

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y PATOGENICIDAD DE HONGOS
 CAUSANTES DE LA MUERTE DESCENDENTE DEL NOGAL NEGRO
 AMERICANO (*Juglans nigra* L)

Tesis

Que presenta MARIO RAYA PÉREZ
como requisito parcial para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

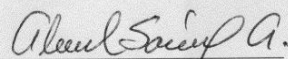
Saltillo, Coahuila

Julio 2016

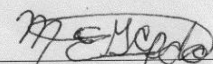
AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y PATOGENICIDAD DE HONGOS
CAUSANTES DE LA MUERTE DESCENDENTE DEL NOGAL NEGRO
AMERICANO (*Juglans nigra* L.)


Tesis


Elaborada por MARIO RAYA PÉREZ como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA con la supervisión y
aprobación del Comité de Asesoría


M.C. Abiel Sánchez Arizpe
Asesor principal


Dr. Oswaldo García Martínez
Asesor


Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda
Asesor


Dr. Raúl Rodríguez Guerra
Asesor


Dr. Alberto Sandoval Rangel
Subdirector de Posgrado
UAAAN

Saltillo, Coahuila

Julio 2016

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por abrirme sus puertas en este proyecto de vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico brindado para la culminación satisfactoria de esta investigación.

A mis Padres y Hermanos, por su apoyo incondicional.

A todos y cada uno de los integrantes del comité de asesoría, **M.C. Abiel Sánchez Arizpe, Dr. Oswaldo García Martínez, Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda y Dr. Raúl Rodríguez Guerra** quienes estuvieron en la mejor disposición para que este proyecto de investigación fuera posible.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental General Terán Nuevo León. Por permitirme desarrollar la fase molecular en sus instalaciones.

A la M.C. Kenzy Iveth Peña Carrillo, por todo su apoyo incondicional en esta investigación.

De manera muy especial al M.C. Abiel Sánchez Arizpe, por el apoyo, dedicación y compromiso mostrado en la investigación.

A todos los maestros del Departamento de Parasitología Agrícola.

A todas las personas que de alguna u otra manera colaboraron en la realización de este trabajo de investigación.

Dedicatoria

A Dios, a mis Padres y Hermanos

Índice General

Agradecimientos	iii
Dedicatoria.....	iv
Índice General	v
Lista de cuadros	vii
Lista de figuras	viii
Resumen	x
Abstract.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVO GENERAL	2
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
HIPÓTESIS	2
REVISIÓN DE LITERATURA	3
Identificación de hongos fitopatógenos por caracterización morfológica	3
Clasificación taxonómica de <i>Trichothecium roseum</i>	3
Caracterización Morfológica del Género <i>Trichothecium</i>	3
Clasificación Taxonómica de <i>Pestalotiopsis steyaertii</i>	4
Caracterización Morfológica del Género <i>Pestalotiopsis</i>	5
Clasificación Taxonómica de <i>Alternaria alternata</i>	6
Caracterización Morfológica del Género <i>Alternaria</i>	6
Clasificación Taxonómica de <i>Rhizoctonia solani</i>	7
Caracterización Morfológica del Género <i>Rhizoctonia</i>	7
Manejo agronómico del cultivo de nogal <i>J. nigra</i> L.	9
Ecología	9
Tratamientos silvícolas.....	10
La poda	11
Producción	11
Rendimiento económico	12
Manejo integrado de hongos fitopatógenos	13
<i>Alternaria alternata</i> ; <i>Trichothecium roseum</i> y <i>Pestalotiopsis steyaertii</i>	13
<i>Rhizoctonia solani</i>	14

Control cultural	15
Control biológico	15
Control químico.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
Área de estudio	19
Aislamiento de hongos.....	19
Caracterización Morfológica de hongos aislados.....	19
Identificación Molecular de hongos aislados.....	20
Pruebas de patogenicidad.....	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
Síntomas de la enfermedad en plantaciones de <i>J. nigra</i>	23
Aislamiento e identificación de hongos	23
Prueba de patogenicidad	26
CONCLUSIONES.....	31
REFERENCIAS	32

Lista de cuadros

Cuadro 1. Resultados del análisis BLAST para las secuencias de la región ITS1 a ITS2 de las cepas *Trichothecium*, *Pestalotia*, *Alternaria* y *Rhizoctonia* aisladas de *Juglans nigra*. Departamento de Parasitología Agrícola, UAAAN 2016.....25

Cuadro 2. Promedios obtenidos de cinco variables evaluadas a los 45 días después de la inoculación de plantas de *J. nigra* con cuatro especies de hongos. Departamento de Parasitología Agrícola, UAAAN 2016.....29

Lista de figuras

Figura 1. Morfología de <i>Trichothecium roseum</i> . Departamento de Parasitología Agrícola, UAAAN 2016.....	4
Figura 2. Morfología de <i>Pestalotiopsis steyaertii</i> . Departamento de Parasitología Agrícola, UAAAN 2016.....	5
Figura 3. Morfología de <i>Alternaria alternata</i> . Departamento de Parasitología Agrícola, UAAAN 2016.....	7
Figura 4. Morfología de <i>Rhizoctonia solani</i> . Departamento de Parasitología Agrícola, UAAAN 2016.....	8
Figura 5. Síntomas de muerte descendente en <i>Juglans nigra</i> . A) árbol con muerte parcial de ramas; B) vista de lesión superficial en rama verde; C) canchros internos. Departamento de Parasitología Agrícola, UAAAN 2016.....	23
Cuadro 1. Resultados del análisis BLAST para las secuencias de la región ITS1 a ITS2 de las cepas <i>Trichothecium</i> , <i>Pestalotia</i> , <i>Alternaria</i> y <i>Rhizoctonia</i> aisladas de <i>Juglans nigra</i> . Departamento de Parasitología Agrícola, UAAAN 2016.	25
Figura 6. Árbol filogenético entre secuencias para <i>Pestalotiopsis steyaertii</i> , aislada de <i>J. nigra</i> según el análisis BLAST (Cuadro 1). Departamento de Parasitología Agrícola, UAAAN 2016.....	26
Figura 7. Síntomas en plántulas inoculadas con cepas de hongos aislados de canchros de ramas de <i>J. nigra</i> . A) Planta sana (testigo) a los 45 días de inoculación; B) Amarillamiento a los 7 ddi en plántula inoculada con <i>T. roseum</i> ; C) Reducción en el crecimiento de la plántula inoculada; D) defoliación en plántula inoculada; E) Parte apical de plántula con coloración rojiza; F) Plántula muerta inoculada. Departamento de Parasitología Agrícola, UAAAN 2016.....	27

Figura 8. Porcentaje de plantas con algún tipo de síntomas en seis fechas post inoculación.
Departamento de Parasitología Agrícola, UAAAN 2016. 28

Resumen

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y PATOGENICIDAD DE HONGOS
CAUSANTES DE LA MUERTE DESCENDENTE DEL NOGAL NEGRO AMERICANO
(*Juglans nigra* L)

Por

MARIO RAYA PEREZ

MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

M.C. ABIEL SÁNCHEZ ARIZPE-ASESOR

Saltillo, Coahuila

Julio 2016

El nogal negro americano (*Juglans nigra* L) es afectado por problemas fitosanitarios, destacando hongos causantes de canchales en ramas que reducen la producción de fruto hasta en 60% (rendimiento promedio 1.9 t/ha). Los objetivos de esta investigación fueron identificar los hongos asociados a canchales presentes en ramas de árboles de *J. nigra* con síntomas de muerte descendente y evaluar su patogenicidad. Se efectuaron aislamientos de hongos a partir de muestras de ramas con síntomas recolectadas en dos huertas del estado de Coahuila. Se obtuvieron cuatro morfotipos de hongos y una cepa de cada hongo se utilizó para su identificación morfológica a nivel de género, mediante la secuenciación de la región ITS1 a ITS2 de los genes ribosomales (rDNA) para su identificación a nivel de especie. Las pruebas de patogenicidad se realizaron en plántulas de *J. nigra* de cuatro meses de edad a las cuales se hizo una fisura la prueba de patogenicidad se realizó una fisura de 3 mm de largo en el tallo y se inocularon con cada especie identificada. Los hongos asociados a los canchales de *J. nigra* fueron identificados morfológicamente como miembros de los géneros *Trichothecium*, *Pestalotiopsis*, *Alternaria* y *Rhizoctonia*. Mediante el análisis BLAST en el GenBank de las secuencias de la región ITS1 a ITS2, fue posible determinar que las cepas están relacionadas a las especies *Trichothecium roseum* (Sharma, *et al.*, 2016), *Pestalotiopsis steyaertii* (Maharachchikumbura, *et al.*, 2013), *Alternaria alternata* (Bonfim, *et al.*, 2016) y a una especie binucleada no determinada de *Rhizoctonia*. La inoculación de las cuatro cepas a plántulas demostró que éstas son patogénicas a *J. nigra*.

Palabras clave: Canchales, identificación, ITS1-2, patogenicidad.

Abstract

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y PATOGENICIDAD DE HONGOS
CAUSANTES DE LA MUERTE DESCENDENTE DEL NOGAL NEGRO AMERICANO
(*Juglans nigra* L)

Por

MARIO RAYA PEREZ

MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

M.C. ABIEL SÁNCHEZ ARIZPE-ASESOR

Saltillo, Coahuila

Julio 2016

American black walnut (*Juglans nigra* L) is affected by phytosanitary problems, highlighting fungi cause cankers on branches that reduce fruit production by up to 60% (average yield 1.9 t / ha). The objectives of this research were to identify the fungi associated with cankers present in tree branches *J. nigra* with dieback symptoms and assess their pathogenicity. Fungal isolates were made from branches with symptoms samples collected from two orchards of the state of Coahuila. four morphotypes of fungi and a strain of each fungus was used for morphological identification to genus level by sequencing the ITS1 to ITS2 ribosomal genes (rDNA) for identification to species level were obtained. Pathogenicity tests were performed on *J. nigra* seedlings four months old at which a crack pathogenicity test a fissure 3 mm long stem was made and inoculated with each species was identified. Fungi associated with cankers *J. nigra* were morphologically identified as members of the genera *Trichothecium*, *Pestalotiopsis*, *Alternaria* and *Rhizoctonia*. Using BLAST analysis in GenBank sequences ITS1 region to ITS2 was possible to determine which strains are related to species *Trichothecium roseum* (Sharma, *et al.*, 2016), *Pestalotiopsis steyaertii* (Maharachchikumbura, *et al.*, 2013), *Alternaria alternata* (Bonfim, *et al.*, 2016) and an unspecified binucleate *Rhizoctonia* species. Inoculation of the four strains showed that these seedlings are pathogenic to *J. nigra*.

Keywords: Cankers, identification, ITS1-2, pathogenicity.

INTRODUCCIÓN

El nogal negro americano (*Juglans nigra* L), nativo de Norteamérica (Michler, *et al.*, 2007), pertenece a la familia Juglandaceae, cultivándose ampliamente en Europa (Tokár y Kukla, 2009; Šálek y Hejčmanová, 2011), Sudamérica y Asia oriental (Fisher, *et al.*, 2013). Este nogal es valorado por las características nutritivas y contenido de antioxidantes de la nuez, y por su madera (Gilman y Watson, 1993; Shifley, 2004). Su cultivo enfrenta diversas plagas y enfermedades que limitan la producción. En 1990 se observó mortalidad del nogal *J. nigra* en las montañas de Wasatch Utah y en el Valle de Willamette en el Estado de Oregón, EE. UU; en 1997 la mortalidad se observó en los estados de Utah y Colorado y en 2001 en el Valle de Española, Nuevo México (Fisher, *et al.*, 2013). La mortalidad para estos años, se asoció a la presencia del escarabajo *Pityophthorus juglandis* (Tiserrat, *et al.*, 2011) (Coleoptera: Scolitidae) sobre ramas y troncos. Se determinó que la disminución de las poblaciones de *J. nigra* era causada por la alta incidencia del escarabajo y el posterior desarrollo de canchales alrededor de las galerías, causadas por una asociación entre éste y el hongo *Geosmithia morbida* Blackman. A partir de 2008, la enfermedad obtuvo el nombre común de enfermedad de miles de canchales (TCD por sus siglas en inglés), debido a la enorme cantidad de canchales que se forman en la corteza de los árboles afectados. TCD continuó distribuyéndose, y para 2009 y 2010 se detectó en los estados de Washington e Idaho con una severidad de hasta 60% del total de la población y remoción debido a la muerte de 300 ejemplares (Tiserrat, *et al.*, 2011). En 2010 esta enfermedad se detectó por primera vez al este de EE. UU y para 2011, 2012 y 2013 se encontró en Virginia, Carolina del Norte y Pensilvania, respectivamente, atribuyéndose a la asociación de *P. juglandis* y *G. morbida* (Fisher, *et al.*, 2013; Utley, *et al.*, 2013; Wiggins, *et al.*, 2014).

En México, la producción de nuez de *J. nigra* se obtiene de forma tradicional desde hace varios siglos en los estados de Puebla, Tlaxcala, Estado de México, Oaxaca y Querétaro. Esta especie está en riesgo debido a los problemas fitosanitarios que enfrenta, la disminución de rendimientos, los altos costos de producción, porque se usa como porta injertos de otras especies dentro del género y por las importaciones de fruto que realiza México (Luna, *et al.*, 2013). En el estado de Coahuila de Zaragoza, los principales Municipios productores de este cultivo son Parras, Zaragoza, Múzquiz, Ramos Arizpe y Saltillo, con una superficie de 1, 446 hectáreas y rendimiento promedio de 1.9 t/ha. Se ha

estimado que las pérdidas del fruto en este estado llegan a ser de hasta 60%, en donde incluso ocurre la pérdida de árboles debido a la muerte descendente provocada posiblemente por canchros presentes en ramas. El objetivo de esta investigación fue aislar, identificar y determinar la patogenicidad de los hongos presentes en canchros asociados a la muerte descendente de *J. nigra* en dos municipios de Coahuila de Zaragoza, México. Lo anterior debe apoyar a determinar las causas de la muerte descendente del nogal negro y a desarrollar estrategias de control en el futuro.

OBJETIVO GENERAL

Identificar y evaluar la patogenicidad de hongos asociados a canchros de ramas de *J. nigra*, causantes de la muerte descendente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificación taxonómica y molecular de los hongos asociados a canchros de ramas de nogal *J. nigra*.
- Determinar la patogenicidad de los hongos asociados a la muerte descendente de nogal *J. nigra* en invernadero.

HIPÓTESIS

Al menos dos de las cepas aisladas de canchros de ramas de *J. nigra* serán patogénicas.

REVISIÓN DE LITERATURA

Identificación de hongos fitopatógenos por caracterización morfológica.

La caracterización morfológica de los Deuteromicetos se basa principalmente en la estructura, composición de las células conidiales, conidióforos, acérvulos, picnidios, esporodoquios, sinemas y clamidosporas (Barnett y Hunter 2006).

La identificación de organismos fitopatógenos por medio de métodos tradicionales, incluye el aislamiento del patógeno y la caracterización de estos a través de pruebas de patogenicidad y características morfológicas que son laboriosas, con un alto consumo de tiempo y propensas a errores si no se tiene la debida experiencia y cuidado (Godoy, *et al.*, 2007).

Clasificación taxonómica de *Trichothecium roseum*

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Subdivisión: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Incertae sedis

Género: *Trichothecium*

Especie: *roseum*

Sharma, *et al.* (2016)

Caracterización Morfológica del Género *Trichothecium*

Las colonias crecen inicialmente de color blanco, pero cambian a color rosa o naranja con la edad (Figura 1A). Los conidióforos son erectos de 200-300µm de longitud, individualmente o en grupos sueltos, hialinos y septados, retrógrados, no se ramifican; a menudo cerca de la base forma cadenas alternas de conidios en el ápice, indistinguibles de las hifas hasta que se producen los conidios (Figura 1B). Los conidios son grandes de 12-18 x 8-10µm, lisos, bicelulares (célula basal y apical), hialinos, elipsoidales a piriformes, con una forma oblicua trunca en la base (Figura 1C), Barnett y Hunter (2006).

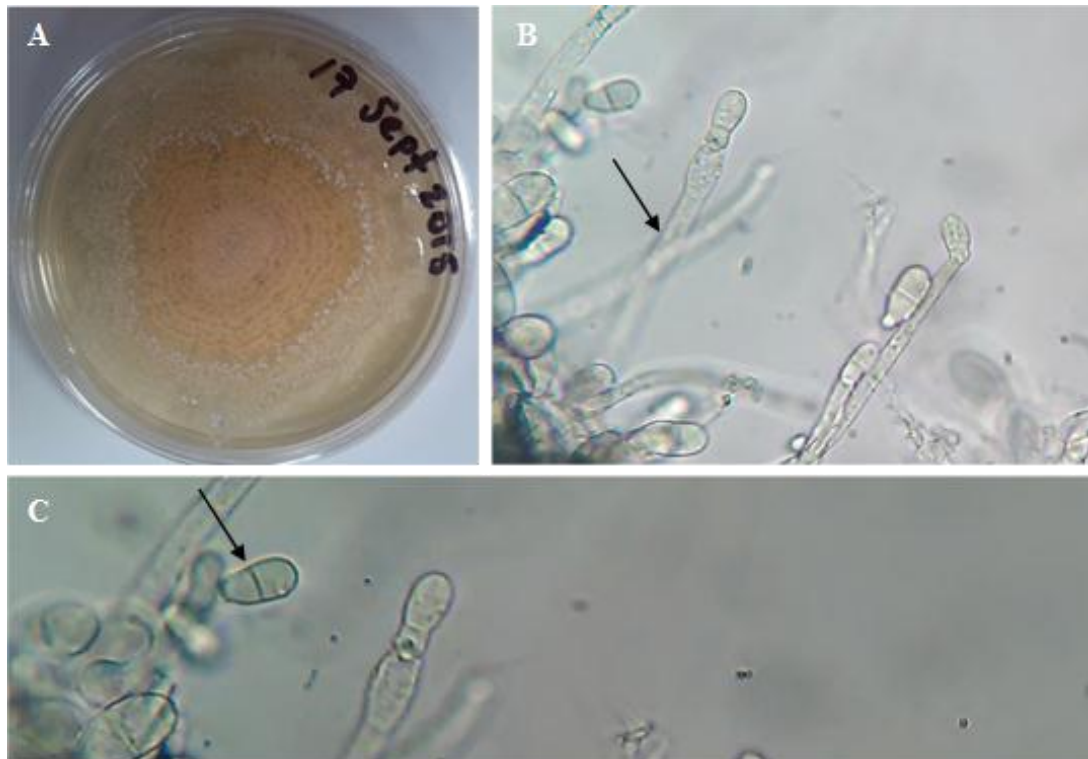


Figura 1. Morfología de *Trichothecium roseum*. Departamento de Parasitología Agrícola, UAAAN 2016.

En 1958, Tubaki amplió la clasificación de *Trichothecium* en la clase Hyphomycetes forma de hongos imperfectos, a Sordariomycetes. Una clasificación reciente ha puesto a *Trichothecium* bajo la división Ascomycota porque produce etapas de conidios que son similares a los hongos perfectos.

Clasificación Taxonómica de *Pestalotiopsis steyaertii*

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Subdivisión: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Orden: Xylariales

Familia: Amphisphaeriaceae

Género: *Pestalotiopsis*

Especie: *steyaertii*

Maharachchikumbura *et al.* (2013)

Caracterización Morfológica del Género *Pestalotiopsis*

Las colonias del hongo son de color blanco, en ocasiones presenta zonas grises pálidas o amarillentas en la parte aérea del micelio (Figura 2A). Produce acérvulos a partir de grupos de hifas en forma de disco de hasta 300um de diámetro (Figura 2B). Los conidios son estrechos en los extremos, rectos o curvos, con 5 células, ligeramente estrechados en los septos, con células terminales puntiagudas y hialinas (rara vez son ligeramente coloreadas), con dos o más apéndices apicales hialinos; las células intermedias son de color uniforme o variable, café pálido o casi negro; el apéndice basal es hialino, simple y rara vez se ramifica (Figura 2C).

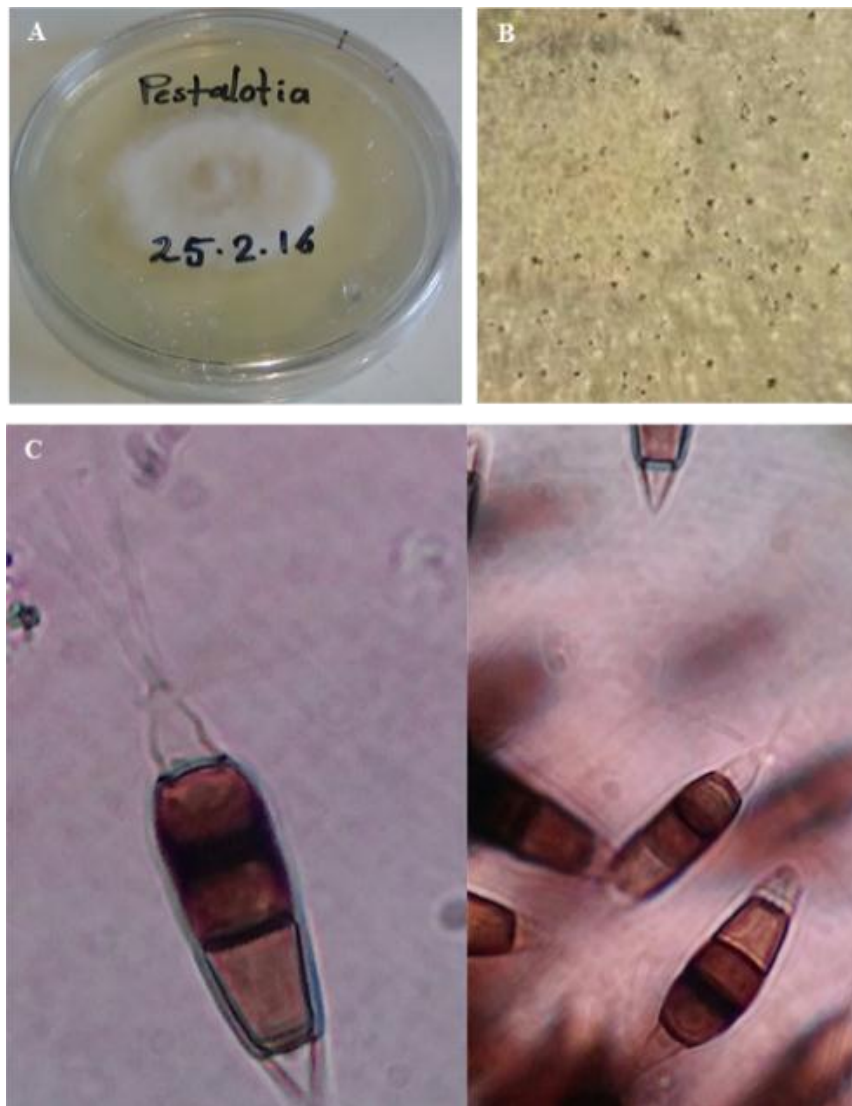


Figura 2. Morfología de *Pestalotiopsis steyaertii*. Departamento de Parasitología Agrícola, UAAAN 2016.

Clasificación Taxonómica de *Alternaria alternata*

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Subdivisión: Pezizomycotina

Clase: Dothideomycetes

Orden: Pleosporales

Familia: Pleosporineae

Género: *Alternaria*

Especie: *alternata*

Bonfim *et al.* (2016)

Caracterización Morfológica del Género *Alternaria*

Al caracterizar morfológicamente las especies de *Alternaria* hay que considerar varios criterios como son la producción de toxinas, planta hospedera, catenulación, septos y esporulación, entre otras (Andersen, 2001). Estos criterios están influenciados por factores externos incluyendo la humedad, luz, temperatura y nutrición. La esporulación de *Alternaria* ocurre en dos fases y ésta depende principalmente de la temperatura y luz. Los rayos ultravioleta (UV) median la formación del conidióforo y la oscuridad la producción de conidios (Rotem, 1988). No obstante, la producción de los conidios puede ser inhibida por los rayos ultravioletas.

El crecimiento del micelio es algodonoso y se interna en el medio de cultivo (Figura 3A). Produce hifas septadas y pigmentadas. Conidios en cadenas ramificadas, que se originan cerca del ápice del conidióforo primario. Cadenas de cinco a siete conidios elipsoides, obclavados u ovoides de 11-53 x 7-15 μm , con 2-6 septos transversales y 0-3 septos longitudinales (Figura 3B). Colonias oscuras verdes o grises, de 45 mm de diámetro, frecuentemente con varios anillos concéntricos. Los conidióforos poseen uno o más septos transversales con apariencia geniculada.

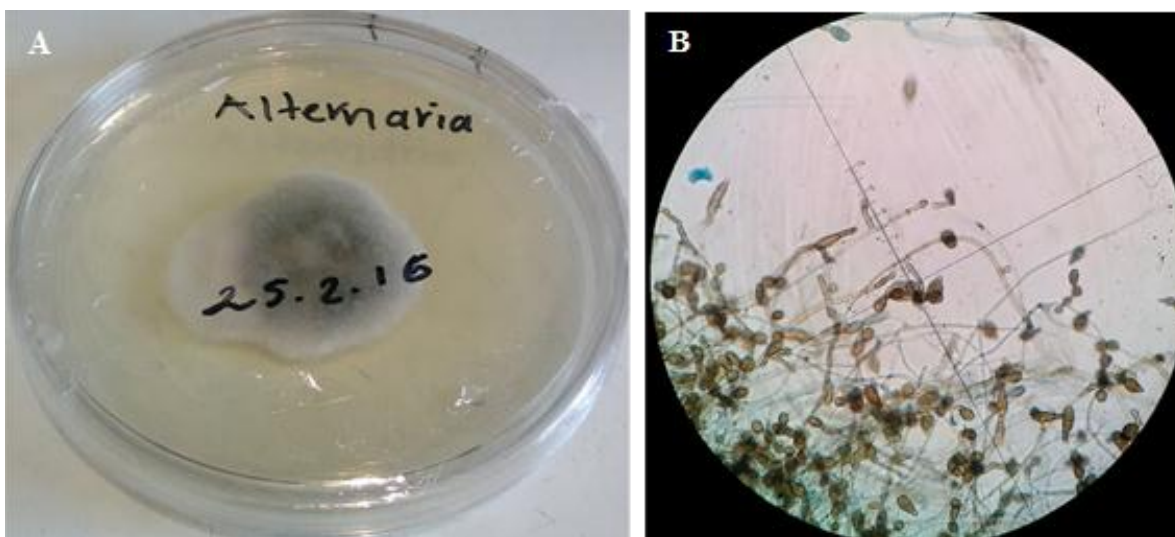


Figura 3. Morfología de *Alternaria alternata*. Departamento de Parasitología Agrícola, UAAAN 2016.

Clasificación Taxonómica de *Rhizoctonia solani*

Reino: Fungi

División: Basidiomycota

Subdivisión: Agaricomycotina

Clase: Agaricomycetes

Orden: Cantharellales

Familia: Ceratobasidiaceae

Género: *Rhizoctonia*

Especie: *solani*

Kareem y Hassan (2013)

Caracterización Morfológica del Género *Rhizoctonia*

R. solani fue descrito por Julios Kühn en 1858. Este hongo, perteneciente a los Basidiomycetos no produce esporas asexuales (conidios) y únicamente en condiciones especiales produce esporas sexuales (basidiosporas). En la naturaleza, *R. solani* se reproduce asexualmente y existe como micelio, el cual forma estructuras de resistencia o esclerocios de color negro y de forma redondeada, que son masas de hifas estrechamente entrelazadas con superficies duras y resistentes. El estado sexual se conoce como *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (Domsch, *et al.*, 1980; Ávila, *et al.*, 1994),

mencionan que el fitopatógeno *R. solani* puede atacar 250 especies de plantas. También indica, que de estas 250 especies que ataca el fitopatógeno, 52 corresponden a plantas asociadas al cultivo de papa (Chavarro, 2011).

R. solani ha sido objeto de múltiples estudios de tipo ecológico, patológico y de control biológico; sin embargo, su taxonomía todavía es confusa y controversial debido a que su morfología es sencilla y los rasgos fisiológicos y patológicos que se usan en su clasificación varían mucho, lo cual dificulta la delimitación taxonómica del grupo (González, 2002). Con base en número de núcleos en cada célula de las hifas jóvenes, la población de *Rhizoctonia* está dividida en tres grandes grupos: mono, bi y/o multinucleado. *R. solani* pertenece al grupo multinucleado y es una especie heterogénea compuesta de un gran número de poblaciones independientes (Nejad, *et al.*, 2007). Desde el punto de vista práctico, la clasificación de *R. solani* permitiría generar un marco previsible para el manejo de este hongo (González, 2002).

Produce hifas pigmentadas marrones a oscuras y septadas. Se ramifica cerca del septo central en la hifa vegetativa joven y forman un ángulo de 90°, forma septos a una distancia corta del punto donde se originan las hifas. Produce células multinucleadas como se muestra en la (Figura 4). No produce conidios (Fernández, 2011).

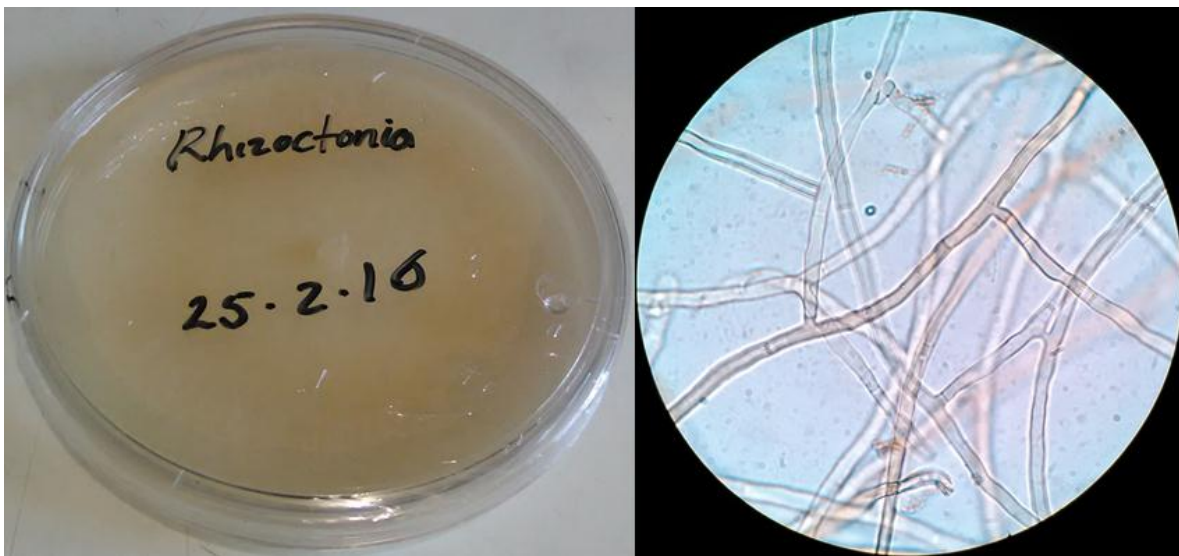


Figura 4. Morfología de *Rhizoctonia solani*. Departamento de Parasitología Agrícola, UAAAN 2016.

Manejo agronómico del cultivo de nogal *J. nigra* L.

Ecología

El nogal negro americano está siendo introducido en Europa ante la escasez en el mercado europeo de la madera de nogal del país (*Juglans regia*) de la que la demanda es muy superior a la oferta. *J. nigra* aporta una de las mejores maderas al mercado americano y en Europa alcanza precios semejantes al nogal del país, si bien el color de su madera es menos atractivo. Varias características la distinguen claramente del nogal europeo: su hoja, que presenta un número de foliolos que es de 15 a 23, dentados y más puntiagudos, el terminal menor, a veces ausente, y la corteza del tronco que se fisura a los dos o tres años (Molina, 2010).

La trascendencia silvícola de *J. nigra* es que esta especie está presente en casi toda la mitad oriental de EE.UU. que se caracteriza por lluvias de verano o uniformes a lo largo del año. En ésta extensa área americana se dan fuertes contrastes, como ocurre con el período vegetativo, que va de 140 a 280 días, las precipitaciones de 640 a 1,780 mm y la temperatura media de 7° a 19° se consideran como valores óptimos para la especie; 900 mm de precipitación y 13 °C de temperatura media anual (Molina, 2010).

Esta especie de nogal es tolerante a la sombra, aunque este catalogada como especie típica de luz. Es resistente al frío invernal; el brote primaveral del nogal americano es muy temprano, lo que lo hace más sensible a las heladas tardías. Este problema se manifiesta cuando se planta en los valles lo que obliga a realizar una poda de formación para evitar que se deprecie la parte maderable del árbol (Molina, 2010).

El nogal americano soporta inundaciones de corta duración y también humedad relativa alta del aire. Soporta acidez del suelo, que puede bajar hasta un pH de 5. Para lograr un buen crecimiento, esta especie necesita suelos ricos, profundos, bien drenados, abastecidos de agua, por ejemplo con un nivel freático a 1 o 2 metros, con abundante materia orgánica y sales minerales. Todas éstas son condiciones que se dan en los suelos aluviales (Molina, 2010).

En general *J. nigra* tiene buen crecimiento, buena verticalidad del tronco y ramas y tiene poca exigencia de nutrientes (Molina, 2010).

Otra característica importante de esta especie es que tiene una alta resistencia a las enfermedades por hongos de raíz como *Armillaria* y *Phytophthora*, lo que les permite

crecer en ambientes más forestales con mayores espesuras iniciales, pues se pueden hacer aclareos para evitar ataque de hongos. Se puede comenzar con densidades de 400 plantas/ha (5 m x 5 m) a 800 pies/ha (3.5 m x 3.5 m) para terminar en la fase adulta con 70 a 100 pies/ha. Para las repoblaciones, la planta empleada es de 1 año de edad. El hongo *Gnomonia leptostyla* también llamada *Gnomonia juglandis* (Mont, 1849), antracnosis del nogal, ataca hojas y fruto en primavera lo cual hace que las hojas se caigan y disminuya su crecimiento, además de destruir y necrosar el fruto en las primeras fases su formación. Esta enfermedad se trata con caldo bordelés, también se puede tratar eficazmente con zineb (Ditiocarbamato de zinc). El caldo bordelés; no se debe emplear cuando hace frío por el riesgo de quemadura foliar (Molina, 2010).

Tratamientos silvícolas

El nogal es una de las especies forestales más exigentes en cuanto a labores culturales, con un costo más elevado del normal por la intensidad de las intervenciones silvícolas en los primeros años. Este riesgo y el elevado costo se compensan con una rentabilidad elevada dado el valor final de los productos obtenidos (Molina, 2010).

La maleza afecta considerablemente al cultivo de nogal. En los primeros dos o tres años es suficiente con eliminar la vegetación que compite con la planta, en un radio de 0.6 a 1 m. Se pueden utilizar herbicidas selectivos a base del ingrediente activo Dalapón (Basfapon, Chapeador, Conapon, Dalacoop, Dowpon, Marmapon, Novapon, Novaron) con modo de acción sistémico. El glifosato no es selectivo por lo que se debe aplicar con mucho cuidado; además, el nogal es bastante sensible si entra en contacto con este producto. Otro sistema es cubrir el suelo con plástico negro o malla de vivero para evitar el nacimiento de hierbas (Molina, 2010).

Los cultivos intercalados, benefician el crecimiento del árbol, por los fertilizantes o riegos que se les aplica. Estos cultivos, aparte de proporcionarle una producción complementaria, reducen los costos por el control de la vegetación competitiva y la fertilización (Molina, 2010).

La poda

Es necesario prestar mucha atención a la poda para obtener troncos de buena calidad. Se debe comenzar por la poda de formación desde el primer año y con frecuencia realizarla anualmente para asegurar la formación de troncos rectilíneos y no bifurcados, en especial en la parte basal del tronco en la que se proyecta seguir con las podas normales para maximizar la obtención de madera de calidad (Molina, 2010).

Una vez efectuadas las podas de formación, es preciso efectuar las podas normales, mediante las que se tratará de evitar que la madera tenga nudos en las dos primeras trozas (hasta 6 metros) (Molina, 2010).

Al realizar las podas se debe procurar mantener una copa uniforme y bien desarrollada, fundamental para que el tronco cierre bien la herida de la poda. Además debe hacerse antes de que el diámetro del tronco en la inserción de la rama pase de 10 cm (Molina, 2010).

La época recomendable para la poda del nogal es de mediados de junio a mediados de julio, aunque también se puede hacer en la primavera antes de brotar lo que ayudara a mejora la cicatrización de las heridas. Es necesario que la planta sea vigorosa por ello es importante fertilizarla. La época más favorable es antes de que broten las yemas (Molina, 2010).

Producción

La producción por árbol de una o dos trozas de gran calidad para chapa plana o ebanistería, con diámetro normal (medido a 1,30 m de altura) de 70 cm de diámetro y una longitud de 3.5 m, lo que representa 1 m³ de madera de primera calidad, puede ser un buen objetivo. El tiempo requerido para lograrlo dependerá del marco de plantación establecido y de la calidad de la estación forestal. Por ejemplo, con un marco de 12 m y en un suelo de buena calidad, el diámetro normal puede aumentar a un ritmo de 1cm/año, lo que exigiría un tiempo de 70 años para alcanzar aquellas dimensiones. Representaría un crecimiento por ha y año en madera de chapa de 1 m³. En otras circunstancias para conseguir esta dimensión pueden necesitarse hasta 100 años en suelos pobres o de 40 años en suelos muy ricos (Molina, 2010).

El precio de la madera dependerá de las dimensiones. Para chapa, la longitud óptima de tronco sin nudos va de 2.5 a 4.2 m según esté equipada la fábrica que las reciba. Para ebanistería de 2.5 a 3.5 m. Con menos de 2 m baja mucho el precio unitario (Molina, 2010).

El diámetro mínimo de la madera para acerrarla es de 30 cm. El precio aumenta con el diámetro, sobre todo a partir de 50 cm. Las trozas con diámetro de 70 cm y longitud de 4 m son muy buenas ya que alcanzan precios que pueden llegar a 62, 185.00 pesos/m³ en pie. Sin embargo, el precio de 1 m³ de rollo en pie sin defectos, apta para tablas destinadas a ebanistería o para hacer chapa, sin defectos, puede oscilar entre 6, 218.00 pesos y 15, 546.00 pesos/m³.

Los nogales pueden emplearse también para la producción mixta de madera y fruto. En este caso hay que considerar que la producción del fruto (nuez) depende principalmente de una buena fertilización (Molina, 2010).

Rendimiento económico

El rendimiento económico de una plantación de nogal negro americano depende de muchos factores. El productor antes de tomar una decisión, debe considerar los siguientes componentes de gastos.

- En la preparación del terreno: subsuelo, laboreo profundo, encalado para adecuar el pH, empleo de estiércol si se dispone de él, fertilizante de acuerdo con el análisis del suelo, el costo se eleve a 26, 946.00 pesos/ha.
- 100 plantas de dos años de la máxima calidad a 62.00 pesos/unidad, representarían 6, 218.00 pesos. En una plantación el recubrimiento del suelo con lámina de plástico y protección contra la fauna, el costo es de 10, 364.00 pesos/ha.
- Las labores culturales como: aplicación de herbicidas, fertilización nitrogenada, etc., durante unos 10 años a 3, 109 pesos/ha/año el costo se elevaría a 31, 092.00 pesos.
- En podas de formación y de calidad del fuste a razón de dos jornales ha/año durante 10 años, representaría 20, 728.00 pesos.

Estas cifras alcanzan un costo total de 86, 022 pesos/ha.

En las circunstancias descritas anteriormente la plantación de *J. nigra* es una alternativa viable y de buena inversión, que requerirá atenciones intensivas en los primeros diez años, pero después se compensa con el alto valor que alcanzan sus productos. El factor más importantes para el éxito del cultivo es la elección de un sitio de buena calidad y la aplicación del buen manejo cultural que requiere (Molina, 2010).

Manejo integrado de hongos fitopatógenos

Las enfermedades constituyen uno de los elementos limitantes dentro de la producción de cualquier cultivo, de aquí que su control, es un factor que se debe tener presente desde la siembra o trasplante hasta la cosecha (Schumann, 1991; Manners, 1993). Muchas veces al no tener un adecuado conocimiento de los posibles microorganismos y patologías asociadas a las distintas especies, y el no saber distinguir claramente la sintomatología que producen distintos hongos en las plantas, nos lleva a aplicar medidas de control inapropiadas. Dentro de un programa de manejo integrado de enfermedades, la clave es el diagnóstico correcto del agente causal del problema (Agrios, 1996).

Durante las últimas décadas, el control de enfermedades ha ido cambiando en cuanto a la forma de enfocarlo, tomando gran importancia el concepto de manejo integrado. Este incluye prácticas culturales con la finalidad de reducir el inóculo o evitar condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad, uso de controladores biológicos y el empleo de medidas de control físico y químico. En el mercado existen una serie de productos químicos para el control de distintas enfermedades, es importante conocer bien el organismo y enfermedad que está afectando el cultivo, antes de decidir que tipo de producto se va a aplicar, ya que la mayoría de ellos presentan una acción específica sólo hacia ciertos patógenos. De igual forma se debe tener presente que algunos sólo tienen acción preventiva, curativa y erradicante. Otro factor importante que se debe considerar es que el producto a aplicar se encuentre registrado en el país para ser utilizado en el cultivo en el que se va a emplear. Por otra parte, si el producto obtenido se destinará a la exportación, el fungicida debe encontrarse registrado en el mercado de destino (Agrios, 1996; Lehmann-Danzinger, 2004).

Alternaria alternata; Trichothecium roseum y Pestalotiopsis steyaertii

Fuentes de inóculo. La fuente de inóculo más importante son los restos de cultivo de la temporada anterior. En estas condiciones se facilita el incremento del inóculo del patógeno (Apablaza, 2000) debido a que éste inverna en resto de plantas infectadas, en el suelo y en semillas (Agrios, 1996; Apablaza, 2000). Los conidios y esporas de estos patógenos son liberados cuando hay presencia de humedad. Estos se diseminan, generalmente, a través de frutos u hojas que estén en contacto con la superficie del suelo; en forma mecánica a través

de las herramientas utilizadas por los trabajadores; por medio del salpicado de la lluvia; por el viento o por medio de algún insecto u otro agente vector. También puede permanecer en malezas o en sus restos, ya que este patógeno tiene una amplia gama de plantas susceptibles en donde puede sobrevivir (Agrios, 1996).

El manejo de las enfermedades se obtiene integrando eficientemente todas las posibles estrategias y medidas de control disponibles. Por ello, el manejo integrado debe estar orientado a reducir las fuentes de inóculo para disminuir o evitar los daños provocados por estos hongos, dándole prioridad a los métodos más seguros para la salud humana y el medio ambiente y que permitan la producción económica de productos de calidad (Estay y Bruna, 2002): el manejo integrado utiliza distintos métodos de control como son: cultural, biológico, legal, físico y químico (Agrios, 1996).

Rhizoctonia solani

R. solani causa varios tipos de enfermedades en una gran cantidad de plantas, siendo las más importantes el “damping off” y el cancro o pudrición de los tallos (Pizano, 2000). Este patógeno ataca gran variedad de cultivos, convirtiéndose en un gran problema si no se detecta y se maneja a tiempo (Pérez, 2003). Fuentes de inóculo. El hongo sobrevive en forma de micelio o esclerocios bajo condiciones adversas Pizano, 2000). En estas condiciones se facilita el incremento del inóculo del patógeno (Apablaza, 2000) debido a que éste inverna en restos de plantas infectadas, en el suelo y semillas (Agrios, 1996; Apablaza, 2000).

R. solani es de especial importancia en plántulas, aunque puede presentarse en plantas adultas, pudiendo causar pérdidas económicas considerables. El hongo tiene requerimientos bastante específicos de humedad y temperatura, siendo óptimos 15° - 18°C y una alta humedad del suelo. Puede ser diseminado en material de propagación, con el agua de riego, herramientas utilizadas por los trabajadores y labores culturales, semillas, insectos (Pizano, 2000).

También puede permanecer en malezas o en sus restos, ya que este patógeno tiene una amplia gama de plantas susceptibles en donde puede sobrevivir. El control de las enfermedades se obtiene integrando eficientemente todas las posibles estrategias y medidas de control disponibles. Por esto, el manejo integrado debe estar orientado a reducir las

fuentes de inóculo para disminuir o evitar los daños provocados por este patógeno, dándole prioridad a los métodos que, siendo los más seguros para la salud humana y el medio ambiente, permiten la producción económica de productos de calidad (Estay y Bruna, 2002). El manejo integrado utiliza distintos métodos de control como son: cultural, biológico, legal, físico y químico (Agrios, 1996).

Control cultural

Esta medida trata de evitar el contacto entre el patógeno y las plantas, así como también eliminar o reducir la cantidad de inóculo del patógeno en una planta o área de cultivo (Apablaza, 2000). Para cumplir este objetivo es necesario implementar rotación del cultivo, controlar maleza ya que estas fungen como hospederos alternos del patógeno, así como también, la destrucción de frutos infectados y la eliminación de plantas enfermas con la intención de disminuir las fuentes de inóculo para la temporada siguiente. Por último, es necesario implementar medidas que no causen daños a la planta, para impedir que en ésta se produzcan heridas que faciliten la entrada y penetración del patógeno (Apablaza, 2000).

Control biológico

Existen muchos microorganismos que han sido considerados como antagonistas de algunos patógenos, constituyendo una alternativa a los productos químicos. La lucha ejercida por ellos puede ser por el contacto físico de éste con el agente causal de la enfermedad o bien por la liberación por parte del biocontrolador de sustancias que tienen un efecto negativo sobre el patógeno. Otra forma de actuar es a través de la competencia por espacio y nutrientes (Vega, 1999; Jarvis, 2001).

Los biocontroladores son selectivos y no dañan los tejidos de la planta, siendo una alternativa ecológica conveniente, sin problemas de contaminación y de residuos químicos (Loison, 2003). Así, se han transformado en una herramienta de gran importancia dentro del manejo integrado de enfermedades (Bruna, 1991). Dentro de la lista de microorganismos con actividad antagonista se pueden mencionar hongos del género *Trichoderma* sp. y algunas de las especies de las bacterias *Bacillus* y *Pseudomonas* (Campbell, 1989).

Trichoderma es un habitante común del suelo, capaz de controlar un gran número de patógenos tales como *Armillaria* spp, *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani* (Kareem y Hassan, 2013), *Sclerotium rolfsii* (Poornima, *et al.*, 2015), *Pythium* spp., *Botrytis cinérea* (Ivanovic, 2016), *Fusarium* spp., *Verticillium* spp. entre otros (Sivan, *et al.*, 1987; de Meyer, *et al.*, 1998). Su forma de acción es por competencia y predación, enrollando su micelio alrededor del cuerpo del patógeno (hifas), mismo que es penetrado y finalmente desintegrado. También algunas especies y razas de este hongo son capaces de producir antibióticos especialmente a pH bajos y generar una respuesta de resistencia sistémica de la planta frente al patógeno (de Meyer, *et al.*, 1998).

Por otra parte, *Bacillus subtilis* (Cohn, 1872) se ha mostrado que actúa como un eficiente controlador de hongos como *Fusarium* y *Rhizoctonia solani* (Kareem y Hassan, 2013) en cultivos como tomate, sandía y papa (Brada, *et al.*, 1995). Cuando se aplica al suelo o en las semillas, no se debe exclusivamente a su antagonismo con los patógenos y la liberación de compuestos con propiedades antifúngicas, sino que también a la producción de sustancias promotoras del crecimiento (Fernández y Vega, 2001).

Las rizobacterias del género *Pseudomonas*, principalmente las especies *P. fluorescens* (Flügge, 1886) y *P. putida* (Trevisan, 1889), también han resultado ser eficientes en el control de enfermedades causadas por agentes fitopatógenos en muchos cultivos, cuando se aplican a las semillas y raíces de plantas (Agrios, 1996).

Control químico

Actualmente existe un gran cambio en el tipo de exigencias de los productos fitosanitarios, priorizando aspectos como toxicología, impacto ambiental y selectividad. En un principio, los productos poseían una estructura química simple y actividad biológica de amplio espectro; mientras que actualmente los ingredientes activos son de estructuras químicas complejas, teniendo una actividad biológica específica (Nitsche, 1998). Estrobilurinas (QoI). Las estrobilurinas constituyen un grupo químico, derivado del ácido β - metoxiacrílico. La estrobilurina es un metabolito fúngico secundario aislado del hongo *Strobilurus tenacellus* (Grum, *et al.*, 2013). Actúan inhibiendo la respiración mitocondrial por el bloqueo de la transferencia de electrones frenando la síntesis del ATP. Es un fuerte inhibidor de la germinación de esporas y, además, impide el crecimiento de micelio

presentando una notable actividad antiesporulante. El espectro de acción de las estrobilurinas incluye hongos Ascomicetos, Basidiomicetos, Deuteromicetos y Oomicetos (Latorre, 1989). Azoxystrobin. Es un ingrediente activo perteneciente al grupo químicos de las Estrobilurinas. Es un fungicida sistémico y de contacto, de origen natural, con amplio espectro de control. Este está especialmente indicado para el control de la alternariosis. Presenta actividad preventiva, curativa y antiesporulante, dependiendo de la enfermedad. Actúa inhibiendo la respiración mitocondrial en los hongos. Se mueve vía xilema (movimiento acropétalo) y tiene sistemicidad y movimiento traslaminar, protegiendo completamente las hojas y los brotes nuevos. Su efecto sistémico y de contacto y su larga residualidad, aseguran la protección de las hojas y su redistribución dentro de la planta, retardando su senescencia y manteniéndolas verdes por más tiempo. El fabricante recomienda usar una dosis de 30 g/100 L de agua. Para un óptimo control se aconseja aplicar en cuanto aparezcan los primeros síntomas, repitiendo cada 10 a 15 días, con un máximo de tres aplicaciones por temporada. Azoxystrobin es compatible con productos fitosanitarios de uso corriente. El tiempo de reingreso es 1 hora después de efectuada la aplicación o bien hasta que se haya secado completamente. La información ecotoxicológica indicada por el fabricante señala que no es dañino para abejas, aves y organismos benéficos a las dosis recomendadas. Muestra baja persistencia en el medio ambiente.

Fungicidas inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (IBE). Estos fungicidas pertenecen a un grupo de compuestos nitrogenados, heterocíclicos, de diversa naturaleza química, alguno de los cuales tienen una alta potencialidad fungicida. Los IBE interfieren en la biosíntesis del ergosterol el cual es un constituyente de las membranas celulares, lo que provoca pérdida de la funcionalidad de éstas estructuras (Latorre, 1991). Se consideran fungicidas específicos, debido a que interfieren en uno o dos sitios dentro del proceso de biosíntesis de este compuesto. Lo que hacen, es bloquear los procesos de desmetilización de los carbonos C₄ y C₁₄. Los fungicidas inhibidores de la biosíntesis del ergosterol poseen un espectro de acción sobre hongos Ascomicetos, Basidiomicetos y Deuteromicetos (Latorre, 1989).

Pyrimethanil. Fungicidas que se caracterizan por inhibir la biosíntesis de aminoácidos como la metionina y la secreción de enzimas pectolíticas. Inhiben las secreciones de enzimas del hongo, destruyendo la célula y bloqueando la asimilación de nutrientes inhibiendo, por lo tanto, el tubo germinativo y el crecimiento celular. Esta

inhibición de actividad enzimática ha sido puesta a prueba sobre las polygalacturonasas, celulasas y proteinasas, interfiriendo los procesos de penetración y desarrollo de micelio del hongo dentro de los tejidos de la planta (Moraga, 2003).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Se recolectaron muestras de ramas de *J. nigra* en dos huertos de dos huertos localizados en los municipios de Arteaga (Latitud 25°23'31.82"N Longitud 100°39'42.15"O 2180 m) y Saltillo (Latitud 25°21'20.45"N Longitud 101° 1'51.61"O 1779 m) en el estado de Coahuila, México. Los árboles fueron seleccionados por mostrar síntomas de muerte descendente (Figura 5A). Las ramas se tomaron de 16 árboles de 15 años de edad en ambas huertas en los meses de Abril y Agosto de 2015, se depositaron en bolsas de plástico y se trasladaron al Laboratorio de Postgrado de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN).

Aislamiento de hongos

Para el aislamiento de hongos se siguieron procedimientos previamente descritos (Alvidrez-Villarreal, 2012; Fisher, *et al.*, 2013) con algunas modificaciones. En laboratorio se observó directamente el material recolectado y se extrajeron canchales del tejido interno, los cuales se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3% por inmersión durante tres minutos, después se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, colocándolos en papel estroza para su secado a temperatura ambiente en la cámara de transferencia de flujo laminar. Los pequeños trozos de los canchales se colocaron en placas con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), colocando cinco trozos por placa. El material se incubó a temperatura de 28 ± 1 °C y a partir de las 24 horas se transfirieron crecimientos fúngicos a nuevas placas con PDA. A partir de las colonias obtenidas se desarrollaron cepas monospóricas o a partir de puntas de hifa. Las cepas se mantuvieron en activo en PDA y fueron conservadas en agua.

Caracterización Morfológica de hongos aislados

A partir de las cepas obtenidas de lesiones con canchales fue posible tener cuatro morfotipos de cepas. Una cepa de cada morfotipo fue seleccionada y utilizada en análisis posteriores. La identificación a nivel de género se realizó a partir de colonias de seis días de edad crecidas en PDA utilizando las claves para hongos imperfectos (Barnett y Hunter, 2006).

En este caso, la caracterización se basó en características de estructuras reproductivas y del micelio (Alvidrez-Villarreal, 2012).

Identificación Molecular de hongos aislados

Cepas de los hongos identificados morfológicamente como *Trichothecium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Alternaria* sp y *Rhizoctonia* sp, aisladas de canchales en ramas de *J. nigra*, se sembraron en PDA y se mantuvieron a una temperatura de 28 ± 1 °C, durante 72 h. La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Ahrens y Seemüller (1992) a partir de micelio de cada hongo.

La extracción de ADN se realizó en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico de Enfermedades Cuarentenarias de Plantas Cultivadas en México, Campo Experimental General Terán del INIFAP, en Nuevo León, utilizando la metodología propuesta por Ahrens y Seemüller (1992). La amplificación de la región espaciadora transcrita interna 1 a 2 (ITS1 a ITS2) de los genes ribosomales (ADNr) se realizó mediante el uso de los iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White, *et al.*, 1990). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: amortiguador 1X, MgCl₂ 1.5 mM (5, µ L), dNTP's 1 µ L, iniciadores ITS1 y ITS4 2 µ L de cada uno, Taq polimerasa (® biogénico) 0.4 µ L y muestra de ADN 1U (2 µ L). El programa de amplificación consistió de 94 °C por 5 min de desnaturalización inicial, 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 60°C por 45 seg y 72°C por 130 min, 72 °C por 8 min de extensión final. La calidad y cantidad del producto de PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, el cual fue teñido con bromuro de etidio y visualizado por medio de luz ultravioleta. Los productos fueron secuenciados en ambos sentidos en un secuenciador Applied Biosystem® en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), San Luis Potosí, México. Las secuencias se revisaron y analizaron con del programa BioEdit Sequence Alignment Editor para obtener una secuencia consenso (Hall, 1999).

Las secuencias consenso de los ITS obtenidas fueron sometidas a un análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Fue

posible determinar la identidad al nivel de especie de las cepas de *Trichothecium* y *Alternaria* mediante el análisis BLAST, y el grupo de especies al que pertenece la cepa de *Rhizoctonia* mediante características morfológicas. Debido a que la cepa de *Pestalotiopsis* mostró relación con seis especies del género, fue necesario realizar un análisis filogenético para determinar la identidad de la cepa. Siete secuencias de seis especies de *Pestalotiopsis* y la secuencia de la cepa aislada de *J. nigra* se alinearon usando ClustalW en la versión 5.2 del programa MEGA (Tamura, *et al.*, 2011). Con el alineamiento resultante se realizó un análisis filogenético con el método Neighbor-Joining basado en el modelo de 2 parámetros de Kimura y se realizó la prueba Bootstrap con 1000 repeticiones (Figura 6).

Pruebas de patogenicidad

Las Cepas de *Trichothecium*, *Pestalotiopsis* y *Alternaria* fueron transferidas a PDA e incubadas a una temperatura de 28 ± 1 °C, con un fotoperiodo de 12:12, hasta la producción de esporas. Una vez que éstas se formaron se elaboró una suspensión para su cuantificación en una cámara de Neubauer, bajo el microscopio compuesto. Finalmente se obtuvo una concentración de 1×10^8 mL⁻¹ para ser utilizada como inóculo en las pruebas de patogenicidad. Para la cepa de *Rhizoctonia*, ésta se transfirió a PDA y se incubó por tres días para ser utilizada como inóculo. Plántulas de *J. nigra* de cuatro meses de edad fueron desarrolladas a partir de semilla sembrada en suelo estéril contenido en vasos de unícel de medio litro.

Las pruebas de patogenicidad se realizaron en un invernadero de la UAAAN, a una temperatura de 24 ± 2 °C. Cada cepa fue inoculada a cinco plántulas sanas de cuatro meses de edad, a las que previamente se les realizó una herida en el tallo de 3 mm de longitud con una navaja para bisturí estéril. Sobre la herida se inoculó 1 ml de la suspensión de 1×10^8 esporas de *Trichothecium*, *Pestalotiopsis* y *Alternaria*, mientras que para *Rhizoctonia solani* el inóculo consistió de un explante de 5 mm de diámetro colocado directamente sobre la herida en el tallo. Las plántulas del testigo consistieron en la inoculación de agua destilada estéril sobre la herida. Una vez realizada la inoculación, la herida se cubrió con plástico estéril con el propósito de evitar el secado rápido del inóculo y el marchitamiento rápido de las plántulas, permitiendo caracterizar los síntomas en respuesta a los hongos

inoculados. El plástico se retiró después de una semana. Los tratamientos fueron distribuidos bajo un diseño completamente al azar.

Cada siete días durante los 45 días después de la inoculación (ddi) las plántulas fueron observadas y se describieron los síntomas que mostraron. La incidencia se registró como el porcentaje de plantas (considerando la planta establecida en cada repetición) con algún tipo de síntoma en relación al testigo. La severidad se determinó con base a una escala visual de cinco valores (1= 0-20%; 2= 21-30%; 3=31-50%; 4=51-80% y 5= más del 80% del tallo con lesión) y los datos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Adicionalmente se determinó la altura de la planta cada siete días y solamente se utilizaron los datos obtenidos a los 28 ddi para su análisis, debido a que en la evaluación de los 35 ddi las plantas de algunos tratamientos inoculados con hongos ya se encontraban muertas. Todas las plantas fueron extraídas a los 45 días y se les determinó la longitud, peso fresco y peso seco de raíz. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza completamente al azar y las comparaciones de medias se realizaron mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Los análisis se realizaron con el paquete estadístico Rdata, versión 3.2.3 (Ihaka, 1996).

A los 45 días de establecida la prueba de patogenicidad, las plántulas inoculadas con los hongos como las del testigo, fueron utilizadas para el aislamiento de hongos a partir de tejido alrededor de las heridas inoculadas, como se describió previamente. Las cepas aisladas fueron comparadas microscópicamente con las inoculadas en cada tratamiento para confirmar los postulados de Koch (Alvidrez, 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntomas de la enfermedad en plantaciones de *J. nigra*

En las dos plantaciones de *J. nigra* de 15 años de edad se observaron árboles con síntomas característicos de muerte descendente (Figura 5A). A partir de ramas muertas y verdes se detectaron lesiones sobre la superficie de 0.5 a 1.5 cm de longitud por 1.0 cm de ancho, con una tonalidad café oscuro en el borde y centro (Figura 5B). Al retirar la epidermis de las lesiones en ramas y quedar expuesto el tejido interno, se observaron canchros con una tonalidad café oscuro y de apariencia rugosa (Figura 5C).

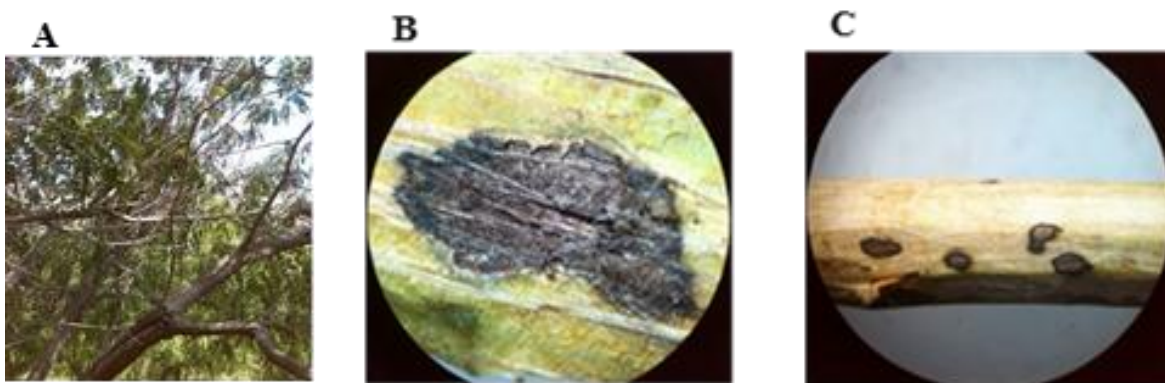


Figura 5. Síntomas de muerte descendente en *Juglans nigra*. A) árbol con muerte parcial de ramas; B) vista de lesión superficial en rama verde; C) canchros internos. Departamento de Parasitología Agrícola, UAAAN 2016.

En *J. nigra* se ha reportado previamente la ocurrencia de la enfermedad conocida como miles de canchros, causada por el hongo *G. mórbida*, asociada al escarabajo de los brotes *Pityophthorus juglandis* (Kolarik, *et al.*, 2011). Sin embargo, en esta investigación se considera que los canchros observados en ramas no se encuentran asociados a algún tipo de escarabajo debido a la ausencia de galerías que lo sugieran. Por lo anterior, es sugestivo que los canchros observados son causados por el daño directo de alguno o varios fitopatógenos.

Aislamiento e identificación de hongos

De los hongos aislados a partir de fragmentos de canchros fue posible observar sólo cuatro morfotipos. Una cepa monospórica o de punta de hifa de cada morfotipo se utilizó para la

identificación y demás propósitos de esta investigación. Las cepas fueron identificadas como miembros de los géneros *Trichothecium*, *Pestalotia*, *Alternaria* y *Rhizoctonia* con base a las claves de (Barnett y Hunter 2006). La amplificación de la región ITS1 a ITS2 mediante PCR convencional, permitió obtener productos de 600, 590, 590 y 650 pb para cada una de las cepas anteriores, respectivamente. Mediante el análisis BLAST las secuencias de estos hongos mostraron los más elevados porcentajes de cobertura y similitud con especies de los género identificados (Cuadro 1), excepto para el género *Trichothecium* que también mostró estar relacionado con *Passalora fulva* (Yan, *et al.*, 2008) (sinónimo: *Cladosporium fulvum* (Tian, 2008); accesiones EF432764 y AB369502), un hongo que produce hifas oscuras con conidios subhialinos u oscuros no relacionado morfológicamente a este género. Aunque la cepa de *Rhizoctonia* aislada de canchales de nogal negro en esta investigación presentó 2 a 3 núcleos por célula, ésta mostró los mayores porcentajes de cobertura y similitud con secuencias de *R. solani* (una especie multinucleada con más de tres núcleos por célula) de tomate de Iraq (Cuadro 1). Seguramente las secuencias de *R. solani* y de *P. fulva* depositadas en el GenBank están etiquetadas equivocadamente, como se ha hecho referencia a otras secuencias (Du, *et al.*, 2005; Crouch, *et al.*, 2009); Federhen, *et al.*, 2016). Con base al análisis BLAST la identidad de las cepas de *Trichothecium* y *Alternaria* corresponden a las especies *T. roseum* y *A. alternata*, respectivamente.

Debido a que la secuencia de la cepa de *Pestalotiopsis* aislada de nogal negro mostró mayor cobertura e identidad con secuencias de seis especies del género (Cuadro 1), se realizó un análisis filogenético con éstas y se utilizó como grupo externo la secuencia de *Eudarluca caricis* (Figura 6). El análisis demostró que la cepa de *Pestalotiopsis* se encuentra más relacionada a *Pestalotiopsis steyaertii* (*Pestalotia* según Barnett y Hunter, 2006; *Pestalotiopsis* según Steyaert, 1949 con base a número de células en conidio; *Neopestalotiopsis steyaertii* según Maharachchikumbura, *et al.*, 2014 con base a análisis de secuencias). La cepa de *Rhizoctonia* se identificó como miembro de las especies binucleadas del género *Rhizoctonia* con base al número de núcleos por célula (Sneh, *et al.*, 1991).

Cuadro 1. Resultados del análisis BLAST para las secuencias de la región ITS1 a ITS2 de las cepas *Trichothecium*, *Pestalotiopsis*, *Alternaria* y *Rhizoctonia* aisladas de *Juglans nigra*. Departamento de Parasitología Agrícola, UAAAN 2016.

Cepa aislada de	Especie	Accesión en	Cobertura	Identidad	Procedencia	Hospedero
<i>Juglans nigra</i>		Banco de Genes	(%)	(%)		
<i>Trichothecium</i> sp.						
	<i>Trichothecium roseum</i>	KT359589	100%	99%	Israel 2016	<i>Persea americana</i>
	<i>Trichothecium roseum</i>	KT359588	100%	99%	Israel 2016	<i>Persea americana</i>
	<i>Trichothecium roseum</i>	KT359587	100%	99%	Israel 2016	<i>Persea americana</i>
	<i>Trichothecium roseum</i>	KT359586	100%	99%	Israel 2016	<i>Persea americana</i>
	<i>Trichothecium roseum</i>	KP317992	100%	99%	China 2015	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>Passalora fulva</i>	EF432764	100%	99%	China 2008	<i>Solanum lycopersicum</i>
	<i>Passalora fulva</i>	AB369502	100%	99%	China 2008	Suelo
<i>Pestalotiopsis</i> sp.						
	<i>Pestalotiopsis steyaertii</i>	KF582796	92%	98%	Tailandia 2013	<i>Eucalyptus viminalis</i>
	<i>Pseudopestalotiopsis kubaensis</i>	KT006749		94%		<i>Mangifera indica</i>
			99%		Malasia 2015	
	<i>Pestalotiopsis fici</i>	AB482200	100%	94%	Japón 2010	<i>Bischofia javanica</i>
	<i>Pseudopestalotiopsis theae</i>	KM510412	100%	94%	Malasia 2015	<i>Mangifera indica</i>
	<i>Pestalotiopsis palmarum</i>	KF481949	100%	94%	India 2013	<i>Areca catechu</i>
	<i>Pestalotiopsis theae</i>	DQ812913	100%	94%	China 2006	<i>Camellia sinensis</i>
	<i>Pestalotiopsis aeruginea</i>	KM111479	100%	94%	Malasia 2014	<i>Musa paradisiaca</i>
<i>Alternaria</i> sp.						
	<i>Alternaria alternata</i>	KT777709	100%	100%	Suiza 2016	<i>Mollinedia schottiana</i>
	<i>Alternaria alternata</i>	KU512288	100%	100%	Italia 2016	<i>Campanula medium</i>
	<i>Alternaria alternata</i>	KU866390	100%	100%	Ecuador 2016	<i>Prunus persica</i>
	<i>Alternaria alternata</i>	KT898773	100%	100%	Portugal 2016	Papel pergamino
<i>Rhizoctonia</i> sp.						
	<i>Rhizoctonia solani</i>	KF372653	100%	99%	Iraq 2013	<i>Solanum lycopersicum</i>
	<i>Rhizoctonia solani</i>	KF372646	100%	99%	Iraq 2013	<i>Solanum lycopersicum</i>
	<i>Rhizoctonia solani</i>	KF372645	100%	99%	Iraq 2013	<i>Solanum lycopersicum</i>

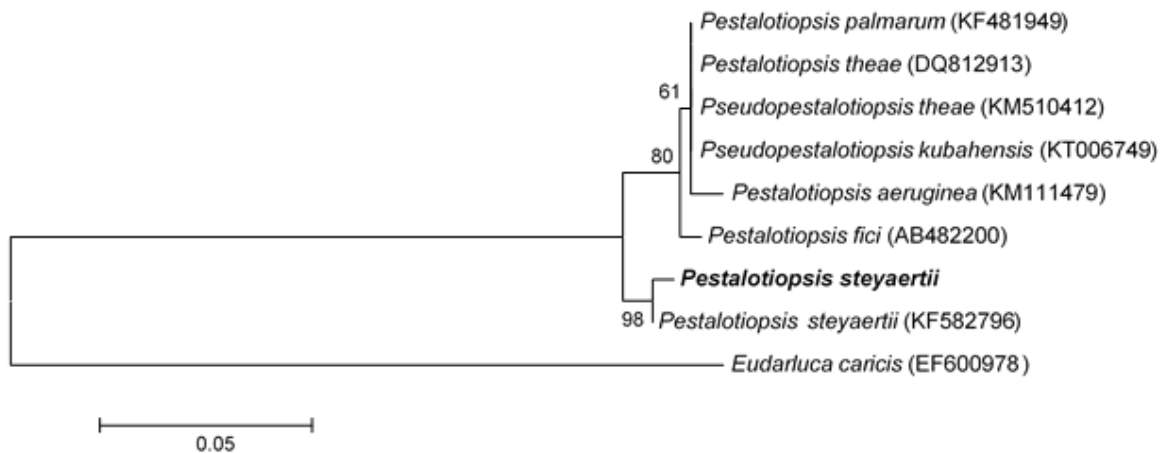


Figura 6. Árbol filogenético entre secuencias para *Pestalotiopsis steyaertii*, aislada de *J. nigra* según el análisis BLAST (Cuadro 1). Departamento de Parasitología Agrícola, UAAAN 2016.

Prueba de patogenicidad

A los siete ddi se observaron síntomas en plántulas inoculadas con *T. roseum*, *P. steyaertii* y *R. solani*, excepto para *A. alternata* que presentó los primeros síntomas a partir de los 14 ddi. Con excepción del testigo en el que las plántulas se mostraron aparentemente sanas (Figura 7A) durante el experimento, los hongos inoculados causaron clorosis (Figura 7B), achaparramiento (Figura 7C) y/o defoliación (Figura 7D) en los primeros 35 ddi. Plántulas inoculadas con *T. roseum*, *P. steyaertii* y *Rhizoctonia* sp. mostraron una pigmentación rojiza en el ápice (Figura 7E). A los 45 días todas las plantas inoculadas con hongos murieron (Figura 7F), siendo *T. roseum*, *P. steyaertii* y *Rhizoctonia* sp, los que causaron la muerte de todas las plantas a los 35 ddi, y sólo sobrevivieron las del testigo hasta el final del experimento.

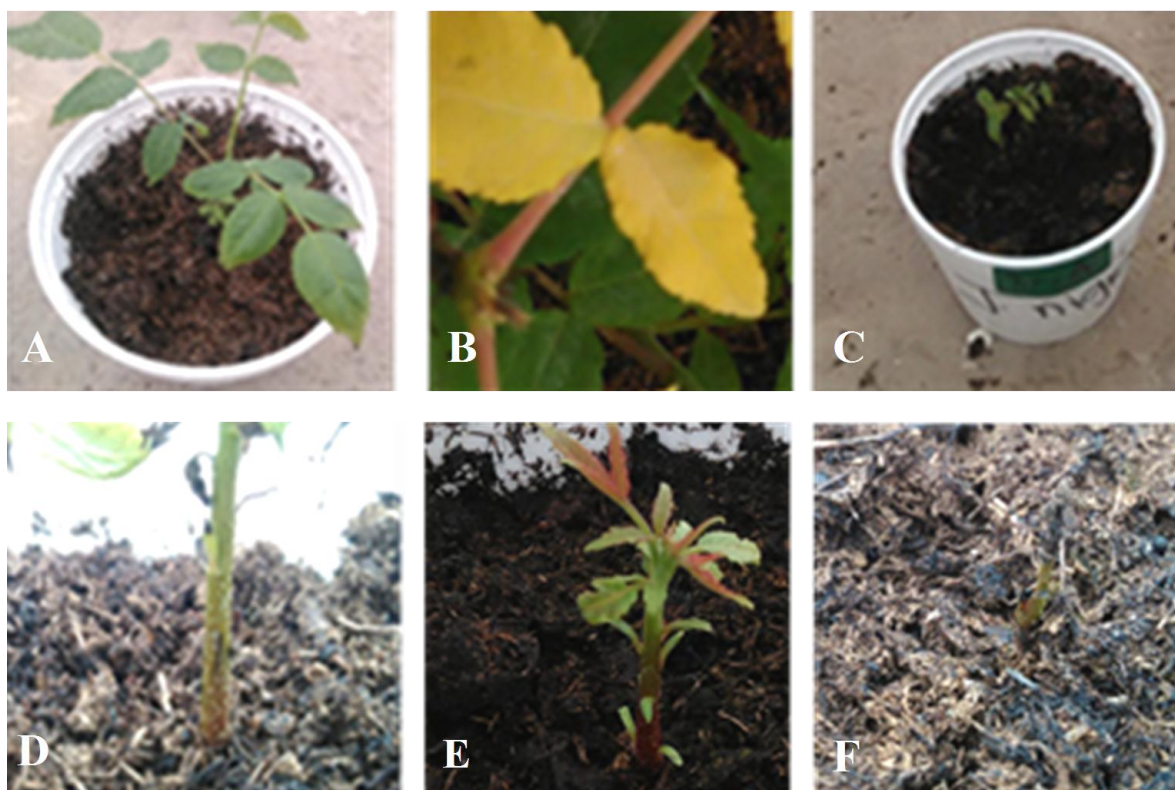


Figura 7. Síntomas en plántulas inoculadas con cepas de hongos aislados de canchales de ramas de *J. nigra*. A) Planta sana (testigo) a los 45 días de inoculación; B) Amarillamiento a los 7 ddi en plántula inoculada con *T. roseum*; C) Reducción en el crecimiento de la plántula inoculada; D) defoliación en plántula inoculada; E) Parte apical de plántula con coloración rojiza; F) Plántula muerta inoculada. Departamento de Parasitología Agrícola, UAAAN 2016.

La incidencia se determinó con base en la presencia de síntomas en plantas inoculadas respecto al testigo, obteniéndose el porcentaje de plantas enfermas (Figura 8). Los datos de severidad se analizaron mediante la prueba Kruskal-wallis y mostraron que las plantas inoculadas con hongos fueron estadísticamente similares entre sí pero diferentes al testigo (Cuadro 2). El análisis de varianza de las variables altura, longitud, peso fresco y peso seco de la raíz mostró diferencias entre tratamientos ($p \leq 0.001$; Cuadro 2). Las especies *T. roseum* y *Rhizoctonia* sp. causaron las mayores reducciones en estas últimas variables. Los hongos aislados del tejido interno de las lesiones observadas en las plantas correspondieron a los hongos inoculados, mientras que de las plantas testigo no fue posible aislar a ninguno

de éstos. Estos resultados indican que las lesiones observadas en las plantas fueron causadas por *T. roseum*, *P. steyaertii*, *A. alternata* y una especie binucleada de *Rhizoctonia*.

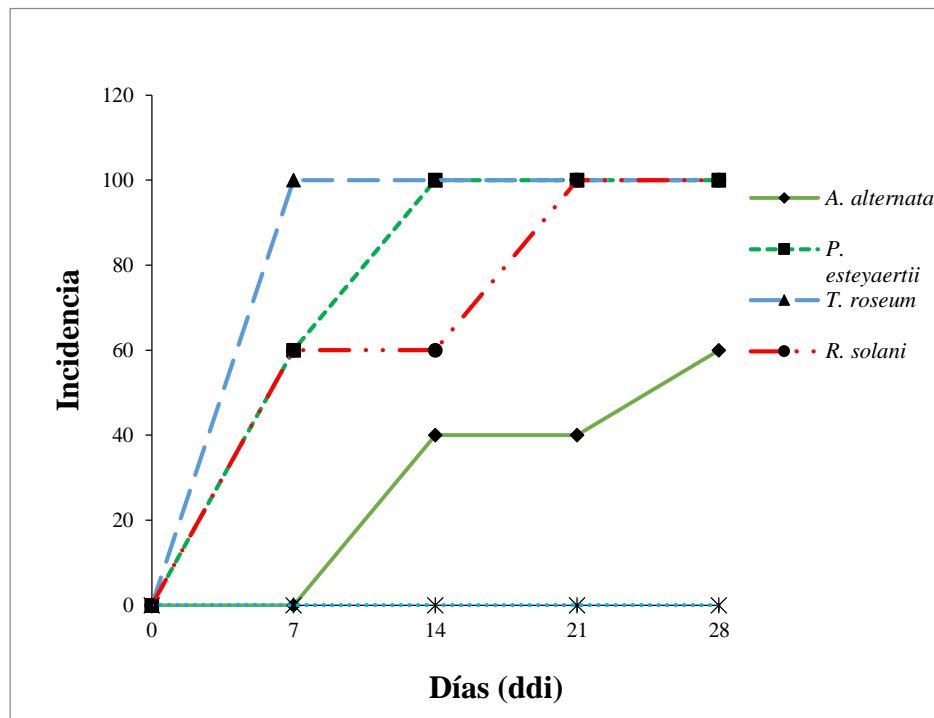


Figura 8. Porcentaje de plantas con algún tipo de síntomas en seis fechas post inoculación. Departamento de Parasitología Agrícola, UAAAN 2016.

De las cuatro especies de hongos evaluadas por su patogenicidad sobre plántulas de *J. nigra*, se ha reportado que *A. alternata* es capaz de causar canchros en manzano (Abou Al Fadil, *et al.*, 2010) y en tomate (Grogan, *et al.*, 1975), *T. roseum* en rosal (Sweets, *et al.*, 1982), y especies de *Pestalotiopsis* en diversas especies de plantas (Espinoza, *et al.*, 2008; Patel, *et al.*, 2013), pero no se encontraron reportes de alguna especie binucleada de *Rhizoctonia* asociada a canchros en plantas. Aunque el hongo *G. morbida* es considerado el más importante causante de canchros asociado a la muerte descendente en *J. nigra* (Fisher, *et al.*, 2013), también se ha encontrado que *Phytophthora citricola* (Beckerman, *et al.*, 2007) y *Fusarium solani* (Montecchio, *et al.*, 2015) son capaces de causar canchros en esta especie de planta. Sin embargo, estas especie tampoco ocurrieron en canchros de *J. nigra* de huertos en Coahuila.

Cuadro 2. Promedios obtenidos de cinco variables evaluadas a los 45 días después de la inoculación de plantas de *J. nigra* con cuatro especies de hongos. Departamento de Parasitología Agrícola, UAAAN 2016.

Tratamiento	Severidad	Altura P=0.001	Longitud de raíz P=0.001	Peso fresco de raíz	Peso seco de raíz
Testigo	18.00 a	6.18 a	5.14 a	1.10 a	0.44 a
<i>Alternaria alternata</i>	103.35 b	2.84 b	3.12 b	0.66 bc	0.21 ab
<i>Pestalotiopsis steyaertii</i>	106.21 b	3.00 b	2.16 bc	0.82 ab	0.21 ab
<i>Trichothecium roseum</i>	106.21 b	1.82 c	0.52 d	0.33 c	0.06 b
<i>Rhizoctonia</i> sp	106.21 b	2.60 b	1.65 c	0.40 c	0.04 b

Trabajos similares mencionan que *A. alternata* y *P. steyaertii* se han aislado comúnmente de canchales de ramas de especies como *Salix bonplandiana* Kunth y *Carya illinoensis* (Koch, 1869), tal como lo menciona González, *et al.*, (2011) y Alvidrez (2012), mientras que *T. roseum* y *Rhizoctonia solani* no han sido reportadas en México como especies asociadas a canchales y causantes de muerte descendente de *J. nigra*. Los resultados obtenidos sugieren que las cepas aisladas *T. roseum.*, *P. steyaertii.*, *A. alternata* y la especie binucleada de *R. solani* son agentes asociados responsables de la muerte descendente de *J. nigra*, debido a su capacidad patogénica que causó la presencia de síntomas de clorosis, defoliación, achaparramiento, marchitez, punta rojiza y muerte de las plantas inoculadas. Además, en el interior de los tallos se observaron inicialmente áreas marrones, y al cortar transversalmente estas áreas se observó necrosis del sistema vascular en forma de anillo. González, *et al.* (2011), mencionan que los árboles están predispuestos a la formación de canchales y a la muerte descendente, por factores externos como: debilidad, falta de agua, plagas; poda inadecuada; condiciones climáticas adversas; huertos abandonados y mal manejo del cultivo. En nuestro estudio fue posible reaislar a *T. roseum*, *P. steyaertii*, *A. alternata* y *R. solani* del tejido interno de plantas inoculadas de *J. nigra* con las mismas cepas, pero no de los testigos en los que se inoculó solamente agua destilada estéril. Estos resultados indican que las lesiones observadas en las plantas inoculadas fueron causadas por *T. roseum*, *P. steyaertii*, *A. alternata* y *R. solani*. La presencia de síntomas en las plantas inoculadas y la recuperación del hongo de las lesiones, permiten reportar en México a *T. roseum*, *P. steyaertii*, *A. alternata* y *R. solani* como patógenos de nogal *J. nigra*.

Fisher, *et al.* (2013) mencionan que la muerte descendente de *J. nigra* se debe a una asociación que existe entre el escarabajo *Pityophthorus juglandis* y el hongo *Geosmithia morbida* Blackman ya que establecen una relación mutua. En esta investigación no se encontró esa relación y no se han reportado como patógenos de *J. nigra*.

CONCLUSIONES

Se demostró que los hongos aislados de canchros de ramas de *J. nigra* fueron identificados como *Trichothecium roseum*., *Pestalotiopsis stayaertii*., *Alternaria alternata* y *Rhizoctonia solani*.

Estos hongos son agentes causales de la muerte descendente de *J. nigra* con niveles altos de Incidencia y severidad.

REFERENCIAS

- Abou, Al Fadil, T., Naffaa, W., Abou Fakher, T., Muzher, B. and Amer, H. 2010. Apple stem canker disease in Sweida: the causal fungus and the susceptibility of some apple varieties to the disease. Arab Journal of Plant Protection. 28: 16-19.
- Agrios, G.N. Plant Pathology. 4th edition. Academic Press. New York. 1996.
- Ahrens, U. and Semuller, E., 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rDNA gene. *Phytopathology* 82(8): 828-832.
- Alvidrez, V.R. 2012. Isolation and pathogenicity of fungi associated to ambrosia borer (*Euplatypus segnis*) found injuring pecan (*Carya illinoensis*) wood. The Journal of Agricultural Science. 1: 45-78.
- Andersen, B. 2001. Chemical and morphological segregation of pathogen *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. Mycological Research. 105: 291-299.
- Apablaza, G. 1990. Enfermedades de postcosecha en el tomate. Chile Agrícola. 15 (155): 104-106.
- Apablaza, G. 2000. Patología de cultivos, epidemiología y control holístico. Santiago de Chile, Pontificia Universidad Católica de Chile. 347 p.
- Ávila de M.C., Sanabria, J. y Buritica, P. 1994. Biocontrol de *Rhizoctonia solani* en papa, aislamiento y selección de cepas antagonicas en laboratorio e invernadero. Revista ICA. 29: 107-113.
- Barnett, H.L. and Hunter, B.B. 2006. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth Edition. The American Phytopathological Society.
- Beckerman, J. and Rhul, G. 2007. *Phytophthora citricola* causes a stem canker in black walnut (*Juglans nigra*). Plant Health Progress Doi: 10.1094/PHP2007042001BR.
- Brada, I.E., Quintana, E., Pelaya, E., Araujo, T. 1995. Efecto de *Bacillus* spp. sobre la germinación y desarrollo de semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* M.) infestadas con *Fusarium oxysporum* Schl. var. *cubensis* Smith. Ciudad Habana, Cuba. 11 p.
- Bruna, A. 1991. Producción de frutas y hortalizas para uso agroindustrial. Fundación Chile, Santiago. 977 p.
- Campbell, R. 1989. Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge University Press Cambridge. 218 p.

- Chavarro, M. E. 2011. Variabilidad genética y detección molecular de poblaciones del hongo *Rhizoctonia solani* en regiones colombianas productoras de papa. 113 pp.
- Crouch, J.A., Clarke, B.B. and Hillman, B.I. 2009. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* group. *Mycologia*, 101:648–656. Doi: 10.3852/08-231.
- de Meyer, G., Bigirimana, J., Elad, y., Höfte, M. 1998. Induced systemic resistanse in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of plant pathology*. 104: 279-286.
- Domsch, K.H., Gams, W. y Anderson, T-H. 1980. Compendium of soil fungi. Academic Press. New York.
- Du, M., Schardl, C.L., Nuckles, E.M. and Vaillancourt, L.J. 2005. Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes. *Mycología*. 97:641–658.
- Duarte, S. y Silvia, M. 2007. Pruebas de patogenicidad *in vitro* con microorganismos aislados de palmas afectadas por marchitez letal. Tesis de Maestría. 112 p.
- Espinoza, J.G., Briceno, E.X., Keith, L.M. and Latorre, B.A. 2008. Canker and twig dieback of blueberry caused by *Pestalotiopsis* spp. and a *Truncatella* in Chile. *Plant Disease Dis*. 92:1407-1414.
- Estay, P., Bruna, A. 2002. Insectos, ácaros y enfermedades asociadas al tomate en Chile. Santiago de Chile. 109 p.
- Federhen, *et al.*, 2016. Meeting report: GenBank microbial genomic taxonomy workshop (12–13 May, 2015). *Standards in Genomic Sciences* (2016) 11:15. Doi: 10.1186/s40793-016-0134-1.
- Fernández, L.L.A. 2011. “Identificación molecular de grupos anastomósicos de *Rhizoctonia solani* Asociados a la Costra negra y Cancro del Tallo en el Cultivo de Papa en Sinaloa.” *The Journal of Agricultural Science*. 66 pp.
- Fernández, O y Vega, L. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario en el manejo integrado de plagas. *Costa Rica*. 62:96-100.
- Fisher, J. R., McCann, D.P. and Taylor, N.J. 2013. *Geosmithia morbida*, thousand cankers disease of black walnut pathogen, was found for the first time in Southwestern Ohio. *Plant Health Progress*.
- Freeland, E., Utley, C., and Tisserat, N. 2011. *Geosmithia morbida* sp. nov., a new phytopathogenic species living in symbiosis with the walnut twig beetle (*Pityophthorus juglandis*) on *Juglans* in the USA. *Micology*. 03:325–332.

- Garnica, M.M., Hernández, D.S., Padilla, R.J.S. y Mayek, P.N. 2004. Diversidad patogénica y genética de aislamientos de *Fusarium* de Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 22: 321-327.
- Gilman, E.F. and Watson, D.G. 1993. *Juglans nigra*: Black walnut. Fact Sheet ST-320. Environmental Horticulture Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida: 85.
- Godoy, E.A., J.C.D.C. Rodríguez, A.M.M. Alves and D.A. Lazo, 2007. Content and quality study of the lignin by analytical pyrolysis in *Pinus caribaea*. *Maderas. Ciencia y Tecnología*, 9: 179-188. DOI: 10.4067/S0718-221X2007000200008.
- González, .H.G. 2002. Estado actual de la taxonomía de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 20:200-205.
- González, D.J.G., García, V.R., Camacho G.C. y Nieto, A.D. 2011. Cancrosis en ramas de *Salix bonplandiana* kunth causada por *Alternaria tenuissima* (Kunze Ex Pers.) Wiltshire. *Agrociencia*. 45: 75-86.
- Hadziabdic, D., Wadl, P.A., Staton, M.E., Klingeman, W.E., Moulton, J.K., Pscheidt, J.W. and Faccoli, M. 2015. Development of microsatellite loci in *Pityophthorus juglandis*, a vector of thousand cankers disease in *Juglans* spp. *Conservation Genetics Resources*. 7: 431-433.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41:95-98.
- Hanlin, R.T. (1990). *Illustrated genera of ascomycetes*. APS Press. Saint Paul, Minnesota. 324-333 p.
- <http://apsjournals.apsnet.org/loi/pdis> Consultada 29 de Mayo de 2016.
- <http://en.bio-soft.net/tree/MEGA.html> Consultada 15 de Marzo de 2016.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Consultada 15 de Marzo de 2016.
- <http://www.plantmanagementnetwork.org/> Consultada 15 de Marzo de 2016.
- Ihaka, R. and Gentleman R. 1996. R: a language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics*. 5: 299-314.
- Jarvis, W. 2000. Pythium pathology, avoidance rather than control. *Practical Hydroponics and Greenhouse*. 55: 26-29.
- KaDonna, C.R., Anita K. R., Christopher M. O., and Mark J. B. 2013. Status of black

- walnut (*Juglans nigra* L.) in the eastern united states in light of the discovery of thousand cankers disease. *Castanea*.78: 2-14.
- Kolarik, M., E. Freeland, C. Utley, and N. Tisserat. 2011. *Geosmithia morbida* sp nov., a new phytopathogenic species living in symbiosis with the walnut twig beetle (*Pityophthorus juglandis*) on *Juglans* in USA. *Mycologia*. 103: 325-332.
- Lee, I.M., Gundersen, R., Dawn, E., Davis, R.E. and Bartoszyk, I.M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Journal of Systematic Bacteriology*. 48: 1153-1169.
- Lehmann-Danzinger, H. 2004. Introduction to integrated pest management of plant diseases and pests in the tropics/subtropics. University of Göttingen, Germany. 396.
- Loison, M. 2003. Biological control: new solutions in the pipeline. *New A. G. International* 9: 18-20.
- Luna, M.N., Jaramillo V J. L., Ramírez J. J., Escobedo G. S., Bustamante G. A., Campos R. G. 2013. Tipología de unidades de producción de nuez de castilla en sistema de producción tradicional. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*.10: 283-303.
- Maharachchikumbura, S.N., Hyde K.D, Groenewald J.Z, Xu J, Crous P.W. 2014. *Pestalotiopsis* revisited. *Stud. Mycología*. 79, 121–186. Doi: 10.1016/j.simyco.2014.09.005.
- Manners, J.G.. Principles of plant pathology. 2nd. Ed. Cambridge University Press, Cambridge, England: 1993.
- Michler, C.H., Woeste, K.E., and Pijut, P.M. 2007. Black walnut (*Juglans nigra* L.). In: C. Kole (ed.). *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*. Volume 7. Forest trees. Springer Berlin Heidelberg New York: 189-198.
- Molina, R.F. 2010. Guía de silvicultura: producción de madera de alto valor. Asociación Forestal de Galicia. 24 p.
- Montecchio, L., Faccoli, M., Short, D.P.G., Fanchin, G., Geiser, D.M. and Kasson, M.T. 2015. First report of *Fusarium solani* phylogenetic species 25 associated with early stages of thousand cankers disease on *Juglans nigra* and *Juglans regia* in Italy. *Plant Disease*. 99:1183.
- Moraga, M. 2003. Efectividad de fungicidas sobre la incidencia y severidad de *Botrytis cinerea* pers. en vid. sauvignon blanc. Tesis. Universidad de Talca. Talca.
- Neergaard, P. Seed pathology. Vols. 1 and 2. Macmillan, London: 1997, 1187 p.
- Nejad, F.R., Cromey, G.S. Moosawi, J. A. 2007. Determination of the anastomosis grouping and virulence of *Rhizoctonia* spp. associated with potato tubers grown in

- Lincoln, New Zealand. Pak. J. Biol. Sci. 10: 3786-3793.
- Nitsche, J. 1998. Fisión de la industria de agroquímicos: un compromiso de la empresa para la producción sana y eficiente de alimentos. En: Actas Curso Chileno de la Manzana. Centro de Pomáceas y Soc. Chilena de Fruticultura: 155-163.
- Orona, C.I., Espinoza, A.J.J., González, C.G. y Murillo, A.B. 2006. Aspectos técnicos y socioeconómicos de la producción de nuez (*Carya illinoensis* Koch.) en la Comarca Lagunera, México. Agricultura Técnica en México. 32: 295-301.
- Patel, J.S., Norman, D., Brennan, M. and Ali, G.S. 2013. First report of elm canker caused by *Pestalotiopsis mangiferae* in the United States. Plant Disease. 97:426.
- Pérez, S. 2003. Manual de establecimiento y prácticas de manejo para el cultivo del clavel (*Dianthus caryophyllus* L) en Colombia. Primera edición. Universidad Nacional. Bogotá Colombia. 128 p.
- Pizano, M. 2000. Clavel (*Dianthus caryophyllus*). Primera edición. Ediciones Horti Técnica. Bogotá Colombia. 181 p.
- Randolph, K.C., Rose, A.K., Oswalt, C.M. and Brown, M.J. 2012. Status of black walnut (*Juglans nigra* L.) in the eastern united states in Light of the discovery of thousand cankers disease. Southern Appalachian Botanical Society. 78: 12-14.
- Rotem, J. 1988. The genus *Alternaria* biology, epidemiology and pathogenicity. American Phytopathological Society, Saint Paul, MN.
- Šálek, L. and Hejcmanová. P. 2011. Comparison of the growth pattern of black walnut (*Juglans nigra* L.) in two riparian forests in the region of South Moravia, Czech Republic. J For Sci. 57: 107-113.
- Samaniego, G.J.A., Herrera, P.T., Pedroza, S.A. y Santamaría, C.J. 2001. Relación entre condiciones de suelo y manejo de las huertas de nogal pecanero *Carya illinoensis* Koch con la dinámica de la pudrición texana. México. Rev. Mexicana de Fitopatología.19: 10-18.
- Sánchez, G.B.M., González, F.F., Pons, H.J.L., Acosta G.J.A., Cabral, E.M., Fraire, V.S., Simpson, J. y Rodríguez, G.R. 2006. *Fusarium lateritium*: nuevo patógeno de la raíz del frijol en México. Agricultura Técnica en México. 32: 251-257.
- Schumann, G. 1991. Plant diseases: their biology and social impact. The American Phytopathological Society. Saint Paul, Minnesota. 397 pp.
- Serdani, M., Vlach, J.J., Wallis, K.L., Zerillo, M., McCleary, T. and Tisserat, N.A. 2013. First report of *Geosmithia morbida* and *Pityophthorus juglandis* causing thousand cankers disease in butternut. Plant Health Progress. Doi: 10.1094/PHP-2013-1018-01-BR.

- Seybold, S.J., King, J.A., Harris, D.R., Nelson, L.J., Hamud, S.M. and Chen, Y. 2012. Diurnal flight response of the walnut twig beetle, *Pityophthorus juglandis* Blackman (Coleoptera: Scolytidae), to pheromone baited traps in two northern California walnut habitats. *Plant Health Progress*. 88: 231–247.
- Sivan, A., Ucko, O., and Chet, I. 1987. Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field conditions. *Plant disease*. 71: 587-592.
- Sneh, B., Burper, L. and Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. The American Phytopathological Society. Saint Paul, Minnesota, USA. 133p.
- Sweets, L.E., Pflieger, FL., Morgan, F.C. and Mizicko, J.R. 1982. Control of fungi associated with cankers of greenhouse roses. *Plant Disease*. 66:491-494.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28:2731-2739.
- Tisserat, N., Cranshaw, W., Putnam, M.L., Pscheidt, J., Leslie, C.A., Murray, M., Hoffman, J., Barkley, Y., Alexander, K. and Seybold, S.J. 2011. Thousand cankers disease is widespread in black walnut in the western United States. *Plant Health Progress*. Doi: 10.1094/PHP-2011-0630-01-BR.
- Tisserat, N.A., Cranshaw, W., Leatherman, D., Utle, C. and Alexander, K. 2009. Black walnut mortality in Colorado caused by the walnut twig beetle and thousand cankers disease. USA; *Plant Health Progress*. Doi: 10.1094/PHP-2009-0811-01-RS.
- Tokár, F. and Kukla, J. 2009. Ecology, phytotechnics and production of black walnut (*Juglans nigra* L.) plantations. *Ekológia (Bratislava)*. 28: 376-388.
- Utle, C. *et al.*, 2013. Susceptibility of walnut and hickory species to *Geosmithia morbida*. *Plant Disease* 97: 601-607.
- Vega, R.J., Reyes, L.A., Mata, B.I., Ortegón, P.J. y Padrón, C.E. 1999. Efecto de la estratificación y del ácido giberélico sobre la germinación y emergencia en nogal negro. *Revista Agraria UAAAN*. 14: 55-68.
- Wiggins, G.J., Grant, J.F., Lambdin, P.L., Merten, P., Nix, K.A., Hadziabdic, D. and Windham, M.T. 2014. Discovery of walnut twig beetle, *Pityophthorus juglandis*, Associated with forested black walnut, *Juglans nigra*, in the Eastern USA. *Forests*. 5: 1185-1193.