



Universidad de Guanajuato
Campus Guanajuato
División de Ciencias Naturales y Exactas

**Estrategias para el control de muérdago enano, *Arceuthobium* spp.,
parásito de *Pinus douglasiana***

Ana Fernanda Rosiles Ortega

Lic. En Biología Experimental

Director de tesis

Dr. José Pedro Castruita Domínguez

Codirectores de tesis

Dr. Julio Cesar Villagómez Castro

C. Dra. Lérica Liss Flores Villavicencio

Dr. Francisco Martín Huerta Martínez

Guanajuato, Gto. Noviembre, 2020.

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Ecología del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jalisco; en colaboración con el Departamento de Biología, de la División de Ciencias Naturales y Exactas, sede Noria Alta, Campus Guanajuato de la Universidad de Guanajuato; bajo la dirección del Dr. José Pedro Castruita Domínguez y la co dirección de cDra. Lérica Liss Flores Villavicencio, Dr. Julio César Villagómez Castro y Dr. Francisco Martín Huerta Martínez.

Comité de sinodales asignados

Dr. Alberto Flores Martínez

Presidente

Dr. Félix Gutiérrez Corona

Secretario

Dr. Gustavo Cruz Jiménez

Vocal

Dr. Gustavo Alexis Niño Vega

Vocal suplente

Ana Fernanda Rosiles Ortega

Estudiante

Dr. José Pedro Castruita Domínguez

Director

Dr. Francisco Martín Huerta Martínez

Codirector

Dr. Julio Cesar Villagómez Castro

Codirector

Cdra. Lérida Liss Flores Villavicencio

Codirector



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA**

Dr. Israel Enrique Padilla Guerrero
Coordinador de la Licenciatura en Biología Experimental
División de Ciencias Naturales y Exactas, campus Guanajuato
PRESENTE

Estimado Dr. Padilla Guerrero.

Por este conducto me permito comunicar a Usted, que la alumna de 8a inscripción de la Licenciatura en Biología Experimental, Ana Fernanda Rosiles Ortega (NUA 312328), desarrollara su trabajo de tesis titulado “Estrategias para el control de muérdago enano, *Arceuthobium spp.*, parásito de *Pinus douglasiana*” en el Laboratorio de Ecofisiología Vegetal de este centro universitario. Por tal motivo, solicitamos la autorización pertinente para iniciar con el procedimiento de titulación a través de la modalidad: Trabajo de Tesis.

El proyecto de investigación se desarrollará durante el periodo Septiembre 2019 – Febrero 2020 y se realizará bajo la dirección a mi cargo en co-dirección con el Dr. Francisco Martín Huerta Martínez del Departamento de Ecología, CUCBA de la Universidad de Guadalajara. En donde, se llevarán a cabo las siguientes actividades: colecta y manejo de muestras de muérdago enano *Arceuthobium spp.* en el área Natural Protegida Sierra de Quila, Jalisco; así como el procesamiento de las muestras para el aislamiento e identificación de los hongos. Por otra parte, con el Dr. Julio César Villagómez Castro y CDra. Lérica Liss Flores Villavicencio del Departamento de Biología, DCNE campus Guanajuato de la Universidad de Guanajuato; se realizará la caracterización de la semilla de muérdago enano con énfasis en glicobiología. Lo anterior, se hace de su conocimiento como requisito para iniciar el procedimiento en cuestión.

Sin más por el momento, agradezco de antemano su atención y quedo a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.

ATENTAMENTE
“PIENSA Y TRABAJA”

Zapopan, Jalisco. Agosto 5 de 2019

Dr. José Pedro Castruita Domínguez

Director de tesis

Tel: (33) 37771150 Ext. 33106

jose.castruita@academicos.udg.mx

Agradecimientos

Primero que nada, quiero agradecer a la vida por haberme traído a un camino tan maravilloso como este; sin duda no ha sido el más fácil, pero si el más satisfactorio, esperando que tenga para mí muchas más aventuras y sabiduría.

Agradezco desde mi corazón a mi familia, a mis padres, a mis amigos y a toda mi familia por elección que han traído tanto amor y conocimiento a mi vida, ustedes son la motivación para continuar en mi formación como persona y profesionalmente.

Gracias a mi papá Gustavo y a mi hermano Gael, por permitirme volar lejos de casa, por verme crecer y darme tantas oportunidades como hasta ahora para perseguir mi pasión y resolver toda mi curiosidad, por escucharme pacientemente mientras platico de todo lo que el estudio de la naturaleza significa en mi vida, por llenarme de tanto amor y sobre todo por su apoyo incondicional, gracias por ser mi pilar para seguir, por siempre brindarme a manos llenas.

Gracias a mis abuelos, Mamá Adelita y Papá Cuco, por creer en mí, por tenerme siempre tanto cariño, ustedes son una parte primordial en mi vida, soy muy afortunada de tenerlos. Gracias también a mis tíos Juan, Felipe, Dulce y José Refugio, así como a Nayeli, Marissa y Verónica y a mis primos, Diego, Andrés, Sara y María, por tanto apoyo y empatía, abrir camino al ámbito científico en la familia no es sencillo, pero lo hemos logrado.

La vida no encontró mejor expresión de amor, que al cruzar mi camino con el de personas magníficas, que iniciaron como mis amigos y ahora son parte de mi familia por elección, ustedes hacen el mundo un lugar mejor cada día.

A Eugenia, mi gemelis del alma, tantos años conociéndonos, creciendo juntas, tan lejos y tan cerca; tú siempre como mi hermana de otra familia, gracias por todo tu apoyo y motivación para seguir adelante, por las llamadas de madrugada para tomar impulso y seguir adelante, por cada palabra de aliento y de emoción. Agradezco también a tus niños hermosos, Mía y Mateo, por ser parte de mi vida.

A Frida, por ser mi mejor amiga, por tantas pláticas en la banqueta hasta la noche, por enseñarme de la vida, por apoyarme y jamás separarte de mí, espero que nuestra amistad dure una infinidad de tiempo. Gracias también por traer a mi vida a tu hermosa Valentina.

A Tefy, Zazil y Ale, por ser mi infalible, por enseñarme a compartir, a trabajar en equipo, por hacerme ver lo que no veía, por hacerme salir de mi zona de confort y sobre todo por todo su amor y amistad incondicional, por hacer la

universidad la mejor etapa de la vida; por estar conmigo en las buenas, en las malas y en las peores. Ustedes significan toda la sabiduría que logré obtener durante esta etapa. Las quiero ver brillar como todas unas biólogas, las amo mucho.

A mis compañeros y amigos, Tetuán, Daniela, Ale, Grecia, Fer, Raúl, Itzel, Francisco y Mayra por tanto conocimiento, risas y momentos irremplazables, por mostrarme que la amistad va mucho más allá de lo que imaginaba.

A Liss, Julio, Pedro, que más allá de ser mis asesores, siempre los vi como mi ejemplo a seguir; gracias por enseñarme con tanta paciencia y por brindarme infinidad de oportunidades para crecer en todos ámbitos, por darme su amistad y conocimientos con tanto cariño. Gracias por forjarme.

A todos mis compañeros de laboratorio, Lucy, Ale, Paco, David, Jesús, Quetzally, Ari, Baruch, Mayela, Mario, Frida, Luis, Irazú; gracias por permitir aprender de ustedes y enseñarles de mí, por hacer las horas en el Lab las más divertidas y productivas, por tantas risas y buenos momentos.

A Dani, por llegar de la manera menos esperada, pero la más linda; por apoyarme y motivarme a seguir adelante, por tanta paciencia y amor de por medio. Gracias por mostrarme que todo el aprendizaje a lo largo de la vida tiene siempre un por qué y un para qué oculto que sólo el tiempo se encarga de mostrar.

A Juanita, Juan Carlos, Edwin, Sra. Gina, Yazmina, Julia, Pablo, Aurea, Lupita, Adalbert, Lolita, Máx, Jens, Sabine, Cris, Jorge, Jorch, Eufemio, Norma, Erika, Fernanda por toda su sabiduría y compañía.

Y por último, a todas las personas que hicieron que este trabajo fuera posible, por mostrarme y enseñarme, por ser parte de mi continuo aprendizaje como persona y futuro científico.

Allí la ciencia facilitaba el planteamiento de las cuestiones profundas en las que la filosofía y la ciencia se unen: ¿Qué somos? ¿De qué estamos hechos nosotros y el universo? ¿De dónde venimos? ¿Cómo funcionamos? No dudo de que debo la elección de una carrera científica a la genialidad de esta educación «idiosincrásica».
-Lynn Margulis-

ÍNDICE

Índice de figuras	I
Índice de tablas	II
Índice de abreviaturas	III
Resumen	V
Introducción	1
Antecedentes	2
Área Natural Protegida Sierra de Quila	2
Descripción del área de estudio	2
Coníferas	2
Género <i>Pinus</i>	3
Especies presentes en ANP Sierra de Quila	3
<i>Pinus douglasiana</i>	4
Plantas parásitas	4
Familia Santalaceae	4
<i>Arceuthobium</i> spp	5
Ciclo de vida	5
Interacción planta-planta	7
Interacción <i>Pinus</i> spp. - <i>Arceuthobium</i> spp.	8
Métodos de control	9
Control físico	9
Control químico	10
Control biológico.....	11
Justificación	13
Hipótesis	14
Objetivo General	15
Objetivos Particulares	15
Materiales y Métodos	16
Mapa de georreferencia del Área Natural Protegida Sierra de Quila, Jalisco, México	16
Colecta y manejo de muestras de muérdago enano <i>Arceuthobium</i> spp.	16

Aislamiento de hongos a partir de muestras de muérdago enano.....	16
Caracterización morfológica macroscópica y microscópica de los hongos	17
Análisis bioquímico de la viscina y tricomas de las semillas de muérdago enano	17
Obtención de viscina a partir de frutos de muérdago enano	17
Purificación de proteínas a partir de tricomas	18
Determinación de proteínas y azúcares totales.....	18
Determinación de grupos funcionales mediante espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FT-IR)	18
Determinación de perfil de proteínas totales	19
Determinación de glicoproteínas mediante tinción en gel (Fucsina básica)	19
Determinación de monosacáridos en viscina y tricomas	19
Resultados	20
Mapa de georreferencia de Área Natural Protegida Sierra de Quila, Jalisco, México	20
Caracterización morfológica de los aislados fúngicos de <i>Arceuthobium</i> spp.....	23
Análisis bioquímico de la viscina y tricomas de las semillas de muérdago enano.....	29
Discusión	35
Conclusiones	38
Perspectivas	39
Bibliografía	40
Anexo	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Pinus douglasiana</i> , rama con espículas.....	4
Figura 2 Ciclo de vida de <i>Arceuthobium</i> spp. parasitando <i>Pinus douglasiana</i>	6
Figura 3 Semilla de muérdago enano	7
Figura 4 <i>Arceuthobium</i> spp. parasitando <i>Pinus douglasiana</i>	9
Figura 5 Mapa de Área Natural Protegida Sierra de Quila obtenido en QGIS 3.8	20
Figura 6 Vista de vegetación presente en el punto de muestreo 1	21
Figura 7 Puntos de referencia correspondientes a las zonas de muestreo (M).....	22
Figura 8 Determinación de perfil de proteínas totales de viscina y tricomas mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes en gel de acrilamida 10% y tinción de plata.	30
Figura 9 Determinación de perfil de glicoproteínas totales presentes en tricomas, homogenado total (HT) y fracciones 1 y 2 obtenidas después de la purificación. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes en gel de acrilamida 7.5% y tinción de fucsina básica (0.4%).	30
Figura 10 Determinación de compuestos monosacáridos mayoritarios en viscina mediante HPLC	31
Figura 11 Determinación de compuestos monosacáridos mayoritarios en tricomas mediante HPLC	31
Figura 12 Determinación de grupos funcionales en viscina mediante espectroscopía infrarroja transformada de Fourier	33
Figura 13 Determinación de grupos funcionales en viscina mediante espectroscopía infrarroja transformada de Fourier	33
Figura 14 Viscina y tricomas de semilla vistos en microscopio invertido .	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Características morfológicas macroscópicas de los hongos aislados a partir de muérdago enano.....	24
Tabla 2 Características morfológicas microscópicas de los hongos aislados a partir de muérdago enano.....	26
Tabla 3 Cuantificación total de proteínas y carbohidratos totales de viscina y tricomas	29

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ANP	Área Natural Protegida
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy o Espectroscopía Infrarroja por transformada de Fourier
PDA	Medio de cultivo Agar-Papa-Dextrosa
MA	Medio de cultivo Agar-Malta
YPGA	Medio de cultivo Peptona-Glucosa-Extracto de Levadura
HPLC	High Performance Liquid Chromatography o Cromatografía Líquida de Alta Resolución
mL	Mililitros
g	Gramos
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis o Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato de sodio
PNIP	Parque Nacional Iztaccíhuatl—Popocatépetl
PNLM	Parque Nacional La Malinche
°C	Grados Celsius o centígrados
PM	Peso molecular
m	Metros
APG II	Sistema para la clasificación de angiospermas según criterios filogenéticos
cm	Centímetros
μL	Microlitros
PBS	Phosphate buffered saline o amortiguador de fosfato salino
KHz	Kilohertzios
rpm	Revoluciones por minuto
μg	Microgramos
BSA	Bovine serum albumin o albúmina de suero bovino
Tris	Trisaminometano

cm	Centímetros
V	Voltios
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate o Dodecilsulfato de sodio
TEMED	Tetrametiletildiamina
M1	Muestreo 1
M2	Muestreo 2
M3	Muestreo 3
M4	Muestreo 4
spp.	Especies
sp.	Especie
ppm	Partes por millón
kDa	Kilo Daltons

Resumen

Sierra de Quila es un área natural protegida del estado de Jalisco con una gran diversidad de coníferas, entre ellas ocho especies del género *Pinus* (*P. devoniana*, *P. douglasiana*, *P. lumholtzii*, *P. herrerae*, *P. leiophylla*, *P. montezumae*, *P. oocarpa* y *P. chihuahuana*), de las cuales destaca *P. douglasiana* debido a su amplia distribución. Actualmente, *P. douglasiana* es parasitada por una especie de muérdago enano del género *Arceuthobium* que se dispersa rápidamente dentro de la población y afecta el vigor de las plantas hospederas hasta causar la muerte, así mismo incrementa la susceptibilidad al ataque de otros patógenos e insectos, así como la vulnerabilidad ante eventos naturales como incendios. Las especies de muérdago enano se caracterizan principalmente por un mecanismo explosivo de dispersión de semilla, lo cual ocurre cuando el fruto, que contiene viscina, al madurar libera de forma explosiva la semilla hasta 20 metros a la redonda, lo que permite la colonización de nuevos hospederos. Actualmente, no existen medidas contundentes para el control de esta planta parásita, por lo que se afecta el repoblamiento natural del bosque y sus funciones como ecosistema, ya que se observa una disminución de nutrientes para otros organismos en el hábitat y una pérdida económica sustancial en la industria maderera. Por ello, se aislaron hongos a partir de ejemplares sanos e infectados de *Arceuthobium* spp. que podrían tener un efecto antagónico con el crecimiento de este parásito. Se obtuvieron 15 aislados de hongos en medio de cultivo PDA y se determinaron las características morfológicas macroscópicas de la colonia con base en su elevación, borde, aspecto, consistencia y color, a su vez, se obtuvieron preparaciones de los hongos teñidos con Blanco de Calcoflúor y fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia (Leica, DMLS) con una cámara AxioCam ICc1 (Carl Zeiss) usando el filtro UV (400-420nm). Por otra parte, se colectó la viscina de los frutos de muérdago sano y a partir de las semillas se obtuvieron los tricomas para realizar un homogenado total. Posteriormente, se determinó el contenido total de proteínas de la viscina y de los tricomas mediante el método de Lowry (1951). Paralelamente, se determinó el contenido total de carbohidratos a través del método de Dubois (1956) y se determinó el perfil total de proteínas por electroforesis (10% SDS-PAGE); obteniéndose proteínas con $M_r \leq 19-47$ kDa en viscina y una banda de alto peso molecular en tricomas, la cual se encuentra glicosilada. La identificación de monosacáridos y grupos funcionales mediante cromatografía de líquidos de alta resolución y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier indicó la presencia de monosacáridos, glucosa y manosa en viscina, mientras que en tricomas: N-acetilglucosamina y

glucosa. En relación con los grupos funcionales, estos correspondieron a biomoléculas de proteínas y carbohidratos. Estos resultados indican la presencia de moléculas que posiblemente son clave para la continuidad del ciclo de vida de esta planta parásita, lo que permitirá incorporar elementos para plantear una estrategia integral para el control de *Arceuthobium* spp.

Introducción

Sierra de Quila es un Área Natural Protegida (ANP) perteneciente al estado de Jalisco, cuenta con un ecosistema de bosque de pino-encino y una población mayoritaria de pinos dentro de su flora, entre los que destaca *Pinus douglasiana* Martínez, por su abundante presencia comparada con el resto de las especies dentro del ANP (CONANP, 2019).

Esta especie de pino actualmente es afectada por una planta parásita del género *Arceuthobium* M. Bieb., conocido también como muérdago enano, para el cual no se ha encontrado un tratamiento que impida su propagación, ya que esta planta parásita posee un ciclo de vida muy complejo y largo. De ahí que diversos estudios se han enfocado en su etapa reproductiva. Una característica interesante de este grupo de plantas es que dispersa sus semillas tras la explosión del fruto maduro, a una distancia de aproximadamente 20 metros a la redonda (Hawksworth, 1961; 1965; Hawksworth y Wiens, 1996).

Actualmente, se cuenta con diversas alternativas para el control de esta planta parásita, entre ellas se encuentra el control químico, en el cual se han utilizado distintas sustancias como 2,4-D, MCP 4-2-metil-4-clorofenoxi y Etephon, que son efectivas a corto plazo por lo que requieren aplicaciones continuas. Otra de ellas es el control físico, el que consiste en la remoción de estructuras infestadas del hospedero o en su caso el derribe o quema del árbol para los ejemplares muy infestados y por último el control biológico, del cual se tiene escasa información. Respecto a esta alternativa de control biológico, en México se han reportado diversos géneros de hongos fitopatógenos de muérdago enano, entre los cuales destacan *Pestalotiopsis* spp., *Alternaria* spp. y *Fusarium* spp. (Shamoun *et al.*, 2003; Plascencia *et al.*, 2007; Conklin y Geils, 2008; Reséndiz *et al.*, 2012; González-Gaona *et al.*, 2017). Sin embargo, es de relevancia investigar especímenes fúngicos dentro de la zona de estudio donde se realizará el control biológico.

En este sentido, la estrategia propuesta en este estudio para el control del muérdago enano es la investigación y caracterización de hongos fitopatógenos presentes en muestras de tejido sano e infectado de la planta parásita, colectados dentro de las zonas altamente infestadas; así como el estudio bioquímico de la viscina y tricomas que cubren a la semilla para entender su papel en el ciclo de vida y por ende en la colonización del hospedero.

Antecedentes

1. Área Natural Protegida Sierra de Quila

Sierra de Quila es reconocida como un ANP por Decreto presidencial desde el 23 de julio de 1982, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 4 de agosto de 1982 como área de protección de flora y fauna. Representa una superficie aproximada de 15,192.50 hectáreas y está incluida en los municipios de Tecolotlán, Tenamaxtlán, San Martín de Hidalgo y Cocula, en el estado de Jalisco (CONANP, 2019).

▪ *Descripción del área de estudio*

La vegetación en esta región está caracterizada por bosque de coníferas, bosque de pino-encino, bosque de encino-pino, bosque de encino, selva baja caducifolia y pastizal; sin embargo, el ecosistema predominante es bosque de pino-encino (CONANP, 2019).

2. Coníferas

Las coníferas representan un grupo de plantas clasificadas en la subdivisión Gymnospermae debido a que presentan los sexos masculino y femenino en el mismo individuo o separados, dependiendo de la especie; las semillas de estas plantas se encuentran desprovistas de un fruto carnoso, la mayoría de estas presentan una corteza áspera y gruesa, sus hojas son simples, persistentes durante todo el año y se muestran como agujas o acículas; los frutos se conocen como conos o piñas, los procesos de floración y fructificación se da en periodo de entre 1 a 3 años dependiendo de la familia (Gernandt, *et al.*, 2014).

Existen 571 especies de coníferas reportadas en todo el mundo. En México, las coníferas están ampliamente distribuidas dentro de todo el territorio, localizándose principalmente en las zonas de clima frío, templado y húmedo, entre los 1500 y 3000 m de altitud y de acuerdo con la más reciente clasificación realizada para las coníferas a nivel mundial, en el país se han reportado cuatro de las seis familias distribuidas en 10 de los 71 géneros, que a su vez representan el 14% de la diversidad mundial, con un total de 95 especies de coníferas en el territorio mexicano. De todos los estados, Jalisco es el que posee mayor diversidad de coníferas con 34 especies reportadas (Gernandt, *et al.*, 2014).

En México, estas especies están distribuidas en 6 familias: Pinaceae (pinos, abetos y hayarines), Cupressaceae (cipreses), Podocarpaceae (podocarpos), Taxaceae (tejo), Sciadopityaceae (Pino sombrilla de Japón) y Araucariaceae (Araucos, Pino de Wollemi y Kauries) (Christenhusz, *et al.*, 2011).

- *Género Pinus*

El género *Pinus* comprende a un conjunto de árboles siempre verdes que se caracteriza por poseer grandes dimensiones y se les considera plantas monoicas. La disposición de las ramas le otorga una forma piramidal a la copa en macroblastos y braquiblastos. Los macroblastos tienen hojas escuamiformes o como escamas, sin clorofila, mientras que los braquiblastos tienen entrenudos muy acortados, las hojas son largas, en forma de agujas y tienen una vaina membranosa de escamas (Narave y Taylor., 1997).

Las hojas, el tronco y las ramas poseen células que se organizan en canales para la síntesis y acumulación de resina. La hojas son aciculares y están reunidas en grupos de 2 a 5 a través de braquiblastos. Las flores son unisexuales y se presentan como estróbilos o conos. Los conos masculinos se disponen en los extremos terminales de las ramas de los pinos y son ovoides compuestos por un eje central con escamas insertadas helicoidalmente, cada una con dos sacos polínicos que contienen polen en su interior. El grano de polen tiene dos vesículas o sacos aeríferos en vista microscópica. Los conos femeninos son ovoides y se forman por un eje central con escamas generalmente bastante engrosadas y leñosas en la madurez, que portan los óvulos. Estas escamas se insertan de manera helicoidal en el eje. Los conos femeninos se disponen en los extremos de las ramas superiores y, luego de la maduración de las semillas, caen al suelo. Las semillas de algunas especies (piñones) tienen una testa lignificada y se prolongan en un ala papirácea para la dispersión (Manzanilla *et al.*, 2018).

- *Especies de Pinos presentes en el ANP sierra de Quila.*

A nivel mundial se encuentran distribuidas aproximadamente 100 especies distintas del género *Pinus*, de las cuales en nuestro país se han reportado 95 especies y en el estado de Jalisco 34; lo cual lo posiciona como el estado con mayor diversidad de pinos en todo el país. En el ANP sierra de Quila se ha reportado la presencia de 8 especies distintas de pinos (*Pinus devoniana*, *P. douglasiana*, *P. lumholtzii*, *P. herrerae*, *P. leiophylla*, *P. montezumae*, *P. oocarpa* y *P. chihuahuana*), de las cuales destaca *Pinus douglasiana* debido a su amplia distribución en ésta ANP. Particularmente, a esta especie se le

conoce con el nombre común de pino avellano o pino hayarín (Santiago-Pérez *et al.*, 2012).

- *Pinus douglasiana* Martínez

P. douglasiana presenta fustes de hasta 35 metros de altura y diámetros de 75 cm; una copa redondeada y densa, con ramas bajas horizontales y ramas superiores ascendentes; corteza densa y piramidal; hojas o acículas que se presentan en grupos de 5, triangulares y de 25 a 33 cm de largo, con bordes finamente aserrados, de color verde claro y yemas de color anaranjado-rojizo (Figura 1).

Sus conos están diferenciados sexualmente, los masculinos son terminales, se les puede observar al inicio de la primavera en paquetes compactos con tonalidades violáceas que luego se tornan anaranjadas y posteriormente rojizas al liberar el polen; los femeninos son subterminales, de color café-violáceo, con escamas de 20 a 30 mm de largo por 15 de ancho en su ápice, normalmente en forma de polígono. Las semillas se observan de color café oscuro, de forma ovoide, de 4 a 5 mm de longitud y con un ala de 25 mm de largo por 8 mm de ancho. La época de floración se presenta de enero a marzo, la apertura de conos de noviembre a diciembre, mientras que la dispersión de semilla comienza en diciembre (Eguiluz, 1978).



Figura 1. *Pinus douglasiana*, rama con espículas

3. Plantas parásitas

- *Familia Santalaceae*

Anteriormente se le conocía a esta familia como *Viscaceae* pero, a partir de 2003, siguiendo el sistema para la clasificación de angiospermas según criterios filogenéticos (APG II) se le denomina familia *Santalaceae*, de distribución casi cosmopolita (Bremer, 2009).

Son plantas hemiparásitas que se fijan al hospedero mediante haustorios que penetran en los tejidos conductores. Poseen clorofila, por lo que son capaces de realizar fotosíntesis mientras se parasita al hospedero.

Dentro de esta familia encontramos 45 géneros, de donde destacamos al género *Arceuthobium* (muérdago enano) que se caracteriza por ser parásito de diferentes pináceas y a los géneros de muérdago verdadero más importantes en México *Phoradendron*, *Psittacanthus* y *Struthanthus* (Sotero, 2018).

- *Arceuthobium* M. Bieb.

Es un género compuesto de 42 especies de plantas parásitas cuyos hospederos principales son miembros de las familias *Pinaceae* y *Cupressaceae* en Norteamérica, Centroamérica, Asia y África. De las 42 especies descritas, 39 son endémicas de Norteamérica y de ellas, 21 son endémicas de Estados Unidos. En México se han reportado tres especies principales de muérdago enano, *A. abietis religiosiae*, *A. globosum* y *A. vaginatum* siendo esta última la especie predominantemente distribuida en todo el país (Hawksworth y Wiens, 1996).

El género *Arceuthobium*, son plantas hemiparásitas que obtienen nutrientes minerales, agua y el 70% de sus fotosintatos, directamente del sistema vascular de su hospedero mediante el desarrollo de una estructura especializada denominada haustorio (Press y Phoenix, 2005).

Estas especies presentan una característica dentro de su ciclo de vida que las diferencia del resto, un mecanismo explosivo de dispersión de semilla, el cual ocurre al madurar el fruto y es capaz de lanzar la semilla hasta 20 metros a la redonda, permitiendo así la colonización de nuevos hospederos y dispersión de esta especie (Hawksworth, 1961).

- *Ciclo de vida*

El ciclo de vida de este parásito consta de 4 etapas principales: la *reproducción*, *dispersión*, *establecimiento* e *incubación* (Figura 2).



Figura 2. Ciclo de vida de *Arceuthobium* spp. parasitando *Pinus douglasiana*.

La *reproducción* tiene una duración de entre cuatro a seis semanas (Figura 3A), en las que ocurre el proceso de polinización anemófila para dar lugar a la generación del fruto que, al madurar pasará a la *dispersión* (durante el otoño), que debido a la presión hidrostática generada por una alta concentración de viscina, tras la maduración del fruto, este estalla liberando la semilla con el fin de adherirse a otra planta hospedera. La viscina es una sustancia mucilaginosa e higroscópica que envuelve a la semilla y es clave para adherirse al hospedero, *establecimiento*; con el tiempo la viscina se seca y con ello las semillas que han logrado adherirse a la base de las acículas, ramas o tallos (Figura 3B y C), continuarán con la etapa de *germinación*, la cual ocurre hasta la primavera siguiente, donde desarrollan un haustorio (Figura 3D), que le permite ingresar hasta el xilema de la planta hospedera para obtener sus nutrientes minerales (Hawksworth, 1965).

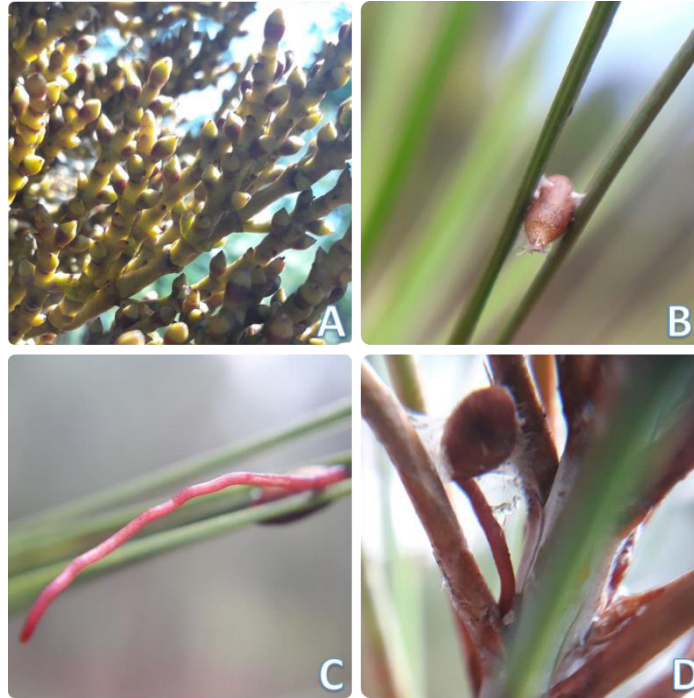


Figura 3. Semilla de muérdago enano. A) Primordio de baya y semilla, B) y C) Desarrollo de haustorio una vez adherida la semilla al hospedero, D) Establecimiento de muérdago en hospedero.

Después de dos a tres años del establecimiento de la semilla, comienza el desarrollo de brotes, que a su vez generan ramificaciones articuladas denominadas “escobas de bruja”, estos pueden medir desde milímetros hasta 50 cm de longitud; antes de este tiempo es difícil decir con certeza que un árbol está infectado con muérdago enano ya que no hay señales visibles de infección en el pino (Rodríguez, 1983; Ramírez-Dávila *et al.*, 2009).

4. Interacción planta-planta

Las interacciones planta-planta involucran una asociación íntima entre los organismos y se clasifican en 3 formas: *mutualismo*, *comensalismo* y *parasitismo*. El *mutualismo* se define como una relación en que ambos individuos se benefician y se puede presentar de dos formas, como *mutualismo facultativo*, en el que los organismos pueden vivir el uno sin el otro y el *mutualismo obligado*, donde ambos necesitan permanecer asociados para sobrevivir. El *comensalismo*, es aquella interacción en que uno de los organismos involucrados se beneficia, mientras que el otro, no se perjudica. En el caso del *parasitismo*, es un tipo de simbiosis en la cual un organismo se beneficia a expensas de otro (Audesirk, *et al.*, 2012; Novoplansky y Williams, 2013). Generalmente cuando se menciona patógenos de plantas, se refiere a algunos organismos tales como nemátodos, hongos, bacterias y

virus. Sin embargo, el parasitismo ha evolucionado en todos los reinos de la vida y en el caso de las plantas no es la excepción, ya que existen plantas parásitas. En este contexto, existen más de 4000 especies de plantas angiospermas parásitas con una gran diversidad en tamaño y estructura. Su rango de hospederos es muy amplio, desde pastos, arbustos, hasta árboles (Caitlin *et al.*, 2017).

El parasitismo puede clasificarse de tres maneras: según el *órgano* que parasitan (tallo o raíz), según la *dependencia* del hospedero (facultativas u obligadas) y según el nivel de *autotrofia* (hemiparásitas u holoparásitas). Las plantas parásitas *facultativas* tienen la característica de tener clorofila por lo que realizan fotosíntesis y pueden crecer hasta la madurez sin necesidad de un huésped, a estas también se les conoce como *hemiparásitas* según su nivel de autotrofia, ya que sólo obtienen agua y nutrientes minerales desde sus hospederos por medio de una estructura especializada llamada haustorio que se conecta con el xilema de la planta hospedera; las plantas parásitas *obligadas*, como su nombre lo dice, requieren del huésped para madurar, también se les conoce como plantas *holoparásitas* según su nivel de autotrofia, ya que al carecer de clorofila, dependen en su totalidad de los fluidos tanto xilemáticos como floemáticos de la planta hospedera (Novoplansky y Williams, 2013).

- *Interacción Pinus spp. – Arceuthobium spp.*

La interacción *Arceuthobium-Pinus* comienza desde la etapa de establecimiento del ciclo de vida del muérdago enano, donde la semilla se adhiere al hospedero y posteriormente comienza el proceso de colonización con el desarrollo del haustorio (Rey *et al.*, 1991).

La infección severa de muérdago enano ocasiona debilitamiento general de la planta lo cual la vuelve menos competitiva y en condiciones limitantes de humedad, durante la época seca, se produce una mayor mortalidad (Roth, 2001); también se ha observado una reducción en el tamaño, número de conos y semillas; así como una menor calidad de la madera (Stanton, 2006). La mortalidad es más notoria en árboles de menos de 25 cm de diámetro (Hawksworth y Wiens, 1996).

Dentro de los síntomas de la infección, destacan abultamiento ligero en la corteza del hospedero; crecimiento anormal de las ramas infectadas, reducción de crecimiento en altura y diámetro, formación de “escobas de bruja” (Figura 4) (Rey *et al.*, 1991; Vega, 1976; Lye, 2006).



Figura 4. *Arceuthobium* spp. parasitando *Pinus douglasiana*.

5. Métodos de control

Existen tres tipos principales de control de muérdago enano parasitando pináceas, estos son: *control físico* que involucra la remoción de estructuras infestadas del hospedero, el *control químico* que consiste en la aplicación de sustancias para el control del desarrollo del parásito sobre el hospedero y por último el *control biológico* en donde se emplean organismos vivos para controlar el crecimiento del muérdago sobre el hospedero, estos organismos vivos son principalmente hongos e insectos.

Actualmente en México se han evaluado las 3 estrategias de control antes mencionadas para distintas especies del género *Arceuthobium* spp. sobre *Pinus* spp., a continuación se describen los procedimientos y resultados del empleo de estas técnicas.

- *Control físico*

Las estrategias para el control de muérdago enano (*Arceuthobium* spp.), incluyen un control físico en los individuos infectados mediante podas de

saneamiento y la tala de organismos totalmente infectados, con el objetivo de disminuir la relación parásito-hospedero, sin embargo, esta estrategia no controla totalmente la dispersión de la planta parásita a toda la población vulnerable de la zona. La poda de ramas infestadas se realiza únicamente en árboles pequeños ligeramente infestados, primero se debe identificar las ramas infestadas para proceder a cortarlas y posteriormente se podan las ramas superior e inferior a la rama infestada para así disminuir la probabilidad de que el individuo sea reinfestado por la planta parásita, después de la poda se asegura dejar al menos el 30% de la copa intacta, de no ser así, el individuo debe derribarse (González-Gaona *et al.*, 2017; Conklin, 2008). Esta técnica se ha probado en Xico, Veracruz sobre la infestación de *Arceuthobium globosum*, los hospederos encontrados fueron *Pinus patula*, *P. pseudostrobus* y *P. ayacahuite* en donde el nivel de infestación al arbolado era leve (15%), logrando hasta un 65% de reducción de infestación posterior a la poda (Vega y Negreros, 2016).

- *Control químico*

Para el control químico se han evaluado distintas sustancias, entre ellas el 2,4-D, MCP 4-2-metil-4-cloro-fenoxi y Etephon (2-cloroetil del ácido fosfórico), en árboles jóvenes, obteniendo resultados positivos en el control de la planta parásita debido a que el tejido muestra abscisión en brotes y reducción en la dispersión del mismo, sin embargo, ocurrió un efecto negativo ya que posteriormente, se observó rebrotación de la planta parásita esto debido a que estos químicos no afectan directamente el sistema endofítico del muérdago enano (Shamoun *et al.*, 2003).

En México, se han realizado varios estudios sobre el uso del Etephon en el estado de México y en Michoacán en *Pinus hartwegii* y *P. pseudostrobus* parasitados por *Arceuthobium globosum*, en los cuales determinaron un control de dicha planta parásita al utilizar dosis superiores 2000 ppm del producto disuelto en agua. El Etephon es asperjado sobre los brotes aéreos del muérdago, sin embargo, el control de la planta parásita se logró de manera temporal (Plascencia *et al.*, 2007).

Por otro lado, se ha probado la aspersion de 2,4-D al 40 y 72% p/v, en donde no se reportan resultados concluyentes, debido a que el equipo para el asperjado es difícil de conseguir y de transportar (Ríos-Insua, 1994).

Otra manera de evaluar el efecto de productos químicos es inyectarlos directamente en el xilema de la planta hospedera logrando así un ataque sistemático al parásito; para llevar a cabo este método de control existen cuatro técnicas: macroinyección, implantes, microinyección e inyecciones a

baja presión. Bajo esta metodología se evaluó el papel del 2,4-D amina al 1% y Glifosato al 3% donde se inyectaron a baja presión 5 mL por cada centímetro de diámetro a los fustes de *Pinus teocote* y *P. hartwegii* en los meses de junio a agosto durante la floración del muérdago, teniendo eficiencias superiores al 80% (Arriola *et al.*, 2014).

- *Control biológico*

Se han realizado pocos estudios que engloben estrategias de control para muérdago enano con organismos vivos o atenuados, pero ninguno desde el punto de vista bioquímico de microorganismos que produzcan sustancias importantes en el ciclo de vida de la planta parásita; algunos de los más destacados evalúan la acción de hongos fitopatógenos sobre diferentes tejidos de la planta parásita y en otros casos se han empleado larvas de insectos, como lepidópteros, para estudiar su efecto antagónico y de control sobre muérdago enano (Shamoun *et al.*, 2003).

Actualmente en México se han estudiado algunos insectos que se alimentan de los tallos tiernos de muérdago enano, entre ellos están los hemípteros *Neoborella* sp. en *Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum*; *Hemiberlesis* sp. sobre *A. vaginatum* subsp. *durangense*; *Niveaspis volcanica*, frecuente en *A. gillii* subsp. *nigrum*, *A. strictum*, *A. vertilliflorum*, *A. vaginatum* subsp. *vaginatum*, *A. vaginatum* subsp. *durangense*, *A. globosum* subsp. *globosum* y *A. globosum* subsp. *grandicaule*; en todos ellos se logran ver resultados rápidamente, sin embargo, son una estrategia de difícil manejo y monitoreo, por ello se buscan alternativas más amigables para el control de esta planta parásita (Hawksworth y Stevens, 1970).

Entre las estrategias propuestas, después del uso de insectos, están los hongos fitopatógenos de muérdago enano, estos se pueden localizar en distintas partes del tejido de estas plantas parásitas y se pueden clasificar en dos grupos principales: aquellos que causan daños sobre tejido aéreo y aquellos que causan cáncer (Hawksworth y Geils, 1996).

Algunos ejemplos de hongos que afectan tejido aéreo son: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cylindrocarpon gillii* y *Caliciopsis arceuthobii*; *Alternaria alternata*, en donde se puede observar que causan un sobre flujo de resinación en las ramas infectadas del hospedero (*A. americanum*), así como marchitez en tallos y antracnosis en el parásito (Mark *et al.*, 1976; Plascencia *et al.*, 2007).

También se han evaluado los hongos *Cytospora abietis* Sacc. (Hawksworth y Wiens, 1972) y *Neonectria neomacrospora* (Mantiri *et al.*, 2001) sobre tejido de muérdago enano, en donde se observó reducción del 30% de la parte

aérea del tejido (Funk *et al.*, 1973) y además, ambos hongos tienen la capacidad de destruir semillas, brotes y hasta el sistema endófito del muérdago. Sin embargo, se encontró que estas especies de hongos tienen la capacidad de matar el tejido del pino hospedero causando cáncer, afectando así la supervivencia de la planta parásita (Shamoun y De Wald, 2002).

Por otra parte, Cortéz en 2013, evaluaron el efecto de *Alternaria alternata* y *Fusarium proliferatum* como control biológico de *Arceuthobium vaginatum* sobre *Pinus* spp. en el parque nacional Iztaccihual-Popocatepetl (PNIP) y la Malinche (PNLM) en donde se observó que después de 90 días de la aplicación de las cepas fúngicas, provocaron marchitez y clorosis en las plantas parásitas.

Plascencia *et al.* en 2007, evaluaron el efecto de *Pestalotiopsis* y *Colletotrichum gloeosporoides* junto con tierra de diatomeas para el tratamiento de *Pinus hartwegii* infectado con muérdago enano. Después del tratamiento se observó marchitez y pérdida de turgencia en *P. hartwegii*, sin producir un efecto significativo de la planta parásita.

Es importante indicar que para la aplicación de una estrategia de control biológico eficiente de muérdago enano, se debe considerar la *especificidad* del hongo fitopatógeno, el cual debe afectar únicamente al parásito sin dañar al hospedero; su *actividad*, en donde se interrumpa directamente alguna etapa del ciclo de vida del parásito; la *productividad alta y fácil* de inóculo para su aplicación a gran escala y la *adaptabilidad del organismo* para su desarrollo y posterior distribución dentro del espacio natural donde se encuentran el hospedero y el muérdago enano (Shamoun, 2003).

Justificación

El muérdago enano (*Arceuthobium* spp.) parasito de *Pinus douglasiana*, se ha distribuido entre los individuos de la población infestándolos en su totalidad, impidiendo así el crecimiento normal de esta especie y por ende reduciendo su tamaño y vigor; lo cual es de gran importancia ecológica debido a que los individuos jóvenes no alcanzan la madurez. Como consecuencia, no existe el repoblamiento natural del bosque y los individuos adultos no cumplen sus funciones dentro del ecosistema por falta de nutrientes, además pierden su importancia económica en la industria maderera.

Por lo tanto, la falta de una estrategia contundente para el control del muérdago enano promueve la búsqueda de una alternativa para su control.

El control biológico ofrece el uso de organismos presentes en el ecosistema, como en este caso hongos, para disminuir el crecimiento de muérdago enano y a su vez impedir el establecimiento de su semilla en el hospedero *P. douglasiana*. Además, el análisis de la etapa de establecimiento de muérdago enano permitirá ampliar el conocimiento del proceso de adhesión del parásito al hospedero.

Hipótesis

Aislados de hongos a partir de ejemplares sanos e infectados de *Arceuthobium* spp., se espera tengan un efecto antagónico con el crecimiento de este parásito. Además, el análisis bioquímico de la viscina permitirá el desarrollo de una estrategia que evite la adhesión de la semilla en *P. douglasiana* y con ello interrumpir el ciclo de vida de esta planta parásita.

Objetivo General

Aislar y caracterizar hongos fitopatógenos como posibles agentes de control biológico de muérdago enano *Arceuthobium* spp., que afecta al bosque de *Pinus douglasiana* en el Área Natural Protegida sierra de Quila, Jalisco, México.

Objetivos Particulares

1. Aislamiento de hongos fitopatógenos relacionados con muérdago enano.
2. Caracterización morfológica macroscópica y microscópica de los hongos fitopatógenos.
3. Caracterización de la viscina y determinación de glicoproteínas en tricomas presentes en semillas de muérdago enano.

Materiales y Métodos

Mapa de georreferencia del Área Natural Protegida Sierra de Quila

Se utilizó el programa de georreferenciación QGIS 3.8 con el cual se realizó un mapa, bajo una malla con cuadrantes cada 1000 m, resaltando las características de la zona, como vegetación, altitud, cuerpos de agua, caminos, carreteras, con la finalidad de obtener una visión general del terreno a evaluar. Con base en este mapa de georreferencia, se establecieron los sitios para realizar los muestreos y colecta de muérdago enano.

Colecta y manejo de muestras de muérdago enano *Arceuthobium* spp.

En la zona de colecta, se realizó la observación de las zonas más infestadas por muérdago enano sobre *Pinus douglasiana* y se georreferenció un punto central en cada una de estas zonas, en total se realizaron 4 colectas dentro del ANP Sierra de Quila. Durante las colectas, se seleccionaron muestras por duplicado de muérdago enano a partir de pinos parasitados, que presentaran características de infección fúngica y se colectó tejido turgente y visiblemente sano; también se colectaron muestras de bayas y semillas con haustorio desarrollado. Las muestras fueron colocadas en bolsas de plástico y tubos estériles, que se guardaron en hieleras para su transporte y su posterior análisis en el laboratorio. Las colectas se realizaron durante los meses de julio, septiembre y octubre.

Aislamiento de hongos a partir de muestras de muérdago enano

Las muestras de muérdago enano se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% en agua destilada estéril, a continuación se enjuagaron 5 veces en agua destilada estéril y se almacenaron en tubos nuevos estériles a 4°C.

Posteriormente se obtuvieron muestras de tejido de 0.5 mm de largo y se colocaron en placas con medio de cultivo para observar el desarrollo de hongos. Los medios de cultivo usados fueron: agar (1.5% p/v) papa (20% p/v)- dextrosa (2% p/v) (PDA); agar (1.5% p/v) Malta (3% p/v) (MA) y agar (2% p/v) extracto de levadura (0.3% p/v), peptona (1% p/v), glucosa (2% p/v) pH 4.5 (YPGA).

Una vez desarrolladas las colonias fúngicas en los medios antes mencionados, se utilizaron para realizar un aislamiento primario en medio PDA y YPGA, incubando a 28°C durante 8 días.

Caracterización morfológica, macroscópica y microscópica de los hongos

Los aislados fúngicos se caracterizaron con base en las características de las colonias que estos forman, como elevación, borde, aspecto, consistencia y color, características que se observaron durante el periodo de incubación. Además, se realizó la adquisición de imágenes del crecimiento fúngico utilizando un microscopio estereoscópico (Nikon).

A su vez, se hicieron microcultivos fúngicos y preparaciones de estos teñidas con Blanco de Calcoflúor para el análisis de su morfología microscópica con técnicas de luz transmitida y epifluorescencia. Las muestras fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia (Leica, DMLS) con una cámara AxioCam ICc1 (Carl Zeiss) usando el filtro UV (400-420nm).

Los aislamientos obtenidos se clasificaron de acuerdo con sus características morfológicas mediante claves taxonómicas; para la identificación se usó la clave de Barnett y Binder (1973) y Campbell *et al.* (1996).

Análisis bioquímico de la viscina y tricomas de las semillas de muérdago enano

– Obtención de la viscina a partir de frutos de muérdago enano

Se colectaron los frutos de las muestras de muérdago, se colocaron en tubos estériles de 15 mL y se mantuvieron durante 1 h a 28 °C, para promover que los frutos liberaran la viscina tras la explosión de estos. Posteriormente, se recuperó la viscina y se colocó en un tubo nuevo de 15 ml, al resto del tejido del fruto se le añadió 8 mL de agua destilada estéril, para recuperar el resto de la viscina. Paralelamente, se le añadieron 20 µL de una mezcla de inhibidores de proteasas (Mini cOmplete™, Roche) y se almaceno a -20 °C hasta su posterior uso.

Por otro lado, a partir de las semillas se obtuvieron los tricomas; estas se colocaron en una caja de petri de vidrio en hielo, se añadieron 3 mL de agua destilada estéril y con ayuda de pinzas y bisturí se desprendieron los tricomas de la testa de 32 semillas. Enseguida, se pasó el líquido obtenido a un tubo estéril de 15 mL, este se centrifugó (Centrífuga 5430 Eppendorf) a 12,000 rpm para eliminar restos de tejido vegetal y se transfirió el sobrenadante a un tubo estéril de 15 mL que contenía 0.5 mL de SDS al 2%, 1 mL de PBS y 20 µL de una mezcla de inhibidores de proteasas (Mini cOmplete™, Roche); luego se sonicó la muestra a 20 KHz y 90% de amplitud,

durante 15 segundos con un procesador de líquidos ultrasónicos Vibra-Cell™ VCX130 (Sonics®); la muestra se almacenó a -20°C.

– *Purificación de proteínas a partir de Tricomas*

Se preparó una columna de desalado de 1.61 mL de volumen con resina p6 de 50-100 mesh (BioRad™), la resina se vertió directamente en la columna para completar 2/3 partes del largo de esta (8.2 cm), se equilibró con agua desionizada y se dejó reposar durante 24 horas a 4°C. Posteriormente, para la purificación de proteínas de tricomas, primero se realizó un lavado con 5 mL de agua desionizada, luego con 10 mL de regulador Tris-NaCl 1 N y finalmente con 15 mL de agua desionizada; en seguida se añadió la muestra y se equilibró con regulador Tris-NaCl 1N, se colectaron fracciones de 1 mL a las que se añadieron 10 µL de una mezcla de inhibidores de proteasas (Mini cOmplete™, Roche). Las fracciones se almacenaron a -20°C para su posterior cuantificación de proteínas y carbohidratos, como se muestra a continuación.

– *Determinación de proteínas y carbohidratos totales*

La concentración de proteína de las muestras de viscina y tricomas se determinó por el método de Lowry (1951) y los datos de absorbancia obtenidos fueron referidos a una curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA).

La concentración de carbohidratos de las muestras de viscina y tricomas se determinó de acuerdo con la metodología de Dubois (1956) y los datos de absorbancia obtenidos fueron referidos a una curva estándar con glucosa.

Las lecturas de absorbancia se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro UV-visible de microplacas Epoch (BioTek®).

– *Determinación de grupos funcionales mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)*

Muestras de viscina y tricomas, previamente liofilizadas, fueron sometidas a FT-IR utilizando un tensor 27 Spectrum (Bruker, OPUS ver. 6.5. A) y un total de 32 escaneos fueron realizados para obtener el espectro.

– *Determinación del perfil de proteínas totales*

Para la determinación del perfil de proteínas, las muestras tanto de viscina como de tricomas se liofilizaron y posteriormente se realizó la separación de las proteínas en geles de poliacrilamida al 10 % para la muestra de viscina y al 7.5% para la muestra de tricomas, ambos en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), usando la técnica descrita por Laemmli (1970).

Para el teñido del perfil proteico se usó el kit comercial de Bio-Rad© Silver Stain Plus Kit y la adquisición de imágenes se realizó en un equipo ChemiDoc MP System-BioRad utilizando el software Image Lab™ software (Bio-Rad©); por último se conservó el gel en ácido acético 5% para su almacenamiento.

– *Detección de glicoproteínas mediante tinción en gel (Fucsina básica).*

El gel obtenido con el patrón de proteínas de la muestra de tricomas se tiñó adicionalmente para identificación de glicoproteínas; para ello se realizó la técnica propuesta por McGuckin y McKenzie (1958), la adquisición de imágenes se realizó con un dispositivo móvil y se conservó el gel en etanol 95% para su almacenamiento.

– *Determinación de monosacáridos en viscina y tricomas*

Para la determinación de la composición de azúcares en las muestras de viscina y de tricomas, estas se lavaron con agua desionizada y se liofilizaron. Posteriormente se sometieron a una hidrólisis con ácido trifluoroacético 2 M y se calentaron a ebullición durante 3 h. El hidrolizado se recuperó y se analizó por cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución en un equipo Dionex utilizando el protocolo reportado anteriormente por (Lozoya-Pérez *et al.*, 2018). La separación de los azúcares se efectuó por su elución en la columna CarboPac PA200 utilizando un gradiente de acetato de sodio en NaOH 0.15 M y flujo de 0.5 mL/min. Las condiciones de elución con el gradiente fueron: 0–5 min, 45–75 mM NaOH; 5.1–15.0 min, 90 mM de NaOH; 15.1–17.0 min, 105 mM de NaOH con acetato de sodio 75 mM; 17.1–20.0 min, 75 mM de NaOH con acetato de sodio 150 mM; y, 20.1–25.0 min, 45 mM NaOH; todo ello a temperatura de columna de 25°C. La detección de los azúcares se realizó con el detector amperométrico del equipo. Como controles se utilizaron corridas de estándares de glucosa, manosa y N-acetilglucosamina aplicados, individualmente o su mezcla, como estándares externos, o bien aplicados individualmente con las muestras de viscina y tricoma, como estándares internos.

Resultados

Mapa de georreferencia del Área Natural Protegida Sierra de Quila, Jalisco, México

Se obtuvo un mapa de georreferencia para seleccionar las zonas con mayor densidad de individuos de *Pinus douglasiana*, tomando como referencia las bases de datos proporcionadas por el INEGI, en cuanto a tipo de vegetación presente en el ANP Sierra de Quila. Las capas descargadas se ensamblaron en el programa QGIS 3.8 (Figura 5).

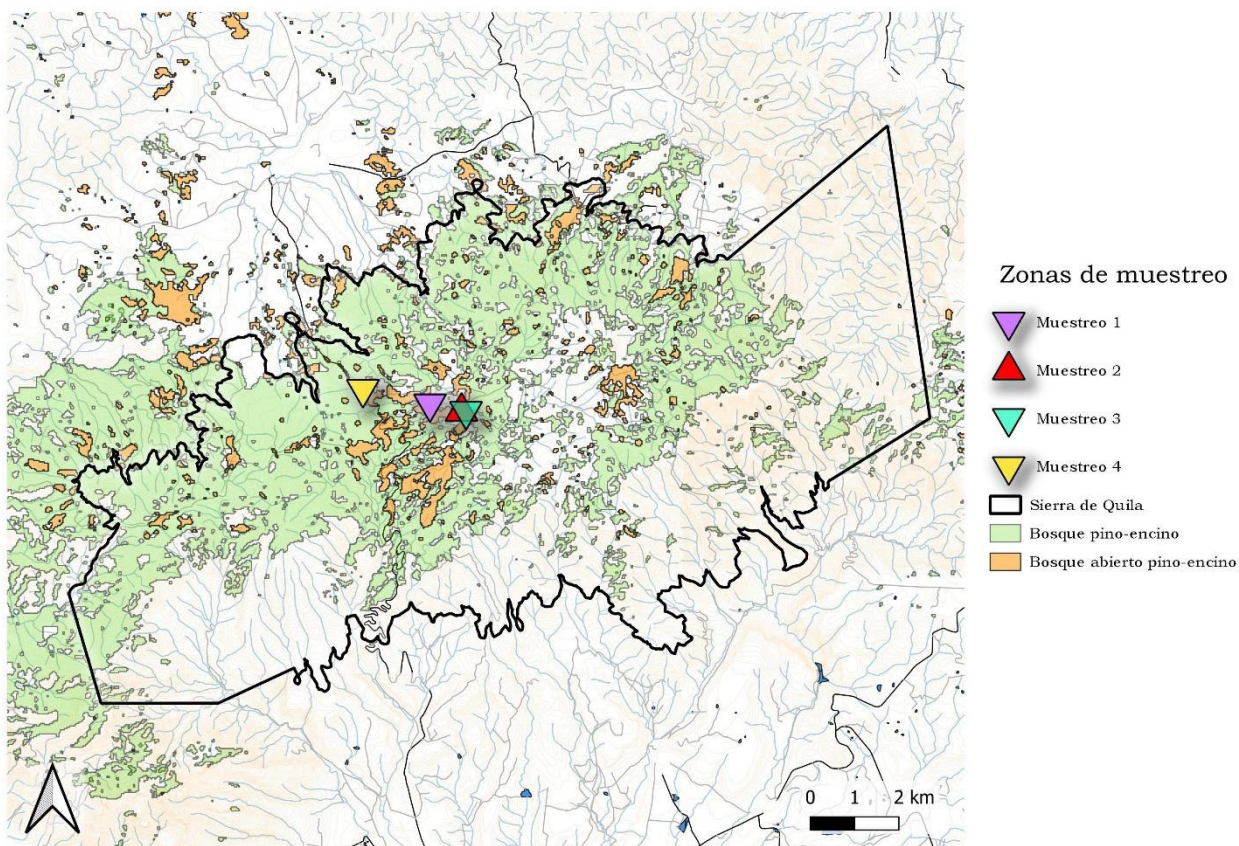


Figura 5. Mapa del Área Natural Protegida Sierra de Quila obtenido en QGIS 3.8. Se muestran las zonas donde se concentra el bosque de pino-encino (verde), bosque abierto de pino-encino (naranja) y las zonas de muestreo.

Una vez que se realizó la visita al Área Natural Protegida, se seleccionaron los puntos con mayor incidencia de infección de muérdago enano sobre *Pinus douglasiana* y con una alta densidad de arbolado joven (Figura 6).



Figura 6. Vista de la vegetación presente en el punto de muestreo 1, se observan de izquierda a derecha ejemplares de *Pinus lumholtzii*, *Quercus* sp. y *Pinus douglasiana*, respectivamente.

Se tomaron 4 puntos de referencia correspondientes a las zonas de muestreo y se muestran en la Figura 7.

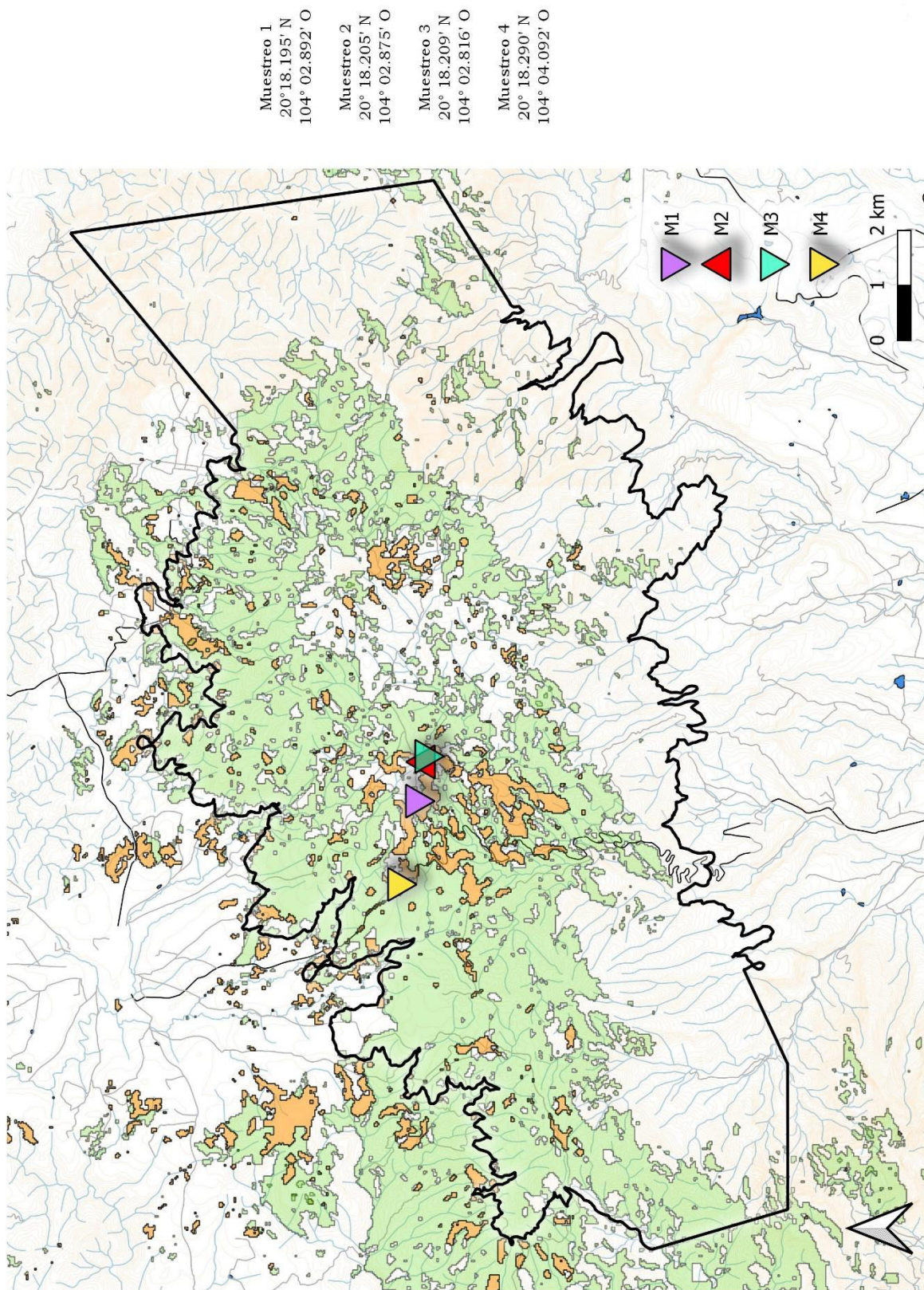







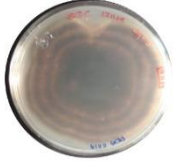

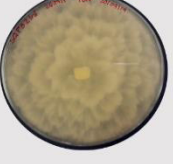
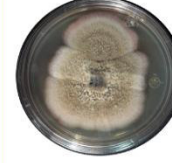
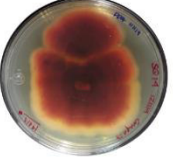
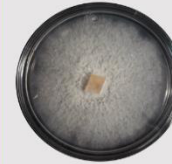
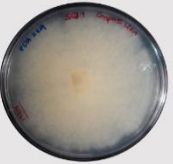
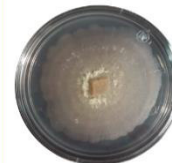
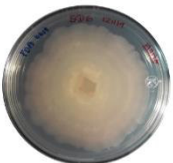
Figura 7. Puntos de referencia correspondientes a las zonas de muestreo (M).

Caracterización morfológica de los aislados fúngicos de *Arceuthobium* spp.

Se obtuvieron un total de 15 hongos, de los cuales 10 pertenecen a aislados obtenidos de tejido necrosado o con presencia fúngica y 5 aislados obtenidos a partir de muestras de tejido sano. Adicionalmente, a los aislados se les asignó un código, SQ por ser provenientes de Sierra de Quila y se les añadió una letra si se aislaron a partir de tejido sano, y un número, si su origen fue de tejido con infección fúngica.

De los microorganismos aislados, se determinó algunas características macroscópicas (Tabla 1) y microscópicas (Tabla 2) importantes. A nivel macroscópico, los aislados fúngicos presentaron diversas características como desarrollo de micelio aéreo, textura, aspecto, entre otras (Tabla 1). A nivel microscópico, en algunos casos fue posible observar micelio septado (Tabla 2) y en otros se logró observar estructuras reproductivas como esporas (Tabla 2). En este caso, de acuerdo con las características de las esporas, los resultados indican que posiblemente pertenezcan a los géneros *Pestalotiopsis* spp., *Ulocladium* spp. y *Alternaria* spp. (Tabla 2). Estos hongos fueron aislados de tejido infectado de muérdago enano.

Tabla 1. Características morfológicas macroscópicas de los hongos aislados a partir de muérdago enano.

Hongo	Morfología macroscópica		Textura	Superficie	Aspecto	Consistencia	Borde de colonia
	Anverso	Reverso					
<i>Pestalotiopsis</i> spp.	 Blanco brillante	 Blanco	Algodonosa	Elevada con micelio aéreo	Cerebriforme	Suave	Irregular
<i>Ulocladium</i> spp.	 Verde oscuro con orillas blancas	 Negro con orillas blancas	Algodonosa	Elevada con micelio aéreo	Cerebriforme	Suave	Irregular
<i>Alternaria</i> spp.	 Café claro	 Café	Algodonosa	Plana	Cerebriforme	Suave	Irregular
SQ 1	 Blanco	 Blanco	Algodonosa	Elevada con micelio aéreo	Cerebriforme	Suave	Irregular
SQ 2	 Centro verde, blanco, rosa, blanco	 Rojo	Algodonosa	Elevada con micelio aéreo	Cerebriforme	Suave	Irregular
SQ 3	 Beige	 Beige	Algodonosa	Plana	Cerebriforme	Suave	Irregular
SQ 4	 Blanco opaco	 Beige	Cérea	Elevada con micelio aéreo	Cerebriforme	Suave	Irregular

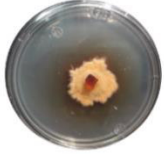
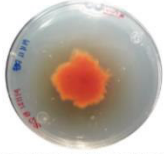
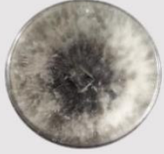
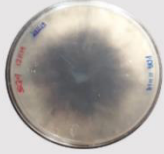
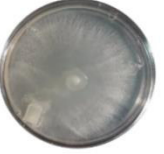
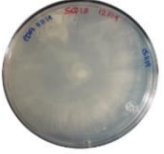
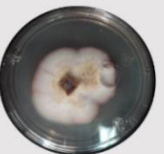
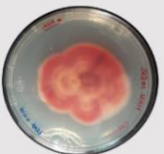
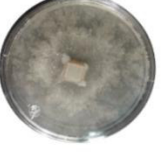

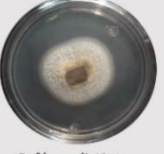
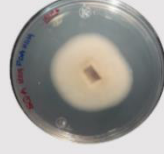

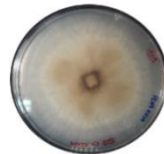
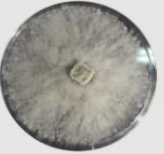

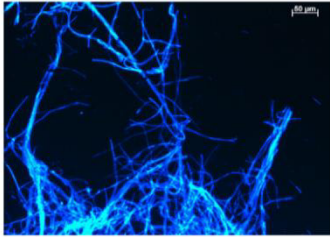
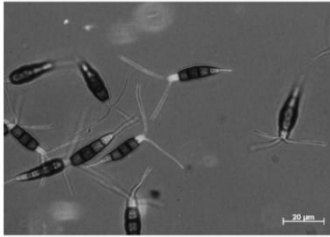
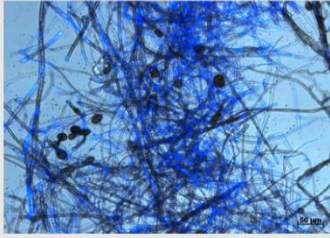



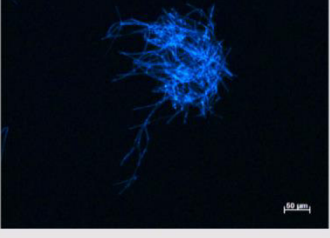

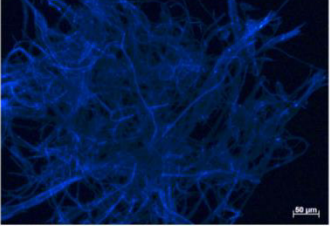
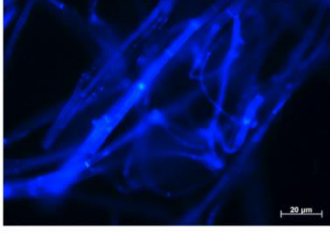





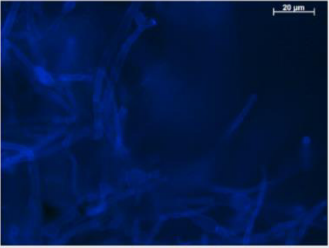

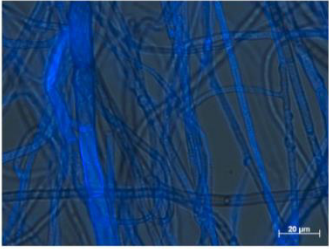
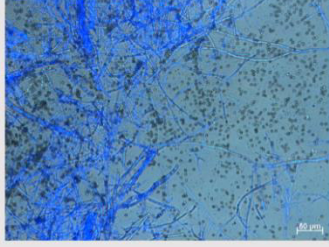

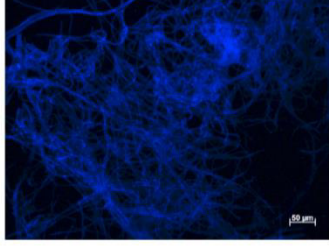
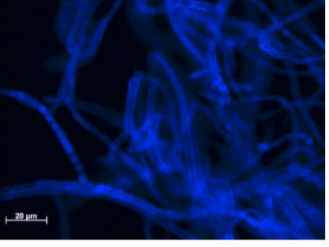
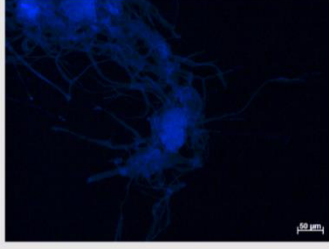
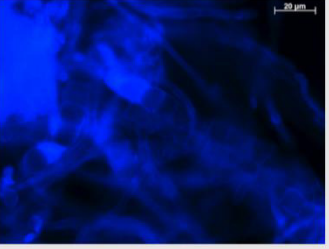
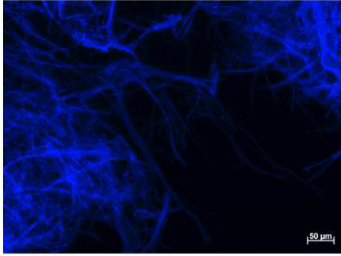
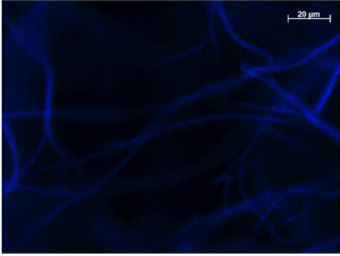

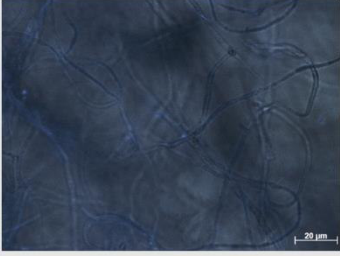
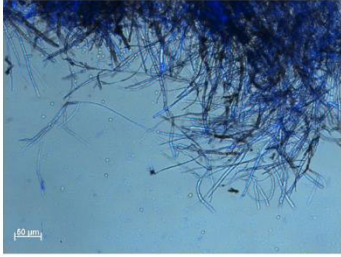
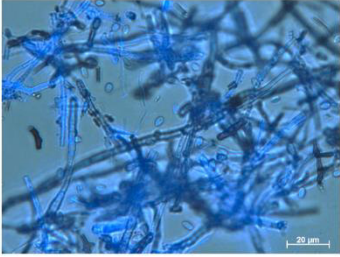
Hongo	Morfología macroscópica		Textura	Superficie	Aspecto	Consistencia	Borde de colonia
SQ 5	Anverso	Reverso	Algodonosa	Elevada con micelio aéreo	Cerebriforme	Suave	Irregular
							
	Naranja y amarillo	Naranja con liberación de pigmento					
SQ 6			Algodonosa	Plana	Cerebriforme	Suave	Irregular
	Blanco, gris y negro	Negro					
SQ 7			Cérea	Plana	Cerebriforme	Firme	Irregular
	Blanco opaco con puntos verdes	Blanco					
SQ A			Algodonosa	Elevada con micelio aéreo	Cerebriforme	Suave	Irregular
	Rosa, blanco y café en el centro	Rosa mexicano					
SQ B			Cérea	Plana	Cerebriforme	Firme	Irregular
	Café opaco	Café					
SQ C			Algodonosa	Plana	Cerebriforme	Suave	Irregular
	Café en distintos tonos	Café en distintos tonos					
SQ D			Algodonosa	Elevada con micelio aéreo	Cerebriforme	Suave	Irregular
	Blanco	Gris					
SQ E			Algodonosa	Elevada con micelio aéreo	Cerebriforme	Firme	Irregular
	Café grisáceo y amarillo	Café					

Tabla 2. Características morfológicas microscópicas de los hongos aislados a partir de muérdago enano.

Hongo	Morfología microscópica	
	10x	40x
<i>Pestalotiopsis</i> spp.		
<i>Ulocladium</i> spp.		
<i>Alternaria</i> spp.		
SQ 1		
SQ 2		
SQ 3		

Hongo	Morfología microscópica	
	10x	40x
SQ 4		
SQ 5		
SQ 6		
SQ 7		
SQ A		
SQ B		

Hongo	Morfología microscópica	
	10x	40x
SQ C		
SQ D		
SQ E		

Análisis bioquímico de la viscina y tricomas de las semillas de muérdago enano

El análisis bioquímico de proteínas y carbohidratos totales demuestra que para ambas biomoléculas, la viscina tiene una mayor concentración de proteína que en tricomas (Tabla 3). Mientras que en el caso de carbohidratos, los tricomas de la semilla presentan una mayor concentración con respecto a viscina (Tabla 3). En lo que se refiere al pH, la viscina presenta un pH de 6.0 y en tricomas el pH es de 5.0.

Tabla 3. Cuantificación total de proteína y carbohidratos totales de viscina y tricomas.

Muestra	Proteína total	Carbohidratos totales
Viscina	0.0623 mg/mL	0.1785 mg/mL
Tricomas	0.0149 mg/mL	0.3926 mg/mL

El análisis del perfil de proteínas indica la presencia de proteínas de mediano y bajo peso molecular, con una movilidad relativa de 50 a 20 kDa para viscina, mientras que en tricomas las proteínas son mayoritariamente de alto peso molecular (198 kDa) (Figura 8). Por otro lado, se determinó la presencia de glicoproteínas en ambas muestras, en el caso de los tricomas, la tinción con fucsina básica reveló que la banda con una movilidad relativa de 198 kDa, corresponde a una glicoproteína (Figura 9)

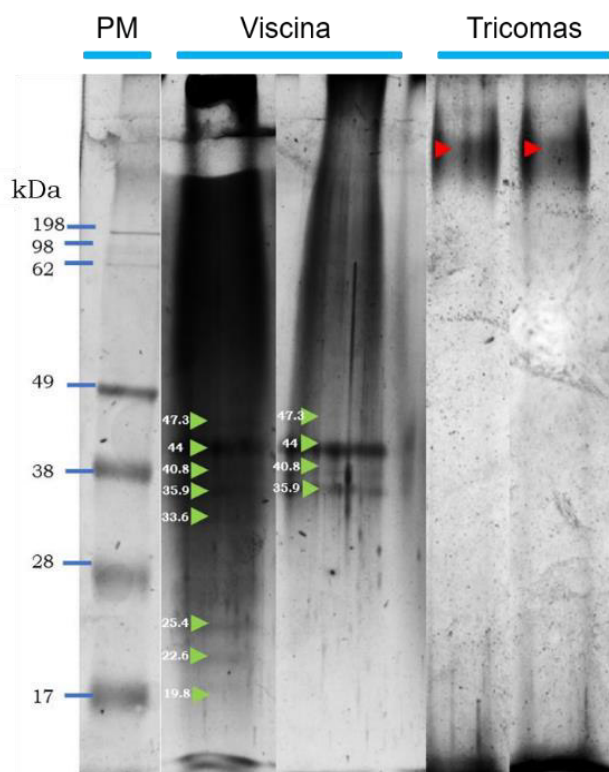


Figura 8. Perfil de proteínas totales de la viscina y tricomas. La separación de las proteínas se realizó mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes en geles de poliacrilamida 10%. El gel fue teñido mediante la tinción con plata. PM: peso molecular.



Figura 9. Determinación de glicoproteínas totales en tricomas. Homogenado total (HT) y fracciones 1 y 2 (F1 y F2, respectivamente) obtenidas después de la purificación. Electroforesis en condiciones desnaturizantes en gel de poliacrilamida 7.5%, teñido con fucsina básica. (0.4%).

La determinación de los monosacáridos en la viscina revela la presencia de glucosa y manosa (Figura 10). Por otra parte, en los tricomas de la semilla se determinó la presencia de glucosa y N-acetilglucosamina (Figura 11).

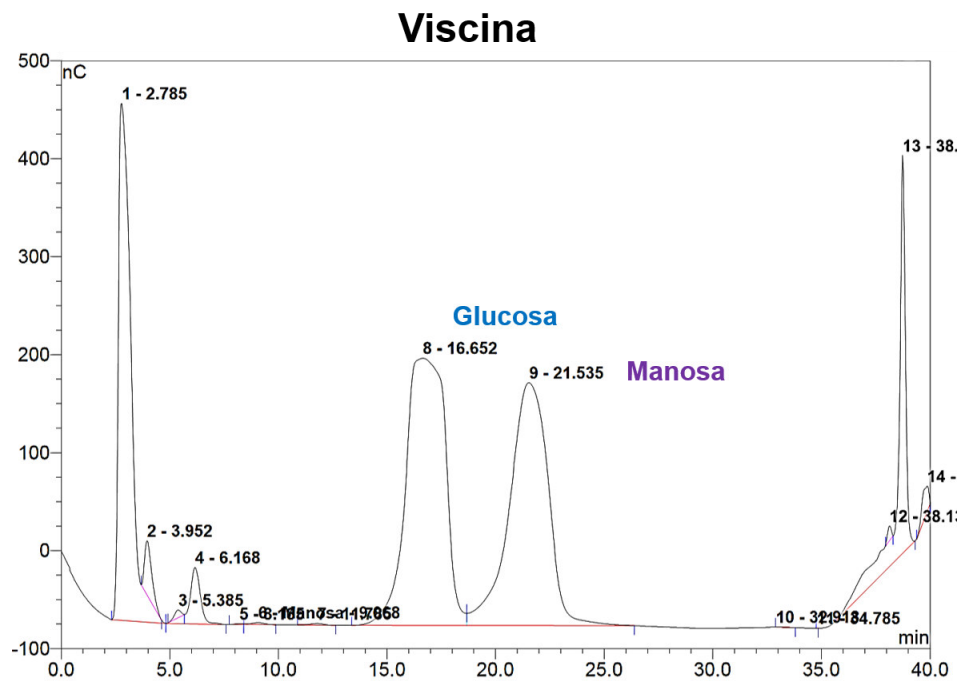


Figura 10. Determinación de los monosacáridos en viscina mediante HPLC.

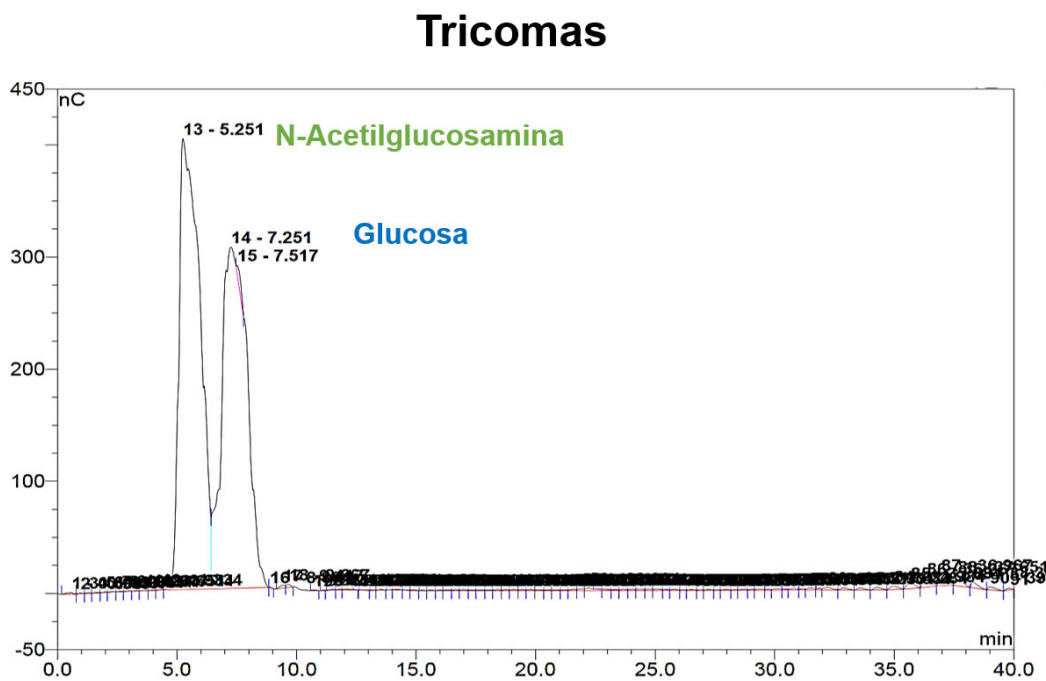


Figura 11. Determinación de los monosacáridos en tricomas mediante HPLC.

El análisis FT-IR, demuestra la presencia de grupos funcionales pertenecientes a carbohidratos y proteínas. En viscina, los grupos pertenecientes a carbohidratos se encuentran desde 667 cm^{-1} a 1442 cm^{-1} y en proteínas se encuentran entre 1602 cm^{-1} a 2362 cm^{-1} (Figura 12). Para el caso de tricomas, los grupos funcionales pertenecientes a carbohidratos se observan entre 663 cm^{-1} a 1450 cm^{-1} y para proteínas y 1606 cm^{-1} a 2160 cm^{-1} (Figura 13). Estos resultados indican, que los carbohidratos y las proteínas son las principales biomoléculas presentes en viscina y tricomas de la semilla.

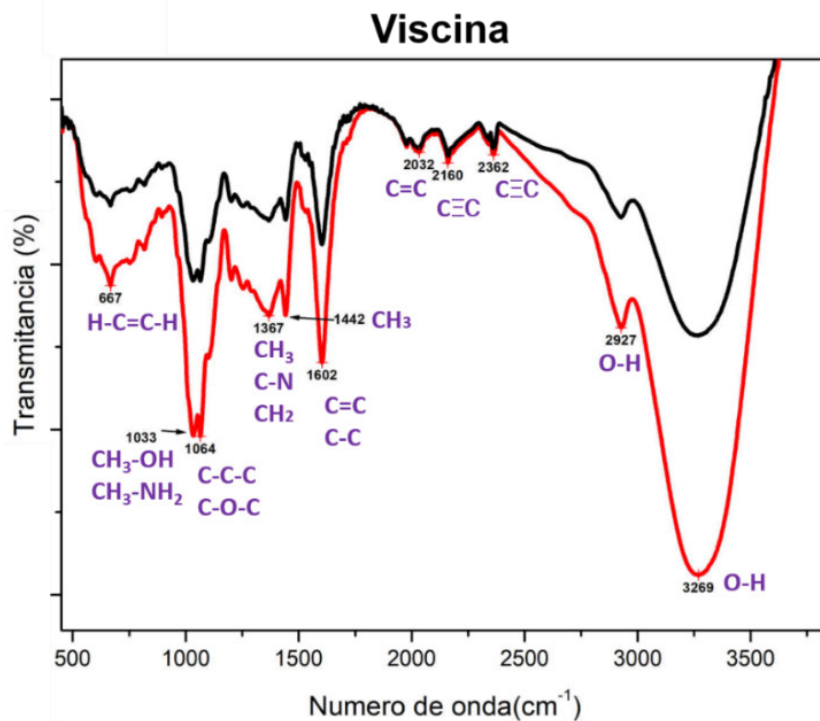


Figura 12. Determinación de los grupos funcionales en viscina mediante espectroscopía Infrarroja transformada de Fourier.

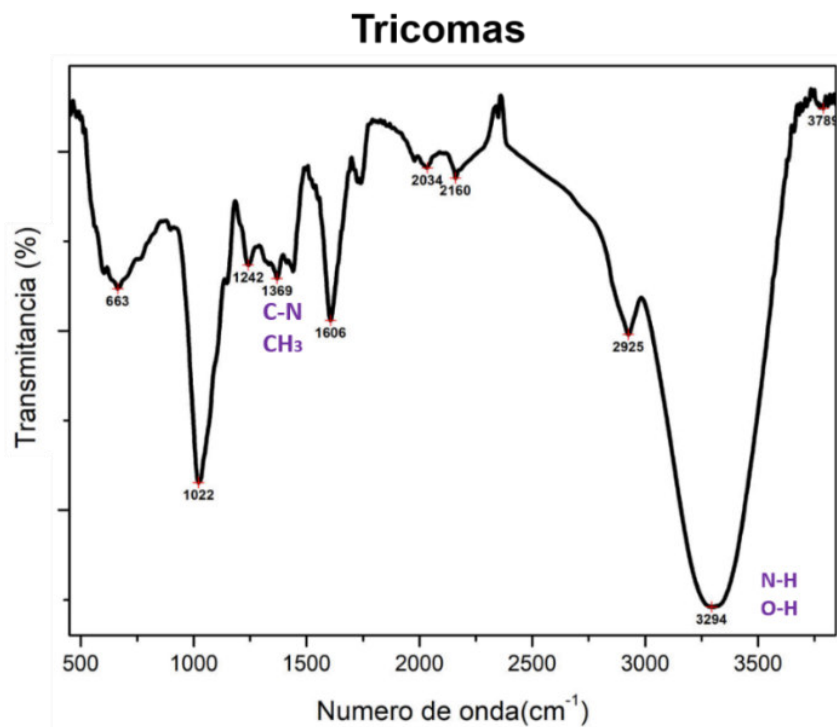


Figura 13. Determinación de los grupos funcionales en tricomas mediante espectroscopía Infrarroja transformada de Fourier.

Además, cabe señalar que las semillas poseen unas estructuras denominadas *tricomas*, estos se encuentran dispuestos alrededor de ella y son esenciales para la etapa de dispersión junto con la *viscina*, debido a que permiten la adhesión de la semilla a cualquier parte de la planta y son fuente de nutrientes para la etapa de establecimiento (Figura 14).

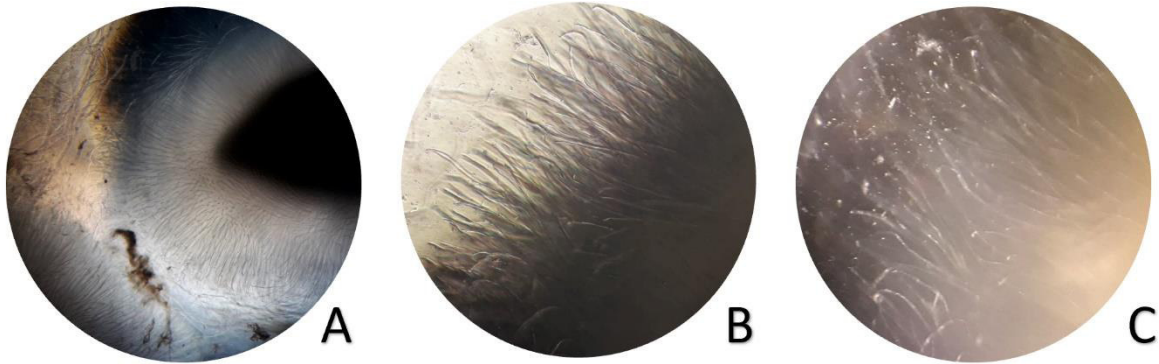


Figura 14. Viscina y tricomas de semilla vistos en microscopio invertido, A) 4x, B) 10x, C) 10x.

Discusión

El control biológico de plantas parásitas es un área que ha tomado importancia en México en los últimos 10 años (González-Gaona *et al.*, 2017), debido a su amplia dispersión en los bosques del territorio nacional, así como de parques y jardines en diversas ciudades o poblaciones del país (Alvarado *et al.*, 2016). Actualmente el muérdago enano, *Arceuthobium* spp., es una planta parásita que afecta al bosque *Pinus douglasiana* en el Área Natural Protegida Sierra de Quila.

El control biológico es considerado como una estrategia ecológica y una alternativa plausible, en el manejo de parásitos y enfermedades. El uso de hongos en el control biológico es un área de investigación que ha repuntado en los últimos años y específicamente en el control de plantas parásitas (Press y Phoenix, 2005; Westwood *et al.*, 2010). En este sentido, se realizó este estudio para aislar hongos fitopatógenos del ANP de Sierra de Quila, con la finalidad de utilizarlos como agentes de control biológico de muérdago enano. Para este propósito, un total de 15 aislados diferentes, fueron obtenidos a partir de muestras de muérdago enano. Con base en sus características morfológicas, se lograron identificar tres hongos, los cuales corresponden a los géneros de *Pestalotiopsis* spp., *Alternaria* spp. y *Ulocladium* spp. Para el género *Pestalotiopsis*, Maharachchikumbura *et al.* (2011) mencionan que las conidias presentan cinco células, apéndices apicales y basales; lo cual coincide con lo observado. Así mismo Barnett y Binder (1973) indican que el desarrollo de micelio es aéreo y septado, con presencia de pigmentación estrictamente ligada a la especie. Por otra parte, el género *Alternaria* spp., presenta esporas redondas a ovaladas, divididas internamente en 4 a 5 segmentos circulares y están altamente melanizadas (Campbell *et al.*, 1996), similar a las esporas aisladas en este estudio. Mientras que para el género *Ulocladium* spp., Vásquez *et al.*, (2003) mencionan que presenta esporas visualmente muy parecidas a las del género *Alternaria*. Sin embargo, la principal diferencia radica en la presencia de 3 divisiones en la espora, lo cual confirma nuestro resultado. Adicionalmente, Campbell *et al.* (1996) indican, que estas esporas están altamente melanizadas con desarrollo de micelio aéreo melanizado.

Respecto al uso de hongos como agentes de control biológico en México, se ha utilizado a *Pestalotiopsis* spp., *Colletotrichum* spp. y *Neonectria* spp., en distintas zonas de Michoacán, Jalisco y Durango. En este trabajo, se demostró que estos hongos provocan necrosis en los ápices, desprendimiento de brotes y pérdida de turgencia en menos del 10% del

área total en *Arceuthobium globosum*, parásito de *Pinus hartwegii*. (Plascencia *et al.*, 2007).

Mientras que para el género *Alternaria*, se ha reportado que *A. alternata* induce marchitez y muerte en el 60% de los brotes de muérdago enano. Sin embargo, provoca un sobre-flujo de resinación de las ramas infectadas del hospedero (Reséndiz *et al.*, 2012). Por otro lado, se evaluó la acción de *A. alternata* junto con *Fusarium proliferatum* contra *Arceuthobium vaginatum* en el Parque Nacional Iztaccíhuatl- Popocatepetl, en donde se reporta que después de 90 días de aplicación de una suspensión de conidias, se provocó marchitez y cambio de coloración sobre el 40% de la superficie total de la planta parásita (Cortés, 2013).

Con respecto al género *Ulocladium* spp., no se tienen reportes de su aislamiento ni evaluación sobre ninguna especie de muérdago enano. Actualmente, se ha reportado que está asociado con el fenómeno de decaimiento forestal en pináceas (García-Garrido, 2017).

Es importante señalar, que pese a la evidencia morfológica que se tiene respecto a estos hongos, es necesario realizar un análisis molecular de los 15 aislados fúngicos, ya que esta información será relevante para los posteriores ensayos del control biológico en muérdago enano.

Durante este estudio se determinó que las semillas se encuentran recubiertas de estructuras denominadas tricomas, que en conjunto con la viscina, ayudan al proceso de adhesión de la semilla al hospedero. Por ello, otro aspecto importante que se abordó en este estudio fue el análisis bioquímico de viscina y tricomas.

Para viscina, los datos muestran que presenta un pH 6.0 y contiene proteínas en un rango de 50 a 20 kDa. Gedalovich *et al.* (1989) reporta un alto contenido de glicina e histidina. Cabe mencionar, que actualmente no se ha reportado cuál es la función de las proteínas presentes en la viscina. Por otro lado, el análisis de carbohidratos, indica que esta biomolécula es el principal componente de la viscina, destacando la presencia de glucosa y manosa. En otras especies de muérdago como *Arceuthobium tsugense*, Paquet *et al.* (1986) ha reportado la presencia de celulosa y ácido D-galacturónico, dichas moléculas le proporcionan a esta su propiedad higroscópica. Así mismo, Gedalovich *et al.* (1989) en viscina de *Arceuthobium americanum*, determinó la presencia de arabinosa, galactosa, xilosa, glucosa y manosa. Estos resultados coinciden con la determinación, al menos, de glucosa y manosa en *Arceuthobium* spp.

En lo que respecta a la composición de los tricomas de la semilla, el estudio demostró un pH de 5.0, así como la presencia de proteínas y carbohidratos,

estos últimos se encuentran en mayor concentración. Además, se determinó la presencia de glucosa y N-acetilglucosamina. Por otra parte, se identificó una glicoproteína de 198 kDa. Actualmente, no existen estudios enfocados en la caracterización y función de las proteínas en estas estructuras.

En este sentido, es fundamental dilucidar la participación de los componentes de los tricomas y la viscina durante la interacción con *P. douglasiana*.

Conclusiones

1. Se obtuvieron 15 aislados fúngicos a partir de tejido de *Arceuthobium* spp. parasitando *Pinus douglasiana*.
2. Se identificaron tres géneros de hongos: *Pestalotiopsis* spp., *Alternaria* spp. y *Ulocladium* spp.
3. Se determinó que la viscina y los tricomas de la semilla, están compuestos principalmente de carbohidratos y proteínas.

Perspectiva

Es necesario realizar una identificación molecular de los 15 aislados fúngicos, para seleccionar aquellas cepas que presenten un potencial en el control biológico de *Arceuthobium* spp.

Por otra parte, la caracterización bioquímica de la viscina y los tricomas de la semilla de *Arceuthobium* spp., permitirá el conocimiento para diseñar estrategias enfocadas a la interrupción del ciclo de vida de esta planta parásita.

Bibliografía

- Alvarado, R.D., Saavedra, R.L.L., y Y. Franco I. (2016). Análisis de la información obtenida en el remuestreo nacional y estatal 2014 del INFyS de los indicadores de la condición de salud de los bosques y selvas en 16 entidades federativas de México. Informe técnico. Comisión Nacional Forestal. México. 153 p.
- Arriola, P. V. G., A. D. Camacho, F. Reséndiz, M., A. R. Gijón, H. (2014). Manual sobre alternativas para el manejo de descortezadores y muérdago enano en áreas naturales protegidas en el eje Neovolcánico Transversal. *Manual Técnico Núm. 13 INIFAPCENID-COMEF*, México. 44p.
- Audesirk, T., Audesirk, G y Byers, B. (2012). Biología. La Vida En La Tierra con Fisiología, 9na edición, pp. 512-523. México: Pearson.
- Barnett, H. L., y Binder, F. L. (1973). The fungal host-parasite relationship. *Annual Review of Phytopathology*, 11: 273-292.
- Bremer Brigitta, Bremer Kåre, Chase Mark W., Fay Michael F., Reveal James L, Soltis Douglas E., Soltis Pamela S. y Stevens Peter F. (2009). «An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnaean Society*, 161: 105-121.
- Caitlin E. Conn and David C. Nelson. (2017). It is not easy being not green: the making of a parasitic plant. *Plant Cell*, 29: 1-9.
- Campbell, C. K., Johnson, E. M., Philpo, C. M. T., y Warnock, D. W. (1996). Identification of Pathogenic Fungi. London, UK: Public Health Laboratory Service, 6: 120-122.
- Christenhusz, M. J. M., J. L. Reveal, A. K. Farjon, M. F. Gardner, R. R. Mill y M. W. Chase. (2011). A new classification and linear sequence of extant gymnosperms. *Phyto taxa*, 19: 55-70.
- Conklin D.A. y Geils, B.W. (2008). Survival and Sanitation of Dwarf Mistletoe-Infected Ponderosa Pine following Prescribed Underburning. *Western Journal for Applied Forestry*, 23(4): 216-222.
- Cortéz, H. M. A. (2013). Hongos antagonistas para el control de muérdago enano (*Arceuthobium vaginatum*) en dos áreas naturales protegidas, del eje Neovolcánico. *Tesis de Licenciatura*. UNAM Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 95 p.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3): 350-356.
- Eguiluz P.T. (1978). Ensayo de integración de los conocimientos sobre el género Pinus en México. *Tesis Profesional*. Universidad Autónoma de Chapingo. Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio en Bosques, Chapingo, México. 68 p.

- García Garrido, S. (2017). Hongos asociados al decaimiento de masas mixtas de *Pinus pinaster* en la Comunidad de Madrid. *Tesis profesional*. Universidad de Valladolid, España. 33 p.
- González-Gaona E., Serrano Gómez C., de Lira Ramos K. V., Quiñonez Barraza S., Sánchez Martínez G., López Pérez I., y Sánchez Lucio R. (2017). Identificación, distribución y control de muérdago enano (*Arceuthobium* spp.) en bosques de coníferas. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Primera edición. ISBN: 978-607-37-0878-4.
- Gedalovich-Shedletzky E., Deborah P. Delmer y Job Kuijt. (1989). Chemical Composition of Viscin Mucilage from Three Mistletoe Species—A comparison, *Annals of Botany*, 64(3): 249–252.
- Gernandt, David S., y Pérez-de la Rosa Jorge A. (2014). Biodiversidad de Pinophyta (coníferas) en México. *Revista mexicana de biodiversidad*. 85:126-133.
- Funk, A., Smith, R. B., y Baranyay, J. A. (1973). Canker of dwarf mistletoe swellings on western hemlock dwarf caused by *Nectria fuckeliana* var *macrospora*. *Canadian Journal of Forest Research* 3: 71-74.
- Hawksworth F.G. (1961). Dwarf mistletoe of ponderosa pine in the Southwest. *USDA Forest Service General Technical Report*, 124(6):112.
- Hawksworth, F. G. (1965). Life tables for two species of dwarf mistletoe I. Seed dispersal, interception, and movement. *USDA Forest Service General Technical Report*.
- Hawksworth, F. G. y D. Stevens. (1970). New taxa and nomenclatural changes in *Arceuthobium* (Visceae). *Brittonia*, 22: 265-269.
- Hawksworth, F. G. y Wiens, D. 1996. Dwarf mistletoes: biology, pathology, and systematics. *Agriculture Handbook* 709. USDA, Forest Service, Washington, DC.
- Hawksworth, F. G. y D. Wiens. (1972). Biology and classification of dwarf mistletoe (*Arceuthobium*) USDA. Forest Service. *Agriculture Handbook* 401. Washington, DC. USA. 234 p.
- Hawksworth, F. G., y Geils, B. W. (1996). Biotic associates. In: Dwarf mistletoes: biology, pathology, and systematics. U.S. Department of Agriculture. *Agriculture Handbook*, 73-89.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193: 265-275.
- Lozoya-Pérez, N. E., Casas-Flores S., de Almeida J. R. F., et al. (2018). Silencing of OCH1 unveils the role of *Sporothrix schenckii* N-linked glycans during the host-fungus interaction. *Infect Drug Resist.* 12: 67-85.

- Lye D (2006). Charting the Isophasic Endophyte of Dwarf Mistletoe *Arceuthobium douglasii* (Viscaceae) in Host Apical Buds. *Annals of Botany*, 97(6): 953-963.
- Maharachchikumbura S. N., Guo L. D., Chukeatirote E., Bahkali A. H. y Hyde K. D. (2011) *Pestalotiopsis*—morphology, phylogeny, biochemistry, and diversity. *Fungal Diversity* 50: 167–187.
- Mantiri, F. R., Samuels, G. J., Rahe, J. E., & Honda, B. M. (2001). Phylogenetic relationships in *Neonectria* species having *Cylindrocarpon* anamorphs inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Canadian Journal of Botany*, 79(3): 334-340.
- Manzanilla, U., Aguirre, Ó. A., y Jiménez-Pérez. (2018). ¿Qué es una conífera y cuantas especies existen en el mundo y en México? *Desde el Herbario CICY*, 10: 168–175.
- Mark, W. R., Hawksworth, F. G., y Oshima, N. (1976). Resin disease: a new disease of lodgepole pine dwarf mistletoe. *Canadian Journal of Forest Research*, 6: 415-424.
- McGuckin, W. F., y McKenzie, B. F. (1958). An improved periodic acid fuchsin sulfite staining method for evaluation of glycoproteins. *Clinical Chemistry*, 4(6): 476-483.
- Narave, F.H. y Taylor, K. (1997). Pinaceae. *Flora de Veracruz fascículo 98*. INECOL-University of California. Xalapa, Ver. 50 p.
- Novoplansky, A. y Williams, M.E. (2013). Plant Interactions. Teaching Tools in Plant Biology: Lecture Notes. The Plant Cell (online)
- Paquet, P. J., Knutson, D. M., Tinnin, R. O., y Tocher, R. D. (1986). Characteristics of viscin from the seeds of dwarf mistletoe. *Botanical Gazette*, 147(2): 156-158.
- Plascencia, G. A., I. López, P., y M. Malagón, A. (2007). Validación del uso de hongos patogénicos para el control del muérdago enano *Arceuthobium* sp. En el estado de Michoacán. Gobierno del Estado y Comisión Forestal de Michoacán. *CONAFOR, México*. 40 p.
- Press, M. C. y Phoenix, G. K. (2005). Impacts of parasitic plants on natural communities. *The New Phytologist*, 166(3):737-751.
- Ramírez-Dávila, J. F. y Porcayo-Camargo, E. (2009). Estudio de la distribución espacial del muérdago enano (*Arceuthobium* sp.) en el Nevado de Toluca, México, utilizando el Método del SADIE. *Madera bosques*, 15(2): 93-112.
- Reséndiz, M. J. F., Pérez, S. M., Olvera, C. L. P., Arriola, P. N. J., y Cortez, H. M. A. (2012). Hongos asociados a muérdago enano (*Arceuthobium globosum*, Hawksworth & Wiens) en el parque nacional Nevado de Toluca. *Resúmenes de la VII Reunión Nacional de Innovación Forestal*. Compiladores R.E. Madrid, A. y J.A. Prieto R. Querétaro, México. P 104.

- Rey, L., A. Sadik, A. Fer, y S. Renaudin. (1991). Trophic relations of the dwarf mistletoe *Arceuthobium oxycedri* with its host *Juniperus oxycedrus*. *Journal of Plant Physiology*, 138: 411-416.
- Rios-Insua, M. V. (1994). Control químico del muérdago enano (*Arceuthobium oxycedri* (DC.)) *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 20 (4): 847-856.
- Rodríguez A. (1983). Muérdago enano sobre Abies, Pinus y Pseudotsuga de México. *Revista Ciencias Forestales*, 45(8): 7-45.
- Roth, L. F. (2001). Dwarf mistletoe-induced mortality in Northwest Ponderosa Pine growing stock. *Western Journal of Applied Forestry*, 16(3):136-141.
- Santiago Pérez A.L., Villavicencio García R., Godínez, Herrera J. J., Chávez Anaya J. M., y Toledo González S.L. (2012). Tamaño de fragmentos forestales en el bosque de pino-encino, Sierra de Quila, Jalisco. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 3(14): 23-38.
- Shamoun, S. F., y L. E. Dewald. (2002). Management strategies of dwarf mistletoes Biological chemical and genetic approaches. In: Geils B., J. Cibrián, T., B. Moody (coord.). *Mistletoes of North America Conifers*. USDA Forest Service Rocky Mountain Research Station. pp 75-82
- Shamoun, S. F., T. D. Rainsfield y B. J. Vander Kamp. (2003). Biological control approach for management of dwarf mistletoes. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 33(3): 373-384.
- Stanton, S. (2006). The differential effects of dwarf mistletoe infection and broom abundance on the radial growth of managed ponderosa pine. *Forest Ecology and Management*, 223: 318-326.
- Sotero García, A. I., Reyes, A., Teresa, T., Martínez Campos, A. R., y Bunge Vivier, V. E. (2018). Conocimiento local del género *Arceuthobium* en un Área Natural Protegida del centro de México.
- Vásquez, E., Piontelli, E., & González, F. (2003). Aspectos morfológicos y moleculares (ITSrDNA) en especies del género *Ulocladium* de suelos desérticos: énfasis en el grupo *U. atrum*. *Boletín Micológico*, 18.
- Vega R. E. (1976). El muérdago enfermedad de bosques de coníferas y hojosas, bosques y fauna. XIII. 1. Departamento de Divulgación Forestal. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. México, 49 pp.
- Vega, M. A., y P. Negreros, C. (2016). Distribución y grado de infección de muérdago en los bosques manejados de la comunidad de Tonalaco, Veracruz. In: El Cofre de Perote, Situación, Perspectivas e Importancia. Naravre, F. H. V., L. Garibay, P., M. A. Chamorro Z., L. R. Álvarez, O., Y. de la Cruz, E. (Coord.) Univ. Veracruzana. *Códice/taller editorial*. Xalapa, Veracruz, 71- 80.
- Westwood, J. H., Yoder J. I., Timko, M. P., and C. W. dePamphilis. (2010). The evolution of parasitism in plants. *Trends in Plants Science*, 15(4): 227-235.

Anexo

- *Participación en congresos nacionales*

VII Simposio de Ecología
18 de septiembre de 2019
Zapopan, Jalisco, México.



XVII encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia
21-25 de septiembre de 2020
León, Guanajuato, México.



*Otorga el presente
Reconocimiento
por su valiosa participación a:*

Ana Fernanda Rosiles Ortega, Lérida Liss Flores Villavicencio, Juan Luis Pichardo Molina, Francisco Martín Huerta Martínez, Cecilia Neri Luna, Julio César Villagómez Castro y José Pedro Castruita Domínguez

Por el trabajo:

Estrategias para el control de muérdago enano, *Arceuthobium spp.*, parásito de *Pinus douglasiana*

