



Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación



Proyecto de Investigación 2018

Unidad:	Saltillo	División:	Agronomía	Departamento:	Parasitología
Tema estratégico (ANA/PEP):	Bioeconomía				
Línea de investigación:	Bioplaguicidas				
Título del proyecto:	Alternativas de control biológico para <i>Phoradendron spp.</i> en árboles forestales de los municipios de General Cepeda y Arteaga, Coahuila.				
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000)	65,000	El proyecto es:	Nuevo	Continuación	X
Tipo de investigación:	Básica	Aplicada	X	Tecnológica	
Vinculación:	Si	No	X	Fondos concurrentes:	
Cooperante(s):					
Entidad (es):	Coahuila	Municipio (s):	General Cepeda y Saltillo		
Localidades:	Presa el Tulillo y sierra de Zapalinamé				
A realizar durante el(los) año(s):	2016-2018				

Participantes		Adscripción (Clave Depto.)	Expediente No.	Firma
Responsable	Dra. Yolanda Rodríguez Pagaza	Parasitología	100067	
Colaborador:	Dr. Sergio Rene Sánchez Peña	Parasitología	2886	
Colaborador:	Dr. Alberto Flores Olivas	Parasitología	2289	
Colaborador:	Dr. José Ángel Villareal Quintanilla	Botánica	1061	
Colaborador:	Dra. Rosalinda Mendoza Villareal	Horticultura	1029	
Colaborador:				
		Grado por obtener	Matrícula	Firma
Tesista:	María Paz Ponce	Doctorado	61111193	
Programa Docente:	Doctorado en Parasitología Agrícola			
Tesista:	Ana Lilia Melchor López	Licenciatura	41149022	
Programa Docente:	Ingeniero Agrónomo Parasitólogo			
Tesista:				
Programa Docente:				
	Vo. Bo.		Autoriza	
Firma y sello				
Nombre	Dr. Ernesto Cerna Chávez Jefe de Departamento		Dr. Armando Robledo Olivo Subdirector de Programación y Evaluación	

• Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

1.-Título del proyecto

Presupuesto solicitado:

Alternativas de control biológico para *Phoradendron spp.* en árboles forestales de los municipios de General Cepeda y Arteaga, Coahuila.

65,000

2.- Introducción

México es uno de los cinco países con mayor diversidad biológica en árboles forestales, junto con Brasil, Colombia e Indonesia y a causa de los muérdagos hay pérdidas de madera por 2 millones de metros cúbicos al año. En los bosques, los muérdagos son el segundo agente biológico de perturbación después de los descortezadores (CONAFOR, 2010; SEMARNAT, 2012). Los géneros más importantes de muérdagos en México son de la Familia Viscaceae (*Arceuthobium sp.* y *Phoradendron sp.*) y de la Familia Loranthaceae (*Psittacanthus sp.*, *Cladocolea sp.* y *Struthantus sp.*) (Cibrián et al., 2007), y los principales efectos que causa el muérdago en el árbol hospedero son: deformación del tallo infectado, pérdida de crecimiento, aumento en la susceptibilidad a otras enfermedades e insectos y reducción de su longevidad. La presencia del muérdago y la mortalidad causada por éstos tiene efectos ecológicos y económicos significantes en bosques y áreas de recreación severamente infestados (Geils y Vazquez, 2002). En Coahuila, las principales localidades que han sido reportadas con árboles severamente infestados con muérdago del género *Phoradendron* son: la Presa el Tulillo, en el municipio de General Cepeda; la sierra de Huachichil y Los Lirios, ambos en el municipio de Arteaga. Los árboles hospedantes son principalmente *Prosopis glandulosa*, *Quercus striatula*, *Juniperus spp.* y *Cupressus arizonica* (Amaro, 2013).

Actualmente, la única medida de control de muérdago autorizada en árboles forestales es la poda, ya que el uso de herbicidas y otros tipos de productos químicos no son apropiados debido a su impacto ambiental, social y económico (Arriola-Padilla et al., 2012). En cuanto al desarrollo de un método de control biológico para *Phoradendron*, las escasas investigaciones solo han reportado algunos hongos patógenos de muérdago como candidatos a usarse como biocontroles (Paz et al., 2013; Vazquez et al., 2006), por lo que se hace necesaria una investigación destinada a probar estos posibles candidatos tanto en laboratorio como en campo, así como proponer una opción alternativa probando algunos metabolitos secundarios derivados de los hongos fitopatógenos detectados en las diferentes especies de *Phoradendron* que afectan al arbolado forestal dentro del estado de Coahuila.

Objetivos

1. Verificar morfológica y molecularmente las especies de *Phoradendron* que parasitan los árboles de *Prosopis glandulosa* en la Presa El Tulillo, en el municipio de General Cepeda; y los árboles de *Quercus striatula* y *Juniperus spp.* en la sierra de Huachichil, en el municipio de Arteaga, Coahuila.
2. Determinar los hongos asociados a las especies de *Phoradendron* que parasitan los árboles de *Prosopis glandulosa*, *Quercus striatula* y *Juniperus spp.* en las localidades bajo estudio.
3. Determinar la selectividad de los hongos asociados a las especies de *Phoradendron* tanto en el muérdago como en las especies forestales *in vitro*.
4. Extraer metabolitos secundarios de los hongos que resulten con mayor patogenicidad y especificidad para los muérdagos y evaluar su desempeño como control biológico *in vitro* y en campo.

Hipótesis

Por lo menos un metabolito secundario de los hongos asociados a muérdago reducirá significativamente las poblaciones de *Phoradendron spp.* en las poblaciones de árboles forestales bajo estudio.

3.-Revisión de Literatura

El control de los muérdagos es un problema muy serio para la sanidad forestal, ya que desde el punto de vista normativo su control está sujeto a la NOM-045- SSA-1993 y al Manual de Sanidad Forestal (CONAFOR 2010) debiendo utilizarse solo los métodos y productos químicos que indiquen estos documentos. El control químico a base de herbicidas como el Ethepon y el Esteron 47*M matan la parte aérea del muérdago pero no es recomendable su aplicación por el grado de fitotoxicidad al hospedero y a las plantas asociadas (Quick, 1963 y Adams et al., 1993). Los métodos culturales discutidos por Franquel y Adams (1989), Hawksworth y Scharpf (1981) y Hernández (1991) se refieren a la poda del muérdago, pero este vuelve a retoñar después de seis meses a un año, ya que solo se elimina la parte aérea pero no sus haustorios.

El control biológico se plantea como una alternativa ecológica y socialmente sustentable. Al respecto, el producto conocido como "Muérdago Killer" es un producto formulado a base de Algas diatomeas y recomendado por la

CONAFOR para que fuera utilizado por algún tiempo, resultando muy efectivo para dar muerte al muérdago pero inaccesible económicamente para controlar grandes áreas de árboles forestales. Las alternativas de control biológico con insectos o microorganismos han sido poco exploradas aún, quedándose en el reporte de los insectos u hongos asociados a diferentes especies de muérdago (Arriola-Padilla *et al.*, 2012; Baranyay y Khutson, 1978; Cárdenas *et al.* 2014; Mark *et al.* 1976; Vázquez *et al.* 2006). Para el caso de Coahuila, Paz *et al.*, (2013) encontraron que *Alternaria alternata*, *A. infectoria* y *Fusarium oxysporum* causan necrosis en las hojas de *Phoradendron macrophyllum* en el municipio de Saltillo. Este mismo autor reporta una incidencia de *P. macrophyllum* en *Prosopis glandulosa* de 82.5%, en la presa El Tulillo, municipio de General Cepeda, en Coahuila, mientras que *P. bolleanum* tiene una incidencia de 93.3% en *Cupressus arizonica* en el cañón de los Lirios (Amaro, *et al.*, 2013) y *P. tomentosum* tiene una incidencia de 57% en *Quercus striatula* en el cañón de Huachichil (Ocaña, *et al.*, 2010), ambas localidades en el municipio de Arteaga, Coahuila.

4.- Procedimiento Experimental

Identificación de las especies de muérdago que parasitan los árboles forestales en las zonas de estudio

Muestreos

Se realizarán colectas de muérdago del género *Phoradendron* que parasitan los árboles de *Prosopis glandulosa* en la Presa El Tulillo, en el municipio de General Cepeda; y los árboles de *Quercus striatula* y *Juniperus* spp. en la sierra de Huachichil, en el municipio de Arteaga, Coahuila.

Identificación morfológica

El material colectado se herborizará y se llevará al herbario de la UAAAN donde se solicitará el apoyo del personal especializado en taxonomía vegetal para determinar el género y la especie a la que pertenecen. Se usarán las claves de Kuj (2003), Marroquín (1976), Rzedowski (2006) y Cibrián *et al.* (2007).

Identificación molecular

El material colectado se procesará en el Laboratorio de Parasitología Molecular para extraer ADN por el método de CTAB (Posso *et al.*, 2009). Se obtendrá un producto de PCR utilizando los primers 18S rDNA (Murray y Thompson 1980) el cual se mandará secuenciar y las secuencias se compararán con la base de datos en el Gen Bank.

Determinación de hongos asociados a las especies de muérdago bajo estudio

Muestreos

Se realizarán colectas de hojas de muérdago (que presenten síntomas y signos de enfermedad causada potencialmente por hongos) del género *Phoradendron* que parasitan los árboles de *Prosopis glandulosa* en la Presa El Tulillo, en el municipio de General Cepeda; y los árboles de *Quercus striatula* y *Juniperus* spp. en la sierra de Huachichil, en el municipio de Arteaga, Coahuila, en los meses de junio, agosto y octubre del presente año.

Crecimiento de hongos asociados y purificación de cepas

Las hojas colectadas se desinfectarán superficialmente y se sembrarán en cajas Petri usando medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA). Las cajas Petri se incubarán a 25°C por 20 días. Los hongos obtenidos mediante esta técnica se purificarán por punta de hifa y por cultivo monosporico en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología

Identificación morfológica y molecular de hongos asociados

Los hongos se identificarán por medio de las claves de Abad (2002); Neergaard (1977) y Barnett (1998). Para la identificación molecular, se hará una extracción de ADN por el método de CTAB (Posso *et al.*, 2009) y se amplificará mediante PCR usando los primers ITS4 e ITS5. El producto de la PCR se mandará secuenciar y se comparará la secuencia con el Gen Bank.

Determinación de selectividad de los hongos asociados

Los hongos asociados se crecerán en cajas Petri con medio PDA para incrementar el inóculo. Las concentraciones de esporas a usar en los bioensayos serán de 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 esporas por mL.

Para cada bioensayo se colectarán previamente hojas aparentemente sanas de los muérdagos bajo estudio así como de los árboles hospedantes. Las hojas se desinfectarán con hipoclorito de sodio al 2% durante 3 minutos, se

enjuagarán en agua destilada estéril y se colocaron en papel secante esterilizado. Se acomodarán individualmente con el envés hacia abajo en cajas Petri que contendrán papel filtro estéril humedecido con agua destilada estéril. En el haz de la hoja se asperjará la dilución de esporas del hongo correspondiente con una aspersora manual. Cabe mencionar que esto se llevará a cabo con las tres especies de muérdagos y sus hospederos con sus respectivos testigos, en los que solo se asperjará agua destilada estéril.

Se medirá diariamente la longitud de las lesiones provocadas por el hongo por medio de un vernier electrónico, hasta que se llene la hoja con el hongo. La unidad experimental será una hoja de muérdago en una caja Petri.

El diseño experimental será un completamente al azar con arreglo factorial de NX3X7, donde el primer factor será el número de hongos asociados encontrados, el segundo factor serán las concentraciones de esporas y el tercer factor serán las 7 repeticiones, más el testigo. El análisis estadístico se hará mediante Diferencia Mínima Significativa (DMS) y prueba de Tukey con una significancia de P=0.05.

Extracción de metabolitos secundarios y pruebas *in vitro* y en campo

Extracción e identificación de metabolitos secundarios

De los resultados obtenidos de las pruebas de patogenicidad *in vitro* se seleccionarán las especies de hongos patógenos con mayor potencial como control biológico, mínimo una especie por muérdago y máximo dos.

A las especies de hongos seleccionadas se les hará un análisis de ácidos fenólicos y triterpenos por HPCL según las técnicas de Luczkiewicz, et al. (2001) y Onyebuchi et al. (2013). La extracción, separación, purificación y cuantificación de los metabolitos encontrados se realizará de acuerdo a los mismos autores. Esta parte del trabajo se realizará en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila.

Pruebas de patogenicidad de los metabolitos secundarios

El bioensayo será similar al descrito para los hongos asociados, solo que aplicando diferentes concentraciones de metabolitos secundarios. Los metabolitos y sus concentraciones se definirán de acuerdo a los resultados obtenidos en el paso del procedimiento experimental anterior. Se plantea que se lleve a cabo mediante un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial, y que el análisis estadístico se realice mediante Diferencia Mínima Significativa (DMS) y prueba de Tukey con una significancia de P= 0.05.

Evaluación de metabolitos secundarios en campo

De acuerdo a los resultados obtenidos en el paso del procedimiento experimental anterior, se seleccionará el metabolito que haya presentado la mayor patogenicidad sobre el muérdago para ser evaluado en campo. Esta parte del estudio se realizará en los mismos sitios donde se realizaron las colectas iniciales de muérdagos (la presa El Tullillo, en el municipio de General Cepeda y la sierra de Huachichil, en el municipio de Arteaga, Coahuila). Las aplicaciones de los metabolitos secundarios serán directas a los muérdagos con una mochila de aspersión a punto de goteo. Se dará seguimiento a los efectos de estas aplicaciones tanto en el muérdago como en el árbol hospedante durante al menos cuatro meses. Para evaluar los efectos de los metabolitos secundarios en el muérdago se utilizará la escala de grado de afectación de acuerdo a Balcazar *et al.* (2013), siendo las variables a medir tres: necrosis, amarillamiento y defoliación. Se realizará un análisis estadístico no paramétrico, con un diseño completamente al azar usando una extensión de la Prueba de Kruskal-Wallis.

Cronograma de Actividades para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Envío del primer artículo científico para su publicación		X										
Determinación de ácidos fenólicos y triterpenos de los hongos patógenos seleccionados por HPLC	X	X	X	X								
Identificación de metabolitos en los hongos patógenos seleccionados		X	X	X								
Pruebas de patogenicidad de metabolitos <i>in vitro</i>			X	X	X							
Análisis de resultados de las pruebas de patogenicidad de metabolitos secundarios <i>in vitro</i> y selección de aquellos con mayor potencial como control biológico					X	X						
Preparación de soluciones de los metabolitos secundarios para las pruebas de campo						X	X					

Presentación de resultados en congreso									X					
Evaluación en campo de metabolitos secundarios								X	X	X				
Análisis de resultados										X	X			
Redacción del segundo artículo científico para su publicación											X	X		
Obtención de grado de la estudiante de doctorado														X

Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Determinación de ácidos fenólicos y triterpenos de los hongos patógenos seleccionados por HPLC	20,000											
Identificación de metabolitos en los hongos patógenos seleccionados		10,000										
Pruebas de patogenicidad de metabolitos <i>in vitro</i>			5,000									
Presentación de resultados en congreso								5,000				
Evaluación en campo de metabolitos secundarios							20,000					
Obtención de grado de la estudiante de doctorado												5,000

Duración total del proyecto

Año de Inicio	2016	Año estimado de conclusión	2018
---------------	------	----------------------------	------

5.-Productos Esperados

- Publicación de dos artículos científicos en revistas arbitradas.
- Graduación de una estudiante como Doctora en Ciencias en Parasitología Agrícola.
- Graduación de una estudiante como Ingeniero Agrónomo Parasitólogo

6.-Literatura Citada

Abad G. (2002), Identificación de Fitopatógenos asociados a semillas mediante técnicas utilizadas por Plant Pathogen Identification Laboratory, Dept. of Plant pathology North Carolina State University. Primer Taller Internacional sobre "Identificación de Hongos y Stramenopilas Transmitidos por Semilla", Texcoco, México.

Adams, D. H. ; Frankel, S.J.; Lichter, J:M: 1993. Considerations when using ethephon for suppressing dwarf mistletoe and leafy mistletoe infestations in ornamental landscapes. Journal of Arboriculture. 19(6): 351-357.

Amaro Romualdo, J., Sánchez Arizpe A., Galindo Cepeda M. E., Paz Ponce, M., 2013. Identificación, Incidencia y Severidad del Muérdago Phoradendron bolleanum (Seem) Eichir Sobre Cupressus arizonica (Greene) en Arteaga, Coahuila. Tesis Profesional, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro 42 pp.

Arriola-Padilla, V. J., Reséndiz-Martínez, F., Chaires-Grijalva, M. P., Medellín-Jiménez, R y Pérez-Silva, M. 2012. Insecta asociada a muérdago enano (*Arcethobium* spp.) en los parques nacionales Izta-Popo y la Malinche. Entomología Mexicana 11(2):829-834.

Bañuelos Balandrán J. J.; Mayek Pérez, N. 2008. Evaluación no Destructiva de la Patogenicidad de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. En Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Rev. Mex. Fitopatol. Vol 26, N. 1 pp 71-75.

Barnett HL, Barry B. Hunter (1998), "Illustrated genera of Imperfect Fungi" Fourth Edition, APS PRESS, The American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, 218p.

Cibrián, T.D., D, Alvarado R. y S. E. García D. (Eds.) 2007, Enfermedades forestales en México/Forest Diseases in Mexico. Universidad Autónoma Chapingo; CONAFOR- SEMARNAT, México; Forest Service USDA, EUA; NRCAN Forest Service, Canadá y Comisión Forestal de América del Norte, COFAN, FAO. Chapingo, México. 587 p.

CONAFOR 2012, Revista Electrónica de la Comisión Nacional Forestal. México Forestal. www.mexicoforestal.gob.mx/plagas

Fonseca R. M. 2006 *Juniperus*, la ginebra, el incienso, los lápices y los repelentes. Revista Ciencias de la UNAM. No.

- Flores Flores J. D. 2005. Diagnóstico Fitosanitario de las poblaciones de Mezquite en los Municipios de Cuatrociénegas y San Pedro de las Colonias, Gobierno Federal, Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Comisión Nacional Forestal y Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- FRA 2010 Evaluación de los Recursos Forestales Mundiales. Informe Nacional México, Departamento Forestal. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, DNA. Nucl. Acids Res. 8 (19): 4321-4326.
- Frankel, S.; Adams, D. 1989. Reduction of dwarf mistletoe with the plant growth regulator ethephon. Forest Pest Management Rep. 89-1. San Francisco: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Southwest Region. 5p.
- Geils B. W. and Vazquez C. L. 2002. Loranthaceae y Viscaceae in North America. Mistletoes of North American conifers. General Technical Reports, U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. 123p.
- Hawksworth, F.G.; Scharpf, R.G: 1981. *Phoradendron* on Conifers. Forest Insect and Disease Leaflet 164. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service. 7p.
- Hernández Cuevas, L.V. 1991. Los muérdagos (Loranthaceae) de la Región Central del Estado de Tlaxcala. Publ. 4 Tizatlán, Tlaxcala: Jardín Botánico de Tizatlán. 38p.
- Kuij J. 1969. Chapter 2: The Mistletoes. In The Biology of Parasitic Flowering Plants. The University of California Press, Berkeley, CA pp. 13-52.
- Luczkiewicz Maria, eisowski Wojciech, Kaiser Piotr, Ochocka Renata and Piotrowski Arkadiusz. 2001. Comparative Analysis of Phenolic Acids in Mistletoe Plant from various Hosts. Department of Pharmacognosy and Department of Biology and Pharmaceutical Botany, Faculty of Bharmacy, Medical University of Gdansk, 107 Gen. J. Hallera Ste., 80-416 Gdansk- Wrzeszcz, Poland. Acta Poloniae Pharmaceutica- Drug Research, Vol 58 No. 5 pp. 373-379.
- Mark, W. R.; Hawksworth, F.G.; Oshima, N. 1976. Resin Disease: A new Disease of Lodgepole pine dwarf mistletoe. Canadian Journal of Forest Research. 6: 415-424.
- Murray, M.F. and W. F. Thompson, 1980. Rapid isolation of hight molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8 (19); 4321-4325.
- Neergaard (1977), Seed Pathology, Volume I y II, John Wiley& Sons New York 200-217 p.
- Ocaña Hernández B., Sánchez Arizpe A., Padrón Corral E., Galindo Cepeda M. E., Cepeda Puente G. 2010. Identificación, Incidencia y Severidad del Muérdago (*Phoradendron spp*) en los cañones de los Chorros, Huachichil la Carbonera, de la Sierra de Arteaga, Coahuila. Tesis Profesional. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, 42 pp.
- Paz Ponce, M., Sánchez Arizpe A., Galindo Cepeda M.E., Sánchez Peña S.R., Flores Flores J.D. 2013. Identificación y Patogenicidad de Hongos en Muérdago (*Phoradendron bolleanum* Eichler= *P. saltillense* Trel. En Arteaga y Saltillo, Coahuila. Tesis de Maestría. Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro. 46 pp.
- Posso Duque Duina, Thaura Ghneim Herrera. 2008. Uso de Marcadores Microsatélites para la Estimación de Diversidad Genética en Plantas. Ediciones IVIC. Murray M.G and Thompson W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant.
- Quick, C.R. 1963. Chemical Control Unit. IX Leafy mistletoes (*Phoradendron spp*). In: Proceedings 10th Western International Forest Disease work Conference; 1962 October 15-19; Victoria, Alberta (sic); 97-98.
- SEMARNAT 2011. Anuario Estadístico de La Producción Forestal. <http://www.semarnat.gob.mx/temas/gestiónambiental/forestalsuelos/Anuarios/ANUARIO 2011 pdf>.
- Vázquez Collazo I., Villa Rodríguez A., Madrigal Huendo S., 2006. Los muérdagos (Loranthaceae) en Michoacán. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro, Campo Experimental Uruapan. Libro Técnico Núm. 2, División Forestal, Uruapan, Michoacán. 97pp.
- Villarreal J. A. 2001. Listados Florísticos de México. XXII Flora de Coahuila. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 137p.
- Watson D. M. (2001), Mistletoe- a Keystone resourse in forests and woodlands worldwide. Annual Review of Ecology and Systematics 32, 219- 249. DOI: 10.1146/ANNUREV. ECOL.SYS.32.081501. 114024