambiente). 2010. Programa de verificación a la importación de árboles de navidad. Procuraduría Federal de Protección al Ambiente. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Disponible en: http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/v/3449/1/mx/programa_de_verificacion_a_la_importacion_de_arboles_de_navidad.html. Fecha de consulta: 20 de diciembre de 2010.
- SENASICA (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2011. Estadísticas de importación de árboles de navidad. Comunicación personal.
- Shaw D.C., Filip G.M., Kanaskie A., Maguire D.A., Littke W.A., 2011. Managing an epidemic of Swiss needle cast in the Douglas-fir region Oregon: the role of the Swiss Needle Cast Cooperative. *Journal of Forestry*:109-119.
- Stone, J., Carrol, G. 1985. Observations of the development of ascocarps in *Phaeocryptopus gaumannii* and on the possible existence of an anamorphic state. *Sydowia*. 38:317-323.
- Stone J.K., Reeser P.W., Kanaskie A. 2007a. Fungicidal suppression of Swiss Needle Cast and pathogen reinvasion in a 20-year-old Douglas-fir stand in Oregon. *West. J. Appl. For.* 22 (4):248-252.

- Stone J. K., Hood I. A., Watt M. S., Kerrigan J. L. 2007b. Distribution of Swiss needle cast in New Zealand in relation to winter temperature. *Australasian Plant Pathology* 36:445-454.
- Stone J. K., Capitano B. R., Kerigan J. L. 2008. The histopathology of *Phaeocryptopus gaeumannii* on Douglas-fir Needles. *Mycologia* 100(3):431-444.
- Sutton B. C. 1980. *The Coelomycetes, Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata.* Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 696 pp.
- Temel F., Johnson G. R., Stone J. K. 2003. First Report of Swiss Needle Cast Caused by *Phaeocryptopus gaeumannii* on Douglas-Fir in Turkey. *Plant Disease* 87(12):1536.
- Temel F., Johnson G. R., Stone J. K. 2004. The relation between Swiss needle cast symptom severity and level of *Phaeocryptopus gaeumannii* colonization in coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*). *For. Path.* 34:383-394.
- Winton L. M., Stone J. K., Hansen E. M. 2007. Polymorphic microsatellite markers for the Douglas-fir pathogen *Phaeocryptopus gaeumannii*, causal agent of Swiss Needle Cast disease. *Molecular Ecology Notes* 7: 1125–1128.

CAPITULO 3

ALGUNOS AVANCES EN LA BIOLOGÍA DE TIZÓN SUIZO EN MÉXICO

RESUMEN

En México el Tizón Suizo, *Phaeocryptopus gaeumannii*, reduce la calidad y producción de árboles de navidad de *Pseudotsuga menziesii* con daños significativos observados desde 2005 y poco se ha hecho para conocer su ciclo biológico que permitan desarrollar adecuadas medidas de control. Por ello el objetivo del estudio fue iniciar a conocer el ciclo biológico del hongo a través de las estaciones de un año. De verano, 2011 a primavera, 2012 en Valle de Bravo, Edo. de México se estableció un área experimental en dos lotes con árboles de navidad de nueve años de edad. En 49 árboles, a través de siete muestreos y en diferentes edades de acículas se identificó al hongo y secuenció; y además se evaluó incidencia, severidad y defoliación. Para la biología se registró porcentaje de aislamientos, ascosporas en pseudotecios y ascosporas aerotransportadas. Se identificó a *P. gaeumannii* y sus secuencias se alinearon con *P. gaeumannii* en NCBI. Los porcentajes de incidencia y severidad mostraron ciclos de hasta tres periodos de incrementos. La defoliación fue severa y directamente proporcional con la edad de las acículas. En primavera fue la mayor actividad biológica del hongo con el mayor número de aislamientos, cantidad de ascosporas en pseudotecios y un periodo de ascosporas aerotransportadas. En general, la biología del hongo fue activa en todas las edades de acículas y a través del año. La información es útil para rediseñar estrategias de control de la enfermedad.

Palabras clave: Ascosporas aerotransportadas, incidencia, *Phaeocryptopus gaeumannii*, severidad, *Pseudotsuga menziesii*.

3.1 INTRODUCCIÓN

El Tizón Suizo (Swiss Needle Cast) es una enfermedad específica del follaje en Douglas-fir, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, causada por *Phaeocryptopus gaeumannii* (Rohde) Petrak. Este Ascomycota fue descrito por primera vez en Suiza en 1925 (Boyce, 1940) en plantaciones para la producción de madera y donde redujo el volumen de corta. Skilling (1981) reportó la enfermedad por primera vez en árboles de navidad, también de *P. menziesii*, y en los que indujo defoliación de acículas y demerito de la calidad. Estudios parciales sobre su biología en relación con las condiciones ambientales se han enfocado para conocer periodos de infección de acículas (Chastagner y Byther, 1983a), crecimiento intercelular (Capitano, 1999; Manter *et al.*, 2003; Stone *et al.*, 2008) y la formación de pseudotecios (Michaels y Chastagner, 1984). El síntoma de Tizón Suizo se presenta aproximadamente al año de la infección por un amarillamiento de acículas y posterior defoliación; y los signos del hongo se forman en el envés de las acículas, donde los pseudotecios globosos y negros se observan superficiales y alineados sobre los estomas (Shaw *et al.*, 2011).

La presencia en México de *P. gaeumannii* se reporta en bosques naturales de *P. menziesii* (Cibrian *et al.*, 2007) en 10 estados: Chihuahua, Coahuila, Durango, Estado de México, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala y Veracruz. En el Estado de México además en plantaciones de árboles de navidad de *P. menziesii*, se observó en 2003 la presencia de tizón suizo. En 2005 se tuvo un aumento notable en la tasa de infección, para finales de 2006 y en principios de 2007 se relacionó la enfermedad con defoliación severa en 12 ha que puso en riesgo la supervivencia de la plantación (Zarate L, comunicación personal, 2010)^[1]

^[1] Zarate L. Director General de Agros Navidad S. A. de C. V. (zaratedl@gmail.com)

El primer estudio del Tizón Suizo en México fue en 2006 sobre el análisis de ascosporas aerotransportadas (Cruz-Juárez, 2007) para hacer eficiente el uso del control químico con clorotalonil tal como lo hacen en EE. UU., en árboles de navidad (Chastagner y Byther, 1983a; Chastagner y Byther, 1983b) y aún así la enfermedad está presente en algunos años y los daños son económicamente importantes (Zarate L, comunicación personal, 2010). En México no existen estudios del ciclo biológico de *P. gaeumannii* y conocerlo permitiría definir estrategias de control adecuadas. Así el objetivo del presente estudio fue iniciar a conocer el ciclo biológico del Tizón Suizo en plantaciones de árboles de navidad de Valle de Bravo, Estado de México, y con la hipótesis de que el hongo se reproduce sexualmente durante todo el año y no solo en temporada de lluvias.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Área de estudio

La zona de estudio se ubicó en Valle de Bravo, Estado de México a una altitud de 2550 m, clima templado húmedo [C (W2) (w) b (i) g] (García, 1988), suelo ligeramente ácido (pH 6.5) y de origen volcánico (andosol). Para la toma de muestras, en un lote de producción de árboles de navidad de nueve años de edad, pendiente del 10 %, una incidencia de la enfermedad del 25 % y severidad del 30 %, se seleccionó una parcela de 108 x 20 m (19°09'40" LN y 99°58'51" LO).

3.2.2 Muestreos

Acículas en ramas. En total se hicieron siete muestreos destructivos. El primero fue un muestreo preliminar en otoño (diciembre, 2010) y donde se tomaron muestras de ramas seleccionadas de dos árboles al azar. Para la toma de muestras, cada árbol se dividió en tres tercios (superior, medio e inferior) y por tercio se tomó una rama al azar y ésta se subdividió en cinco segmentos según la edad: brotes apicales (\pm de seis meses) y acículas de 1, 2, 3 y 4 años de edad y que se determinó por la posición (número) de entrenudos de afuera hacia la base de la rama.

Los siguientes seis muestreos fueron principalmente uno por cada estación del año como sigue: verano (julio) y otoño (octubre) en 2011; e invierno (febrero) y primavera en 2012. En esta última estación fueron tres muestreos (marzo, abril y mayo) dado que en esa estación se reporta en Nueva Zelanda y EE. UU., la mayor actividad de Tizón Suizo (Stone *et al.*, 2007b; Shaw *et al.*, 2011). Para cada muestreo fueron 49 árboles al azar y las ramas muestreadas se tomaron sólo en los tercios superior y medio (el tercio inferior se eliminó en base a que en el muestreo preliminar se observó severa defoliación); y cada rama se subdividió en cinco segmentos según la edad como ya indicado.

Acículas de mantillo. Se hicieron siete muestreos, uno preliminar (dos árboles) y por cada estación del año seis muestreos totales. En cada uno, del dosel de cinco árboles previamente marcados al azar, se colectaron las acículas desprendidas, y se tomó una submuestra de 100 acículas enteras y al azar para su análisis en el microscopio estereoscópico (American Optical, StereoStar, USA).

3.2.3 Identificación

Se hizo en base a la descripción de síntomas, apariencia de acículas y signos del hongo. La descripción morfológica fue de pseudotecios, ascas y ascosporas según Dennis (1978). Por cada segmento de rama muestreado se seleccionaron al azar dos acículas con pseudotecios, se hicieron montajes en ácido láctico y midieron en μm cinco pseudotecios por muestra, enseguida se presionaron y midieron en microscopio compuesto (American Optical, One Ten Microstar, USA) cinco ascas y cinco ascosporas por pseudotecio.

3.2.4 Actividad biológica del hongo

Aislamientos. Para determinar el porcentaje de colonias aisladas del hongo a través de cada muestreo y sección por rama de cinco árboles, se seleccionaron (según disponibilidad de éstas): 25 acículas aparentemente sanas y 25 con signos del hongo. Estas fueron desinfestadas con hipoclorito de sodio al 1.5 % por 2 min, lavadas tres veces con agua destilada estéril, secadas (Agrios, 2010) y sembradas en medio de cultivo de Malta Extracto Agar (MEA) al 2 % (Oxoid LTD, LM0059, England) más Agar-Agar (0.5 g por 100 g del medio) (Merck, 101614, Alemania). Cada acícula se colocó con el envés en contacto con el medio y se incubaron en oscuridad constante a 21 °C. Las colonias desarrolladas se purificaron por punta de hifa (French y Hebert, 1980) en MEA al 2 % y se conservaron en tubos inclinados con Papa Dextrosa Agar

(PDA: dextrosa 14 g, agar agar 16 g, papa blanca sin cáscara 200 g, por litro de agua destilada); y al mes de edad los cultivos se cubrieron con aceite mineral estéril (Química Meyer, México).

3.2.5 Características culturales

Alícuotas de cinco colonias representativas con tres repeticiones de cada una, se cultivaron por inoculación en punto en tres medios de cultivo: Avena Agar (OA: sobrenadante de 12 h de reposo de 30 g de hojuelas de avena, agar agar 16 g, por litro de agua destilada), MEA 2 % y PDA, se incubaron en oscuridad constante a 17 ° C por un mes y se caracterizó la morfología de las colonias y su diámetro en cm.

3.2.6. Caracterización molecular

Con seis cultivos puros del muestreo preliminar y 12 cultivos representativos de los aislamientos en cada muestreo se extrajo el ADN (Ahrens y Seemüller, 1992) y por PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa) se hizo la ampliación de las regiones internas ITS1 e ITS2 de genes rRNA (White, 1990); se secuenciaron en dos direcciones (MACROGEN) y analizaron con el programa DNASTAR y alinearon en el banco de genes de NCBI.

3.2.7 Microscopia Electrónica de Barrido

La forma de estomas en acículas sanas, posición y anclaje de pseudotecios y el mecanismo de abertura de los pseudotecios se observaron con el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) (JEOL, JSM-6390/LGS, Japón) por el método de Bozzola y Russell (1992) en muestras colectadas en febrero, mayo y julio de 2012.

3.2.8 Evaluación de la enfermedad

Daño. Cada segmento por cada una de las 49 rama en tercio superior y otras 49 en tercio medio se observaron al microscopio estereoscópico y con base a la ausencia o presencia de pseudotecios superficiales en el envés de las acículas, se evaluó: incidencia (porcentaje de acículas con al menos un pseudotecio observado), severidad (porcentaje de área de la acícula con pseudotecios) y defoliación (porcentaje de cicatrices dejadas en tallos).

Ascas y ascosporas en árboles. Para determinar su presencia o ausencia por cada segmento de ramas de cinco árboles muestreados, se seleccionó una acícula con pseudotecios y en cinco de éstos, los de mayor aparente tamaño, se hicieron montajes en ácido láctico, se flameó, se presionaron los pseudotecios y se observaron los montajes al microscopio compuesto a 45X.

Mantillo. Por muestreo, de una acícula con presencia de unos 10 pseudotecios se hicieron montajes de cinco pseudotecios seleccionados para determinar la presencia de ascas y ascosporas como arriba descrito.

3.2.9 Ascosporas aerotransportadas

Se elaboraron trampas para capturar ascosporas del aire (Ostry, 1982) con portaobjetos que se impregnaron de un lado con pegamento de petrolato diluido en hexano (Calderón, 2002). Se seleccionaron cuatro árboles. Dos de éstos estuvieron ubicados al centro de la parcela de estudio, denominado Ladera, con pendiente, exposición al Este, y rodeados de cobertura forestal de una sierra cercana y que generó un microambiente; y los otros dos árboles se ubicaron fuera del área de estudio en un predio cercano, denominado Leños, plano y expuesto a ventilación.

Por tercio de cada árbol se colocó una trampa. En el primer tercio la trampa se colocó en posición horizontal con el pegamento hacia arriba, en el segundo en forma vertical con pegamento orientado hacia el interior del árbol y en el tercero con ubicación horizontal y pegamento hacia abajo. Las trampas se colectaron y cambiaron cada semana durante 9.5 meses (Noviembre 19, 2011 a Agosto 31, 2012). Para el conteo del número de ascosporas por trampa, en cada portaobjetos sobre el área expuesta con pegamento, se agregaron gotas de ácido láctico con azul de algodón, se cubrieron con cubreobjetos y observaron todos los campos con el microscopio compuesto a 45X. Las observaciones fueron en zigzag y las ascosporas fueron contadas en base a su forma, presencia de un septo, que fueran hialinas y su tamaño en μm (Dennis, 1978).

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Identificación

El hongo de estudio se identificó como *P. gaeumannii*. Síntomas. De las acículas muestreadas a través del año, predominaron con coloración verde (Figura 1A), turgente y aparente tamaño que se apreció, no difirió entre acículas sanas y las enfermas. Estas últimas solo se diferenciaron por la presencia de pseudotecios en el envés. En pocas acículas se observó tenue amarillamiento a cafésoso tejido del área de acícula con pseudotecios (Figura 1B).

Signos. Solo en el envés se observaron pseudotecios superficiales en hileras y sobre los estomas de las acículas, redondos (Figura 1C), de 80 a 100 μm de diámetro (Figura 1C, 1D; colectados en Primavera, 2012), con una pequeña proyección (peg) en la base que se ubicó en la cavidad del estoma (Figura 1D, 1E, 1F); y con numerosas ascas de diferentes estados de madurez (Figura 1G), y lo que puede explicar que hubiera diferentes periodos de infección por ascosporas. Ascas claviforme, bitunicadas, ventricose, 40 x 15 μm y con ocho ascosporas en arreglo biseriado (Figura 1H). Ascosporas obovoid cuando maduras, hialinas, didymospora (septo ligeramente arriba de la parte central) 15 x 6 μm (Figura 1I).

3.3.2 Caracterización molecular

Las 18 secuencias depositadas en NCBI (seis del muestreo preliminar: JN204508-JN204513; y otras 12 de los muestreos formales y en proceso de depósito), fueron de 498-505 bp y tuvieron 100% de similaridad entre sí, y se alinearon en el banco de genes con secuencias de *P. gaeumannii* (AY826766, EU700364, GQ852753, JN408843) con 100 % de máxima identidad y similaridad.

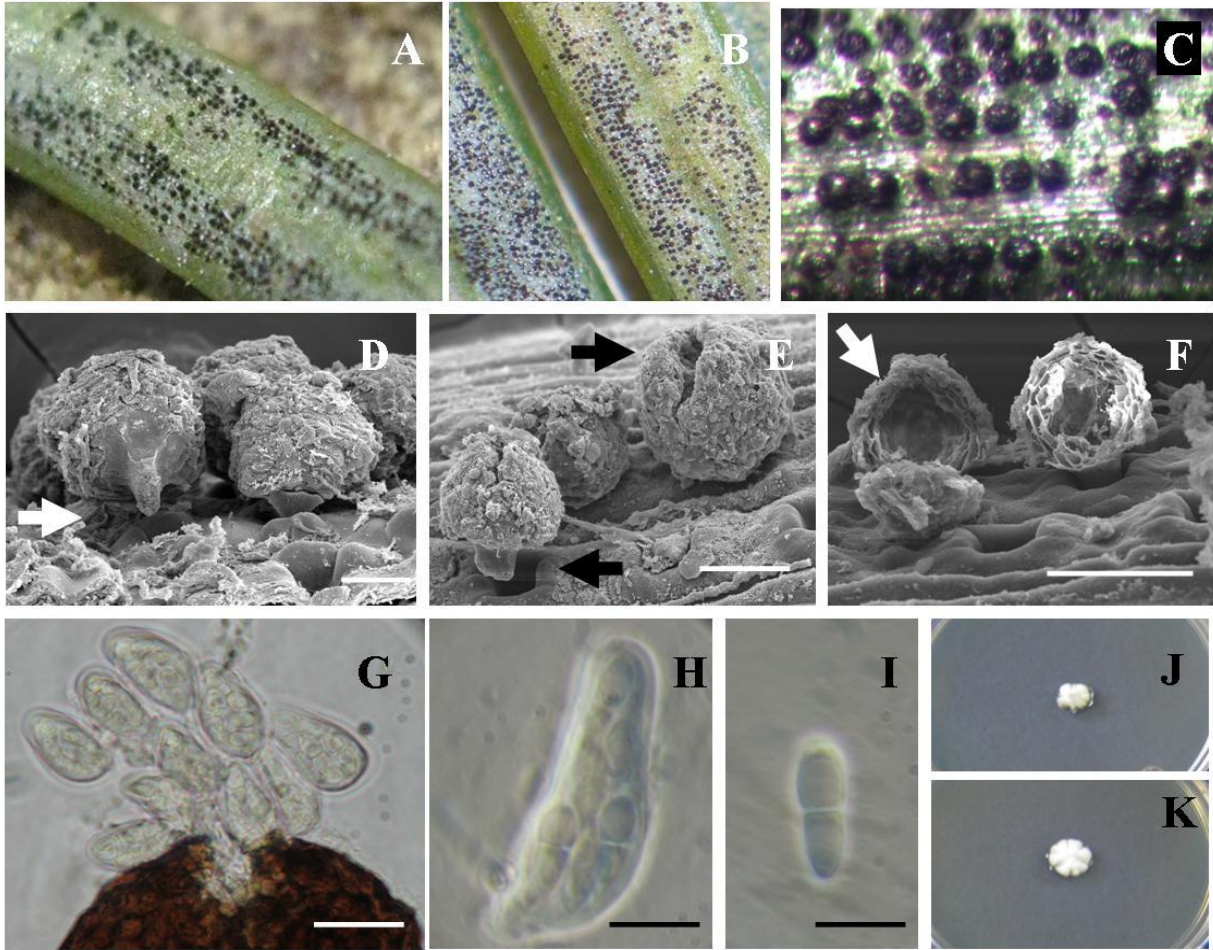


Figura 1. A, B, C: Acículas de Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) de un año de edad con pseudotecios de Tizón Suizo (*Phaeocryptopus gaeumannii*) alineados sobre los estomas. D: Pseudotecios con proyección (peg) emergiendo de estomas. E, F: Diferentes formas de aberturas espontáneas de pseudotecios para exposición de ascosporas (D-F: en microscopio electrónico de barrido). G, H: Ascas con ascosporas. I: Ascospora (G - I: en contraste de fases). J, K: Colonias en MEA 2 %. Valle de Bravo, Edo. de México, Méx. Barras de escala: D = 40 μ m, E = 50 μ m, F = 80 μ m, G = 30 μ m, H, I = 10 μ m.

3.3.3 Actividad biológica del hongo

Aislamientos. A través de las estaciones del año se aislaron de una hasta 23 colonias según la estación y segmento de la rama (Cuadro 1). De los segmentos principalmente de un año seguido del de dos años se aisló el mayor número de colonias totales. El menor número fue en otoño en mayoría de edades de acículas. Es importante hacer notar que en acículas aparentemente sanas de 9 a 12 meses de edad y sin signos de *P. gaeumannii*, se aislaron colonias del hongo.

Cuadro 1. Actividad biológica de *P. gaeumannii* sobre acículas del primer y segundo tercio de árboles de navidad, *P. menziesii*.

Parámetros evaluados	2011		2012	Primavera - 2012		
	Verano	Otoño	Invierno	1	2	3
Cultivos (#)						
6 meses	4*/2**	0/0	0/1	4/4	2/0	0/0
1 año	0/10	1/4	6/9	23/15	9/5	6/3
2	1/9	1/0	1/5	1/18	1/18	1/6
3	1/2	1/0	1/2	1/0	1/3	1/3
4	1/1	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
Mantillo (#)	0	0	2	0	0	0

*Primer tercio, ** Segundo tercio

3.3.4 Características culturales

Al mes de edad en los tres medios de cultivo las colonias fueron redondeadas, no esporularon y “umbonate” (superficie levantada al centro). En MEA 2 % de 0.8-1.2 mm de diámetro, margen lobado, al frente grisáceo a blanco o blanquesino y blanco-rosáceo, con margen delineado gris oscuro y reverso gris oscuro a negro. En PDA de 1.0-1.4 mm de diámetro, margen lobado, al frente gris claro a rosáceo, margen café oliváceo y reverso gris ó gris oscuro. En OA de 0.8-1.1 mm de diámetro, margen lobado, entero y aserrado (cronate), gris blanco, blanco o gris claro, margen gris oscuro u olivo y reverso verde negruzco o negro. Los cultivos se depositaron en la colección de cultivos del Laboratorio 128 de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados con números de registros CP-A0032 a CP-A049 y el material vegetal en Herbario CMPH (Herbario de Micología de Enfermedades de Plantas del Colegio de Postgraduados).

3.3.5 Daños por la enfermedad

Incidencia. En el tercio superior (línea horizontal sobre los valores a la izquierda de la diagonal en Cuadro 2) en acículas de seis meses, hubo un incremento continuo y con baja incidencia final (0.3-11 %) de otoño a principios de primavera, y una menor incidencia que no progresó a finales también de primavera; y en el tercio medio (horizontal línea punteada sobre los valores a la derecha de la diagonal en mismo Cuadro 2) fue un solo incremento de invierno a principios de primavera y con baja incidencia. En acículas de un año en tercio superior, fue un prolongado incremento de incidencia con hasta 38 % a través de casi todo el año y decreció a principios de primavera; y en tercio medio fueron dos incrementos continuos, uno prolongado de finales de primavera a otoño y otro corto, e incidencia final menor que en tercio superior (26 y 21 % respectivamente). En acículas de dos y tres años fueron tres continuos incrementos, y con

máximos porcentajes en mediados de primavera, verano e invierno (14-19 %); y en acículas de cuatro años la incidencia fue la más baja de finales de primavera a verano (Cuadro 2).

Severidad. A través del año al igual que en incidencia, hubo continuos periodos de incremento de severidad (Cuadro 2). En el tercio superior en acículas de seis meses fue un periodo de otoño a principios de primavera con baja severidad (7 %) y otro de mayor severidad a finales de primavera y que no prospero. En acículas de un año, en ambos tercios, se apreciaron principalmente un periodo prolongado de incremento continuo de hasta 45 y 57 % de severidad alcanzada en otoño. En tercio superior después hubo dos decrementos de severidad en invierno y principios de primavera; y en tercio medio además un periodo corto de incremento de hasta 12 % de severidad. En acículas de dos y tres años fue principalmente un periodo de continuo incremento de severidad (22 y 16 % respectivamente) de finales de primavera a invierno. En acículas de cuatro años solo en verano hubo registros de severidad.

La información anterior indicó que tanto en incidencia como en severidad la enfermedad estuvo presente todo el año y en todas las ramas de los tercios del árbol. También, debido a que a través de algunas estaciones hubo un continuo y ascendente porcentaje de incremento de presencia de pseudotecios, que fue en que se determinó la incidencia y severidad, por esta razón, esta información puede indirectamente ser estimada como un indicativo de varios periodos de infección (Cuadro 2). La mayor incidencia y severidad en acículas de uno y dos años determinada, fue también observada para severidad en otros estudios en EE. UU. (Hansen *et al.*, 2000). En general las acículas infectadas puede ser un foco de inculo constante por la dispersión de ascosporas producidas por los pseudotecios y después llevadas por el viento y otros agentes dispersores y que explicarían varios de los periodos de incremento en incidencia y severidad.

En EE. UU., algunos estudios han mostrado un periodo de infección por *P. gaeumannii* en árboles de navidad a principios del verano, y hay indicaciones de dos periodos de infección a finales de primavera y de otoño (Chastagner and Byther, 1983). Lo anterior soporta la información de este estudio de varios periodos de progreso de la enfermedad en diferentes estaciones del año. Por consecuencia se puede inferir que las medidas de control químico serían en diferentes periodos del año, también discutido por otros autores (Chastagner and Byther, 1983), y no solo en uno como actualmente se hace en la región de estudio y con clorotalonil.

Defoliación. A través de los muestreos se encontró que el número de acículas adheridas a tallos se incrementó en ambos tercios en forma ascendente e inversamente proporcional, desde cuatro años de edad (bajo número, 6 %) hasta los segmentos apicales de 6 meses (exuberante número de acículas, 83 %) (Figura 2); segundo tercio y lo mismo para primer tercio, ± 58 % a un año y 79 % a seis meses (Figura 2), y a excepción durante principios a mediados de primavera en que se invirtió la proporción. En cuanto a las cicatrices dejadas por acículas desprendidas, la relación fue directamente proporcional a la edad del segmento de la rama y tercio, y de ahí que los porcentajes de defoliación lo reflejaron (Figura 2). En cuadro 3, acículas del tercio superior en ambos segmentos (seis meses y un año) la defoliación fue mayor (2-55 %) en relación al tercio medio (1-36 %). En acículas de seis meses, tal defoliación podría no solo atribuirse al Tizón Suizo, dado que en ésta etapa el insecto *Pandeleiteius* sp. se alimenta de las acículas tiernas y se favorece la defoliación o posiblemente también puede ser por deficiencias nutrimentales que las deforman e inducen su desprendimiento.

En el segundo tercio, la defoliación se incrementó desde 40 (acículas de dos años de edad) hasta 100 % (acículas de cuatro años de edad). Los valores más altos de defoliación coincidieron

con el cambio de estación verano-otoño e invierno-primavera (Cuadro 3). Sin embargo la defoliación no puede ser totalmente atribuible a *P. gaeumannii*, dado que se observaron acículas desprendidas sin signos del hongo pero con una coloración amarilla, al igual que observado en Oregón, EE. UU. (Hood *et al.*, 1990; Kimberley *et al.*, 2011; Weiskittel y Maguire, 2007). Como se observó en Figura 2, la defoliación no fue directamente proporcional con incidencia y severidad, ambas decrecieron en acículas de 2, 3 y 4 años de edad y por el contrario la defoliación continuó incrementándose en porcentajes muy elevados.

La defoliación a sido atribuida por diversos autores como una consecuencia de la enfermedad por *P. gaeumannii*, en éste estudio la Figura 2 sugirió que tal defoliación puede, además de la enfermedad, atribuirse a deficientes labores culturales como poda y fertilización, factores ambientales tales como la variación de temperaturas (Stone *et al.*, 2007b) que en la región de estudio fluctúa de -10 °C a 30 °C y la ausencia de lluvias en invierno. Por otro lado, otra explicación es que los pseudotecios que se forman sobre los estomas de acículas obstruyen y reducen la asimilación de CO₂ lo que induce defoliación (Manter *et al.*, 2000) aunque en este estudio solo se evaluó defoliación en base a cicatrices en tallos de los segmentos. En general la defoliación es muy importante por demeritar la calidad de árboles de navidad para su venta y entonces se comercializan como de segunda calidad, según los estándares nacionales e internacionales del mercado.

Cuadro 2. Daño en porciento de pseudotecios de *P. gaeumannii* sobre acículas del primer y segundo tercio de árboles de navidad, *P. menziesii*.

Parámetros evaluados	2011		2012	Primavera - 2012		
	Verano	Otoño	Invierno	1	2	3
Incidencia (%)						
6 meses	0*/0**	0.3/0	5.5/0.5	11/3.1	0/0	3.4/0
1 año	23/7.7	27/26	38/2.6	27.5/21	0/0	3.4/0.3
2	/18	/5.6	/14	/7.2	/19	/7
3	/15	/1	/1.5	/0.1	/7.3	/0.5
4	/3	/0	/0	/0	/3	/0.1
Mantillo (#)	30	25	0	0	0	0
Severidad (%)						
6 meses	0/0	1/0	3/0	7/7	0/0	14/0
1 año	15/7	57/45	36/2	17/12	5/0	20/6
2	/7	/17	/22	/14	/25	/4
3	/15	/16	/13	/0	/11	/16
4	/20	/0	/0	/0	/0	/0
Mantillo (#)	25	6	0	0	0	0

*Primer tercio, ** Segundo tercio

Cuadro 3. Daño en por ciento por defoliación de acículas del primer y segundo tercio de árboles de navidad, *P. menziesii*.

Parámetros evaluados	2011		2012	Primavera - 2012		
	Verano	Otoño	Invierno	1	2	3
Defoliacion (%)						
6 meses	3*/2**	2/1	6/4	14/2	0/0	5/2
1 año	33/11	55/36	56/26	43/8	21/8	42/23
2	/29	/79	/64	/64	/40	/74
3	/47	/90	/73	/96	/82	/91
4	/88	/100	/100	/98	/88	/98

*Primer tercio, ** Segundo tercio

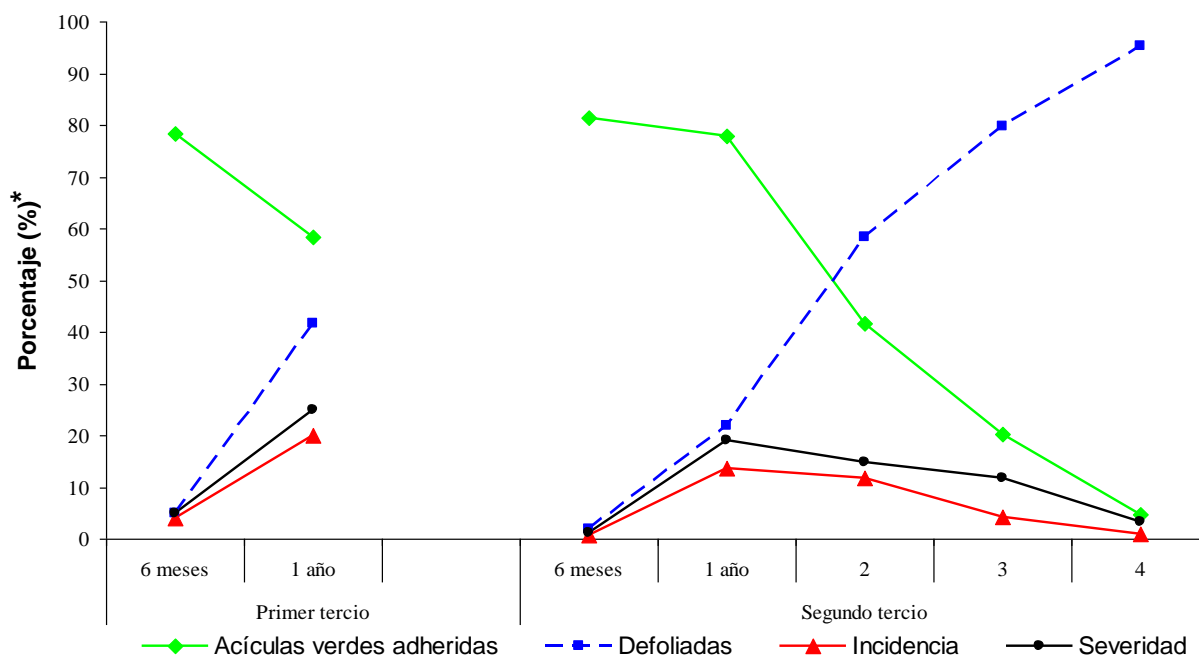


Figura 2. Comportamiento de la defoliación *P. menziesii* en relación a la incidencia y severidad de *P. gaumannii* en acículas de diferentes edades.

* Promedio del porcentaje acumulado a través de las estaciones del año y por edad de la acícula.

3.3.6 Presencia de ascosporas

Acículas. En general los pseudotecios produjeron ascosporas a través del año, excepto en otoño y en invierno que no, o casi no tuvieron ascosporas (Cuadro 4). La mayoría de los pseudotecios de mediados de primavera si produjeron de 2-16 ascosporas totales en cinco pseudotecios según el segmento de rama. El mayor número de ascosporas se obtuvo en acículas de un año de edad a través de las estaciones, 80-327 a principios y finales de primavera respectivamente (Cuadro 4).

Mantillo. Solo hubo incidencia de pseudotecios en verano y otoño (Cuadro 2), con severidad de 25 y 6 % respectivamente (Cuadro 2) y se lograron aislar al menos dos colonias (Cuadro 1). Solo en pseudotecios de verano se observaron al menos 3 ascosporas (Cuadro 4). En los demás muestreos el mantillo colectado ya estaba en proceso de degradación por lo que no fue posible seleccionar pseudotecios y cuando fue posible, éstos tuvieron hasta 11 ascosporas en invierno (Cuadro 4).

Cuadro 4. Presencia de ascosporas en pseudotecios de *P. gaeumannii* sobre acículas de árboles de navidad *P. menziesii*.

Parámetros evaluados	2011		2012	Primavera - 2012		
	Verano	Otoño	Invierno	1	2	3
Ascosporas (#)						
6 meses	0*/0**	0/0	0/0	0/15	0/0	0/0
1 año	1/13	0/0	0/0	80/5	2/0	327/0
2	/34	/0	/3	/41	/5	/0
3	/0	/0	/0	/0	/12	/0
4	/0	/0	/0	/0	/16	/0
Mantillo (#)	0	3	11	0	0	0

*Primer tercio, ** Segundo tercio. Ascosporas en pseudotecios a través del año.

Ascosporas aerotransportadas. En ambos lotes las trampas registraron al menos una ascospora en dos marcados periodos (Figuras 3 y 4). El primer periodo abarcó de invierno 2011 hasta principios de primavera en 2012 y en el segundo fue del último mes de primavera hasta mediados de verano.

La trampa en el tercio superior capturó el mayor número de ascosporas en ambos periodos en lote Ladera, y solo en el segundo periodo en lote Leños. Esto indicó que las ascosporas principalmente arriban a las plantaciones de otros lotes de árboles enfermos, vecinos o lejanos. En ambos lotes, baja fluctuación ocurrió en trampas del segundo tercio, aunque fue un indicativo que otra fuente de ascosporas que son liberadas por pseudotecios entre las ramas y pueden producir también nuevas infecciones.

En lote Ladera en el primer periodo, una alta fluctuación de ascosporas se registró en trampas del tercio inferior y en el segundo lote fue baja. Lo anterior sugirió que otra fuente de ascosporas que infectan las acículas de ramas del tercer tercio dentro del cultivo, probablemente provienen del mantillo.

En el segundo lote, el bajo número registrado posiblemente fue por no contar éste con una barrera física, como si lo hubo en el primer lote, y entonces el viento arrastra las ascosporas a otras áreas y lo mismo puede suceder con el mantillo que lo desplace fuera del área de los árboles.

En ambos lotes, el segundo periodo del patrón de número de ascosporas aerotransportadas coincidió exactamente con los análisis de Cruz-Juárez (2007) en la región de estudio.

Cuantitativamente, en el lote Ladera (Figura 3), las primeras ascosporas fueron trapeadas en Invierno (Enero 19) en el segundo tercio, una ascospora; una segunda captura se dio en Febrero 11 con siete ascosporas en el segundo tercio y 24 en el tercer tercio; en Febrero 25 se capturaron 19 ascosporas en la trampa del segundo tercio. A finales del invierno, en Marzo 17, se capturaron: 87 ascosporas en el primer tercio, una en el segundo y 59 en el tercer. Esta etapa de liberación coincidió con la presencia de ascosporas en los pseudotecios mostrada anteriormente, y un mes antes de la emisión de nuevos brotes y por consiguiente, antes de la aplicación del control químico (clorotalonil) que se realiza en plantaciones de los alrededores. Este sería un aspecto importante a considerar en el desarrollo de estrategias de control.

Un segundo periodo de dispersión de ascosporas se tuvo a partir de Mayo 19 hasta Julio 28, donde las ascosporas trapeadas variaron, y el máximo ocurrió en Junio 23 con 63 ascosporas capturadas en el primer tercio; éste dato coincidió nuevamente con los análisis de Cruz-Juárez (2007). En el lote Leños (Figura 4), no hubo presencia de ascosporas en invierno como en el lote Ladera, por lo que la captura de ascosporas se presentó a partir de Mayo 12 en los tres tercios y concluyó en Julio 21, el pico máximo de captura se presentó en Junio 23 con 98 ascosporas en el primer tercio.

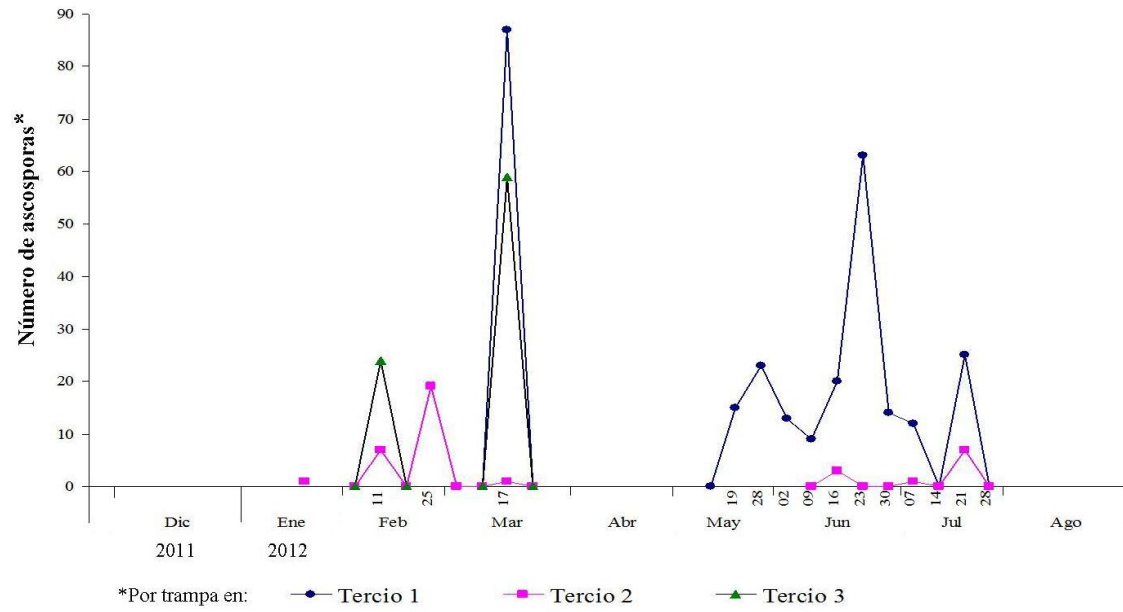


Figura 3. Ascosporas aerotransportadas en lote Ladera de otoño 2011 a verano 2012.

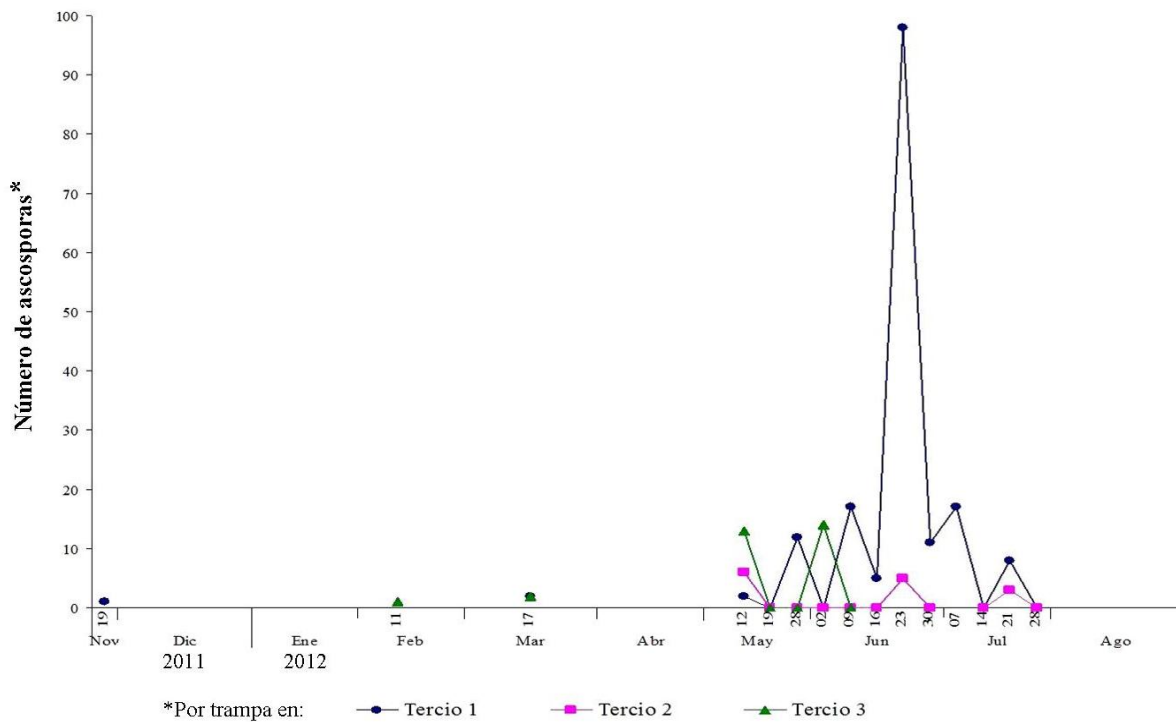


Figura 4. Ascosporas aerotransportadas en el lote Leños de otoño 2011 a verano 2012.

Al sobreponer el número de ascosporas trampeadas y acumuladas en porciento por estación del año y en relación a los porcentajes del progreso de incidencia y severidad (Figura 5), se observa que se relacionan. Según varios autores, después de la infección por la ascospora, la presencia de pseudotecios será un año después, entonces, la cantidad de ascosporas trampeadas serían un indicativo de los porcentajes de incidencia y severidad a predecir para el próximo año. Aunque esto sería también en función de las condiciones ambientales que hubiera.

De manera general se infiere que *P. gaumannii* está presente durante todo el año en las acículas de *P. menziesii*, con dos predecibles periodos de infección por ascosporas aerotransportadas (Figura 5), y hasta tres periodos de ciclos de progresos de incidencia y severidad (Cuadro 2).

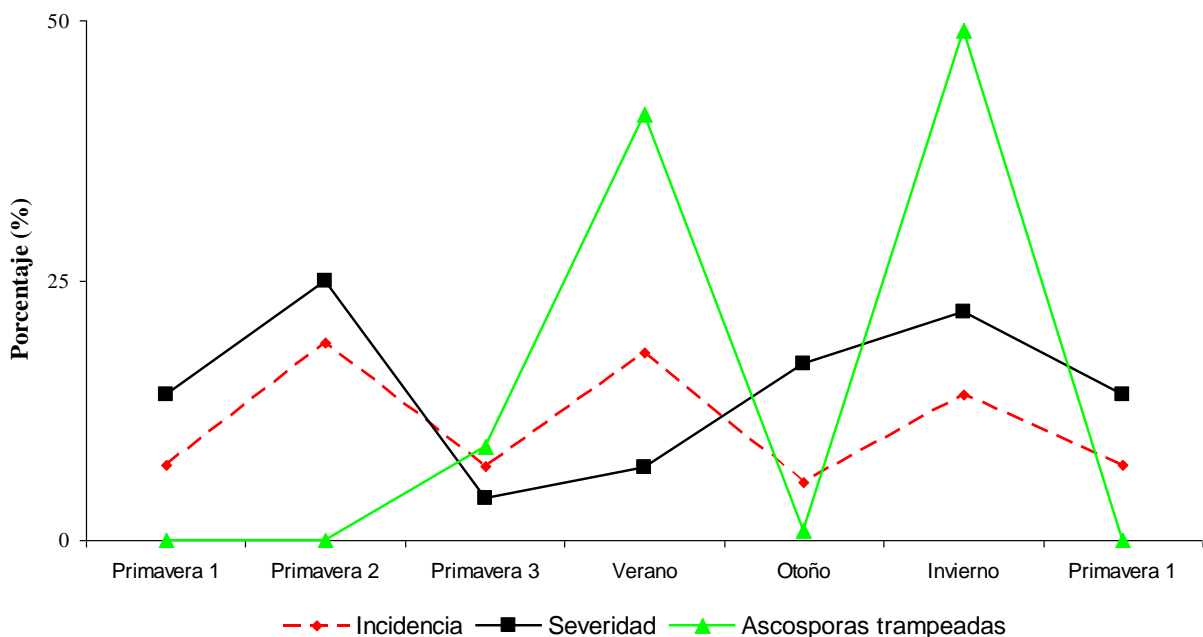


Figura 5. Comportamiento de *P. gaumannii* en acículas de *P. menziesii* a lo largo del año.

3.4 CONCLUSIONES

Con la información obtenida se tuvieron varios periodos de incidencia y severidad a través del año y varias etapas de ascospores aerotransportadas y la actividad biológica del hongo es principalmente alta en segmentos de uno y dos años de edad. También, los resultados explican por qué la única aplicación que actualmente el productor hace en la región de estudio, no es suficiente. Información que ayudaría para mejorar las estrategias de manejo de la enfermedad del Tizón Suizo en México, y que se espera sean con el menor efecto negativo al ambiente.

Agradecimientos

El presente trabajo corresponde a una investigación de estudios de Maestría en Ciencias Forestales del primer autor, fue posible gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Colegio de Postgraduados. Nuestro agradecimiento a Luciano Zárate Duarte y Claudio Rivera Lozano de la empresa Agros Navidad S. A. de C. V. por permitir acceso a sus instalaciones, a Octaviano Molina Fabila por su apoyo en las actividades de campo y a Greta Rosas de la Unidad de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados por su invaluable apoyo en el procesamiento de las muestras y la toma de imágenes.

3.5 LITERATURA CITADA

- Agrios, N.G., 2010. Plant pathology. 5th Ed. Elsevier Academic Press. Oxon, UK. 897 pp.
- Ahrens U., Seemüller E., 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.
- Boyce J.S., 1940. A needle cast of Douglas-fir associated with *Adelopus gaeumannii*. *Phytopathol* 30: 649-654.
- Bozzola J.J., Russell L.D., 1992. Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologist. Second Edition. Jones and Bartlett Publishers. Burlington, USA.
- Calderon C., Ward E., Freeman J., McCartney A., 2002. Detection of airborne fungal spores sampled by rotation-arm and Hirst-type spore traps using polymerase chain reaction assays. *Aerosol Science* 33: 283-296.
- Capitano B.R., 1999. The infection and colonization of Douglas-fir needles by the swiss needle cast pathogen *Phaeocryptopus gaeumannii* (Rhode) Petrak. MS Thesis. Oregon State University, Oregon, USA.
- Chastagner G.A., Byther R.S., 1983a. Infection period of *Phaeocryptopus gaeumannii* on Douglas-fir needles in Western Washington. *Plant Disease* 67: 811-813.
- Chastagner G.A., Byther R.S., 1983b. Control of Swiss Needle Cast on Douglas-fir Christmas trees with aerial applications of clorothalonil. *Plant Disease* 67: 790-792.
- Cibrián-Tovar D., Alvarado R.D., García-Díaz S.E., 2007. Enfermedades forestales de México/ Forest Diseases in Mexico. Chapingo, México: Universidad Autónoma Chapingo, Comisión Nacional Forestal, Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Forest Service, United States Department of Agriculture, Canadian Forest Service y Comisión Forestal de América del Norte.
- Crous P.W., Verkley G.J.M., Groenewald J.Z., y Samson R.A., 2009. Fungal Biodiversity. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. Utrecht, The Netherlands.
- Cruz-Juárez J, 2007. *Etiología del tizón suizo (Phaeocryptopus gaeumannii) en Pseudotsuga macrolepis Flous, como árbol de navidad*. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- Dennis R. W. G. 1978. British Ascomycetes. J. Cramer. Vaduz, Alemania.

- French E.R., Hebert T.T., 1980. Métodos de Investigación Fitopatológica. San José de Costa Rica. Costa Rica: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas.
- García E., 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Koppen (para adaptarlas a las condiciones de la República Mexicana). 4ª edición. México D. F.
- Hansen E.M., Stone J.K., Capitano B.R., Rosso P., Sutton W., Winton L., Kanaskie A., Mcwilliams M.G., 2000. Incidence and impact of Swiss needle cast in forest plantations of Douglas-fir in coastal Oregon. *Plant Disease* 84: 773-778.
- Hood I.A., Sandberg C.J., Barr C.W., Holloway W.A., Bradbury P.M., 1990. Changes in needle retention associated with the spread and establishment of *Phaeocryptopus gaeumannii* in planted Douglas-fir. *Eur. J. For. Path.* 20: 418-429.
- Johnson G.R., Gartner B.L., Maguire D., Kanaskie A., 2003. Influence of Bravo fungicide applications on wood density and moisture content of Swiss Needle Cast affected Douglas-fir trees. *Forest Ecology and Management* 186: 339-348.
- Kimberley M.O., Hood I.A., Knowles R.L., 2010. Impact of Swiss needle cast on growth of Douglas-fir. *Phytopathology* 101: 583-593.
- Manter D.K., Bond B.J, Kavanagh K.L., Rosso P.H., Filip G.M., 2000. Pseudothecia of Swiss needle cast fungus, *Phaeocryptopus gaeumannii*, physically block stomata of Douglas fir, reducing CO₂ assimilation. *New Phytol* 148: 481-491.
- Manter D.K., Winton L.M., Filip G.M., Stone J.K., 2003. Assessment of swiss needle cast disease: temporal and spatial investigations of fungal colonization and symptom severity. *J. Phytopathology* 151: 344-351.
- Michaels E., Chastagner G.A., 1984. Seasonal availability of *Phaeocryptopus gaeumannii* ascospores and conditions that influence their release. *Plant Disease* 68(11): 942-944.
- Ostry M.E., Nicholls T.H., 1982. A technique for trapping fungal spores. Research Note NC-283. Department of Agriculture, Forest Service. St. Paul, Minnesota, USA.
- Shaw D.C., Filip G.M., Kanaskie A., Maguire D.A., Littke W.A., 2011. Managing an epidemic of Swiss needle cast in the Douglas-fir region Oregon: the role of the Swiss Needle Cast Cooperative. *Journal of Forestry*:109-119.
- Skilling D.D., 1981. Control of Swiss needle cast in Douglas-fir. *American Christmas Tree J.* 25(3): 34-37.

- Stone J.K., Reeser P.W., Kanaskie A., 2007a. Fungicidal suppression of Swiss Needle Cast and pathogen reinvasion in a 20-year-old Douglas-fir stand in Oregon. *West. J. Appl. For.* 22(4): 248-252.
- Stone J.K., Hood I.A., Watt M.S., Kerrigan J.L., 2007b. Distribution of Swiss needle cast in New Zealand in relation to winter temperature. *Australasian Plant Pathology* 36: 445-454.
- Stone J.K., Capitano B.R., Kerigan J.L., 2008. The histopathology of *Phaeocryptopus gaeumannii* on Douglas-fir Needles. *Mycologia* 100(3): 431-444.
- Temel F., Johnson G.R., Stone J.K., 2004. The relation between Swiss needle cast symptom severity and level of *Phaeocryptopus gaeumannii* colonization in coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*). *For. Path.* 34: 383-394.
- Weiskittel A.R., Maguire D.A., 2007. Response of Douglas-fir leaf area index and litterfall dynamics to swiss needle cast in north coastal Oregon, USA. *Ann. For. Sci.* 64: 121-132.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., eds. *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. San Diego, USA: Academic Press, 315-322.

CAPITULO 4

NUTRIMENTOS Y CRECIMIENTO *in vitro* DE TIZÓN SUIZO

RESUMEN

El desarrollo de *Phaeocryptopus gaeumannii*, patógeno del follaje de Douglas-fir, se afecta por la composición nutrimental de las acículas de Douglas-fir, por lo que el objetivo del presente estudio fue examinar el efecto de diferentes nutrimentos sobre el crecimiento *in vitro* del patógeno. Se establecieron dos experimentos completamente al azar, el primero involucró la siembra de inóculo del patógeno en 10 tratamientos con diferentes nutrimentos y MEA, incubados 42 d a 21 °C y oscuridad total, se midió el crecimiento y calculó la tasa de crecimiento relativo instantáneo; el segundo constó de 21 tratamientos con nutrimentos en medio líquido (extracto de papa) incubados 35 d a 23 °C con agitación a 250 g, se midió peso en húmedo y seco. El exceso de macronutrimentos en el medio de cultivo favoreció el crecimiento de *P. gaeumannii*, los micronutrimentos lo restringieron; cobre, zinc y manganeso en dosis normal contribuyeron a reducir el crecimiento del patógeno. Una dosis balanceada de nutrimentos y silicio en dosis alta redujo el crecimiento del patógeno en condiciones controladas. Los resultados obtenidos constituyen la base para diseñar una fórmula de fertilización para Douglas-fir, que le permita ofrecer mayor resistencia a los efectos del patógeno e inhibir parcialmente el desarrollo de éste.

Palabras clave: *Phaeocryptopus gaeumannii*, *Pseudotsuga menziesii*, silicio.

4.1 INTRODUCCIÓN

El suministro y absorción de componentes químicos necesarios para el crecimiento y metabolismo de un ser vivo puede ser definido como nutrición y los componentes químicos requeridos se denominan nutrimentos. La falta o el exceso de un nutrimento genera problemas en el crecimiento normal de una planta, entre ellos es que la hace susceptible al ataque de fitopatógenos. Los mecanismos primarios de resistencia a fitopatógenos en los que la nutrición mineral puede afectar, son la formación de barreras mecánicas, principalmente, a través del desarrollo de paredes celulares más gruesas (Mengel y Kirkby, 1987), la síntesis de compuestos naturales de defensa como fitoalexinas, antioxidantes y flavonoides que proveen protección contra patógenos, y la activación de los mecanismos sistémicos de defensa de la planta (Agrios, 2010).

En plantaciones forestales, para la producción de árbol de navidad, con Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*), ubicadas en Valle de Bravo, Estado de México, anualmente se realiza una fertilización edáfica con dosis NPK ha⁻¹ de 250-90-60 (urea, superfosfato de calcio triple y cloruro de potasio) y foliar con dosis NPK ha⁻¹ de 40-50-20 (sulfato de amonio, superfosfato simple y cloruro de potasio) (Rivera, 2010)^[3], para favorecer el crecimiento de los nuevos brotes; sin embargo, éstos brotes son susceptibles a la infección del patógeno Tizón Suizo. Este es una enfermedad del follaje de *P. menziesii*, causado por el hongo Ascomycota *Phaeocryptopus gaeumannii* (Rhode) Petrak, con crecimiento intercelular en el interior de las acículas y su síndrome se presenta aproximadamente al año posterior a la infección, mediante un amarillamiento de acículas y posterior defoliación; los signos se observan en el envés de las acículas, son pseudotecios globosos y negros, alineados sobre los estomas (Dennis, 1978).

^[3] Rivera-Lozano C. Gerente de Producción. Agros Navidad S. A. de C. V. claudioriveral@hotmail.com

El-Hajj *et al.* (2004) llevó a cabo un estudio en Idaho, EE. UU. en el que en un suelo franco-limoso aplicaron urea como fertilizante en plantas de Douglas-fir de 10 años de edad, encontró que *P. gaeumannii* respondió positivamente al estado nutricional del árbol hospedero, y que el incremento de N disponible dentro de las acículas de Douglas-fir estuvo ligado al incremento de la severidad de la enfermedad de Tizón Suizo; Kavanagh (2013)^[4] recomendó aplicar fertilizantes nitrogenados, únicamente si los niveles de nitrógeno en el follaje eran inferiores a 0.8 %; en contraste Mulvey *et al.* (2013) en suelos profundos, de textura fina, alto contenido de N orgánico y pH ácido (4.5-5.5) fertilizaron árboles de Douglas-fir de entre 10 y 30 años de edad, con urea, carbonato de calcio, cloruro de calcio, fosfato monosódico y fosfato monoamónico y determinó que la fertilización, en particular, incrementó la concentración de nitrógeno en las acículas de Douglas-fir y no incrementó los índices de severidad de *P. gaeumannii*; sin embargo, si disminuyó la concentración de P, otros autores han mencionado resultados similares (Mohren *et al.*, 1986; Gijsman, 1990a; Gijsman, 1990b; Zas, 2003). El objetivo del presente trabajo fue observar el efecto de algunos fertilizantes comerciales sobre el crecimiento *in vitro* de *P. gaeumannii* y estudiar la relación de los nutrimentos aplicados a las plantaciones de *P. menziesii* sobre los procesos de infección y posible control de la enfermedad.

^[4] Kathleen Kavanagh. Forest Resources Department, University of Idaho, Moscow, USA; katyk@uidaho.edu.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Fuente de inóculo

Un cultivo puro de *P. gaeumannii* (Número de Accesoión NCBI: JN204508), se multiplicó por el método de estriado de la colonia en medio de cultivo Malta Extracto Agar (MEA) al 2 % (Oxoid LTD, LM0059, Inglaterra) más Agar-Agar (Merck, 101614, Alemania), a una temperatura constante de 21 °C y en oscuridad total durante 30 d, para ser utilizado en los experimentos.

4.2.2 Crecimiento en MEA y Agar

La concentración de macro y macronutrientes de la solución nutritiva de Hewitt y Smith (1975), y dos dosis de silicio: 0, 250 y 1000 ppm, fueron usadas para explorar sus efectos en el crecimiento de *P. gaeumannii*. Se diseñó un experimento factorial 3X3 con los factores nutrientes y dosis de Si, cada uno con tres niveles, más el testigo que consistió sólo en MEA al 2 % (Cuadro 1), con cinco repeticiones, lo que originó un total de 50 unidades experimentales. Los fertilizantes empleados fueron fosfato monoamónico, sulfato de potasio, sulfato de magnesio, nitrato de calcio, metasilicato de sodio, sulfato de manganeso, sulfato de zinc, sulfato de cobre, ácido bórico, molibdato de amonio y solución de fierro preparada según la solución nutritiva propuesta por Hewitt y Smith (1975). A las soluciones se les adicionó Malta Extracto Agar (MEA) al 2 % (Oxoid LTD, LM0059, Inglaterra) más Agar-Agar (Merck, 101614, Alemania), se esterilizaron a 120 °C durante 20 min, se les midió pH y en su caso se ajustó a 5.5 con ácido sulfúrico 0.01 N previamente esterilizado y vaciaron en caja de Petri de 5 cm de diámetro. Se sembraron fragmentos de 1 mm de diámetro del inóculo de *P. gaeumannii* en cada una de las cajas Petri, e incubaron a temperatura constante de 21 °C y oscuridad total durante 42 d, cada 7 d se registró el crecimiento mediante el incremento en diámetro de la colonia.

Cuadro 1. Nutrimientos utilizados en el experimento de *Phaeocryptopus gaeumannii*, in vitro en MEA al 2 %.

No. Tratamiento	Nutrimento	Dosis Si (ppm)
T1	N P K Ca Mg S (macronutrientos)	0
T2	N P K Ca Mg S	250
T3	N P K Ca Mg S	1000
T4	Fe Cu B Mo Zn Mn (micronutrientos)	0
T5	Fe Cu B Mo Zn Mn	250
T6	Fe Cu B Mo Zn Mn	1000
T7	N P K Ca Mg S Fe Cu B Mo Zn Mn (solución completa)	0
T8	N P K Ca Mg S Fe Cu B Mo Zn Mn	250
T9	N P K Ca Mg S Fe Cu B Mo Zn Mn	1000
TT	Malta Extracto Agar al 2% (testigo)	

Los datos de crecimiento en diámetro se analizaron con la técnica de análisis de crecimiento (Fisher, 1921), para ello se convirtieron a logaritmo natural (Ln) y posteriormente se realizó una regresión lineal. Con ello se obtuvo la tasa de crecimiento relativo instantáneo con el siguiente modelo:

$$\text{Ln } a = b + R (\text{DDIE})$$

donde: a = variable evaluada, b = valor donde la recta cruza la ordenada, R = Tasa de crecimiento relativo instantáneo, DDIE = Días después de iniciado el experimento.

4.2.3 Crecimiento en extracto de papa y medio líquido

La concentración de macro y micronutrientos de la solución nutritiva de Hewitt y Smith (1975), y dos dosis de silicio: 0, 250 y 1000 ppm, fueron usadas para explorar sus efectos en el crecimiento de *P. gaeumannii*. Se diseñó un experimento completamente al azar con 20

tratamientos y un tratamiento testigo que consistió sólo en extracto de papa (Cuadro 2), con cinco repeticiones, lo que originó un total de 110 unidades experimentales. Los fertilizantes empleados fueron fosfato monoamónico, sulfato de potasio, sulfato de magnesio, nitrato de calcio, metasilicato de sodio, sulfato de manganeso, sulfato de zinc, sulfato de cobre, ácido bórico, molibdato de amonio y solución de fierro preparada según la solución nutritiva propuesta por Hewitt y Smith (1975). En función del tratamiento correspondiente, los fertilizantes se agregaron a 100 mL de extracto de papa y se les adicionó 1.4 g de dextrosa (J.T. Baker, 1916-01, México) para obtener un medio líquido por tratamiento, que se esterilizó a 120 °C durante 20 min. En condiciones asépticas de una cámara de flujo laminar (Mod. 1839, Thermo Electron Corporation; Marietta, Ohio, EE. UU.), se midió pH del medio líquido y en su caso se ajustó a 5.5 con ácido sulfúrico 0.01N estéril, por cada tratamiento se vertieron 5 mL del medio de cultivo en tubo tipo Falcón (Becton Dickinson, New Jersey, EE. UU.) de 12 mL de capacidad, con cinco repeticiones por tratamiento, fragmentos de aproximadamente 1mm (0.002g) de diámetro del inóculo de *P. gaeumannii* se sembraron en cada uno de los tubos Falcon, los tubos se colocaron en un agitador (SHKA4000-7, Thermo Scientific, Dubuque, Iowa, EE. UU.) a 23 °C y 250 g durante 35 días. La colonia se extrajo del medio líquido, se registró peso húmedo en una balanza electrónica con aproximación de 0.001 g (AP210-O, Ohaus, New Jersey, EE. UU.) y se colocaron en cajas Petri de 10 cm estériles para deshidratarlas en estufa de cultivo (Craft Instrumentos Científicos, México) a 35 °C durante 48 h, finalmente se registró peso seco.

Cuadro 2. Nutrientes utilizados por tratamiento en el experimento en medio líquido con extracto de papa y dextrosa.

Tratamientos	Condiciones
T1	N P K Ca Mg S
T2	Fe Cu B Mo Zn Mn
T3	N P K Ca Mg S Fe Cu B Mo Zn Mn
T4	N P K Ca Mg S + 250 ppm Si
T5	N P K Ca Mg S + 1000 ppm Si
T6	Fe Cu B Mo Zn Mn + 250 ppm Si
T7	Fe Cu B Mo Zn Mn + 1000 ppm Si
T8	N P K Ca Mg S Fe Cu B Mo Zn Mn + 250 ppm Si
T9	N P K Ca Mg S Fe Cu B Mo Zn Mn + 1000 ppm Si
T10	N P K Ca Mg S en dosis doble
T11	Fe Cu B Mo Zn Mn en dosis doble
T12	N P K Ca Mg S Fe Cu B Mo Zn Mn en dosis doble
T13	Cu Zn Mn
T14	Cu Zn Mn en dosis doble
T15	N P K Ca Mg S en dosis doble + 250 ppm Si
T16	Fe Cu B Mo Zn Mn en dosis doble + 250 ppm Si
T17	N P K Ca Mg S Fe Cu B Mo Zn Mn en dosis doble + 250 ppm Si
T18	Cu Zn Mn + 250 ppm Si
T19	250 ppm Si
T20	1000 ppm Si
T21	Tratamiento testigo: extracto de papa más dextrosa.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Crecimiento en MEA y Agar

La Figura 1 muestra que en todos los tratamientos se presentó el crecimiento de la colonia de *P. gaeumannii*, pero sus tasas de crecimiento relativo instantáneo (TCRi) se afectaron con relación a la TCRi del tratamiento testigo, de éste modo los tratamientos que mostraron la menor TCRi fueron el T5 y T3, seguidos por los T9, T6, T8, T4 y T2 cuya TCRi fue muy similar, mientras que se favoreció la TCRi en los T7 y T1.

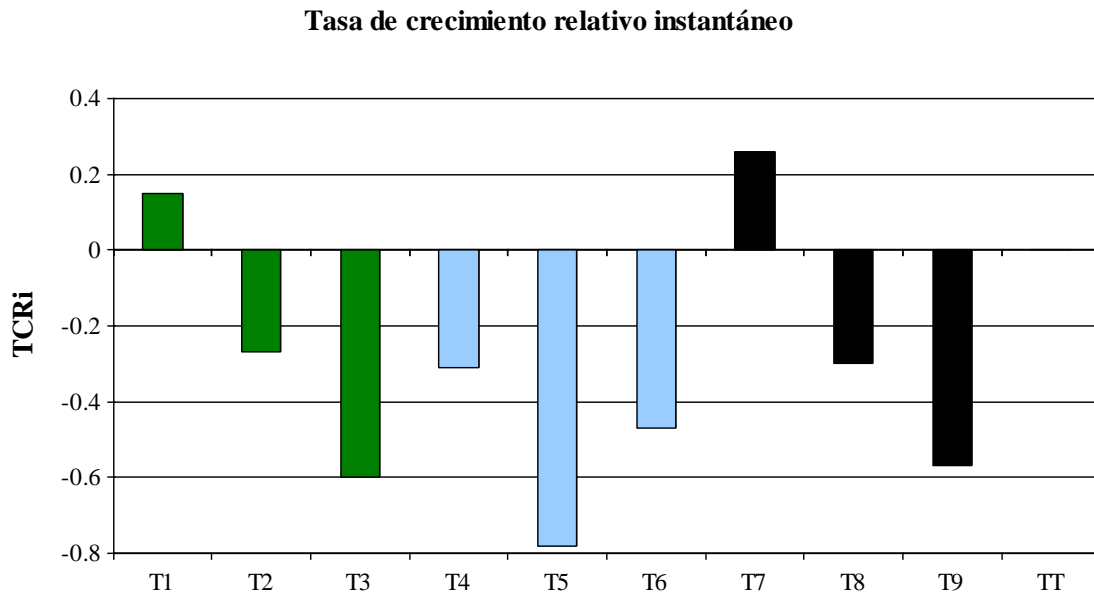


Figura 1. Tasa de Crecimiento Relativo Instantáneo de *P. gaeumannii* en MEA.

Estos datos sugieren que la adición de sólo macronutrientes en el medio de cultivo, así como la combinación balanceada de macro y micronutrientes, favoreció la TCRi del hongo en condiciones controladas; es posible que los micronutrientes por si solos tengan influencia negativa en la TCRi, pero su efecto es mayor al adicionar silicio en dosis intermedia (250 ppm

Si), al incrementar la concentración de silicio a dosis alta (1000 ppm Si) el efecto sobre la TCRi se redujo.

Como ya se mencionó, la combinación de macro y micronutrientes favoreció la TCRi del patógeno, pero disminuyó conforme aumentó la dosis de silicio.

La respuesta de la TCRi del patógeno a la presencia de silicio, llevó a la inquietud de plantear el experimento en medio de cultivo líquido.

4.3.2 Crecimiento en extracto de papa y medio líquido

En la figura 2 se observa que los tratamientos que registraron el mayor peso de *P. gaeumannii* fueron aquellos con macronutrientes en dosis doble (T10, T15), seguidos por los tratamientos con la dosis nutritiva completa (T12 y T17) y el tratamiento con dosis alta de Si (1000 ppm), es de notar el T4 que sugiere que Si en dosis baja (250 ppm) en combinación con los macronutrientes regula el crecimiento de la colonia. El resto de los tratamientos mostraron un efecto negativo en el crecimiento del hongo con respecto al tratamiento testigo, pero aquellos tratamientos con macronutrientes (T2, T8) son los que mayor influencia negativa tuvieron en el crecimiento del patógeno; sin embargo, se observó que el Si en dosis alta (1000 ppm Si) promovió el desarrollo del hongo, mientras la dosis baja (250 ppm Si) lo inhibió. Los tratamientos donde se empleó Cu, Mn y Zn en dosis normal (T13 y T18) no mostraron diferencia respecto al testigo, sólo en el tratamiento en el que se utilizó dosis doble (T14) se observó una disminución en el peso del hongo.

En el segundo experimento, de forma similar al experimento en medio de cultivo *in vitro*, se observó que el exceso de macronutrientes y de Si en el medio de cultivo favoreció el

crecimiento de *P. gaeumannii*, mientras que los micronutrientes y una dosis intermedia de Si lo restringieron. Los datos del peso en seco no manifestaron ninguna diferencia en relación a su peso húmedo, el comportamiento fue el mismo.

El N se reconoce como un componente esencial para la vida en general, el P es constituyente del ATP, DNA y RNA, esta puede ser una de las razones por las que los tratamientos que incluyeron N y P con dosis doble en su formulación manifestaron la mayor TCRi y mayor peso húmedo y seco de las colonias de *P. gaeumannii*.

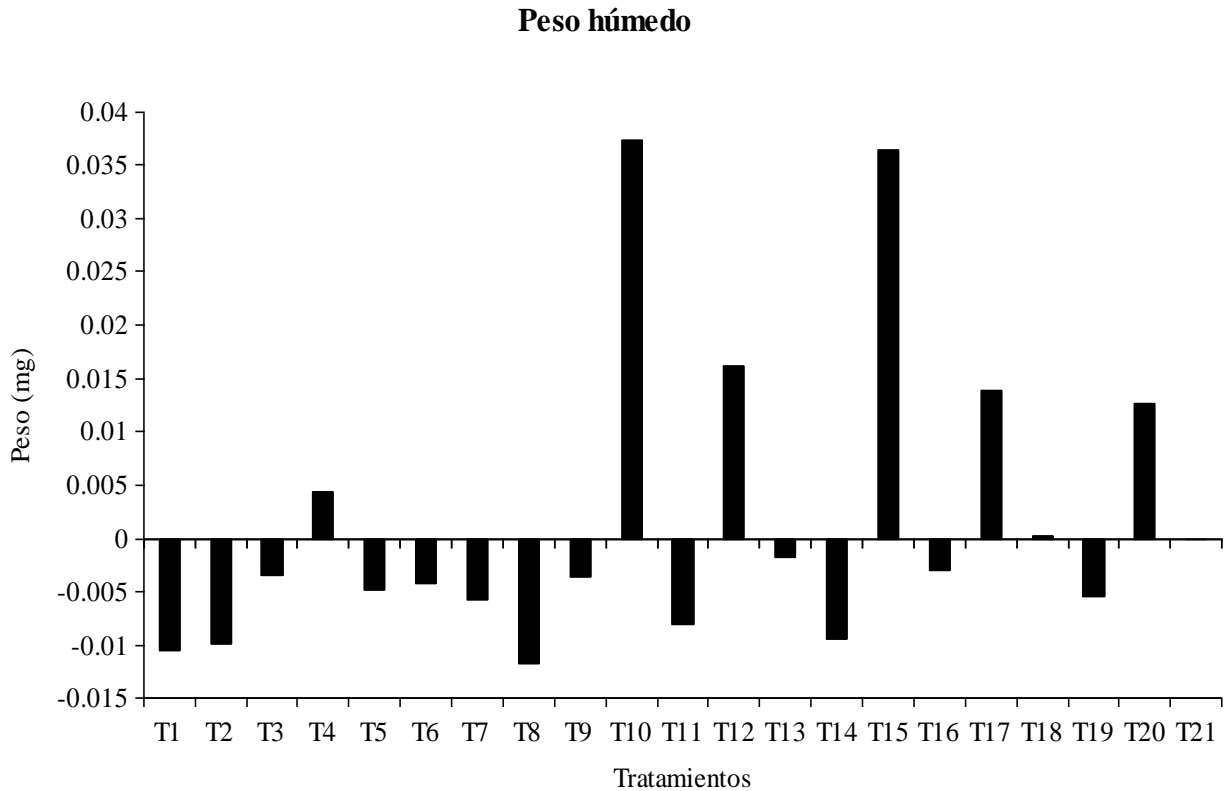


Figura 2. Peso húmedo *P. gaeumannii* después de 42 días en extracto de papa y dextrosa en medio líquido y el efecto negativo de los tratamientos sobre su crecimiento, en relación al tratamiento Testigo.

Los datos del tratamiento que incluyó Cu, Mn y Zn en dosis normal, sugieren que estos elementos contribuyen a regular el crecimiento del patógeno. Los resultados de los experimentos *in vitro* son semejantes con los de El-Hajj *et al.* (2004) pero contrastan con los de Mulvey *et al.* (2013) con relación a la respuesta del hongo al N, es importante considerar que ambos emplearon urea en sus experimentos de fertilización en Douglas-fir, la diferencia puede deberse a las características de suelo existentes en ambos experimentos. La respuesta en el crecimiento de las colonias que se obtuvo en los tratamientos que involucraron Si, supone que es un elemento que debe incluirse en la fórmula fertilizante de Douglas-fir en Valle de Bravo, debido a que balancea el contenido nutrimental de la planta (Hodson y Sangster, 1999) lo que se manifiesta con mayor resistencia a factores abióticos (Epstein, 1999), además induce la producción de fitoalexinas con actividad antifúngica (Epstein, 2001) que podrían reducir la severidad de infección de *P. gaeumannii* y al traslocarse en la epidermis de las hojas ofrece protección contra el ataque de insectos fitófagos (Epstein, 1999).

La influencia de la fertilización en la severidad de las enfermedades es desconocida en la mayoría de los patosistemas forestales por lo que los datos obtenidos invitan a que el experimento debe realizarse con todos los nutrientes por separado para determinar si sólo N es el que favorece el crecimiento de *P. gaeumannii*, y por otro lado determinar al micronutriente (B, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn) y la concentración óptima de Si que lo restringe, pues en dosis alta, la respuesta podría atribuirse al sodio presente en la formulación aplicada.

4.4 CONCLUSIONES

Se infiere que el hongo fue susceptible al abastecimiento de silicio, particularmente a la dosis de 250 ppm, además, los micronutrientes en forma conjunta y en particular Cu, Mn y Zn inhibieron significativamente el crecimiento del hongo. Se sugiere continuar la investigación para determinar la dosis necesaria de Cu, Mn y Zn que mejor inhibe la población del patógeno. La concentración y balance de la solución nutritiva empleada puede ser utilizada como base para el desarrollo de una fórmula de fertilización para Douglas-fir que cause inhibición al hongo y permita un crecimiento aceptable del árbol, y considerar incluir al silicio.

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a la Dra. Raquel Alatorre Rosas, por las facilidades otorgadas en el uso del equipo del Laboratorio de Entomología del Colegio de Postgraduados, y a la Srita. Julieta Martínez estudiante del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo por su apoyo en el establecimiento de los experimentos.

4.5 LITERATURA CITADA

- Agrios, N. G. 2010. Plant Pathology. 5th Ed. Elsevier Academic Press. Oxon, UK. 897 p.
- El-Hajj Z., K. Kavanagh, C. Rose, Z. Kanaan-Atallah. 2004. Nitrogen and carbon dynamics of a foliar biotrophic fungal parasite in fertilized Douglas-fir. *New Phytologist* 163:139-147.
- Dennis R. W. G. 1978. *British Ascomycetes*. J. Cramer. Vaduz, Alemania. 585 p.
- Epstein E. 1999. Silicon. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:641-664.
- Epstein E. 2001. Silicon in Plants: Facts vs. concepts. *In: Datnoff L. E., G. H. Snyder, G. H. Korndörfer (eds). Silicon in Agriculture*. Belle Glade, FL, U.S.A. Elsevier Science, pp:1-15.
- Gijsman A. J. 1990a. Nitrogen nutrition of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) on strongly acid sandy soil. I. Growth, nutrient uptake and ionic balance. *Plant and Soil* 126:53-61.
- Gijsman A. J. 1990b. Nitrogen nutrition of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) on strongly acid sandy soil. II. Proton excretion and rhizosphere pH. *Plant and Soil* 126:63-70.
- Hewitt E J, T A Smith. 1975. *Plant Mineral Nutrition*. The English Universities Press. London, UK. 298 p.
- Hodson M. J., Sangter A. G., 1999. Aluminium/silicon interactions in conifers. *J. of Inorganic Biochemi.* 76:89-98.
- Mengel K., E. A. Kirkby. 1987. *Principles of Plant Nutrition*. 4th Ed. International Potash Institute. Worblaufen-Bern, Switzerland. 593 p.
- Mohren G. M. J., J. van Den Burg, F. W. Burger. 1986. Phosphorus deficiency induced by nitrogen input in Douglas fir in the Netherlands. *Plant and Soil* 95:191-200.
- Mulvey R. L., D. C. Shaw, D. A. Maguire. 2013. Fertilization impacts on Swiss needle cast disease severity in western Oregon. *Forest Ecology and Management* 287:147-158.
- Stone J. K., B. R. Capitano, J. L. Kerigan. 2008. The histopatology of *Phaeocryptopus gaeumannii* on Douglas-fir Needles. *Mycologia* 100(3):431-444.
- Zas R. 2003. Foliar nutrient status and tree growth response of young *Pseudotsuga menziesii* Mirb. (Franco) to nitrogen, phosphorus and potassium fertilization in Galicia (Northwest Spain). *Invest. Agrar.: Sist. Recur. For.* 12(1): 75-85.

CAPÍTULO 5

TIZÓN SUIZO, SILICIO Y NUTRICIÓN EN ÁRBOLES DE NAVIDAD

RESUMEN

El Tizón Suizo *Phaeocryptopus gaeumannii*, infecta a *Pseudotsuga menziesii* que se cultiva como árbol de navidad, causándole defoliaciones severas y daños estimados del 20% en el Edo. de México. El silicio proporciona a las plantas resistencia mecánica al ataque de enfermedades, por ello el objetivo del presente estudio fue explorar el posible efecto del uso de nutrición balanceada complementada con silicio, que inhiba el desarrollo del hongo y favorezca el crecimiento del árbol. Se empleó un experimento factorial 2x2x3 con un diseño experimental en bloques al azar y cuatro repeticiones, la unidad experimental fue de un árbol. Tres factores de variación: fuente de silicio con dos niveles, método de aplicación con dos niveles, y dosis de Si con tres niveles, que generaron 12 tratamientos que se adicionaron con una dosis nutritiva, la variable a medir fue el porcentaje de defoliación en segmentos de uno y dos años de edad, para ello a inicios de invierno y cada mes; durante primavera se realizaron muestreos de follaje en el primer y segundo tercio del árbol; en las parcelas testigo se colectó follaje del segundo tercio y se determinó el contenido nutrimental de las acículas. No hubo diferencias significativas entre tratamientos para la variable porcentaje de defoliación. Se determinó deficiencia de fósforo y potasio durante el periodo de estudio, el resto de los macro y micronutrientes estudiados se mostraron con niveles normales. Los síntomas severos de *P. gaeumannii* sobre Douglas-fir pueden aminorarse al existir un programa de nutrición balanceada.

Palabras clave: *Phaeocryptopus gaeumannii*, *Pseudotsuga menziesii*.

5.1 INTRODUCCIÓN

El síndrome de Tizón Suizo (*Phaeocryptopus gaeumannii* (Rhode) Petrak) se presenta aproximadamente al año posterior a la infección, mediante un amarillamiento de acículas y posterior defoliación; los signos se encuentran en el envés de las acículas, donde los pseudotecios globosos y negros, aparecen alineados sobre los estomas (Dennis, 1978).

El silicio está presente en todas las plantas en cantidades equivalentes a los macronutrientes, pero al no ser considerado un elemento esencial, es omitido de muchas formulaciones nutritivas (Epstein, 1999) sin embargo, en ausencia de silicio las plantas vasculares son más vulnerables a patógenos, insectos fitófagos y herbívoros (Aguirre, 2007). La presencia de silicio en las plantas, les proporciona resistencia mecánica al ataque de enfermedades, disminuye la transpiración del cultivo, atenúa o elimina los efectos adversos provocados por el exceso de fósforo, metales pesados o la salinidad del medio (Epstein, 1999).

Douglas-Fir (*Pseudotsuga menziesii*) es una de las especies forestales con contenido de silicio por arriba del 1%, la deposición de fitolitos de silicio se realiza en las células de la epidermis y el mesófilo de la acícula (Hodson y Sangster, 1999), lo que contribuye al ciclo biogeoquímico del silicio en suelos (Gerard, *et al.*, 2008), no obstante poco se sabe de los beneficios que de ello se pueden obtener. Por ello el objetivo del presente trabajo fue realizar una exploración del posible efecto del uso de la nutrición balanceada complementada con silicio, para reducir la defoliación por efecto de Tizón Suizo en el cultivo de árboles de navidad en el Estado de México.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Área de estudio

La zona de estudio se ubicó en Valle de Bravo, Estado de México a una altitud de 2660 msnm, con clima templado húmedo (C (W2) (w) b (i) g) (García, 1988) y suelo ligeramente ácido (pH 6.5) de origen volcánico (andosol). En un lote de producción de árboles de navidad de 9 años de edad, que presentó una pendiente del 10% y una incidencia de la enfermedad del 25% y severidad del 30%, se trazó una parcela de investigación de 108x20m (19°09'40" LN y 99°58'51" LO), que se dividió en 4 bloques de 27x15m, cada bloque conformado por 12 parcelas de 9x5m, con un total de 48 parcelas y una parcela externa que correspondió al testigo; por cuestiones de manejo agronómico de la plantación, en promedio hubo 10 árboles por parcela, con un total de 515 árboles. Es importante mencionar que a excepción de la eliminación manual de malezas y poda de formación de los árboles, el productor no realizó ninguna otra labor de cultivo en el año previo y durante el tiempo que duró el experimento. En todas las parcelas se aplicó la fertilización, óptima balanceada NPK para el género *Abies* (Flores, 2011). La aplicación se realizó en el mes de febrero de 2012, por lo que previo a ella se hizo muestreo de acículas para determinar el contenido nutrimental.

Se empleó un experimento factorial 2x2x3 con un diseño experimental en bloques al azar y cuatro repeticiones, la unidad experimental fue de un árbol. Los tres factores de variación: fuente de silicio con dos niveles: silifertidol (fertilizante comercial) y metasilicato de sodio; método de aplicación con dos niveles: edáfico y foliar, y dosis de Si con tres niveles: 100, 550 y 1000 ppm, se combinaron según el método de Yates, lo que produjo 12 tratamientos (Cuadro 1).

Cuadro 1: Tratamientos del experimento factorial 2x2x3 en árboles de navidad.

	Factor 1	Factor 2	Factor 3
Tratamiento	Fuente de silicio	Método de Aplicación	Dosis (ppm Si)
T1	Silifertidol Ultra (Si: 42-45%)	Foliar	100
T2	“	“	550
T3	“	“	1000
T4	“	Edáfica	100
T5	“	“	550
T6	“	“	1000
T7	Metalisicato de sodio (Si: 44%)	Foliar	100
T8	“	“	550
T9	“	“	1000
T10	“	Edáfica	100
T11	“	“	550
T12	“	“	1000

ppm Si: partes por millón de silicio en la solución.

La variable porcentaje de defoliación se calculó en unidades porcentuales, por lo que mediante la función arcoseno $(Y/100)^{1/2}$, se realizó una transformación previa al análisis estadístico, de éste modo los datos tienen una distribución normal y no una distribución binomial (Little y Hills, 1983).

5.2.2 Muestreos

En diciembre de 2011 se realizó un muestreo, en las parcelas testigo se tomaron muestras de dos árboles seleccionados al azar; posterior a la aplicación de los tratamientos se realizaron muestreos en cada parcela en los meses de marzo, abril y mayo de 2012. Cada árbol se dividió en tres tercios (superior, medio e inferior), sólo en los tercios superior y medio se muestreó una rama, ésta se subdividió en segmentos por edad que fueron: brotes apicales (\pm de seis meses) y acículas de 1, 2, 3 y 4 años de edad.

5.2.3 Evaluación de la enfermedad

Cada segmento se observó en el microscopio estereoscópico (American Optical, StereoStar, EE. UU.) y en base a la presencia de acículas y cicatrices dejadas en el tallo del segmento se evaluó el porcentaje de defoliación. En el primer tercio se evaluó la defoliación en segmentos de un año de edad y en el segundo tercio los segmentos de uno y dos años de edad, los datos obtenidos se sistematizaron y posteriormente se hizo análisis de varianza con el programa estadístico SAS Versión 9.

5.2.4 Análisis vegetal

En las fechas de muestreo mencionadas anteriormente y adicional a las muestras para evaluación de la enfermedad, de las parcelas testigo en el segundo tercio del árbol se tomaron muestras de follaje, acículas de un año de edad y brotes recientes, se colocaron en bolsas de polietileno previamente etiquetadas para su identificación y se colocaron en un contenedor (5 °C) para ser trasladadas a laboratorio para determinación cuantitativa, una vez ahí, se lavaron con agua destilada y se colocaron en una estufa con convección de aire a 75 °C durante 72 horas hasta alcanzar peso constante. Se realizó análisis vegetal, los nutrimentos analizados fueron N, P, K,

Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, B y Mn. Para N la matriz orgánica se mineralizó mediante digestión húmeda con una mezcla de ácido sulfúrico-salicílico y posterior destilación, por arrastre de vapor, por el procedimiento semimicrokjeldahl. Se realizó una digestión en una mezcla de ácido perclórico-nítrico (1:2), para determinar el resto de los nutrientes por espectrofotometría de emisión.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Evaluación de la enfermedad

La variable estudiada, porcentaje de defoliación, no presentó efectos estadísticamente significativos en todos los muestreos realizados (Cuadro 2), debido posiblemente al corto periodo de estudio y a que se realizó una sola aplicación, lo que contrasta con el largo ciclo de vida de *P. gaeumannii* y que ya estaba presente en las acículas al momento de la aplicación de los tratamientos; sin embargo, éste estudio es la base para futuras investigaciones, por lo que se propone realizar el mismo experimento durante mayor tiempo y con mayor número de aplicaciones.

5.3.2. Análisis vegetal

Se presentaron factores que no permitieron realizar análisis de silicio, pero se hicieron determinaciones de los macro y micronutrientes presentes en las acículas para explorar su comportamiento durante la fase de crecimiento del árbol. En relación a la concentración de nitrógeno (CN) en las acículas que se presentó en diciembre de 2011 (1.62%) y posterior a la aplicación de la solución fertilizante, se observó una reducción paulatina en la CN en marzo y abril de 2012 (1.49%) y en mayo (1.3%) fue inferior al óptimo (1.45%) reportado por Ballard y Carter (1986) (Figura 1).

La concentración de fósforo (CF) en las acículas que se presentó en diciembre (0.08%) fue baja en comparación con el valor óptimo (0.15%); posterior a la aplicación de la solución fertilizante, la CF se mantuvo baja y constante entre diciembre y marzo (0.08%), y en abril (0.07%) mostró reducción, misma que no varió en el mes de mayo de 2012. (Figura 1).

Cuadro 2. Valores medios transformados de la variable “porcentaje de defoliación”.

Trat	Primavera 1			Primavera 2			Primavera 3		
	1T		2T	1T		2T	1T		2T
	1A	1A	2A	1A	1A	2A	1A	1A	2A
T1	1.019	0.995	0.673	1.257	1.271	0.775	0.938	1.012	0.604
T2	0.942	1.164	0.422	1.259	1.330	0.433	0.810	0.852	0.510
T3	0.976	1.031	0.729	1.166	1.230	0.774	0.948	0.939	0.361
T4	0.801	1.341	0.857	1.186	1.222	0.785	0.992	1.110	0.677
T5	1.009	1.132	0.737	1.233	1.287	0.949	0.840	0.826	0.290
T6	0.917	1.251	0.641	1.219	1.186	0.579	0.871	1.022	0.267
T7	0.912	1.377	1.012	1.140	1.242	0.965	0.605	1.008	0.450
T8	0.722	1.308	0.760	1.252	1.305	0.779	0.849	1.178	0.941
T9	1.078	1.204	0.783	1.142	1.395	0.859	0.643	0.920	0.621
T10	1.019	1.121	0.804	1.400	1.280	0.693	0.939	1.183	0.291
T11	0.945	1.087	0.646	1.180	1.293	0.911	0.990	1.031	0.460
T12	0.909	1.150	0.510	1.231	1.346	0.885	0.696	0.944	0.487

Trat: número de tratamiento, (ver Cuadro 1.), 1T: primer tercio del árbol, 2T: segundo tercio del árbol, 1A: un año de edad del segmento donde se midió la variable “porcentaje de defoliación”, 2A: dos años de edad del segmento donde se midió la variable “porcentaje de defoliación”.

La concentración de potasio (CK) en diciembre (0.8%) fue ligeramente mayor al óptimo (0.75%), se mostró una ligera reducción en el mes de marzo (0.74%), y la tendencia se mantuvo en abril (0.67%) y obtuvo su valor más bajo en mayo (0.54%) (Figura 1).

La concentración de calcio (CCa) en las acículas tuvo fluctuaciones, pero siempre se mantuvo por arriba del valor óptimo (0.25%); de diciembre a marzo la CCa mostró una leve reducción de la concentración en el mes de marzo (0.48%), inició la tendencia a incrementar en abril (0.49%) y el valor máximo se obtuvo en mayo (0.61%) (Figura 1).

La concentración de magnesio (CMg) en diciembre fue alta (0.29%) en relación al valor óptimo (0.12%), se observó una reducción en marzo (0.08%), con un ligero incremento en abril y mayo (0.11%) (Figura 1).

El valor óptimo de concentración de manganeso (CMn) reportado por Ballard y Carter (1986) es de 25 ppm, los valores encontrados fueron superiores, sin embargo, se observó fluctuación en las CMn, hubo un descenso en la CMn en marzo (84 ppm), se incrementó en abril (95 ppm), y en mayo (146 ppm) tuvo su valor máximo (Figura 2).

La concentración de hierro (CFe) reportada por Ballard y Carter (1986) es de 50 ppm de hierro, en las acículas colectadas en diciembre se encontró una CFe de 119 ppm, en marzo (53 ppm) se encontró una disminución en la CFe, y creció de manera gradual en abril (83 ppm) y en mayo se obtuvo un incremento que llegó hasta 297 ppm (Figura 2).

La concentración óptima de Zn es de 15 ppm, se mantuvo en un valor constante de 14 ppm, durante los meses de marzo a mayo (Figura 2). En comparación con el valor de la concentración de Cu que se obtuvo en diciembre (4 ppm), se presentaron fluctuaciones de concentración, con una media aritmética de 3.4 ppm de Cu, ligeramente abajo del valor óptimo que es de 4 ppm de Cu (Figura 2).

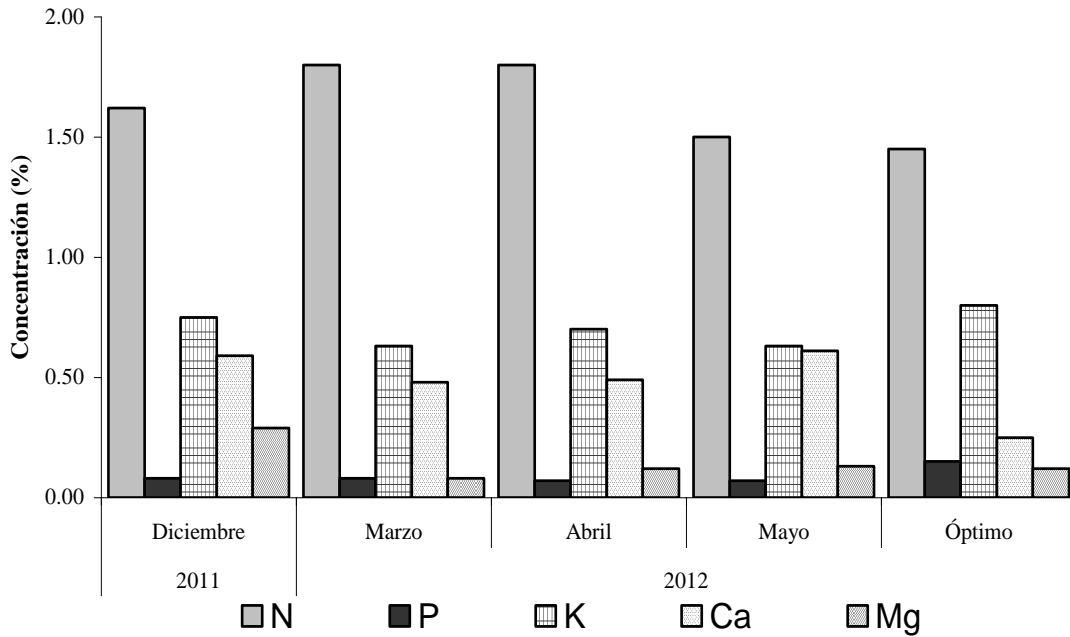


Figura 1. Contenido de macronutrientos en acículas de *P. menziesii* durante el periodo de estudio.

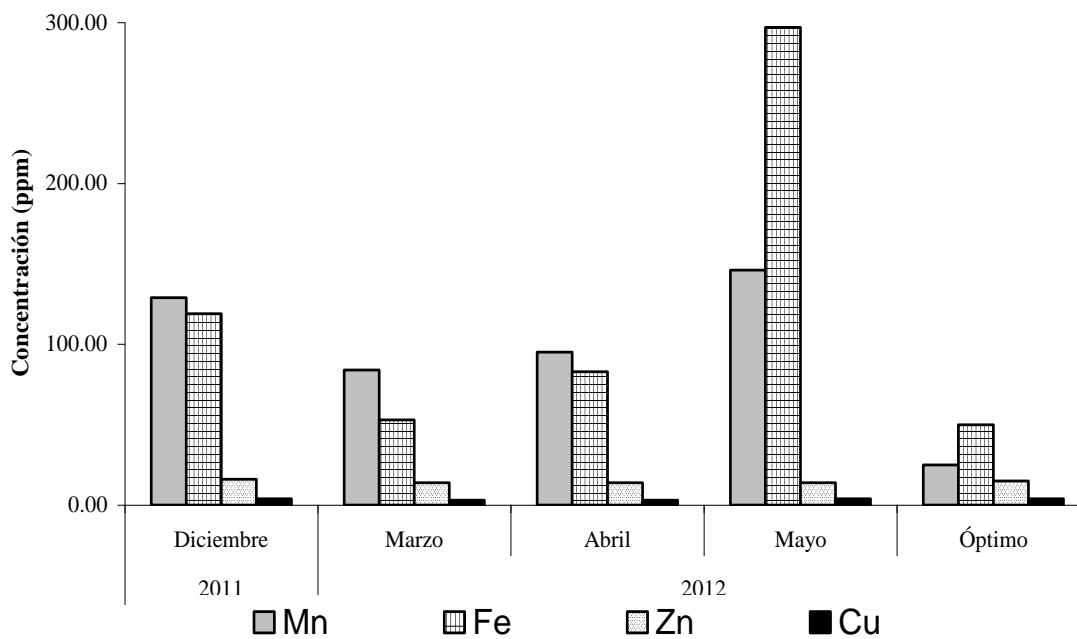


Figura 2. Contenido de micronutrientos en acículas de *P. menziesii* durante el periodo de estudio.

5.4 DISCUSIÓN

Las concentraciones más altas de nutrimentos se presentaron en diciembre, lo que supone que los árboles absorben y acumulan nutrimentos durante el verano u otoño, para ser utilizadas en primavera y cubrir las necesidades de nutrimentos durante las fases fenológicas de brotación de yemas y alargamiento del árbol, que se presentan a partir del mes de marzo y concluyen en mayo. Sin embargo, ésta reserva es insuficiente para cubrir las necesidades del árbol, la concentración de nitrógeno que a inicios de primavera estaba próxima al óptimo según lo reportado por Ballard y Carter (1986), se redujo conforme avanzó la demanda por los brotes en crecimiento debido a la alta movilidad del N (Mengel y Kirkby, 1987) y que puede interpretarse como un comportamiento normal. Esta situación pudo deberse a que en éste periodo se presenta la fase fenológica de brotación de yemas y crecimiento, por lo que la demanda de N incrementa y al ser un nutrimento móvil se trasloca hacia los centros de demanda fisiológica. Además, este comportamiento es normal cuando la hoja está en proceso de crecimiento y aún no está metabólicamente madura, por lo que la tasa de acumulación de biomasa seca es mayor a la tasa de acumulación del N, lo que produce una dilución; es decir, menor concentración. La concentración de P mostró un comportamiento similar al nitrógeno, sin embargo, su deficiencia fue más notoria debido a que se determinó casi al 50% del valor óptimo reportado por Ballard y Carter (1986) para Douglas-fir. La concentración de K siguió una tendencia similar a los nutrimentos mencionados anteriormente, se encontraron valores por debajo del óptimo, el balance de nutrimentos sugirió que éste comportamiento esta dado por el exceso de N, y produjo una leve deficiencia de K. El exceso de N puede estimular enfermedades por hongos, y dichas enfermedades son especialmente severas si la disponibilidad de K y P en los cultivos es baja (Mengel y Kirkby, 1987). El resto de los nutrimentos no manifestó deficiencia en el análisis foliar, pero si se observó fluctuación conforme avanza la demanda nutrimental.

Es importante considerar que para dar la forma cónica característica de los árboles de navidad, el crecimiento de primavera (marzo – abril) del árbol, recibe un proceso de poda que se realiza entre los meses de junio a agosto y representa pérdida de nutrimentos (Cline *et al.*, 2009), que el productor busca corregir aplicando urea o sulfato de amonio y fosfato diamónico; sin embargo, su asimilación por el árbol puede ser limitada, por un lado por al proceso de nitrificación del compuesto amoniaco y el cambio en el pH del suelo (Mengel y Kirkby, 1987) por la adición de fertilizantes, y por el otro la intensa precipitación: 404 mm promedio máxima mensual (SMN, 2013), presente entre junio y agosto en el área de estudio, que favorece la lixiviación de los nutrimentos y acidificación del suelo.

Cline *et al.*, (2009) encontraron que Douglas-fir no presenta respuesta a la disponibilidad de nutrimentos y auxinas posterior a la poda del primer crecimiento, pero si fue altamente sensible ante la poda del segundo crecimiento; En México, un segundo proceso de poda denominado “poda de afinación” se realiza entre los meses de septiembre y octubre, su finalidad es acondicionar a los árboles con altura comercial, para su cosecha durante noviembre y diciembre, razón por la cual el productor no considera importante el realizar fertilización posterior a la poda de afinación, sin embargo, al no reunir los requisitos de calidad que exige el mercado, no todos los árboles de una misma parcela son cosechados y obliga al productor a realizar entresacas; los árboles que se quedan en la plantación no reciben fertilización, lo cual explicaría las bajas reservas de nutrimentos y es un proceso de acumulación de deficiencias de nutrimentos de al menos tres o cuatro años, de los ocho años en promedio que dura el proceso de producción.

Por otro lado, Manter *et al.*, (2000) encontró que el intercambio gaseoso en las acículas de Douglas-fir infectadas por *P. gaeumannii* y durante su desarrollo como endofítico, se comporta

de manera normal, pero se ve afectado con la emergencia de los pseudotecios del hongo sobre los estomas de las acículas, debido a que una vez que los pseudotecios han emergido, el intervalo de asimilación de CO₂ es inversamente proporcional a la presencia de los pseudotecios, que aunado a la deficiencia de fósforo, debe influir drásticamente en el proceso de fotosíntesis, al tener el fósforo una activa participación en la formación de las membranas de los cloroplastos (Alcántar-González *et al.*, 2009), efecto que se ve reflejado en clorosis y una severa defoliación de acículas. El presente estudio involucró la aplicación de silicio, sin embargo, no se tuvo diferencia significativa entre los diferentes tratamientos. Esto debido posiblemente a las reducidas ocasiones de aplicación, al breve periodo de estudio y al proceso avanzado de infección de acículas por *P. gaeumannii*, sin embargo, los efectos benéficos del silicio reportados por diversos autores en cultivos básicos (Datnoff, 2011) podrían contribuir a mantener estables los niveles de nutrimentos en Douglas-Fir, además de reducir los efectos del estrés del árbol causados por factores ambientales y al manejo de la producción de árboles de navidad por parte del productor, por lo que se recomienda efectuar esta investigación durante al menos dos años más.

5.5 CONCLUSIONES

Los árboles presentaron deficiencia de fósforo durante la primavera, la cual se acentúa en verano por la movilidad del elemento hacia las hojas nuevas, lo que generó amarillamiento en las hojas más viejas y su posterior defoliación. Se cuantificó una deficiencia latente de potasio. La fertilización contribuyó al crecimiento del árbol, sin embargo la escasa fertilización durante el manejo del árbol en el ciclo anterior inhibió el crecimiento del árbol dado al desbalance N:P:K que presentó en el ciclo de crecimiento del estudio, esto es el balance óptimo de la bibliografía es 9.7-1-5 y el del estudio fue 19.7-1-9.1 lo que acrecentó la susceptibilidad del árbol al hongo.

Los síntomas severos de *P. gaeumannii* sobre Douglas-fir pueden aminorarse al existir un programa de nutrición balanceada, desarrollado en función del análisis nutrimental realizado cada seis meses como mínimo.

Agradecimientos

Nuestro sincero agradecimiento al M.C. Jaime Cruz Díaz del Laboratorio de Química de Suelos del Colegio de Postgraduados, por todas las facilidades otorgadas para realizar los análisis nutrimentales de la primera fase de investigación, y a la Dra. Ma. Edna Álvarez Sánchez del Laboratorio de Química de Suelos de la Universidad Autónoma Chapingo cuyo apoyo permitió concluir la segunda fase de investigación.

5.6 LITERATURA CITADA

- Aguirre C, Chavez T, García P, Raya JC. 2007. El silicio en los organismos vivos. *Interciencia* 32 (8): 504-509.
- Alcantar-González G, Trejo-Téllez L, Fernández-Pavía L, Rodríguez-Mendoza MN. 2009. Elementos Esenciales. En: Alcantar-González G, Trejo-Téllez L. *Nutrición de Cultivos*. Colegio de Postgraduados – Mundi Prensa. 1a Edición. México, D. F. Pg: 7 – 47.
- Ballard TM, Carter, RE. 1986. *Evaluating Forest Stand Nutrient Status*. Ministry of Forest. Vancouver. B.C, Canada, 70p.
- Cline MG, Bhave N, Harrington CA. 2009. The possible roles of nutrient deprivation and auxin repression in apical control. *Trees* 23:489–500.
- Datnoff LE, Snyder GH, Korndörfer GH, 2011. *Silicon in Agriculture*. Belle Glade, FL, U.S.A. Elsevier Science, 380p.
- Dennis R. W. G. 1978. *British Ascomycetes*. J. Cramer. Vaduz, Alemania. 585 p.
- Epstein E, 1999. Silicon. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 641-664.
- Flores-Rojas, S. 2011. Determinación de dosis óptimas NPK en especies de interés económico y forestal en cultivo hidropónico. Tesis de Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México, México, 71 p.
- García E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen para adaptarlas a las condiciones de la República Mexicana.
- Gérard F, Mayer KU, Hodson MJ, Ranger J. 2008. Modelling the biogeochemical cycle of silicon in soils: application to a temperate forest ecosystem. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 741–758.
- Hodson MJ, Sangster AG, 1999. Aluminium/silicon interactions in conifers. *Journal of Inorganic Biochemistry* 76, 89-98.
- Little TM, Hills FJ. 1983. *Métodos estadísticos para la investigación en agricultura*. Trillas. México D. F. 270p.
- Manter DK, Bond BJ, Kavanagh KL, Rosso PH, Filip GM, 2000. Pseudothecia of Swiss needle cast fungus, *Phaeocryptopus gaeumannii*, physically block stomata of Douglas fir, reducing CO₂ assimilation. *New Phytol* 148, 481-491.
- Mengel K, Kirkby EA. 1987. *Principles of Plant Nutrition*. 4th Ed. International Potash Institute. Worblaufen-Bern, Switzerland. 686 pp.

SMN. 2013. Servicio Meteorológico Nacional. Comisión Nacional del Agua. Normales climatológicas. Disponible en: www.smn.conagua.gob.mx. Fecha de consulta: 14 de febrero de 2013.

CAPITULO 6

DISCUSIÓN GENERAL

En relación a la biología de *P. gaeumannii* sobre *P. menziesii*, de las acículas muestreadas a través del año, predominaron con coloración verde y turgente, que se apreció no difirió entre acículas sanas y las enfermas. Estas últimas solo se diferenciaron por la presencia de pseudotecios en el envés. En pocas acículas se observó tejido con un tenue amarillamiento a cafésoso, aunque los síntomas reportados para *P. gaeumannii* son amarillamiento de acículas y una intensa defoliación (Hood *et al.*, 1990; Kimberley *et al.*, 2011). Defoliación fue evidente en el área de estudio en dos estaciones del año, el primero en el cambio de estación verano-otoño, y el segundo en invierno-primavera, en ambas ocasiones las acículas defoliadas no mostraban signos de la enfermedad y cuando los presentaban los porcentajes de severidad eran bajos y en desproporción a la defoliación, lo cual sugiere que además de la incidencia de *P. gaeumannii* sobre el árbol, existen factores que influyen en los índices de defoliación, como pueden ser el efecto del control químico con clorotalonil (Stone *et al.*, 2007a), climáticos como la temperatura (Stone *et al.*, 2007b), y labores culturales principalmente poda y fertilización, otro efecto del patógeno es que los pseudotecios se forman sobre los estomas y obstruyen y reducen la asimilación de CO₂ (Manter *et al.*, 2000). La posible abscisión espontánea de acículas verdes es otro aspecto a investigar y los factores relacionados.

Indirectamente se encontró que alta incidencia y severidad de la enfermedad se tuvo en tres ocasiones a lo largo del año, por lo que se infiere que *P. gaeumannii* está presente durante todo el año en las acículas de *P. menziesii*, y que los procesos de infección se dan no sólo por la dispersión de ascosporas aerotransportadas, también influye la presencia de pseudotecios con ascosporas presentes en las acículas y que infectan a las acículas con las que entran en contacto.

Se registraron dos periodos de captura de ascosporas aerotransportadas, con picos máximos en principios de primavera (marzo) y verano (junio); Michaels y Chastagner (1984) también reportaron dos periodos de dispersión de ascosporas, el primero en primavera y el segundo en otoño. Cruz-Juárez (2007) reportó un solo pico de captura de ascosporas aerotransportadas en verano, el cual coincide con nuestros datos, su periodo de estudio abarcó de abril a septiembre de 2006, posiblemente por ello no detectó el periodo de liberación en primavera, y tal información fue la base para el diseño de medidas de control químico por parte del productor, sin embargo los datos de éste estudio sugieren que dichas medidas se realizan de manera incompleta y deben modificarse. Durante la dispersión de ascosporas de primavera se inicia la poda de formación de árboles, actividad que es una potencial fuente de dispersión del inóculo, pues las herramientas usadas entran en contacto con acículas con signos de la enfermedad y los métodos de desinfección de herramientas pudieran no ser efectivos, además de que no se desinfectan cada vez que se poda un árbol, sino hasta que el podador lleva cierta cantidad de árboles podados.

En lo que respecta a los estudios *in vitro* de el desarrollo de *P. gaeumannii*, el crecimiento del hongo a las dosis altas de los macronutrientes disminuyó, lo que se atribuyó a que el 70% del N total usado en el experimento fue nitrato y el resto en amonio, por lo que se infiere que el hongo fue susceptible a la fuente de N amoniacal. Se determinó también que la dosis alta de micronutrientes y en forma conjunta de Cu, Mn y Zn decreció el desarrollo del hongo, por lo que se infiere que éstos nutrientes inhiben el desarrollo del hongo y se sugiere continuar la investigación para determinar la dosis necesaria de Cu, Mn y Zn que mejor inhibe la población del patógeno.

La concentración y balance de la solución nutritiva empleada puede ser utilizada como base para el desarrollo de una fórmula de fertilización para Douglas-fir que cause inhibición al hongo y permita un crecimiento aceptable del árbol. La respuesta en el crecimiento de las colonias que se obtuvo en los tratamientos que involucraron silicio, supone que es un elemento que debe incluirse en la fórmula fertilizante de Douglas-fir en Valle de Bravo, debido a que balancea el contenido nutrimental de la planta (Hodson y Sangster, 1999) lo que se manifiesta con mayor resistencia a factores abióticos (Epstein, 1999), además induce la producción de fitoalexinas con actividad antifúngica (Epstein, 2001) que podrían reducir la severidad de infección de *P. gaumannii* y al trasladarse en la epidermis de las hojas ofrece protección contra el ataque de insectos fitófagos (Epstein, 1999).

En el experimento desarrollado en campo, las más altas concentraciones de nutrimentos se presentaron en diciembre, lo que supone que los árboles generan reservas de nutrimentos durante el verano u otoño, para ser utilizadas en primavera y cubrir las necesidades de nutrimentos durante las fases fenológicas de brotación de yemas y elongación del árbol, que se presentan a partir del mes de marzo y concluyen en mayo. Sin embargo, ésta reserva es insuficiente para cubrir las necesidades de árbol, la concentración de N que a inicios de primavera estaba próxima al óptimo según lo reportado por Ballard y Carter (1986), se redujo conforme avanza la demanda por los brotes en crecimiento debido a la alta movilidad del N (Mengel y Kirkby, 1987) y que puede interpretarse como un comportamiento normal. La concentración de P y K mostró un comportamiento similar al N. El balance de nutrimentos sugirió que éste comportamiento está dado por el exceso de N, y produjo una deficiencia latente de K.

El exceso de N puede estimular enfermedades por hongos, y dichas enfermedades son especialmente severas si la disponibilidad de K y P en los cultivos es baja (Mengel y Kirkby, 1987). El resto de los nutrimentos no manifestó deficiencia en el análisis foliar, pero si se observó fluctuación conforme avanza la demanda nutrimental.

Es importante considerar que la poda realizada para dar la forma cónica característica de los árboles de navidad, representa pérdida de nutrientes (Cline *et al.*, 2009), que el productor busca corregir aplicando urea o sulfato de amonio y fosfato diamónico; sin embargo, su asimilación por el árbol puede ser limitada, por un lado por al proceso de nitrificación del compuesto amoniaco y el cambio en el pH del suelo (Mengel y Kirkby, 1987) por la adición de fertilizantes, y por el otro la intensa precipitación: 404 mm promedio máxima mensual (SMN, 2013), presente entre junio y agosto en el área de estudio, que favorece la lixiviación de los nutrimentos.

No se tuvo diferencia significativa a la aplicación de silicio entre los diferentes tratamientos, debido posiblemente a las reducidas ocasiones de aplicación, al breve periodo de estudio y al proceso avanzado de infección de acículas por *P. gaeumannii*, sin embargo, los efectos benéficos del silicio reportados por diversos autores en cultivos básicos (Datnoff, 2011) podrían contribuir a mantener estables los niveles de nutrimentos en Douglas-Fir, además de reducir los efectos del estrés del árbol causados por factores ambientales y al manejo de la producción de árboles de navidad por parte del productor, por lo que se recomienda efectuar esta investigación durante al menos dos años más.

CAPITULO 7

CONCLUSIONES GENERALES

Con la información obtenida se mostró que hay varios periodos de ciclos de incidencia y severidad a través del año y varias etapas de ascospora aerotransportadas y la actividad biológica del hongo es principalmente alta en segmentos de uno y dos años de edad. También que la defoliación fue alta y a través de todo el año.

El crecimiento del hongo a las dosis altas de los macronutrientes disminuyó con la aplicación de nitrato, y se infiere que el hongo es susceptible a la aplicación de N amoniacal.

Se determinó también que una dosis alta de micronutrientes en forma conjunta de Cu, Mn y Zn decreció el desarrollo del hongo, por lo que se infiere que éstos nutrientes inhiben el desarrollo del hongo y se sugiere continuar la investigación para determinar la dosis necesaria de Cu, Mn y Zn que mejor inhibe la población del patógeno.

Los árboles presentan deficiencia de P y K durante la primavera.

Los avances generados de la biología de la enfermedad y la fertilización balanceada pueden ser empleados como parte de una estrategia de control integrado, que cause inhibición al hongo y no afecte la fisiología del árbol.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Agrios NG, 2010. Plant pathology. 5th Ed. Elsevier Academic Press. Oxon, UK. 897 pp.
- Ahrens U, Seemüller E, 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82, 828-832.
- Aguirre C, Chavez T, García P, Raya JC, 2007. El silicio en los organismos vivos. *Interciencia* 32 (8): 504-509.
- Alcantar-González G, Trejo-Téllez L, Fernández-Pavía L, Rodríguez-Mendoza MN, 2009. Elementos Esenciales. En: Alcantar-González G, Trejo-Téllez L. *Nutrición de Cultivos*. Colegio de Postgraduados – Mundi Prensa. 1a Edición. México, D. F. Pg: 7 – 47.
- Ballard TM, Carter RE, 1986. Evaluating Forest Stand Nutrient Status. Ministry of Forest. Vancouver. B.C, Canada, 70p.
- Boyce JS, 1940. A needle cast of Douglas-fir associated with *Adelopus gaeumannii*. *Phytopathol* 30: 649 – 654.
- Bozzola JJ, Russell LD, 1992. *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*. Second Edition. Jones and Bartlett Publishers. Burlington, USA.
- Calderon C, Ward E, Freeman J, McCartney A, 2002. Detection of airborne fungal spores sampled by rotation-arm and Hirst-type spore traps using polymerase chain reaction assays. *Aerosol Science* 33, 283-296.
- Capitano BR, 1999. The infection and colonization of Douglas-fir needles by the swiss needle cast pathogen *Phaeocryptopus gaeumannii* (Rhode) Petrak. MS Thesis. Oregon State University. Oregon, USA. 81 pp.
- Chastagner GA, Byther RS, 1983a. Infection period of *Phaeocryptopus gaeumannii* on Douglas-fir needles in Western Washington. *Plant Disease* 67, 811-813.
- Chastagner GA, Byther RS, 1983b. Control of Swiss Needle Cast on Douglas-fir Christmas trees with aerial applications of chlorothalonil. *Plant Disease* 67, 790-792.
- Cibrián-Tovar D, Alvarado RD y García-Díaz SE, 2007. *Enfermedades forestales de México/ Forest Diseases in Mexico*. Universidad Autónoma Chapingo, Comisión Nacional Forestal, Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Forest Service, United States Department of Agriculture, Canadian Forest Service y Comisión Forestal de América del Norte. Chapingo, México. 587 p.

- Cibrián-Tovar D, 2009 Estudio de análisis de riesgo de plagas de los insectos y patógenos exóticos que pueden entrar en los árboles de navidad que se importan de Estados Unidos y Canadá a México. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. México D. F. 434 p
- Cline MG, Bhave N, Harrington CA, 2009. The possible roles of nutrient deprivation and auxin repression in apical control. *Trees* 23:489–500.
- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal), 2009. Plantaciones forestales comerciales. (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales). Disponible en www.conafor.gob.mx/plantacionescomerciales. Fecha de consulta: 8 de abril de 2009.
- CONAPO (Consejo Nacional de Población), 2005. Grado de marginación por municipio: Estado de México. Región VII Valle de Bravo. (Secretaría de Gobernación) Disponible en: www.conapo.gob.mx/publicaciones/margina2005/anexob/mapas/b_1507.pdf. Fecha de consulta: 06 de febrero de 2010.
- Cruz-Juárez J, 2007. Etiología del tizón suizo (*Phaeocryptopus gaeumannii*) en *Pseudotsuga macrolepis* Flous, como árbol de navidad. Tesis de Maestría en Ciencias. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Mexico. 106 p.
- Datnoff LE, Snyder GH, Korndörfer GH, 2011. Silicon in Agriculture. Belle Glade, FL, U.S.A. Elsevier Science, 380p.
- El Hajj Z, Kavanagh K, Rose C, Kanaan-Atallah Z, 2004. Nitrogen and carbon dynamics of a foliar biotrophic fungal parasite in fertilized Douglas-fir. *New Phytologist* 163, 139-147.
- Epstein E, 1999. Silicon. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 641-664.
- Epstein E, 2001. Silicon in Plants: Facts vs. concepts. In: Datnoff LE, Snyder GH, Korndörfer GH, eds. Silicon in Agriculture. Belle Glade, FL, U.S.A. Elsevier Science, 1-15.
- Flores-Rojas S, 2011. Determinación de dosis óptimas NPK en especies de interés económico y forestal en cultivo hidropónico. Tesis de Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México, México, 71 p.
- French ER, Hebert TT, 1980. Métodos de Investigación Fitopatológica. San José de Costa Rica. Costa Rica: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas.
- García E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Koppen (para adaptarlas a las condiciones de la República Mexicana). 4ª edición. México D. F. 217p.
- Gérard F, Mayer KU, Hodson MJ, Ranger J, 2008. Modelling the biogeochemical cycle of silicon in soils: application to a temperate forest ecosystem. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 741–758.

- Gijsman AJ, 1990a. Nitrogen nutrition of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) on strongly acid sandy soil. I. Growth, nutrient uptake and ionic balance. *Plant and Soil* 126, 53-61.
- Gijsman AJ, 1990b. Nitrogen nutrition of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) on strongly acid sandy soil. II. Proton excretion and rhizosphere pH. *Plant and Soil* 126, 63-70.
- Hansen EM, Stone JK, Capitano BR, Rosso P, Sutton W, Winton L, Kanaskie A, McWilliams MG, 2000. Incidence and impact of Swiss needle cast in forest plantations of Douglas-fir in coastal Oregon. *Plant Disease* 84, 773-778.
- Hewitt EJ, Smith TA, 1975. *Plant Mineral Nutrition*. The English Universities Press. London, UK.
- Hood IA, Sandberg CJ, Barr CW, Holloway WA, Bradbury PM, 1990. Changes in needle retention associated with the spread and establishment of *Phaeocryptopus gaeumannii* in planted Douglas-fir. *Eur. J. For. Path.* 20, 418-429.
- Hodson MJ, Sangter AG, 1999. Aluminium/silicon interactions in conifers. *Journal of Inorganic Biochemistry* 76, 89-98.
- Johnson GR, Gartner BL, Maguire D, Kanaskie A, 2003. Influence of Bravo fungicide applications on wood density and moisture content of Swiss Needle Cast affected Douglas-fir trees. *Forest Ecology and Management* 186, 339-348.
- Kanaskie A, McWilliams M, 2010 Swiss Needle Cast Aerial Survey. Oregon Department of Fish and Wildlife. Oregon State Government. Disponible en: http://oregon.gov/ODF/private_forests/fh.shtml#survey_maps__data. Fecha de consulta: 25 de noviembre de 2010.
- Kimberley MO, Hood IA, Knowles RL, 2010. Impact of Swiss needle cast on growth of Douglas-fir. *Phytopathology* 101, 583-593.
- Little TM, Hills FJ, 1983. *Métodos estadísticos para la investigación en agricultura*. Trillas. México D. F. 270p.
- Manter DK, Bond BJ, Kavanagh KL, Rosso PH, Filip GM, 2000. Pseudothecia of Swiss needle cast fungus, *Phaeocryptopus gaeumannii*, physically block stomata of Douglas fir, reducing CO₂ assimilation. *New Phytol* 148, 481-491.
- Manter DK, Winton LM, Filip GM, Stone JK, 2003. Assessment of swiss needle cast disease: temporal and spatial investigations of fungal colonization and symptom severity. *J. Phytopathology* 151, 344-351.
- Mengel K, Kirkby EA, 1987. *Principles of Plant Nutrition*. 4th Ed. International Potash Institute. Worblaufen-Bern, Switzerland. 686 pp.
- Michaels E, Chastagner GA, 1984. Seasonal availability of *Phaeocryptopus gaeumannii* ascospores and conditions that influence their release. *Plant Disease* 68(11), 942-944.

- Mohren GMJ, van Den Burg J, Burger FW, 1986. Phosphorus deficiency induced by nitrogen input in Douglas fir in the Netherlands. *Plant and Soil* 95, 191-200.
- Mulvey RL, Shaw DC, Maguire DA, 2013. Fertilization impacts on Swiss needle cast disease severity in western Oregon. *Forest Ecology and Management* 287, 147-158.
- Myren DT, 1984. Needle Cast of Douglas-fir caused by *Rhabdocline pseudotsugae subsp.pseudotsugae* and *Phaeocryptopus gaeumannii* in Ontario. *Plant Disease* 68:1099.
- Osnaya-Gonzalez MM, 1994. Influencia del silicio sobre la cenicilla *Sphaerotheca pannosa* (Wallr. Ex. Fr.) Lév. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 84 p.
- Osorio M, 2007. Detección del hongo defoliador *Phaeocryptopus gaeumannii* en plantaciones de *Pseudotsuga menziesii* de Valdivia, Chile. *Bosque* 28 (1): 69 – 74.
- Ostry ME, Nicholls TH, 1982. A technique for trapping fungal spores. Research Note NC-283. St. Paul, Minnesota, USA: Department of Agriculture, Forest Service.
- PROFEPA (Procuraduría Federal de Protección al Ambiente), 2010. Programa de verificación a la importación de árboles de navidad. Procuraduría Federal de Protección al Ambiente. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Disponible en: http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/v/3449/1/mx/programa_de_verificacion_a_la_importacion_de_arboles_de_navidad.html. Fecha de consulta: 20 de diciembre de 2010.
- SENASICA (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria), 2011. Estadísticas de importación de árboles de navidad. Comunicación personal.
- Shaw DC, Filip GM, Kanaskie A, Maguire DA, Littke WA, 2011. Managing an epidemic of Swiss needle cast in the Douglas-fir region Oregon: the role of the Swiss Needle Cast Cooperative. *Journal of Forestry*, 109-119.
- Skilling DD, 1981. Control of Swiss needle cast in Douglas-fir. *American Christmas Tree J.* 25(3), 34-37.
- SMN (Servicio Meteorológico Nacional), 2013. Normales climatológicas. Comisión Nacional del Agua. Disponible en: www.smn.conagua.gob.mx. Fecha de consulta: 14 de febrero de 2013.
- Stone, J., Carrol, G. 1985. Observations of the development of ascocarps in *Phaeocryptopus gaeumannii* and on the possible existence of an anamorphic state. *Sydowia*. 38: 317-323.

- Stone JK, Reeser PW, Kanaskie A, 2007a. Fungicidal suppression of Swiss Needle Cast and pathogen reinvasion in a 20-year-old Douglas-fir stand in Oregon. *West. J. Appl. For.* 22 (4), 248-252.
- Stone JK, Hood IA, Watt MS, Kerrigan JL, 2007b. Distribution of Swiss needle cast in New Zealand in relation to winter temperature. *Australasian Plant Pathology* 36, 445-454.
- Stone JK, Capitano BR, Kerigan JL, 2008. The histopathology of *Phaeocryptopus gaeumannii* on Douglas-fir Needles. *Mycologia* 100(3), 431-444.
- Sutton BC, 1980. *The Coelomycetes, Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata.* Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 696 pp.
- Temel F, Johnson GR, Stone JK, 2003. First Report of Swiss Needle Cast Caused by *Phaeocryptopus gaeumannii* on Douglas-Fir in Turkey. *Plant Disease* 87(12): 1536.
- Temel F, Johnson GR, Stone JK, 2004. The relation between Swiss needle cast symptom severity and level of *Phaeocryptopus gaeumannii* colonization in coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*). *For. Path.* 34, 383-394.
- Weiskittel AR, Maguire DA, 2007. Response of Douglas-fir leaf area index and litterfall dynamics to swiss needle cast in north coastal Oregon, USA. *Ann. For. Sci.* 64, 121-132.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, and White TJ, eds. *PCR Protocols: A guide to methods and applications.* San Diego, USA: Academic Press, 315-322.
- Winton LM, Stone JK, Hansen EM, 2007. Polymorphic microsatellite markers for the Douglas-fir pathogen *Phaeocryptopus gaeumannii*, causal agent of Swiss Needle Cast disease. *Molecular Ecology Notes* 7, 1125–1128.
- Zas R, 2003. Foliar nutrient status and tree growth response of young *Pseudotsuga menziesii* Mirb. (Franco) to nitrogen, phosphorus and potassium fertilization in Galicia (Northwest Spain). *Invest. Agrar.: Sist. Recur. For.* 12(1), 75-85.

OTROS FORMATOS

- Aguirre C., Chavez T., García P., Raya J.C. 2007. El silicio en los organismos vivos. *Interciencia* 32 (8): 504-509.
- Boyce J. S. 1940. A needle cast of Douglas-fir associated with *Adelopus gaeumannii*. *Phytopathol* 30: 649 – 654.
- Capitano B. R. 1999. The infection and colonization of Douglas-fir needles by the swiss needle cast pathogen *Phaeocryptopus gaeumannii* (Rhode) Petrak. MS Thesis. Oregon State University. Oregon, USA.
- Chastagner G. A. Byther R. S. 1983b. Control of Swiss Needle Cast on Douglas-fir Christmas trees with aerial applications of clorothalonil. *Plant Disease* 67, 790-792.
- Cibrián-Tovar D., Alvarado R. D. y García-Díaz S. E. 2007. Enfermedades forestales de México/ Forest Diseases in Mexico. Universidad Autónoma Chapingo, Comisión Nacional Forestal, Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Forest Service, United States Department of Agriculture, Canadian Forest Service y Comisión Forestal de América del Norte. Chapingo, México. 587 p.
- Cibrián-Tovar D. 2009 Estudio de análisis de riesgo de plagas de los insectos y patógenos exóticos que pueden entrar en los árboles de navidad que se importan de Estados Unidos y Canadá a México. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. México D. F. 434 p
- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal). 2009. Plantaciones forestales comerciales. (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales). Disponible en www.conafor.gob.mx/plantacionescomerciales. Fecha de consulta: 8 de abril de 2009.
- CONAPO (Consejo Nacional de Población). 2005. Grado de marginación por municipio: Estado de México. Región VII Valle de Bravo. (Secretaría de Gobernación) Disponible en: www.conapo.gob.mx/publicaciones/margina2005/anexob/mapas/b_1507.pdf. Fecha de consulta: 06 de febrero de 2010.
- Cruz-Juárez J. 2007. Etiología del tizón suizo (*Phaeocryptopus gaeumannii*) en *Pseudotsuga macrolepis* Flous, como árbol de navidad. Tesis de Maestría en Ciencias. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Mexico. 106 p.
- Epstein E. 1999. Silicon. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 641-664.
- Hansen E. M., Stone J.K., Capitano B.R., Rosso P., Sutton W., Winton L., Kanaskie A., Mcwilliams M.G. 2000. Incidence and impact of Swiss needle cast in forest plantations of Douglas-fir in coastal Oregon. *Plant Disease* 84, 773-778.

- Johnson G. R., Gartner B.L., Maguire D., Kanaskie A. 2003. Influence of Bravo fungicide applications on wood density and moisture content of Swiss Needle Cast affected Douglas-fir trees. *Forest Ecology and Management* 186, 339-348.
- Kanaskie A., McWilliams M. 2010 Swiss Needle Cast Aerial Survey. Oregon Department of Fish and Wildlife. Oregon State Government. Disponible en: http://oregon.gov/ODF/private_forests/fh.shtml#survey_maps__data. Fecha de consulta: 25 de noviembre de 2010.
- Manter D. K., Bond B. J., Kavanagh K. L., Rosso P. H., Filip G. M. 2000. Pseudothecia of Swiss needle cast fungus, *Phaeocryptopus gaeumannii*, physically block stomata of Douglas fir, reducing CO₂ assimilation. *New Phytol* 148, 481-491.
- Osnaya-Gonzalez M. M. 1994. Influencia del silicio sobre la cenicilla *Sphaerotheca pannosa* (Wallr. Ex. Fr.) Lév. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 84 p.
- Osorio M. 2007. Detección del hongo defoliador *Phaeocryptopus gaeumannii* en plantaciones de *Pseudotsuga menziesii* de Valdivia, Chile. *Bosque* 28 (1): 69 – 74.
- PROFEPA (Procuraduría Federal de Protección al Ambiente). 2010. Programa de verificación a la importación de árboles de navidad. Procuraduría Federal de Protección al Ambiente. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Disponible en: http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/v/3449/1/mx/programa_de_verificacion_a_la_importacion_de_arboles_de_navidad.html. Fecha de consulta: 20 de diciembre de 2010.
- SENASICA (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2011. Estadísticas de importación de árboles de navidad. Comunicación personal.
- Stone, J., Carrol, G. 1985. Observations of the development of ascocarps in *Phaeocryptopus gaeumannii* and on the possible existence of an anamorphic state. *Sydowia*. 38: 317-323.
- Stone J.K., Reeser P.W., Kanaskie A. 2007a. Fungicidal suppression of Swiss Needle Cast and pathogen reinvasion in a 20-year-old Douglas-fir stand in Oregon. *West. J. Appl. For.* 22 (4), 248-252.
- Stone J. K., Hood I. A., Watt M. S., Kerrigan J. L. 2007b. Distribution of Swiss needle cast in New Zealand in relation to winter temperature. *Australasian Plant Pathology* 36, 445-454.
- Stone J. K., Capitano B. R., Kerigan J. L. 2008. The histopathology of *Phaeocryptopus gaeumannii* on Douglas-fir Needles. *Mycologia* 100(3), 431-444.
- Sutton B. C. 1980. *The Coelomycetes, Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata.* Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 696 pp.

- Temel F., Johnson G. R., Stone J. K. 2003. First Report of Swiss Needle Cast Caused by *Phaeocryptopus gaeumannii* on Douglas-Fir in Turkey. *Plant Disease* 87(12): 1536.
- Temel F., Johnson G. R., Stone J. K. 2004. The relation between Swiss needle cast symptom severity and level of *Phaeocryptopus gaeumannii* colonization in coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*). *For. Path.* 34, 383-394.
- Winton L. M., Stone J. K., Hansen E. M. 2007. Polymorphic microsatellite markers for the Douglas-fir pathogen *Phaeocryptopus gaeumannii*, causal agent of Swiss Needle Cast disease. *Molecular Ecology Notes* 7, 1125–1128.