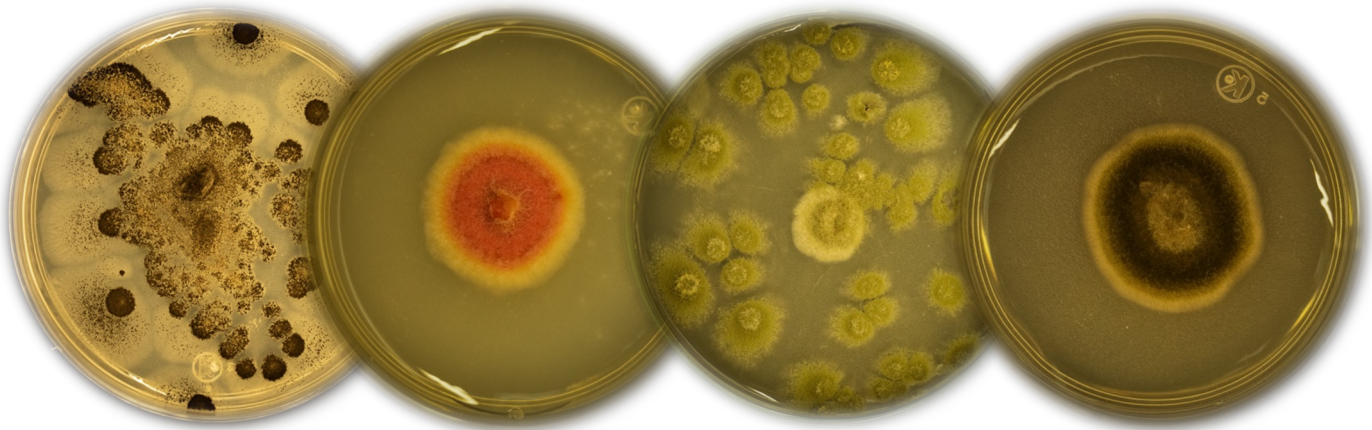


Manual para el aislamiento de hongos fitopatógenos para su uso como agentes de control biológico para *Arceuthobium* *globosum* y *A. vaginatum*



Angel Rolando Endara Agramont
Alma Abigail Luna Gil
Miriam Alejandra Rosas Sánchez



CONTENIDO

1.	Introducción.....	3
	Objetivo.....	4
2.	Generalidades del muérdago.....	4
3.	Hongos y sus características principales	6
3.1.	Morfología del hongo.....	6
4.	Hongos fitopatógenos	7
5.	Los hongos como agentes de control biológico.	8
6.	Recolección de material vegetal para el aislamiento de los hongos.....	12
6.1.	Criterio para la recolección de muestras de muérdago con presencia de hongos.....	12
6.2.	Aislamiento	13
6.3.	Preparación de los medios	15
7.	Medios de cultivo	17
7.1.-	Tipos de medios de cultivo	17
8.	Fermentación sólida.....	19
9.	Metodología para realización del PCR para la identificación de cepas	21
9.1.	Extracción de ADN	22
9.2.	Electroforesis.....	23
9.3.	Estandarización de la PCR.....	24
10.	Conservación de cepas.....	25
11.	Metodología de repique o transferencias periódicas	25
Anexos		26
	Papa Dextrosa Agar	26
	Sabouraud Dextrosa Agar	26
	Secuenciación genética de las cepas de hongos identificadas.....	27
Bibliografía		31

1. Introducción

México se caracteriza por poseer alta biodiversidad, cerca de 138.7 millones de hectáreas (ha) están cubiertas por algún tipo de vegetación forestal, que corresponde al 70.6% del territorio mexicano (CONAFOR, 2020). Los ecosistemas forestales se encuentran amenazados por diversas causas, entre las más dañinas destacan la tala ilegal, los incendios, el cambio de uso de suelo, la contaminación y las plagas y enfermedades (GFW, 2023). En este sentido y, de acuerdo con la SEMARNAT (2008), los descortezadores son una de las plagas más dañinas afectando actualmente 31, 710 ha boscosas, en segundo lugar, se encuentran los muérdagos enanos con 21, 967 ha y en tercer lugar se encuentran los defoliadores dañando 10, 175 ha.

Debido al aumento de la incidencia de plantas parásitas en los bosques mexicanos, se han implementado principalmente dos tipos de control: químicos y mecánicos. Sin embargo, los herbicidas (control químico) además de contaminar considerablemente el ecosistema no evitan que el muérdago vuelva a aparecer. Por otro lado, el control mecánico como la poda de muérdago y derribos reducen la incidencia de muérdago en bajos porcentajes (20%). En las últimas décadas, tanto el control genético como el control biológico han tomado auge, esto por considerarse aquellos que menos efectos colaterales tienen para el ecosistema (Geils *et al.*, 2002).

El control biológico se define como el manejo de plagas por medio de sus enemigos naturales, lo cual tiene la ventaja de reducir los efectos colaterales de las podas y los agroquímicos (Gutiérrez-Flores *et al.*, 2022). El control biológico comprende los hongos (organismos heterótrofos), los cuales secretan enzimas que degradan moléculas complejas en moléculas mucho más pequeñas que pueden ser absorbidas (Campbell y Reece, 2007). Los hongos se han convertido en una alternativa para el control biológico de plagas tales como broca del café, pulgón y la roya (Motta-Delgado y Murcia-Ordoñez, 2011; Rojas-Gutiérrez *et al.*, 2017;

Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2020) colocándolos como una solución muy prometedora sin aparentes repercusiones en el ambiente.

Para lograr un control eficaz de las plagas en ecosistemas forestales, es indispensable detectar el organismo causal (Sánchez, 2018). En las plantas parásitas, de igual forma, es necesario identificar la presencia de focos de infección inicial por hongos fitopatógenos y que son factibles de aislarse e incrementarse en medio de cultivo para posteriormente, ser desarrollados e implementados en los programas de control biológico de plantas parásitas (Dávila *et al.*, 2013).

Objetivo

Aplicar las metodologías aquí descritas para el aislamiento y conservación de las cepas fúngicas presentes en el muérdago.

2. Generalidades del muérdago

Originar información respecto a la interacción patógeno hospedante es de vital importancia, esto con el fin de poder establecer medidas de control efectivas. Los muérdagos enanos se encuentran entre los parásitos forestales que tienen mayor impacto biológico y económico en los bosques templados pues se distribuyen en zonas boscosas y áreas urbanas (Cibrián *et al.*, 2007). Son plantas hemiparásitas, que desarrollan una estructura especializada llamada haustorio, por medio de la cual obtienen sus nutrientes a partir del sistema vascular de su hospedero (sus principales hospederos pertenecen a las familias Pinaceae y Cupressaceae) (Queijeiro-Bolaños y Cano-Santana, 2015). México es considerado un centro de endemismo al presentar 21 especies del género *Arceuthobium* (Mathiasen *et al.*, 2008). A pesar de que los muérdagos son abundantes en México, existe poca información acerca de su comportamiento en los diferentes hospederos (Martínez *et al.*, 2015).

Las plantas parásitas, en específico el muérdago enano reduce el vigor de su hospedero y, por tanto, una disminución en crecimiento e incluso puede ocasionar la muerte del árbol (Hawksworth y Wiens, 1996). Son plantas de 17 a 35 cm de

altura con los tallos de color amarillo, amarillo-verdoso o negro. Su ciclo de vida se divide en cuatro fases: dispersión, establecimiento, incubación y reproducción. Estas plantas florecen a partir de 4 a 6 años y sus frutos maduran de 5 a 16 meses, liberando sus semillas en una distancia aproximada de 20 metros; semillas que están cubiertas por una sustancia pegajosa llamada viscina que les permite adherirse a ramas y corteza del hospedero (Martínez *et al.*, 2021).

Los muérdagos enanos son componentes esenciales de los ecosistemas ya que regulan las poblaciones de árboles eliminando individuos muy viejos o enfermos, lo cual además ayuda a conservar los árboles con mejor constitución genética. Cuando sus poblaciones se salen de control se consideran patógenos (agentes causantes de enfermedades) debido a sus efectos dañinos, como la reducción en



el crecimiento de sus huéspedes, distorsiones en ramas (hipertrofia), escobas de bruja, disminución de la longevidad, predisponer al árbol al ataque de otros parásitos e incluso ocasionar la muerte (Hawksworth y Wiens, 1996; Conklin, 2000) (Figura 1).

Figura 1. Hipertrofia causada por muérdago enano (*Arceuthobium globosum*) en pino.

3. Hongos y sus características principales

Los hongos constituyen un diverso grupo de organismos, incluyen a los mohos, las setas y las levaduras. Mundialmente, se han descrito aproximadamente 100,000 especies de hongos, y se estima que existen hasta 1.5 millones de especies (Hawksworth, 2001), de las cuales, en México, se estima que podrían existir más de 200,000. Su distribución es cosmopolita y habitan en el suelo, agua, madera, restos vegetales y otros (Salmones y Mata, 2012).

Los hongos en el suelo son organismos descomponedores, (principalmente de la lignina y la celulosa), así como recicladores de nutrientes. También se utilizan en diferentes prácticas culturales, ya que existen comestibles y medicinales o utilizarse en la agricultura debido a la acción de algunos hongos que combaten otros hongos y patógenos que afectan las plantas, suelo, incluso insectos (Zúñiga-Castro y Quirós-Cedeño, 2021).

Respecto a la forma de vida de los hongos, la mayoría son saprótrofos (se alimentan de materia orgánica muerta), otros son mutualistas (micorrizas, líquenes y hongos endófitos) y, cuando se establece una relación en la que el hongo es el único beneficiado en detrimento de su hospedero, se denominan parásitos. Estos últimos pueden ser obligados (biótrofos) ya que necesitan que las células que parasitan estén vivas; o pueden ser facultativos (necrótrofos), es decir, matan las células del hospedero para luego alimentarse de sus componentes (Cepero *et al.*, 2012).

3.1. Morfología del hongo

Los hongos microscópicos presentan una estructura que se ramifica a medida que el hongo crece llamada hifa y, el conjunto de estas se conoce como micelio. Particularmente, los hongos fitopatógenos forman un apresorio, el cual se origina por el ensanchamiento del ápice de un tubo germinal, esto como resultado de la germinación de un conidio (espora asexual) sobre la planta. Dicho apresorio le permite al hongo una mayor adhesión a su hospedero y constituye el primer paso para originar la hifa (Cepero *et al.*, 2012). Las hifas están formadas por paredes

celulares tubulares que rodean la membrana citoplasmática, a menudo están septadas, es decir, con paredes que dividen cada hifa en células separadas (Parker *et al.*, 2004).

Los hongos, al igual que las plantas poseen pared celular, está compuesta por polisacáridos y, en menor cantidad proteínas (representan del 1 al 15% de la pared). La membrana plasmática de los hongos es una capa bilipídica que constituye la interfase entre el hongo y el ambiente, las funciones de esta son proteger el citoplasma, regular la entrada y salida de solutos, además de facilitar la síntesis de pared y material capsular. Dicha membrana delimita una serie de estructuras conocidas como organelos: núcleo (1-3µm), mitocondrias, hidrogenasas, vesículas, vacuolas, ribosomas, dictiosoma (similar al aparato de Golgi), retículo endoplasmático, microtúbulos (parte del citoesqueleto), microfilamentos y microcuerpos. Los hongos presentan también estructuras de reproducción tales como los gametangios (en Oomycota), esporangios (estructuras de reproducción asexual) y células conidiogénicas, entre otras (Cepero *et al.*, 2012).

4. Hongos fitopatógenos

Los hongos que atacan a las plantas son conocidos como fitopatógenos (de *pitón*, planta, y *pathos*, enfermedad), alrededor de ocho mil especies de hongos son considerados fitopatógenos (Velásquez *et al.*, 2017). Su hábitat es muy amplio, se encuentran en el suelo, agua y en las plantas y animales; además se desarrollan en condiciones climáticas muy variadas y en todo tipo de ecosistemas (Cuervo *et al.*, 2022).

Los hongos fitopatógenos no poseen movimiento propio y, por lo tanto, dependen para su movimiento (de hospedero a hospedero o aún en el mismo hospedero) de agentes como el viento, agua, insectos y pájaros; el viento es el principal agente de diseminación (Velásquez *et al.*, 2017).

La mayoría de los hongos fitopatógenos pasan una parte de su ciclo de vida en su hospedero y la otra parte en el suelo o en restos de materia orgánica vegetal en el

suelo. Su supervivencia depende de condiciones como de temperatura, humedad o la presencia de agua en su ambiente, esto debido a que el micelio del hongo requiere permanecer dentro de un rango de temperatura entre -5 y 45 °C y en contacto con humedad ya sea en el interior o exterior del hospedero (Velásquez *et al.*, 2017).

Los hongos fitopatógenos causan más del 70% de las enfermedades de plantas y se distribuyen en tres reinos diferentes: Protista, Chromista y Fungi (hongos verdaderos) (Granados, 2018). Ocasionan daños en la producción biológica, es decir, a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedantes atacadas por estos microorganismos (González, 2001).

5. Los hongos como agentes de control biológico.

El control biológico consiste en la utilización de microorganismos antagonistas que ejercen su acción de biocontrol para el combate de enfermedades causadas por fitopatógenos (Trujillo-Negrellos, 2010). El uso de hongos como control biológico es una alternativa eficiente y ecológica, tal es el caso del uso de hongos fitopatógenos que producen enfermedades en las plantas (Agrios, 2005). Además, es uno de los avances de mayor importancia en la búsqueda de soluciones y controladores naturales ya que los hongos poseen la capacidad de eliminar patógenos, controlar nematodos y enfermedades, de esta manera, se logra reducir la cantidad de agroquímicos y fármacos inhibidores en las plantas (Zúñiga-Castro y Quirós-Cedeño, 2021).

El uso de hongos fitopatógenos como agentes de control biológico ha ido avanzando, han demostrado resultados favorables para las distintas plagas que afectan a las plantas, como es el caso de *Hypothenemus hampei* que hace afectaciones en el café (Cárdenas *et al.*, 2007; Vuelta-Lorenzo *et al.*, 2017), en donde utilizan al hongo *Beauveria bassiana* como un controlador biológico. También se utilizan los hongos *B. bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control de *Melanaphis sacchari* (pulgón amarillo) que se alimenta del sorgo (Lorenzo, 2021).

En los ecosistemas forestales, dada la complejidad, tanto de extensiones como de impactos ecológicos, aún no se han encontrado agentes para el control biológico de muérdago enano. Cortez-Hernández *et al.* (2013) realizaron un estudio de hongos antagonistas (*Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides* y *Fusarium proliferatum*) en cuatro Áreas Naturales protegidas, dos de ellas, el Parque Nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl y Parque Nacional Malinche para el control de *Arceuthobium vaginatum*, en donde se observaron cambios en la coloración y marchitez en muérdago enano. Por otro lado, existe la producción, comercialización y uso de bioinsecticidas compuestos por hongos entomopatógenos tales como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium lecanii* y *Paecilomyces fumosoroseous* para el control de plagas en cultivos de hortalizas, gramíneas y leguminosas (Tamez *et al.*, 2001).

En México se han detectado asociados a muérdagos los géneros de hongos: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium* (Figura 2), *Pestalotia*, *Phoma*, *Trichoderma*, *Lasioidiplodia* y *Uromyces* (Plascencia *et al.*, 2007; Reséndiz *et al.*, 2012), siendo *Pestalotiopsis* sp. el más promisorio. Hernández (2015), realizó una búsqueda de agentes asociados al género *Arceuthobium* para el control biológico del muérdago enano, identificó a los hongos *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. y *Phoma* spp., los cuales provocaron síntomas de marchitez, necrosis en tallos y frutos del muérdago (*A. globosum* subsp. *grandicaule*, *A. vaginatum* subsp. *vaginatum* y *A. abietis religiosae*), como resultado del tratamiento de hongos, los más prometedores fueron *Fusarium* spp. y *Phoma* spp.

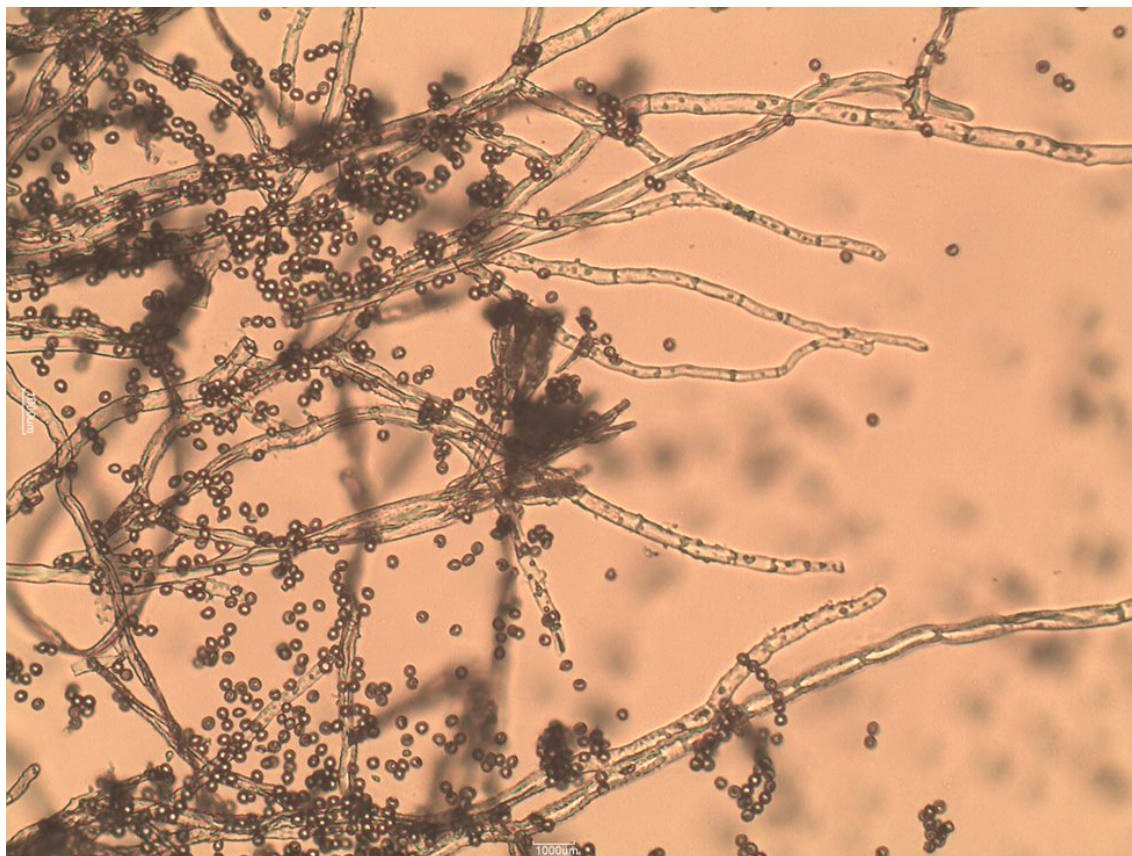


Figura 2. *Penicillium* sp.

El pino de las alturas (*Pinus hartwegii*) prolifera asociado a comunidades vegetales donde predominan los pastizales (Figura 3); los individuos maduros alcanzan alturas entre los 15 y 30m (Musálem y Solís, 2000; Manzanilla-Quiñones *et al.*, 2019). El pino de las alturas tiene una gran importancia biológica al ejercer funciones de protección a otros recursos asociados, tener un efecto regulador del ciclo hidrológico por medio del deshielo de los volcanes, alimentar los mantos freáticos, aminorar los efectos de la contaminación y albergar una importante biodiversidad (Musálem y Solís, 2000).



Figura 3. Bosque de *Pinus hartwegii*

La conservación de esta especie se encuentra seriamente comprometida por factores como la sobreexplotación forestal, tala clandestina, asentamientos humanos, contaminación, pastoreo de ganado, erosión de los suelos, déficit hídrico, enfermedades forestales (descortezadores y muérdago enano), incendios descontrolados (Endara-Agramont *et al.*, 2013), además del cambio climático, por lo anterior, se pronostica una mayor reducción de sus áreas de distribución y por tanto, más vulnerables a incendios forestales y plagas (Manzanilla-Quiñones *et al.*, 2019; Saénz-Romero *et al.*, 2020). Los principales parásitos de *P. hartwegii* son los insectos descortezadores (Scolytinae), avispa (Torymidae) polillas (Pyralidae), hongos (*Ganoderma* spp., *Polyporus* spp., *Amillaria* spp.) y plantas parásitas (*Arceuthobium* spp. y *Psittacanthus* spp.).

6. Recolección de material vegetal para el aislamiento de los hongos

Se han realizado muestreos en cinco Áreas Naturales Protegidas: Parque Nacional Cofre de Perote (PNCP), Parque Nacional Volcán Nevado de Colima (PNVNC), Parque Nacional Pico de Orizaba (PNPO), Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca (APFFNT), Área de Protección de Flora y Fauna Sierra de Quila (APFFSQ). La colecta del material vegetal se hizo durante octubre y noviembre de 2020 y mayo hasta octubre de 2021 (Mora, 2023), fue un tipo de muestreo dirigido o intencional (Hernández *et al.*, 1998) en rodales de pino (*P. hartwegii*) infestados con muérdago enano (*A. vaginatum* y *A. globosum*).

6.1. Criterio para la recolección de muestras de muérdago con presencia de hongos

Material

- Bolsas de papel de estraza
- Etiquetas
- Equipo GPS
- Contenedor de Poliestireno
- Marcador indeleble
- Tijera para poda
- Guantes de látex

Método

La identificación del agente causal de sintomatologías en el muérdago, posibilita la aplicación de métodos de control más adecuados. Con ayuda de las tijeras para poda, se colectan aquellas partes aéreas de muérdago enano de las dos especies (*Arceuthobium globosum* y *A. vaginatum*) que presenten síntomas de marchitez, canchros, fumagina y necrosis (Sánchez-González *et al.*, 2007) (Figura 4); las muestras se colocan en bolsas de papel de estraza y se etiquetan con los datos de georreferencia, especie, sintomatología de enfermedad en el muérdago, fecha y

lugar de colecta. Las muestras requieren que se resguarden en un contenedor de poliestireno y así ser trasladadas al laboratorio para su posterior análisis.

Los ejemplares colectados, deberán ser acompañados con los siguientes datos:

Generales: Número de muestra, localidad, fecha, cultivo (hospedero).

Cultivo: Marchitez, áreas muertas, manchas y/o escamas, tallos caídos, fumagina, presencia de micelio, otros.



Figura 4. Colecta de muérdago enano con sintomatología

6.2. Aislamiento

Material

- Material biológico (muestras de muérdago)
- Tijeras quirúrgicas
- Papel filtro.
- Vasos de precipitados
- Mechero de alcohol

- Campana de flujo laminar
- Incubadora
- Autoclave
- Cajas Petri 100
- Reactivos.
- Solución de hipoclorito de sodio al 1%
- Balanza analítica
- Parrilla de agitación magnética
- Agua destilada
- Medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA)
- Medio de cultivo Sabouraud Dextrosa Agar (SDA)

Método

El muérdago al ser infectado y colonizado por el hongo, provoca diversas manifestaciones visuales que se denominan síntomas, específicamente, los hongos son capaces de producir estructuras reproductivas sobre el tejido dañado, a los cuales se llama signos (Granados, 2018). Se seleccionan las ramas con signos de infección, éstas se cortan en segmentos de 1 cm (Figura 5: A), posteriormente, deben ser tratados con hipoclorito de sodio al 1% donde se mantendrán por 3 minutos para luego ser enjuagados 3 veces con agua esterilizada (B) y, finalmente proceder a secarlas en papel filtro a temperatura ambiente (C).



Figura 5. Esterilización del material vegetal A) Corte en segmentos del muérdago enano, B) Esterilización en hipoclorito, C) Secado en papel filtro.

6.3. Preparación de los medios

La identificación de un patógeno requiere el aislamiento del mismo, para ello, es necesaria la elaboración de medios de cultivo que permitan el desarrollo de dicho patógeno (Cuervo *et al.*, 2022). En la balanza analítica, pesar la cantidad especificada en la etiqueta del envase del medio, esto se deberá diluir con agua destilada en un matraz Erlenmeyer, enseguida, su homogenización se realiza en la parrilla de agitación y, posteriormente, se esterilizarán en la autoclave a una temperatura de 121° por 15 minutos.

Una vez que los medios de cultivo estén esterilizados, de manera aséptica (a la flama del mechero, para evitar contaminaciones o bien, en la campana de flujo laminar), verter aproximadamente 10 a 12 ml del medio de cultivo en las cajas Petri y dejar solidificar (Figura 6).

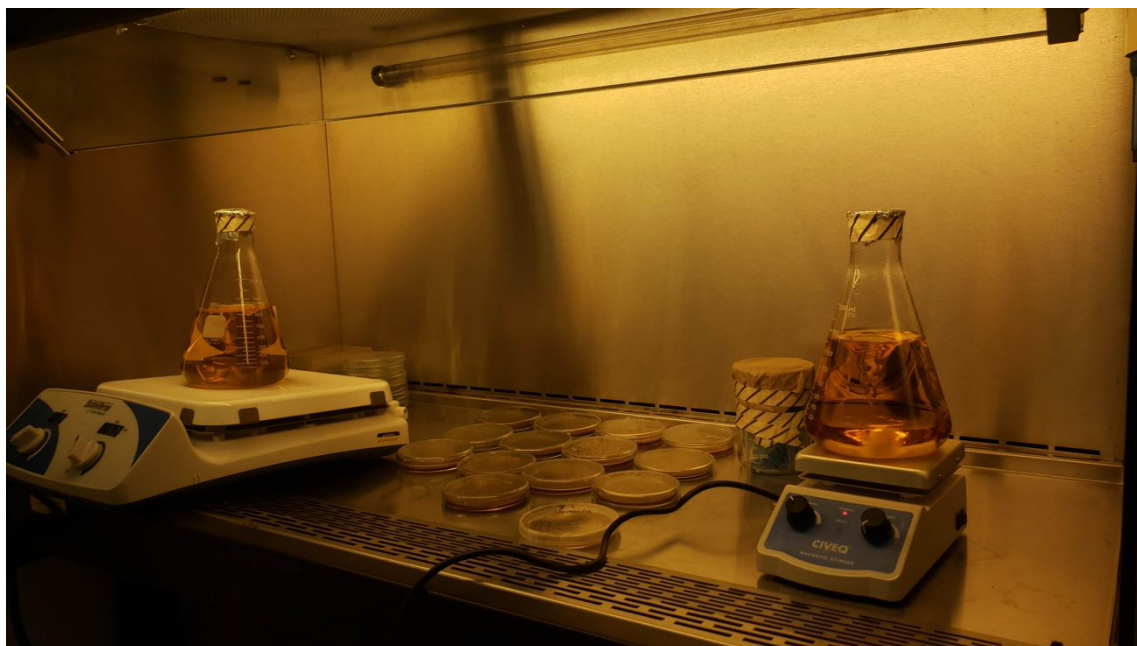


Figura 6. Homogenización en la parrilla de agitación y medio de cultivo en cajas Petri.

Ya que hayan solidificado los medios en las cajas Petri, colocar en estas las muestras de material biológico (Figura 7). Cabe mencionar que deben ser marcadas y/o etiquetadas para su identificación y llevarlas a la incubadora a una temperatura de 27 ± 1 °C por 72 h, en la espera de su crecimiento y, realizar las depuraciones necesarias para la obtención de las cepas de hongos (Mora, 2023).

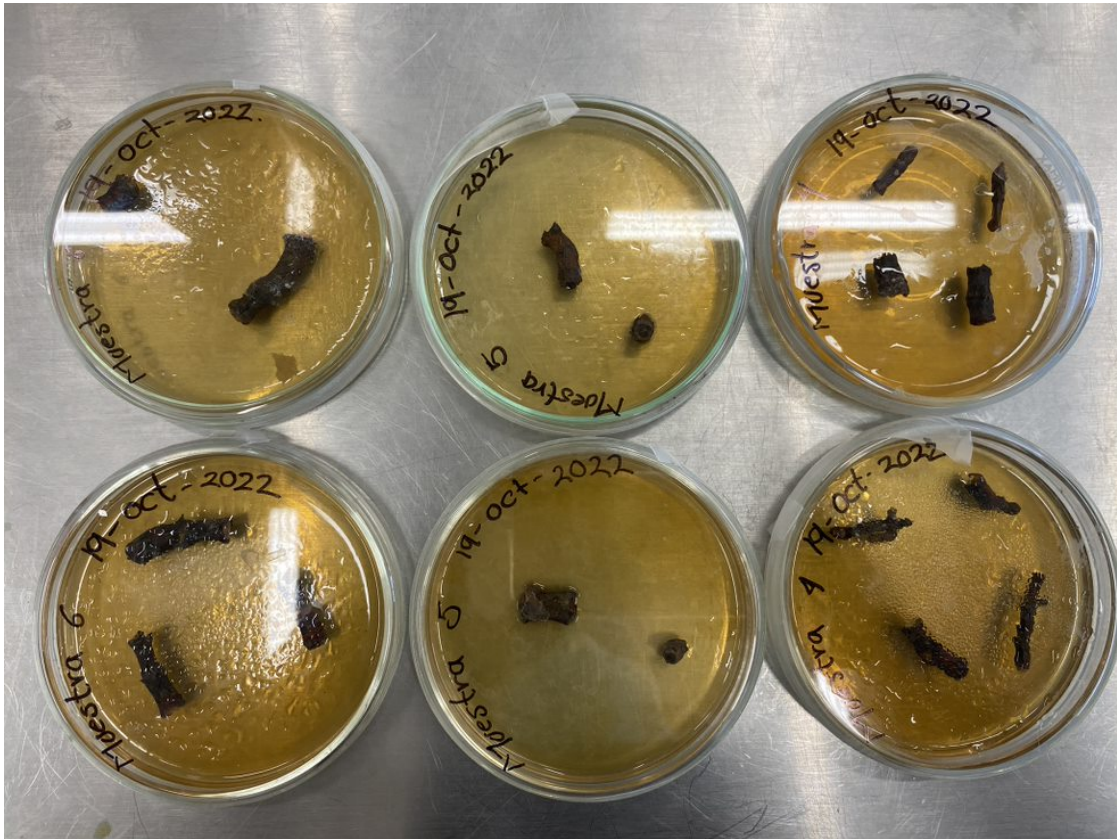


Figura 7. Material biológico en medios de cultivo.

Trascurrido el tiempo y una vez que se observa micelio, nuevamente se prepara medio de cultivo para su reproducción (Figura 8).



Figura 8. Cultivo de hongos.

7. Medios de cultivo

Para crecer, los microorganismos requieren de nutrimentos orgánicos e inorgánicos. El objetivo de los medios de cultivo es crear un ambiente adecuado para el crecimiento, por ello es necesario seleccionar apropiadamente la concentración y los componentes o nutrientes a utilizar, tales como: fuente de carbono, nitrógeno, fósforo y potasio, además de condiciones como son concentración de oxígeno, temperatura, humedad y pH (Gómez y Batista, 2006), esto de acuerdo a los factores de crecimiento específicos que requiera cierto microorganismo puesto que los medios de cultivo y la temperatura pueden influir tanto en la morfología del micelio como en la producción de esclerocios (estructuras de supervivencia que constituyen la principal fuente de inóculo primario) (Hernández *et al.*, 2004).

Para la conservación de cepas puras, los medios simples contienen los requerimientos mínimos necesarios para mantener viables a los microorganismos. Es importante mencionar que el aislamiento de cepas, requiere de pruebas selectivas de diversos medios de cultivo lo que permite identificar los requerimientos potenciales para inducir el desarrollo del micelio (Domínguez *et al.*, 2013). En la actualidad, la mayoría de los medios de cultivo se encuentran comercializados; normalmente bajo la forma de liofilizados a los que es preciso rehidratar.

Los hongos generalmente crecen de mejor manera en medios ricos en carbohidratos, sin embargo, la permanencia en estos durante largo tiempo, podría reducir la esporulación. También prefieren un pH 6.0 – 6.5, es decir, una reacción ligeramente ácida (Castaño, 1986).

7.1.-Tipos de medios de cultivo

Los medios de cultivo, por su composición, influyen en el desarrollo y la esporulación de los hongos (Hernández y Rosón, 2005). Existen varios tipos de medios de cultivo, cada uno con una función específica en el laboratorio, y se pueden diferenciar según su consistencia y composición.

Consistencia

Sólidos. Generalmente en forma de agar, gelatina, albúmina. El agar es una sustancia gelatinosa que se utiliza para solidificar los medios de cultivo, es decir, al enfriarse quedan sólidos por completo. Empleados para el aislamiento y reproducción de hongos y bacterias (Sánchez, 2018).

Semisólidos. Contienen bajas proporciones de agar y gelatina, al enfriarse permanecen en estado coloidal. Tienen la capacidad de mantener cultivos por largo tiempo (Sánchez, 2018).

Líquidos. Aquellos en los que los nutrientes están en forma líquida, es decir, se preparan sin agar u otras sustancias solidificantes (Sánchez, 2018). Se utilizan para la producción de grandes cantidades de microorganismos o para la observación de características microscópicas de los microorganismos. (Solmeglas, 2023).

Composición

Naturales. Consisten únicamente en material vegetal natural, comúnmente se utilizan tejidos vegetales asépticos como interiores de frutos, vainas, tubérculos, entre otros, tejidos vegetales esterilizados (French y Hebert, 1982).

Complejos o semisintéticos. Son aquellos que contienen sustancias naturales y elementos sintéticos. Se utilizan extractos de animales (extracto de carne, gelatina), extractos vegetales (caldo de papa) y preparados vegetales (harina de maíz, hojuelas de avena) (French y Hebert, 1982). El más conocido es el medio PDA (papa-dextrosa-agar).

Sintéticos o definidos. En estos medios de cultivo se conoce con exactitud su composición de cada uno de sus componentes (Sánchez, 2018), ya que todo su contenido es químicamente definido, por ejemplo, agar y Czapek.

8. Fermentación sólida

La fermentación es el proceso mediante el cual los sustratos sólidos o líquidos son convertidos por microorganismos procariontes (bacterias) y eucariontes (microalgas, levaduras, hongos) en productos de alto valor agregado (Vuppala *et al.*, 2015).

Para la producción masiva de un inoculante biológico se necesitan fuentes de carbono y nitrógeno que promuevan su crecimiento y desarrollo, esto mediante fermentación sólida, sumergida o bifásica. Entre los sustratos utilizados en la fermentación sólida destacan el trigo, centeno, arroz y maíz (Costa *et al.*, 2010). Emplear alguno de estos sustratos va en función de que proporcionen un buen desarrollo y una elevada producción de conidios viables de hongos, según la especie de interés. Además, deben facilitar una nueva metodología de producción masiva de biocontroladores que permita reducir el costo de producción y viabilizar un mayor uso de dicho hongo (Arévalo *et al.*, 2017).

La fermentación sólida ofrece una serie de ventajas económicas sobre los procesos convencionales de fermentación sumergida; su característica esencial es el crecimiento del microorganismo sobre un sustrato insoluble sin una fase libre, donde el nivel de humedad varía del 30 a 80% (Ruíz-Leza *et al.*, 2007) y, constituye la forma más fácil de cultivo de hongos filamentosos productores de enzimas (Cujilema *et al.*, 2018).

Materiales

- Balanza analítica
- Autoclave
- Incubadora
- Campana de flujo laminar
- Pipeta de 5ml
- Bolsas de poli papel
- Cultivo madre.

- Agua destilada.
- Solución de hipoclorito de sodio al 1%
- Paja de trigo

Procedimiento

La paja se coloca en remojo en la solución de hipoclorito de sodio al 1%, esto durante 10 minutos, posteriormente, se enjuaga con agua destilada por 3 veces consecutivas, como siguiente paso se escurre para llevarla a la estufa con el fin de su secado a 30° C por 24 horas. Terminado este proceso, se pesa la paja, para colocarla dentro las bolsas de polipapel, llevándolas a la autoclave para su esterilización a una temperatura de 121°C por 15 minutos.

En la campana de flujo laminar se colocan las bolsas con la paja esterilizada, se toman 5 ml del cultivo madre para la inoculación, para posteriormente colocarlas en la incubadora a una temperatura a 27 ± 1 °C por 72 horas. El resultado de este procedimiento se observa en la Figura 9.

Este mismo procedimiento se emplea para inocular también pacas de muérdago.

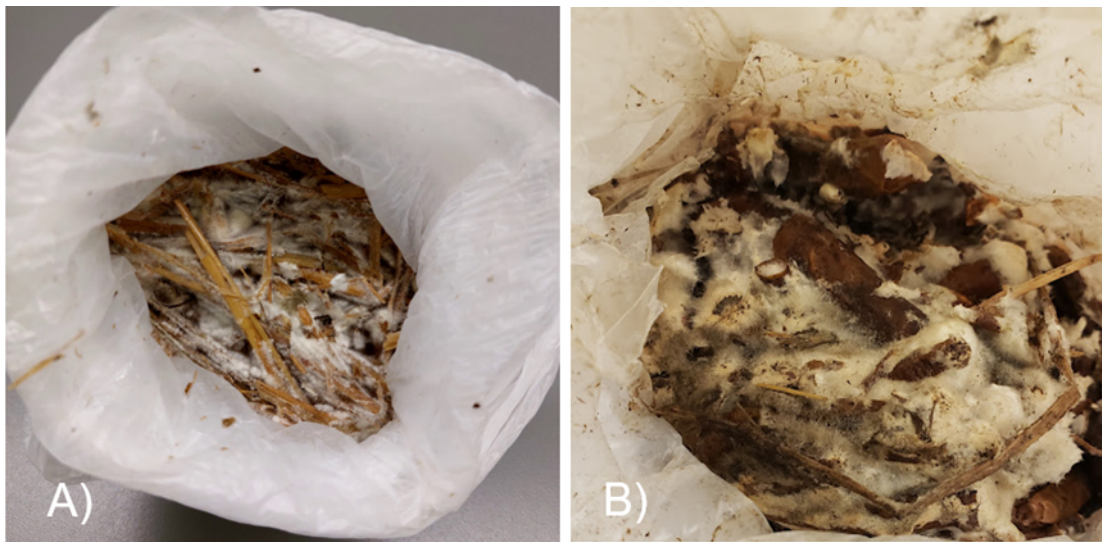


Figura 9. Cultivo de hongos en pacas de paja y muérdago: A) Paca de paja B) Paca de muérdago.

En especies fúngicas, los métodos más utilizados para identificación taxonómica son 1.- el que utiliza al detergente aniónico SDS (Sodio dodecil sulfato) para solubilizar proteínas, tejidos y membranas; 2.- el CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio), un detergente catiónico que cumple la función de solubilizar polisacáridos y 3.- PCR, un método común y generalizado (Chávez y Kohli, 2018).

9. Metodología para realización del PCR para la identificación de cepas

La PCR es utilizada para generar varias copias de fragmentos específicos de ADN, esto con el fin de poder identificar las colonias aisladas. Para ello, son indispensables los oligonucleótidos o primers, estos permiten que la taq polimerasa inicie la reacción; dicha reacción se realiza en un equipo llamado termociclador que tiene la capacidad de controlar la temperatura dependiendo del ciclaje (Burbano *et al.*, 2017).

Los pasos fundamentales de la PCR son: 1. Desnaturalización térmica (90 a 96°C) del ADN, donde se separa la doble cadena de ADN a una cadena sencilla, que servirá como molde; 2. Hibridación, en este paso la temperatura se reduce para permitir el alineamiento de las moléculas iniciadoras o “primers” (parte de la secuencia a amplificar) a la secuencia blanco del ADN molde, esta secuencia de los cebadores sintéticos permite hibridar uno a cada lado de la secuencia diana y, 3. Extensión, se lleva la extensión de la molécula iniciadora mediante la enzima ADN polimerasa de los oligonucleótidos anillados que actúan como cebadores. Estos tres pasos se repiten indeterminadas veces en el termociclador, obteniendo de manera exponencial el fragmento o fragmentos discretos sintetizados a partir del molde de ADN (Méndez-Álvarez y Pérez-Rotha, 2004).

Existen diferentes metodologías para la extracción de ADN genómico para hongos. No obstante, es necesario que los mohos se siembren en el medio de cultivo de PDA líquido, durante cuatro días a una temperatura de 28° C, con agitación constante a 100 revoluciones por minuto. Un buen método de extracción debe

mantener tanto la integridad física como la bioquímica del ADN, además de incrementar sus rangos de pureza y concentración (Suárez, 2016).

9.1. Extracción de ADN

Anteriormente la taxonomía y clasificación de los hongos se basaba en características morfológicas, sin embargo, actualmente el progreso de las técnicas moleculares ha permitido su identificación mediante la reacción de polimerización en cadena (PCR) (Pérez *et al.*, 2023).

Método

Tomar una pequeña cantidad del moho y ponerlo en un tubo de 2 ml con un balín y colocarlo en congelación $\pm 70^{\circ}\text{C}$ un día anterior.

Molerlos durante cuatro minutos a 50 oscilaciones por segundo.

Agregar a cada muestra 500 μl de CTAB (10%), verificar que la muestra se encuentre totalmente sumergida en la solución de CTAB.

Homogenizar con Vortex.

Incubar a 65°C durante 30 min.

Agregar 500 μl de SEVAG (cloroformo, alcohol isoamílico 24:1), mezclar suavemente mediante inversión del tubo y dejar escapar el gas. Dejar el SEVAG durante 30 min., mezclando varias veces con suavidad o usando el agitador a intensidad moderada.

Dejar escapar el gas que se formó.

Centrifugar a 9,000 rpm durante 10 min y transferir la fase acuosa (superior) a un tubo de 1.5 ml limpio y etiquetado, cuidar de no pipetear la fase aceitosa, ni los sólidos.

Se deben de recuperar los balines, lavar y esterilizar para su reutilización.

Precipitar con 2/3 el volumen (e.g., 350 μl si se obtuvieron 500 μl de extracto) de etanol absoluto si es de material fresco o de isopropanol (2- propanol) absoluto si se trata de material de herbario.

El etanol/isopropanol previamente se enfría a -20°C .

Mezclar invirtiendo suavemente el tubo hasta observar precipitado, como un enturbiamiento blanquecino de la mezcla extracto – alcohol.

Dejar reposar a -20°C durante 1 hora o hasta el día siguiente.

Centrifugar a 13000 rpm durante 5 min., y descartar el líquido. Se forma una pastilla blanca la cual debe cuidarse que no se despegue del tubo en el momento de decantar el etanol.

Agregar 500 µl de etanol al 70% y centrifugar a 3000 rpm durante 3 min.

Descartar el etanol (cuidando de no perder la pastilla).

Secar la pastilla en una centrifuga de vacío (10 min.) o protegidos de la luz y el polvo al aire durante 2 a 3 hrs. Otra alternativa es dejar secando en un baño María a 55 °C con las tapas de los tubos abiertas, con el fin de que se evapore totalmente el etanol.

Si el extracto estuviera muy sucio o aceitoso repetir la centrifugación con etanol nuevo antes de secar.

Resuspender el precipitado seco, en 50 µl de agua bidestilada (o agua inyectable) o Buffer TE 1X (Tris-Acetato-EDTA) a temperatura ambiente o precalentar a 65° C.

Mezclar bien y mantener a -20° C (o a -70° C si es por periodos prolongados).

9.2. Electroforesis

Pesar 1 g de agarosa, diluir en 100 ml de TBE1X.

Esperar que la solución de agarosa pierda calor, de manera que quede a una temperatura de 50°C.

Agregar 1 µl de gel Red o 7 µl del stock de bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ml.

Se deja solidificar a temperatura ambiente aproximadamente 20 min.

Carga de las muestras de ADN:

1. Colocar 2 µl de Buffer de carga (Bromo-fenol-azul).
2. Colocar 2 µl de la muestra.

Colocación de las muestras en la placa de agarosa.

1. Colocar la placa de agarosa en la cámara de electroforesis.
2. Colocar el buffer de carga más la muestra en cada uno de los pozos de la placa de agarosa y en el último pozo se coloca la escalera
3. Se cargan en el primer pozo 4 µl de marcador de peso molecular (escalera).

4. Se corre la electroforesis a 80 volts durante 20 min.
5. El gel se coloca en el transiluminador para corroborar la presencia de manchas de alrededor de 1000pb que indican la presencia de DNA.

9.3. Estandarización de la PCR

En la PCR, generalmente se utilizan secuencias pequeñas de nucleótidos en uno de los tres loci usados como marcador (codificador de ADN), dichas secuencias, normalmente se encuentran codificadas entre los genes codificantes del rRNA. Una vez que se ha obtenido el ADN del hongo a identificar, se utiliza como “templado” para hacer la reacción de PCR. Se utilizan como cebadores secuencias ITS4 e ITS5 que son secuencias de transcripción interna de los ribosomas.

La reacción se prepara de la siguiente manera:

Reactivo	Volumen (µl)
Buffer 10 X	2.5
MgCl	2.1
dNTPs 10 mM	0.5
ITS4 (Primer forward)	0.25
ITS5 (Primer reverse)	0.25
ADN	200 ng*
Taq polimerasa	0.25
H ₂ O libre de nucleasas	25

Los tubos se colocan en el termociclador. La duración de la reacción estará en función del programa que se utilice para la amplificación del fragmento. El programa para utilizar en este protocolo es el siguiente: Desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min; seguida por 35 ciclos a 95 °C y un min, templar a 58 °C por un minuto, extensión a 72 °C por 2 min, y extensión final por 10 min; mantener a 4 °C.

Con el fin de verificar si se obtuvo ADN, se prepara un gel de agarosa al 1% como se describió previamente. Finalmente se procede a secuenciar.

Las cepas que han sido identificadas son las siguientes:

Fusarium sambucinum (NRRL 20444, 20663), *Alternaria alternata* isolate WA4, *Alternaria tenuissima* strain Alt-J-Ir, *Fusarium proliferatum* isolate PCNB3, *Aspergillus* sp. strain GXNU-A9, *Aspergillus flavus* strain BS18.2, *Cladosporium delicatulum* isolate CL_FF_10_, *Cladosporium marinum* strain SFC20230103-M38.

10. Conservación de cepas

Este método tiene la ventaja de fácil procedimiento, además de bajo costo; el tiempo de conservación es menor de dos años. Por otro lado, tiene como desventaja que las cepas con las resiembras continuas, pueden mutar y perder su capacidad para producir toxinas.

11. Metodología de repique o transferencias periódicas

1. Preparar agar inclinado (PDA) en tubos de cultivo con tapón de rosca.
2. Sembrar la cepa del hongo en tubos con medio e incubarlo a una temperatura de 25°C durante siete días.
3. Posteriormente almacenar los tubos a 5°C.
4. Etiquetar con los datos del hongo y la fecha de almacenamiento.
5. También se pueden cubrir con aceite mineral estéril aproximadamente 10 mm por arriba del nivel del agar (Pérez *et al.*, 2023).

Anexos

Papa Dextrosa Agar

El agar papa dextrosa es un medio de cultivo microbiológico que se prepara a partir del medio de cultivo deshidratado, de infusión de patata y dextrosa. Esta infusión de papa y dextrosa favorecen el crecimiento exuberante de hongos fomentando la esporulación y producción de pigmentos (Bio-bacter, 2010), por lo que se utiliza para el cultivo de hongos y levaduras (Beever y Bollard, 1970). Algunos procedimientos señalan bajar el pH del medio a 3.5 ± 0.1 con ácido tartárico al 10 %, para inhibir el crecimiento bacteriano.

Composición (en gramos por litro)

Extracto de papa	4 gr
Dextrosa	20 gr
Agar	15 gr

Sabouraud Dextrosa Agar

Sabouraud Dextrosa Agar, se considera el medio estándar para recuperar y mantener una amplia variedad de hongos que pueden aislarse en laboratorio. En dicho se puede observar la morfología típica de los hongos, aunque no es el medio ideal de crecimiento o para estudiar la esporulación (Navarro y Morejón, 2013).

Los componentes de este medio de cultivo tales como la glucosa, peptona y tripteína favorecen el incremento de microorganismos, mientras que la presencia de antibióticos y el pH ácido, inhiben el desarrollo bacteriano. Las peptonas son fuentes de factores de crecimiento nitrogenados y la dextrosa proporciona una fuente de energía para el crecimiento de microorganismos (Kane y Summerbell, 1999).

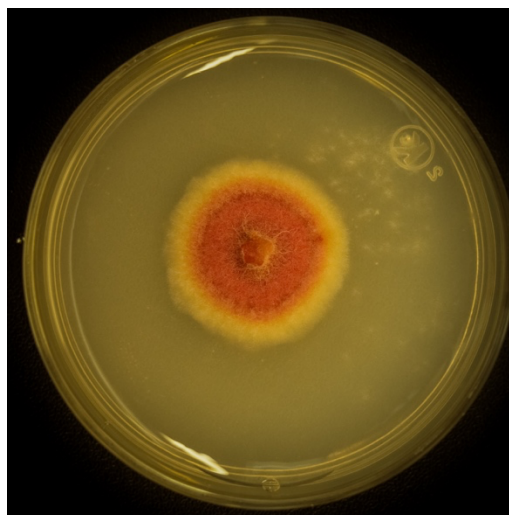
Composición (en gramos por litro)

Digerido pancreático de caseína	5 gr
Digerido péptico de tejido animal	5 gr
Dextrosa	40 gr
Agar	15 gr

Secuenciación genética de las cepas de hongos identificadas

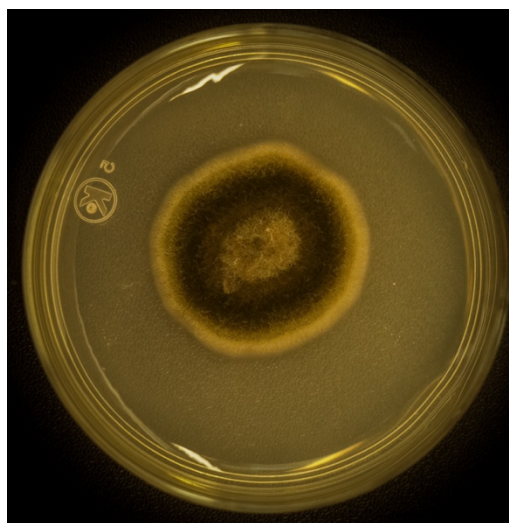
Fusarium sambucinum (NRRL 20444, 20663)

CCCGCCGGAGGACCCCTAACTTTGGTTTTA
ATGCATCTTCTCAGTAAAAAATCATATAAATC
AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTG
GCATCCATGAAAAACGCCGCAAAATGCCATA
AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAATGAATCAT
TCAATCTTTCAACGCACCTTGCGCCCGCCA
GTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGT
CTTTTCAACCCTCAAGCCCGGCTTGGGGTT
GGGAGCTGTCGTCTGACACTCCCCAAATAC
ATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATATCGTA
CTCCTTTACCCTTCGGTACTGGTA

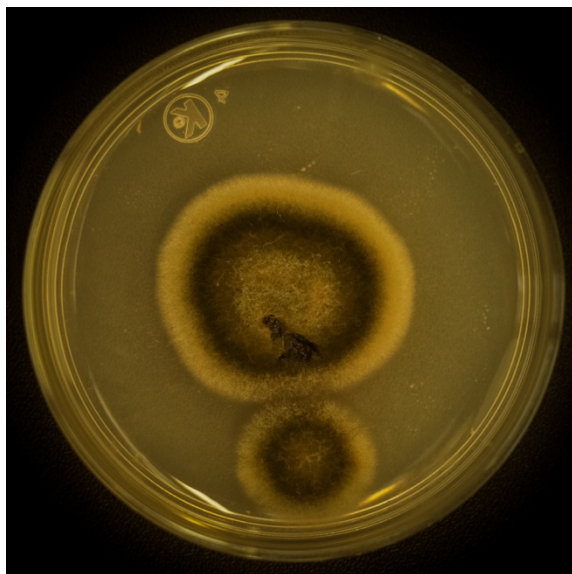


Alternaria alternata isolate WA4

CTTGTGCTGCGCTCCGAAACCAGTAGGCCG
GCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAG
CAAAGCTAGAGACAAGACGCCCAACACCAA
GCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGA
ACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGC
GCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCAC
TGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATT
TCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCA
AGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATTATTA
TTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAA
GGTTTATGTTTGTCTAGTGGTGGGCGAAC
CCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAAGA
CAAGGGTGAATAATTCAGCAAGGCTGTAAC
CCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATT
GTGTAATGATCCCTCCGCAGGTTACCTAC
GGAGACCTTGTTA

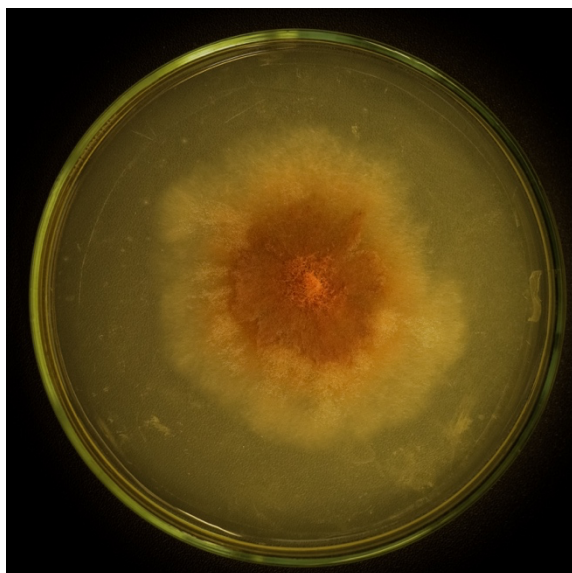


***Alternaria tenuissima* strain Alt-J-Ir**



GCTGAATTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTA
CTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTGCCCCAC
CACTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAAAT
GCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTA
CAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTG
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA
TAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAA
TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC
CTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTT
GAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTT
GGTGTTGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGC
TGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGC
CGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACA
AGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAG
CATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTTGAC
CTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAA

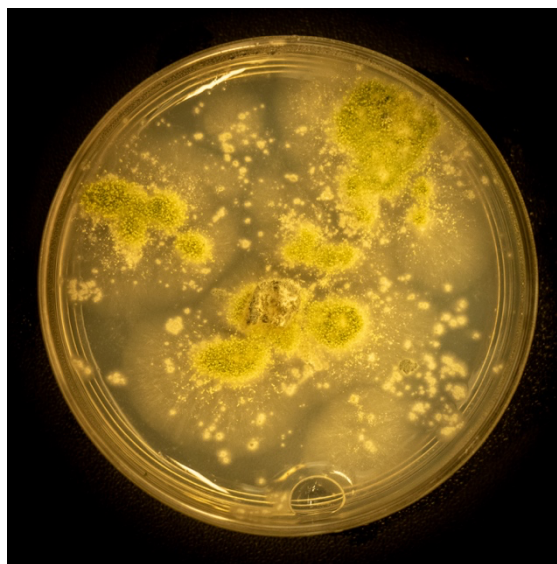
***Fusarium proliferatum* isolate PCNB3**



GTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCG
GTAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACC
CCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGA
GTAAACCATATAAATAATCAAACTTTCAAC
AACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGA
AGAACGCAGCAAATGCGATAAGTAATGT
GAATTGCAGAATTCATTGAATCATCGAATC
TTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATT
CTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATT
TCAACCCTCAAGCCCCCGGGTTTGGTGTT
GGGGATCGGCGAGCCCTTGCGGCAAGCC
GGCCCCGAAATCTAGTGGCGGTCTCGCT
GCAGCTTCCATTGCGTAGTAGTAAACCCT
CGCAACTGGTACACGGCGCGGCCAAGCC
GTTAAACCCCCAACTTCTGAATGTTGACCT
CG

Aspergillus sp. strain GXNU-A9

GGGCCCCGCGCCCCGCGGAGACACCACGA
ACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTG
ATTGTATCGCAATCAGTTAAACTTTCAACA
ATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAG
AACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAA
TTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTT
GAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCG
GGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCT
GCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGT
CGTCGTCCCCTCTCCGGGGGGGACGGGC
CCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCG
ATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCCG
CTCTGTAGGCCCCGGCCGGCGCTTGCCGAA
CGCAAATCAATCTTTTCCAGGTTGACCTCG
GATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAG
CATATCAAT



Aspergillus flavus strain BS18.2

GCCGGCCGGGCCTACAGAGCGGGTGACAAAGC
CCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGC
CGCTGCCTTTGGGGCCCGTCCCCCGGAGAG
GGGACGACGACCCAACACACAAGCCGTGCTTG
ATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCC
CCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTC
AAAGACTCGATGATTACGGAATTCTGCAATTCA
CACTAGTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCG
ATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTT
TAACTGATTGCGATACAATCAACTCAGACTTCAC
TAGATCAGACAGAGTTCGTGGTGTCTCCGGCGG
GCGCGGGCCCCGGGGCTGAGAGCCCCCGGCGG
CCATGAATGGCGGGCCCGCCGAAGCAACTAAG
GTACAGTAAACACGGGTGGGAGGTTGGGCTCG
CTAGGAACCCTACACTCGGTAATGATCCTTCCGC



***Cladosporium delicatulum* isolate CL_FF_10_**



GTTTTACGGCGATAGCCTCCCGAACACCC
TTTAGCGAATAGTTTCCACAACGCTTAGGG
GACAGAAGACCCAGCCGGTCGATTTGAG
GCACGCGGCGGACCGCGTTGCCAATAC
CAAGCGAGGCTTGAGTGGTGAAATGACG
CTCGAACAGGCATGCCCCCGGAATACCA
GGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCTGA
TGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACT
TATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATG
CCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAAGT
TTTAATTTATTAATTAAGTTTACTCAGACTG
CAAAGTTACGCAAGAGTTTGAAGTGTCCA
CCCGGAGCCCCCGCCCGAAGGCAGGGT
CGCCCCGAGGCAACAGAGTCGGACAAC
AAAGGGTTATGAACATCCCGGTGGTAAGA
CCGGGGTCACTTGTAAATGATCCCTCCGCA
GGTTCACCTACGGAGA

***Cladosporium marinum* strain SFC20230103-M38**



TTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCT
GCCTTCGGGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTT
CAAACCTCTTGCGTAACTTTGCAGTCTGAGTAAA
CTTAATTAATAAATTAACCTTTTAACAACGGATC
TCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCG
AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA
GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGC
CCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTCTGA
GCGTCATTTCACTCAAGCCTCGCTTGGTAT
TGGGCAACGCGGTCCGCCGCGTGCCTCAAAT
CGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTT
GTGGAAACTATTGCTAAAGGGTGTTCGGGAG
GCTACGCCGTAAACAACCCCATTTCTAAGGTT
GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAAC
TTAAGC

Bibliografía

- Agrios, G.N. (2005). Fitopatología (Translation). Editorial Limusa. México.
- Arévalo, E., Cayotopa, J., Olivera, D., Gárate, M., Trigos, E., Costa, B. y Leon, B. (2017). Optimización de sustratos para la producción de conidias de *Trichoderma harzianum*. Por fermentación sólida en la región de San Martín. Perú. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 19(2), 135–144.
- Beever, R.E. y Bollard, E.G. (1970). The nature of the stimulation of fungal growth by potato extract. *J. Gen. Microbiology*, 60, 273–279.
- Bio-bacter. (2010). Medio de cultivo agar papa dextrosa. Ficha técnica. Cirumedics.
- Burbano, R.E., Caetano, A.B., Otero, R.I. y Álvarez, S.L. (2017). Manual de Biología Molecular: Procedimientos Básicos. Pasto: Editorial Universitaria–Universidad de Nariño.
- Campbell, N.A. y Reece, J.B. (2007). Biología. Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A.
- Cárdenas, A.B., Villalba, D.A., Bustillo, A.E., Montoya, E.C. y Góngora, C.E. (2007). Eficacia de mezclas de cepas del hongo *Beauveria bassiana* en el control de la broca del café. *Cenicafé*, 58(4), 293–303.
- Castaño, J.Z. (1986). Prácticas de laboratorio de fitopatología. EAP. Departamento de protección vegetal.
- Cepero, G.M., Restrepo, R.S., Franco-Molano, A.E., Cárdenas, T.M. y Vargas, E.N. (2012). Biología de hongos. Universidad de los Andes, Bogotá.
- Chávez, A.R. y Kohli, M.M. (eds). (2018). Pyricularia de trigo en Paraguay: Compendio de Investigación. CAPECO, Asunción, Paraguay.
- Cibrián, T., Alvarado R.D. y García, D.S. (2007). Enfermedades Forestales en México/Forest Diseases in Mexico. Universidad Autónoma Chapingo; Conafor-Semarnat, Servicio Forestal de EUA; Servicio Forestal Canadiense y COFAN, FAO. Chapingo, México.
- CONAFOR. (2020). Principales indicadores del sector forestal en México. DataBosques. México.
- Conklin, D.A. (2000). Dwarf mistletoe management and forest health in the Southwest. US Department of Agriculture, Forest Service, Southwestern Region.
- Cortez-Hernández, M.A., Reséndiz, M.J., García, V.V. y Pérez, S.M. (2013). Estudio comparativo de la distribución de micromicetos asociados con muérdago enano *Arceuthobium vaginatum* (Will.) en cuatro Parques Nacionales de México. VIII Reunión Nacional de Innovación Forestal. Veracruz, México. pp. 86.
- Costa, M., Torres, M., Magariños, H. y Reyes, A. (2010). Producción y purificación parcial de enzimas hidrolíticas de *Aspergillus ficuum* en fermentación sólida sobre residuos agroindustriales. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(2), 163–175.
- Cuervo, U.Y., Espadas, R.M. y Zita, P.G. (2022). Fitopatología (Manual de prácticas de ingeniería agrícola). Ediciones UNAM-FESC, México.

- Cujilema, Q.M., León-Revelo, G., Rizo, P.M., Taramona, R.L. y Ramos-Sánchez, L.B. (2018). Producción de lipasas por fermentación sólida con *Aspergillus niger*: influencia del pH. *Centro Azúcar*, 45(4), 1–9.
- Dávila, M.M., Gallegos, M.G., Hernández, C.F., Ochoa, F.Y. y Flores, O.A. (2013). Actinomicetos antagónicos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4(8), 1187–1196.
- Domínguez, R.D., Vázquez, R.H., Reyes, R.B., Arzaluz, R.J. y Martínez, C.A. (2013). Aislamiento y purificación del hongo ectomicorrízico *Helvella lacunosa* en diferentes medios de cultivo. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 16(1), 51–59.
- Endara-Agramont, A. R., Calderón C.R., Nava, B.G. y Franco, M.S. (2013). Analysis of Fragmentation Processes in High-Mountain Forests of the Centre of Mexico. *American Journal of Plant Sciences*, 4(3), 697–704.
- French, E.R. y Hebert, T.T. (1982). Métodos de investigación fitopatológica. IICA. San José, Costa Rica.
- Geils, B.W. Cibrián-Tovar, J. y Moody, B. (2002). Mistletoes of North American conifers. Gen. Tech. Rep. RMRS-GTR-98. Ogden, UT: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. 123 p.
- Global Forest Watch (GFW). (2023). Data Forest Frontiers Initiative. World Resources Institute.
- Gómez, G. y Batista, C. (2006). Optimización de medios de cultivos para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de biopreparados de interés agrícola. *Cultivos Tropicales*, 27(3), 17–24.
- González, M.D. (2001). Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. *Acta Zoológica Mexicana*, (N.S.), 53–78.
- Granados, M.M. (2018). Identificación morfológica de “hongos fitopatógenos”. Taller básico. Universidad de Costa Rica. Costa Rica.
- Gutiérrez-Flores, L.M., López-Reyes, L., Hipólito-Romero, E., Torres-Ramírez, E., Castañeda-Roldán, E. y Mauricio-Gutiérrez, A. (2022). Biological control perspectives in the pine forest (*Pinus* spp.), an environmentally friendly alternative to the use of pesticides. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 40(3), 401–424.
- Hawksworth, D.L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.* 105, 1422–1432.
- Hawksworth, G.F. y Wiens, D. (1996). Dwarf mistletoes: biology, pathology, and systematics. USDA. SF. Agriculture Handbook 709. USDA, Forest Service, Washington, DC. 410 p.
- Hernández, J.J., Montes, B.R., Flores, M.H., Nava J.R. y Chanona, P.J. (2004). Caracterización de aislamientos de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en diferentes medios de cultivo. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(3), 345–350.
- Hernández, M.A. y Rosón, Á.C. (2005). Evaluación preliminar del crecimiento y la esporulación de *Aschersonia aleyrodis webber* en medios de cultivo convencionales. *Fitosanidad*, 9(3), 61–63.
- Hernández, S. (2015). Búsqueda de agentes de control biológico en muérdago del género *Arceuthobium* (Tesis de Maestría). Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas.

- Hernández, S.R., Fernández, C.C. y Baptista, L.P. (1998). Metodología de la Investigación. Mc. Graw Hill, México.
- Kane, J. y Summerbell, R.C. (1999). Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton, and agents of superficial mycoses, p. 1275-1294. En: P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, y R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C
- Lorenzo, C.D. (2021). Control biológico de *Melanaphis sacchari* en *Sorghum bicolor* mediante *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Clavicipitaceae), en Campeche, México. (Tesis de Maestría). Instituto Tecnológico de Chiná.
- Manzanilla-Quñones, U., Aguirre-Calderón, Ó.A., Jiménez-Pérez, J., Treviño-Garza, E.J. y Yerena-Yamallel, J.I. (2019). Distribución actual y futura del bosque subalpino de *Pinus hartwegii* Lindl en el Eje Neovolcánico Transversal. *Madera y bosques*, 25(2), e2521804.
- Martínez, M.N., Ramírez, D.J., Lara, V.F. y Figueroa, F.D. (2021). Distribución espacial de muérdago enano en la Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca. *Colombia forestal*, 24(2), 65–81.
- Martínez, S.M., Madrigal, H.S., Vázquez, C.I., Velasco, B.E., Morales, N.C. y Villareal, G.F. (2015). Efecto de *Arceuthobium vaginatum* (Willd.) Presl. subsp. *vaginatum* en *Pinus hartwegii* Lindl. en Colima. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6(29), 44–55.
- Mathiasen, R.L., Shaw, D.C., Nickrent, D. y Watson, D. (2008). Mistletoes. Pathology, Systematics, Ecology, and Management. *Plant Disease*, 92(7), 988–1006.
- Méndez-Álvarez, S. y Pérez-Rotha, E. (2004). La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(3), 183–192.
- Mora, E.I. (2023). Hongos fitopatógenos como control biológico de *Arceuthobium globosum* y *Arceuthobium vaginatum* en poblaciones de *Pinus hartwegii* del Centro de México (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma del Estado de México.
- Motta-Delgado, P. A. y Murcia-Ordoñez, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente & Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 6(2), 77–90.
- Musálem, S.M. y Solís, M.A. (2000). Monografía de *Pinus hartwegii*. INIFAP. México.
- Navarro, R.O. y Morejón, A. L. (2013). Micología veterinaria. Universidad Nacional Agraria. Nicaragua.
- Parker, J., Martinko, J.M. y Madigan, M.T. (2004). Brock, Biología de Los Microorganismos. Pearson Educacion.
- Pérez, R.M., Sánchez, H.G., Martínez, F.R., Garza, R.J. y Espinosa, R.J. (2023). Mohos productores de micotoxinas. Proyecto UNAM-DGAPA-PAPIME PE206620.
- Plascencia, G.A., López, P. y Malagón, A.M. (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.
- Queijeiro-Bolaños, M.E. y Cano-Santana, Z. (2015). Dinámica temporal de la infestación por muérdago enano (*Arceuthobium globosum* y *A. vaginatum*) en

- Zoquiapan (Parque Nacional Iztaccíhuatl Popocatepetl), México. *CienciaUAT*, 9(2), 06–14.
- Ramírez-Rodríguez, R.F., Castañeda-Hidalgo, E., Robles, C., Santiago-Martínez, G.M., Pérez-León, M.I. y Lozano-Trejo, S. (2020). Efectividad de biofunguicidas para el control de la roya en plántulas de café. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(6), 1403–1412.
- Reséndiz, M.J., Pérez, S.M., Olvera, C.L., Arriola, P.N. y Cortez, H.M. (2012). Hongos asociados a muérdago enano (*Arceuthobium globosum* Hawksw & Wiens) en el Parque Nacional Nevado de Toluca. En: Resúmenes de la VII Reunión Nacional de Innovación Forestal. Compiladores R.E. Madrid, A. y J.A. Prieto R. Querétaro, México. p 104.
- Rojas-Gutiérrez, R.L., Loza-Murguía, M., Vino-Nina, L., Serrano-Canaviri, T. (2017). Capacidad biocontroladora de *Beauveria brongniartii* (Sacc.) y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) en el control de pulgones *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of the Selva Andina Research Society*, 8(1), 48–68.
- Ruíz-Leza, H.A., Rodríguez-Jasso, R.M., Rodríguez-Herrera, R., Contreras-Esquivel, J.C. y Aguilar, C.N. (2007). Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6(1), 33–40.
- Sáenz-Romero, C., Mendoza-Maya, E., Gómez-Pineda, E., Blanco-García, A., Endara-Agramont, A.R., Lindig-Cisneros, R., ... y Vargas-Hernández, J.J. (2020). Recent evidence of Mexican temperate forest decline and the need for ex situ conservation, assisted migration, and translocation of species ensembles as adaptive management to face projected climatic change impacts in a megadiverse country. *Canadian Journal of Forest Research*, 50(9), 843–854.
- Salmones, D. y Mata, G. (2012). Ceparios de hongos en México. En: Sánchez, V.J. y Mata, G (Eds). Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica: investigación y desarrollo en un entorno multicultural. ECOSUR, INECOL. México.
- Sánchez, A.P. (2018). Manual de practices: Fitopatología. PAIA, ITZM. Quintana Roo, México.
- Sánchez-González, A., González, L. M. y Contreras-Ramos, A. (2007). Técnicas de recolecta de plantas y herborización. La Sistemática, Base del Conocimiento de la Biodiversidad. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, México.
- SEMARNAT. (2008). Compendio de Estadísticas Ambientales. México.
- SOLMEGLAS. (2023). Biotecnología Material y Servicios especializados para tu Laboratorio de Investigación: Medios de cultivo, que son, funcionalidades, calidad. Madrid.
- Suárez, C.L. (2016). Extracción y purificación del adn de *Moniliophthora roreri* hongo que ataca el cacao, en norte de santander. *Respuestas*, 10(2), 4–8.
- Tamez, G.P., Galán, W.L., Medrano, R.H., García, G.C., Rodríguez, P.C., Gómez, F.R. y Tamez, G.R. (2001). Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. *Ciencia UANL*, 4(2), 143–152.

- Trujillo-Negrellos, E. (2010). Biocontrol de hongos fitopatógenos en cítricos. *CienciaUAT*, 4(3), 20–23.
- Velásquez-Valle, R., Reveles-Hernández, M. y Reveles-Torres L.R. (2017). Identificación de enfermedades causadas por hongos en cultivos de Aguascalientes, Durango y Zacatecas. Folleto Técnico Núm 90. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC – INIFAP.
- Vuelta-Lorenzo, D.R., Rizo-Mustelier, M. y Basile-Rodríguez, R. (2017). Evaluación del efecto del hongo *Beauveria bassiana*, trampas y el Nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* en el Control de la Broca del Café (*Hypothenemus hampei*) en las Yaguas. *Ciencia en su PC*, (4), 38–52.
- Vuppala, G., Krishna, R. y Murthy, K. (2015). Industrial Fermentation. *Research and Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology* (RRJET), 4(1), 1–7.
- Zúñiga-Castro, K. y Quirós-Cedeño, G. (2021). Los hongos como elementos clave en la productividad del suelo, la agricultura y el bienestar social. *Biocenosis*, 32(1), 46–58.