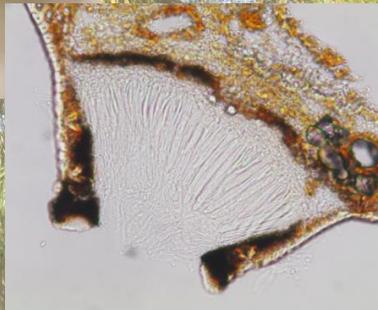




PLAN DE CONTINGENCIA FITOSANITARIA FORESTAL EN VARIOS MUNICIPIOS DEL ESTADO DE PUEBLA: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

INFORME FINAL

DICIEMBRE 2016





CRÉDITOS

Universidad Autónoma Chapingo

Coordinador:

Dr. David Cibrián Tovar

Colaboradores:

M. C. Uriel M. Barrera Ruiz

Dr. Omar Alejandro Pérez Vera

Ing. Sergio Arturo Quiñónez Favila

Ing. Fabiola Vianey Uribe Gutiérrez

Ing. Alberto Lara Beltrán

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN EJECUTIVO	1
1. Talleres de capacitación	1
2. Evaluación de los tratamientos contra <i>Lophodermium</i> aplicados en el Municipio de Zacatlán durante la primera mitad del año	2
3. Ensayo de control de ninfas de <i>Ocoaxo</i> cerca <i>fowleri</i> en campo.....	2
4. Primer ensayo <i>in vitro</i> de control de adultos de <i>Ocoaxo</i> cerca <i>fowleri</i>	4
5. Modificación del planteamiento de control de adultos de <i>Ocoaxo</i> cerca <i>fowleri</i>	4
6. Segundo ensayo <i>in vitro</i> de control de adultos de <i>Ocoaxo</i> cerca <i>fowleri</i>	5
7. Daño causado por <i>Ocoaxo</i> al follaje de los hospedantes	5
8. Monitoreo terrestre y detección temprana – trapeo de adultos de <i>Ocoaxo</i> cerca <i>fowleri</i>	6
9. Hongos de follaje involucrados en el proceso de declinación forestal.....	7
10. Actividades de difusión	7
INTRODUCCIÓN.....	9
OBJETIVOS.....	10
Productos.....	10
RESULTADOS.....	12
1. Talleres de capacitación	13
2. Evaluación de la efectividad de los tratamientos contra <i>Lophodermium</i> realizados en el municipio de Zacatlán.....	16
2.1. Metodología.....	17
2.2.1. Resultados para <i>Lophodermium</i>	20
2.2.2. Resultados para <i>Ocoaxo</i> cerca <i>fowleri</i>	24
2.3. Conclusiones	26
3. Ensayo en campo de control de ninfas de <i>Ocoaxo</i> cerca <i>fowleri</i>	27

3.1. Metodología.....	28
3.2 Resultados.....	34
3.2.1. Distribución de ninfas.....	34
3.2.2. Efecto de los tratamientos.....	36
3.2.3. Aislamiento de <i>Metarhizium anisopliae</i> de productos evaluados.....	38
3.3. Conclusiones	39
4. Ensayo <i>in vitro</i> de control de adultos de <i>Ocoaxo cerca fowleri</i>	40
4.1. Primer ensayo	41
4.1.1. Metodología.....	41
4.1.2. Resultados.....	45
4.1.3. Conclusiones	50
4.2. Modificación del planteamiento de control de adultos de <i>Ocoaxo cerca fowleri</i> ..	50
4.2. Segundo ensayo	50
4.2.1. Metodología.....	51
4.2.2. Resultados.....	53
4.3.3. Conclusión	55
5. Determinación del daño de <i>Ocoaxo cerca fowleri</i> y <i>Ocoaxo assimilis</i> al follaje de los pinos, su efecto en la caída foliar y en la declinación forestal	57
5.1. Desarrollo de sintomatología en laboratorio	58
5.2 <i>Ocoaxo cerca fowleri</i> . sintomatología en campo	67
5.3. Hospedantes de <i>Ocoaxo cerca fowleri</i>	72
5.3.1. Ninfas.....	73
5.3.2. Adultos	74
5.4. <i>Ocoaxo assimilis</i> . sintomatología en campo	77
5.5. Conclusiones	82
6. Monitoreo terrestre – trampeo.....	83
6.1. Metodología.....	86

6.2. Resultados.....	88
6.3 Conclusiones	93
7. Identidad de los hongos de follaje involucrados en el proceso de declinación forestal y evaluación de control	94
7.1. Identificación de daños en campo.....	95
7.1.1. Signos y síntomas	95
7.1.1.1. Resultados.....	96
7. 2. Identificación de hongos del follaje	112
7.2.1. Características culturales de hongos aislados	112
7.1.4. Caracterización molecular del patógeno: Extracción de ADN, amplificación y secuenciación	119
7.1.4.1. Anexo 1	119
7.1.4.2. Anexo 2	120
7.1.4.3. Resultados.....	124
7.3. Ensayo <i>in vitro</i> de <i>Lophodermium</i> con fungicidas	125
7.3.1. Resultados y discusión	128
7.4. Pruebas de patogenicidad	131
8. Actividades de difusión.....	133
8.1. Mención del proyecto de investigación en la Comisión Forestal de America del Norte	134
8.2. Reuniones en municipios considerados en la contingencia y en Zacatlán de las Manzanas.....	136
CONCLUSIONES GENERALES.....	145
AGRADECIMIENTOS	149
LITERATURA CITADA	151

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Relación de polígonos seleccionados por tratamiento.	18
Cuadro 2. Relación de polígonos de la evaluación efectividad de tratamientos contra <i>Lophodermium</i> realizados durante la primera mitad de 2016.....	19
Cuadro 3. Resultados de la evaluación de <i>Lophodermium</i> en follaje de 2015 en Zacatlán de las Manzanas.	23
Cuadro 4. Promedio de ninfas m ² por tratamiento.	25
Cuadro 5. Tratamientos del ensayo en campo de control de <i>Ocoaxo</i> cerca <i>fowleri</i>	29
Cuadro 6. Tabla de frecuencias de ninfas por m ² ; ensayo en campo de control de ninfas de <i>Ocoaxo</i> cerca <i>fowleri</i>	35
Cuadro 7. Dosis de producto comercial empleado en la evaluación de control.	44
Cuadro 8. Número de adultos vivos por tratamiento/día de agosto/hora de revisión, del primer ensayo <i>in vitro</i> de control de adultos de <i>Ocoaxo</i> cerca <i>fowleri</i>	47
Cuadro 9. Descripción cuantitativa de tratamientos de evaluación de control 2 de <i>Ocoaxo</i> en laboratorio.	52
Cuadro 10. Número de adultos de <i>Ocoaxo</i> cerca <i>fowleri</i> por mes, por municipio.	88
Cuadro 11. Coordenadas de los sitios de colecta en Puebla.	95
Cuadro 12. Sitios de evaluación de daños causado por <i>Ocoaxo</i> cerca <i>fowleri</i> y por <i>Lophodermium</i> en <i>Pinus patula</i> y <i>P. pseudostrobus</i>	97
Cuadro 13. Porcentaje de acículas dañadas por tipos de agente causal.	99
Cuadro 14. Promedio de acículas con daño, por municipio.	100
Cuadro 15. Secuencias de los ADNs amplificados con ITS.	124
Cuadro 16. Fungicidas comerciales utilizados en la prueba in-vitro para el control de <i>Lophodermium</i>	127
Cuadro 17. Participantes en las reuniones de difusión de resultados de campaña de contingencia fitosanitaria.	137

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Promedio de salivazos por m ² ; datos de 1140 unidades de 1 m ² cada una.....	3
Figura 2. Taller de capacitación del 03 de junio del 2016.....	14
Figura 3. Plática y práctica del taller capacitación realizado el 30 de junio del 2016.....	15
Figura 4. Brigada de trabajo de Zacatlán de las Manzanas y algunas de las ninfas encontradas.....	17
Figura 5. Proceso de instalación de sitios; fotografía tomada el 14 de junio del 2016.....	18
Figura 6. <i>Pinus pseudostrobus</i> . a) cuerpos fructíferos (cf) de <i>Lophodermium</i> en acículas de 2015; a, b) acículas con necrosis (ne); d) follaje nuevo de 2016 con necrosis (ne) y bandeado (bd) causado por <i>Ocoaxo cerca fowleri</i>	21
Figura 7. Número de fascículos del 2015 con síntomas/signos de <i>Lophodermium</i> y daños por <i>Ocoaxo cerca fowleri</i> en <i>Pinus pseudostrobus</i> y <i>Pinus patula</i> en Zacatlán de las Manzanas.....	22
Figura 8. Gráfica de número de ninfas de <i>Ocoaxo cerca fowleri</i> por m ² por tratamiento.....	24
Figura 9. Gráfica de número total de ninfas de <i>Ocoaxo cerca fowleri</i> por m ²	24
Figura 10. Proceso de aplicación de tratamientos contra <i>Ocoaxo cerca fowleri</i> , fotografías tomada el 16 de junio del 2016.....	30
Figura 11. Aplicación de tratamientos realizada el 05-06 de julio del 2016.....	31
Figura 12. Proceso de evaluación inicial de los sitios tratados, 16 de junio.....	32
Figura 13 Adultos de <i>Ocoaxo cerca fowleri</i> alimentándose de las acículas de pino; fotografía tomada el 21 de julio del 2016.....	33
Figura 14. Gráfica de cuadros/individuos por m ² de ensayo en campo de control de <i>Ocoaxo cerca fowleri</i>	34
Figura 15. Promedio de individuos por metro cuadrado en cada tratamiento.....	37
Figura 16. <i>Metarhizium anisopliae</i> en medio de cultivo; a) Aislamiento de producto comercial, b) aislamiento del Colegio de postgraduados.....	38
Figura 17. Adultos empleados en la evaluación de control; fotografía tomada el 24 de agosto del 2016.....	42
Figura 18. Preparación de cajas Petri; fotografía tomada el 24 de agosto del 2016.....	42
Figura 19. Aplicación de tratamientos; fotografía tomada el 24 de agosto del 2016.....	43

Figura 20. Cajas Petri con adultos tratados; fotografía tomada el 24 de agosto del 2016. ...	45
Figura 21. De izquierda a derecha, de arriba a abajo: adulto tratado con acefato, con <i>Metarhizium anisopliae</i> del CP, con <i>M.anisopliae</i> comercial-dosis baja, con <i>M. anisopliae</i> -dosis alta y Testigo.....	46
Figura 22. Huevos de <i>Ocoaxo cerca fowleri</i> ; fotografías tomadas el 30 de agosto del 2016.	49
Figura 23. Número de adultos vivos/ horas después de aplicado el tratamiento; resultados del segundo ensayo <i>in vitro</i> de control de adultos de <i>Ocoaxo cerca fowleri</i>	54
Figura 24. Promedio y mediana de porcentaje de desarrollo de micelio sobre adultos/tratamiento, a las 90 y 114 horas de aplicados los tratamientos.	55
Figura 25. Gotas de mielecilla o savia que adultos de <i>Ocoaxo cerca fowleri</i> expulsan durante su alimentación; fotografía tomada el 11 de agosto del 2016.	59
Figura 26. Secuencia de daños de adultos, de esquina superior izquierda hacia la derecha, hacia abajo y a la izquierda.....	60
Figura 27. Diversos niveles de daño provocados por la alimentación de los adultos de <i>Ocoaxo cerca fowleri</i> en árboles de las cajas de emergencia.	61
Figura 28. Daños en acículas por alimentación de adultos de <i>Ocoaxo cerca fowleri</i> ; fotografía tomada el 25 de agosto del 2016.	61
Figura 29. Daños al follaje de pinos en invernadero. Izquierda: los dos pinos de la izquierda estuvieron sometidos al ataque de adultos de <i>Ocoaxo cerca fowleri</i> , el de la derecha no. Derecha: detalles de los daños por alimentación en el follaje de los pinos. Fotografías tomadas el 18 de agosto del 2016.....	62
Figura 30. Daño causado por 25 adultos de <i>Ocoaxo cerca fowleri</i> durante 20 días.....	63
Figura 31. Postura de alimentación de los adultos de <i>Ocoaxo cerca fowleri</i>	64
Figura 32. Sitio de colecta de adultos de <i>Ocoaxo cerca fowleri</i> en el municipio de Zautla; fotografía tomada el 14 de septiembre del 2016.....	65
Figura 33. Adultos de <i>Ocoaxo assimilis</i> y áreas boscosa con daño en follaje en Nicolás Bravo; fotografías tomadas el 10 de septiembre del 2016.	65
Figura 34. Síntomas de daño por alimentación de adultos de <i>Ocoaxo cerca fowleri</i> en laboratorio; fotografías tomadas el 30 de septiembre del 2016.	66
Figura 35 Individuos de <i>Pinus patula</i> y <i>Pinus pseudostrobus</i> sometidos a dos periodos de alimentación de adultos de <i>Ocoaxo cerca fowleri</i> ; fotografías tomadas el 13 de octubre del 2016.....	67

Figura 36. Adultos de <i>Ocoaxo</i> cerca <i>fowleri</i> alimentándose en campo; fotografía tomada el 25 de agosto del 2016.....	67
Figura 37. Adultos de <i>Ocoaxo</i> cerca <i>fowleri</i> apareándose; fotografías tomadas entre el 4 y el 12 de agosto.....	68
Figura 38. Aspecto de algunos de los árboles que mostraron cambio de color del follaje; municipio de Tetela de Ocampo.....	69
Figura 39. Aspecto de algunas áreas que mostraron cambio de coloración del follaje; municipio de Tetela de Ocampo.....	69
Figura 40. Árboles de <i>Pinus pseudostrobus</i> fuertemente afectados por <i>Ocoaxo</i> cerca <i>fowleri</i> ; municipio de Zacatlán de las Manzanas.....	70
Figura 41. Adultos apareándose; fotografías tomadas el 12 de septiembre del 2016.....	70
Figura 42. Desarrollo del cambio de color de septiembre a noviembre en Zacatlán de las Manzanas; fotografías del 12 de septiembre (superiores), 7 de octubre (intermedias) y 23 de noviembre (inferiores) del 2016, del mismo sitio.....	71
Figura 43. Desarrollo del cambio de color de septiembre a noviembre en Tetela de Ocampo; fotografías del 12 de septiembre (superiores), 7 de octubre (intermedias) y 24 de noviembre (inferiores) del 2016, del mismo sitio.....	72
Figura 44. Ninfas de <i>Ocoaxo</i> cerca <i>fowleri</i> en la raíz de sus hospedantes.....	73
Figura 45. Ninfas de <i>Ocoaxo</i> cerca <i>fowleri</i> en la raíz de sus hospedantes.....	74
Figura 46. Adultos de <i>Ocoaxo</i> cerca <i>fowleri</i> alimentándose en plantas herbáceas; fotografía tomada el 10 de septiembre del 2016 en Zautla, Puebla.....	75
Figura 47. Adultos de <i>Ocoaxo</i> cerca <i>fowleri</i> alimentándose de herbáceas; fotos tomadas el 12 de septiembre (superior) en Tetela de Ocampo y el 14 de septiembre (media e inferior) en Zautla.....	76
Figura 48. Adulto de <i>Ocoaxo</i> cerca <i>fowleri</i> alimentándose de una acícula de <i>Pinus pseudostrobus</i>	77
Figura 49. Áreas boscosas de Nicolas Bravo con síntomas de daño por alimentación de adultos de <i>Ocoaxo assimilis</i> ; fotografías tomadas el 15 de octubre del 2016.....	79
Figura 50. Pino con cambio evidente de color de follaje; fotografía tomada el 15 de octubre del 2016.....	80
Figura 51. Tres niveles de cambio de color en follaje: poco evidente, intermedio, completo; fotografías tomadas el 15 de octubre del 2016.....	81

Figura 52. Trampa de luz en la comunidad San Miguel Tenango, Zacatlán; foto tomada el 08 de julio del 2016.	84
Figura 53. Trampa de luz en la comunidad La Soledad, Tetela de Ocampo; fotografía tomada el 19 de julio del 2016.	85
Figura 54. Trampa de luz en la comunidad Ayocuantla, Aquixtla; fotografía tomada el 20 de julio del 2016.	85
Figura 55. Trampa de luz en la comunidad Xahuinteno, Xochiapulco; fotografía tomada el 28 de julio del 2016.	86
Figura 56. Pasos de colecta de adultos en trampas de luz.	87
Figura 57. Trampa de luz en Tetela de Ocampo.	89
Figura 58. Gráfica de adultos colectados en la trampa de luz de Tetela de Ocampo.	90
Figura 59. Trampa de luz en Zacatlán de las Manzanas.	91
Figura 60. Gráfica de adultos capturados/precipitación registrados en la trampa de luz de Zacatlán de las Manzanas.	92
Figura 61. Gráfica de resultados de evaluación de daño, realizada con follaje colectado en noviembre del 2016.	101
Figura 62. Bosque de pino en el municipio de Zacatlán de las Manzanas; a, b) caída de acícula de pino en <i>Pinus pseudostrobus</i> con presencia de <i>Lophodermium</i> en follaje del 2016 (flecha roja), c) histerotecios en acículas.	102
Figura 63. Proporción de acículas sanas, acículas con daño por <i>Ocoaxo</i> cerca <i>fowleri</i> + acículas histerotecios de <i>Lophodermium</i> y acículas solo con daños por <i>O. cerca fowleri</i> en <i>Pinus pseudostrobus</i> en Zacatlán de las Manzanas.	103
Figura 64. Bosque de pino en el municipio de Aquixtla; a) Caída de acículas en <i>Pinus pseudostrobus</i> con poca presencia de <i>Lophodermium</i> en follaje del 2016 (flecha roja); b, c) acículas necrosadas del 2016 con histerotecios (flecha roja).	104
Figura 65. Proporción de acículas sanas, acículas con daño por <i>Ocoaxo</i> cerca <i>fowleri</i> + acículas histerotecios de <i>Lophodermium</i> y acículas solo con daños por <i>O. cerca fowleri</i> en <i>Pinus patula</i> y <i>Pinus pseudostrobus</i> en el municipio de Aquixtla.	105
Figura 66. Bosque natural de pino en el municipio de Tetela de Ocampo; caída de acículas en <i>Pinus pseudostrobus</i> con presencia de <i>Lophodermium</i> en follaje del 2016.	106
Figura 67. Proporción de acículas sanas, acículas con daño por <i>Ocoaxo</i> cerca <i>fowleri</i> + acículas histerotecios de <i>Lophodermium</i> y acículas solo con daños por <i>O. cerca fowleri</i> en <i>Pinus pseudostrobus</i> en el municipio de Tetela de Ocampo.	107

- Figura 68. Bosque natural de pino en el municipio de Xochiapulco; caída de acícula en *Pinus pseudostrabus* y *Pinus patula* con poca presencia de *Lophodermium* en follaje del 2016..... 108
- Figura 69. Proporción de acículas sanas, acículas con daño por *Ocoaxo* cerca *fowleri* + acículas histerotecios de *Lophodermium* y acículas solo con daños por *O. cerca fowleri* en *Pinus patula* y *Pinus pseudostrabus* en el municipio de Xochiapulco..... 109
- Figura 70. Bosque natural de pino en el municipio de Zautla; a, b) caída de acícula en *Pinus pseudostrabus* con poca presencia de *Lophodermium* en follaje del 2016; c) acículas necrosadas en brotes con ausencia del hongo..... 110
- Figura 71. Proporción de acículas sanas, acículas con daño por *Ocoaxo* cerca *fowleri* + acículas histerotecios de *Lophodermium* y acículas solo con daños por *O. cerca fowleri* en *Pinus pseudostrabus* en el municipio de Zautla..... 111
- Figura 72. Caída de acícula de pino en *Pinus* en el municipio de Aquixta, Puebla. a) Bosque natural de *P. pseudostrabus*, note que las acículas cafés (flecha naranja) fueron formadas en 2015; en cambio, las de 2016 (flecha verde) se observan verdes. b) Acículas necrosadas del 2015. c) Acículas en suelo con histerotecios maduros d) Histerotecios en acículas de 2015. e) Histerotecios..... 113
- Figura 73. a) Acículas de *Pinus pseudostrabus* en cámara húmeda. b, c) Micelio emergiendo del interior del cuerpo fructífero de hongo. d) Corte transversal del cuerpo fructífero con ascas y parafisos. e) Ascas y ascosporas. f) colonia del hongo creciendo en MEA a..... 114
- Figura 74. Caída de acícula de pino en *Pinus* en el municipio de Tetela de Ocampo, Puebla. a) Bosque natural de *P. oaxacana*. b) Acículas necrosadas se formaron en 2015. c) Histerotecios maduros..... 115
- Figura 75. a) Acículas de *Pinus oaxacana* en cámara húmeda. b) Liberación de ascas y ascosporas desde el cuerpo fructífero (flechas). c) Corte transversal del cuerpo fructífero con ascas y parafisos. d) Ascas. e) colonia del hongo creciendo en MEA a los 20 días. 116
- Figura 76. Caída de acícula de pino en *Pinus* en el municipio de Zacatlán de las Manzanas, Puebla. a) Bosque natural de *P. pseudostrabus*. b) Acículas necrosadas del 2015 (flecha), en contraste con las formadas en 2016, que lucen verdes. c) Acículas en suelo con cuerpos fructíferos maduros..... 117
- Figura 77. a) Acículas de *Pinus pseudostrabus* en cámara húmeda. b) Cuerpo fructíferos. c) Corte transversal del cuerpo fructífero con ascas y parafisos. d) Ascas y ascosporas. f) colonia del hongo creciendo en MEA a los 20 días..... 118
- Figura 78. Extracción de ADN del hongo *Lophodermium*. a). medio líquido de extracto de malta de 25 días. b) Lavado de micelio con agua destilada estéril. c y d) kit comercial Dneasy® Plant Mini kit. e y f). Almacenamiento de ADN a -20 °C. 121

Figura 79. Visualización de ADN del hongo <i>Lophodermium</i> . a).Preparación del gel de agarosa. b) Llenado de pozos con producto de ADN. c) Sistema de fotodocumentación (Gel Logic 200, Kodak) para la captura de imágenes. d) Bandas de ADN en gel de agarosa al 1%.....	122
Figura 80. a) fungicidas: Propiconazol, Clorotalonil y Oxicloruro de cobre, b) medio de cultivo extracto-malta-agar (EMA) con fungicidas.	126
Figura 81. Efecto de dos dosis de propiconazol en el crecimiento micelial de <i>Lophodermium sp</i> ; b) 3.5 ml, c) 2ml.....	128
Figura 82. Efecto de dos dosis de oxicloruro de cobre en el crecimiento micelial de <i>Lophodermium sp</i> ; d) 1.5 gr, e) 2 gr.....	129
Figura 83. Efecto de dos dosis de clorotalonil en el crecimiento micelial de <i>Lophodermium sp</i> ; f) 1 gr, g) 1.5 gr.....	130
Figura 84. Pruebas de patogenicidad en <i>Pinus oaxacana</i> . a) Cepa de <i>Lophodermium</i> en medio de cultivo MEA. b) <i>P. oaxana</i> inoculado con suspensión de micelio micelio. c) árboles de pino con 15 días de inoculación.....	132
Figura 85. Recorrido en campo de grupo de trabajo de insectos, enfermedades y plantas invasoras, de la Comisión Forestal de América del Norte; fotografías tomadas el 26 de octubre del 2016.....	134
Figura 86. Reunión de grupo de trabajo de insectos, enfermedades y plantas invasoras, de la Comisión Forestal de América del Norte en Puebla, Puebla; fotografías tomadas el 27 de octubre del 2016.....	135
Figura 87. Reunión de difusión en Tetela de Ocampo; fotografías tomadas el 02 de diciembre del 2016.	138
Figura 88. Reunión entre medios de comunicación, autoridades de CONAFOR y miembros de la Unión Agroforestal de Puebla, Colegio de Postgraduados y la Universidad Autónoma Chapingo, en Tehuacán, Puebla; fotografías tomadas el 05 de diciembre del 2016.....	139
Figura 89. Reunión de difusión en Nicolás Bravo; fotografías tomadas el 05 de diciembre del 2016.....	140
Figura 90. Reunión de difusión en Zautla; fotografías tomadas el 06 de diciembre del 2016.	141
Figura 91. Reunión de difusión en Xochiapulco; fotografías tomadas el 06 de diciembre del 2016.....	142
Figura 92. Reunión de difusión en Aquixtla; fotografías tomadas el 08 de diciembre del 2016.....	143

Figura 93. Reunión de difusión en Zacatlán; fotografías tomadas el 09 de diciembre del 2016..... 144

RESUMEN EJECUTIVO

Las actividades de investigación pactadas en el contrato de prestación de servicios celebrado entre la **Unión Agroforestal de Puebla (UNIÓN)** y la **Universidad Autónoma Chapingo (UACH)**, en el marco del proyecto "Proyecto Integral Estatal de Contingencia Fitosanitaria para el Combate a los Principales Actores que Deterioran a las Coníferas en Puebla" acordado entre **CONAFOR** y la **UNIÓN**, se realizaron entre julio y noviembre del 2016.

En el contrato mencionado se indica que deben realizar las actividades de "evaluación de los tratamientos de saneamiento en el proceso de declinación forestal, control de los chupadores de savia de género *Ocoaxo sp.* en los Municipios de Zautla, Xochiapulco, Tetela de Ocampo y Aquixtla y además del estudio de los hongos del follaje en este proceso de declinación".

Las actividades que se han realizado en el presente proyecto de investigación y que dan cumplimiento al objetivo y a los productos planteados en el contrato, se ubican en alguno de los siguientes temas:

1. **Talleres de capacitación.**
2. **Evaluación de los tratamientos contra *Lophodermium* aplicados en el Municipio de Zacatlán durante la primera mitad del año.**
3. **Ensayo de control de ninfas de *Ocoaxo cerca fowleri* en campo.**
4. **Primer ensayo *in vitro* de control de adultos de *O. cerca fowleri*.**
5. **Modificación del planteamiento de control de adultos de *O. cerca fowleri*.**
6. **Segundo ensayo *in vitro* de control de adultos de *O. cerca fowleri*.**
7. **Determinación del daño causado por *O. cerca fowleri* y *Ocoaxo assimilis* al follaje de los hospedantes, su efecto en la caída foliar y en la declinación forestal.**
8. **Monitoreo terrestre y detección temprana – trampeo de adultos de *O. cerca fowleri*.**
9. **Hongos del follaje involucrados en el proceso de declinación forestal, con particular enfoque en *Lophodermium*.**
10. **Actividades de difusión.**

A continuación se presenta el resumen de cada tema.

1. Talleres de capacitación

Se realizaron dos talleres de capacitación dirigidos a los técnicos y miembros de las brigadas de saneamiento. El primer taller se realizó el 03 de junio, antes del inicio de las actividades consideradas en el proyecto de Contingencia fitosanitaria y el segundo taller se realizó el 30 de junio.

En el primer taller se revisó la sintomatología de *Lophodermium* y se expuso la información conocida hasta el momento sobre las ninfas de *O. cerca fowleri*; el taller consistió en una plática y en una visita a campo.

En el segundo taller, se expuso la información vista en el primer taller y se realizó una demostración del muestreo de ninfas, instalación de sitios y aplicación de tratamientos del ensayo de control en campo; el taller consistió en una plática y en una visita a campo.

2. Evaluación de los tratamientos contra *Lophodermium* aplicados en el Municipio de Zacatlán durante la primera mitad del año

Lophodermium. En la evaluación de las actividades de control de *Lophodermium* no se encontraron diferencias entre los tratamientos (aplicación de clorotalonil al suelo, quemado de hojarasca, barrido, quemado y barrido) y el testigo, en la cantidad de acículas con infección de hongos, es decir, no hubo una reducción de la infección de hongos en las acículas.

O. cerca fowleri. En julio-agosto se evaluó el efecto de los tratamientos contra *Lophodermium* en las ninfas de *O. cerca fowleri*.

Se encontró que la población de ninfas tiene un comportamiento de agregación, particularmente en microambientes con alta humedad, capa gruesa de hojarasca y presencia algunas plantas preferidas, que al parecer son su fuente de alimento; y que entre mayor sea el grado de disturbio que la actividad de saneamiento provoque al suelo, mayor es la reducción del número de ninfas.

Toda actividad dirigida a modificar las condiciones del suelo conlleva un impacto ecológico proporcional al grado de perturbación provocado, por lo que, si bien se genera un control de la población de ninfas, también se provoca un impacto negativo en el ecosistema, por lo que se debe tener cuidado al recomendar el barrido de acículas como medida de combate contra las ninfas de *Ocoaxo*.

3. Ensayo de control de ninfas de *Ocoaxo cerca fowleri* en campo

En el ensayo de control de ninfas de *O. cerca fowleri* en campo, realizado en julio, se evaluaron tres insecticidas químicos (acefato, bifentrina, bifentrina + imidacloprid) y dos biológicos (*Metarhizium anisopliae* comercial, *M. anisopliae* cepa MaN1 proporcionada por el Dr. Francisco Hernández Rosas, del Colegio de Postgraduados (CP)-Campus Córdoba).

Cada repetición (dos por tratamiento) consistió en un sitio de 400 m² compuesto por cuatro cuadrantes de 100 m². El tratamiento solo se aplicó en un cuadrante.

Se realizaron tres evaluaciones:

- Inicial: solo se muestrearon los tres cuadrantes testigo.
- Segunda: solo el cuadrante tratado.
- Tercera: el cuadrante tratado y un cuadrante testigo.

La metodología de muestreo se describe en la [sección](#) correspondiente.

Se compararon los resultados de los cuadrantes tratados con sus cuadrantes testigo (Figura 1).

Con la aplicación del *M. anisopliae* comercial, en ambas dosis y con/sin barrido, con acefato con barrido y con *M. anisopliae* del CP con barrido, se tuvo menor población de ninfas de *O. cerca fowleri* que en los testigos. En el resto de tratamientos no se observaron diferencias en la cantidad de ninfas.

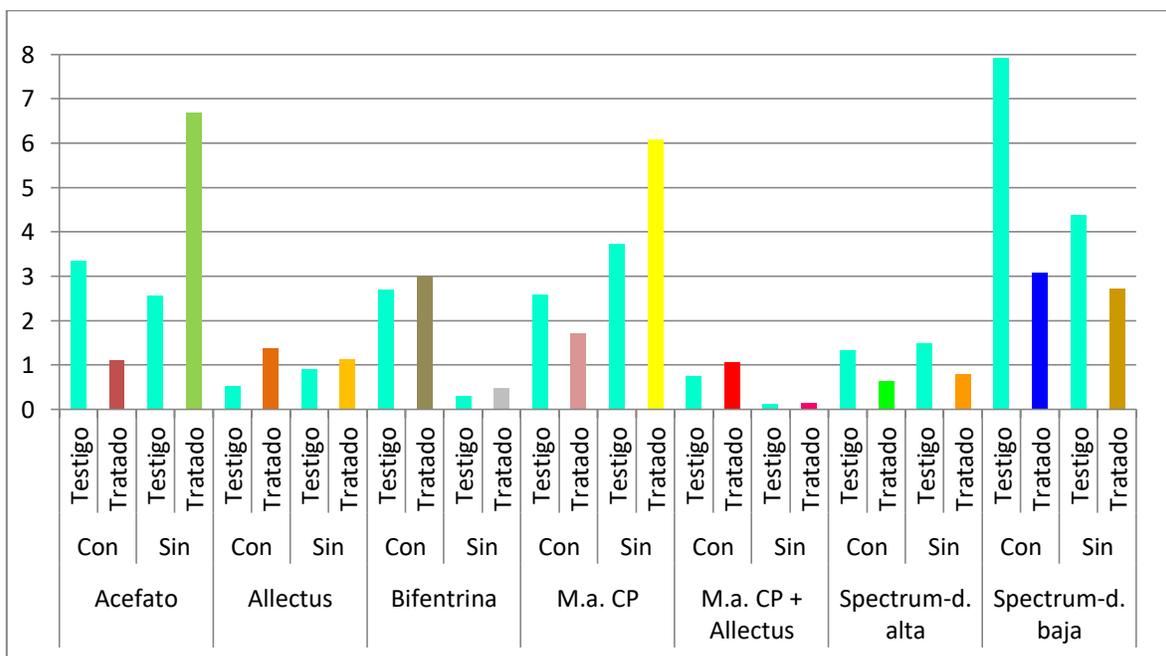


Figura 1. Promedio de salivazos por m²; datos de 1140 unidades de 1 m² cada una.

En la gráfica, Con=con barrido; Sin=sin barrido, Spectrum es el nombre del producto comercial de *Metarhizium anisopliae*, M.a. CP es la formulación de *M. anisopliae* del CP y Allectus es el nombre comercial del producto evaluado con bifentrina + imidacloprid.

Después del ensayo de control de ninfas en campo se realizó un ensayo *in vitro* de control de adultos.

4. Primer ensayo *in vitro* de control de adultos de *Ocoaxo cerca fowleri*

El ensayo *in vitro* de control de adultos de *O. cerca fowleri* se realizó en agosto; se evaluó al acefato, *M. anisopliae* comercial a las dosis baja y alta evaluadas en el ensayo de control en campo y la cepa MaN1 de *M. anisopliae* del CP.

Con el acefato se registró el 100 % de mortalidad a las 3 horas de aplicado el tratamiento, mientras que con el *M. anisopliae* comercial en dosis alta ocurrió a las 27 horas, observándose en este último, desarrollo de micelio sobre el cuerpo de los adultos.

El *M. anisopliae* comercial en dosis baja también infectó a los adultos tratados, pero lo hizo en menor proporción, mientras que en los adultos tratados con el *M. anisopliae* del CP no se desarrolló micelio y la tasa de mortalidad fue similar a la del testigo, es decir, su efectividad fue muy baja o nula.

Para corroborar la germinación de los entomopatógenos, se sembró una muestra del *M. anisopliae* comercial y de la formulación del CP; esto demostró que ambas cepas estaban activas.

Se desconoce porque la cepa MaN1 de *M. anisopliae* no provocó una mortalidad significativa en adultos de *O. cerca fowleri*, aunque se cree que la especificidad hacia salivazos de la caña de azúcar de dicha cepa, afectó su capacidad para infectar a *Ocoaxo*, aun cuando ambas especies sean cercópidos (familia Cercopidae).

Los resultados obtenidos obligaron a replantear la recomendación para el combate en campo.

5. Modificación del planteamiento de control de adultos de *Ocoaxo cerca fowleri*

Debido a los resultados deficientes de la cepa MaN1 de *M. anisopliae* en las evaluaciones de control en campo e *in vitro*, se propuso una modificación al planteamiento inicial de control, en común acuerdo entre el Dr. Francisco Hernández Rosas y el Dr. David Cibrián Tovar.

La modificación al planteamiento de control consistió en la aplicación de una mezcla de:

- 250 gr de acefato (Orthene Ultra).
- 1 L de *Metarhizium anisopliae* comercial (Spectrum Meta-A; 1×10^{11} UFC por litro).
- 500 ml de *Beauveria bassiana* (1×10^{12} esporas por 500 ml).
- Y 100 mL del surfactante-penetrante Inex-A por cada 100 L de agua.

Esta mezcla de productos se evaluó mediante un ensayo de control *in vitro*, cuyos resultados se presentan en éste informe.

6. Segundo ensayo *in vitro* de control de adultos de *Ocoaxo* cerca *fowleri*

En el ensayo *in vitro* de control de adultos de *O. cerca fowleri* realizado en septiembre se evaluó al: 1: acefato, 2: producto comercial de *M. anisopliae*, 3: producto comercial de *M. anisopliae* + *Beauveria bassiana* + *Paecilomyces fumosoroseus*, 4: acefato en combinación con el producto comercial de *M. anisopliae* y 5: acefato en combinación con el producto comercial de *M. anisopliae* + *B. bassiana* + *P. fumosoroseus*.

Los resultados indican que:

1. La aplicación de acefato, solo o en combinación con alguno de los insecticidas biológicos evaluados, provocó la muerte de los adultos de *O. cerca fowleri* en menor tiempo que cuando se aplicó alguno de los insecticidas biológicos solos.
2. De los tratamientos con algún insecticida biológico, el que tuvo la mayor mortalidad y desarrollo de micelio en los adultos, fue el acefato + *M. anisopliae* comercial, seguido del acefato + (*M. anisopliae* + *B. bassiana* + *P. fumosoroseus* comercial), del *M. anisopliae* comercial y del *M. anisopliae* + *B. bassiana* + *P. fumosoroseus* comercial, por lo que se puede recomendar la aplicación de alguno de los productos biológicos en combinación con acefato, ya que el tiempo de desarrollo de los entomopatógenos en los insectos fue menor que cuando se aplicaron los productos biológicos solos.
3. De acuerdo a los resultados de este ensayo *in vitro*, se puede esperar que la modificación del planteamiento de control de adultos tenga un control adecuado de adultos de *Ocoaxo* en los sitios donde se aplicó.

7. Daño causado por *Ocoaxo* al follaje de los hospedantes

En agosto-septiembre se instalaron cajas de emergencia con individuos de *Pinus oaxacana*, *Pinus patula* o *Pinus pseudostrobus* en su interior, unas con adultos de *O. cerca fowleri* y otras con adultos de *O. assimilis*.

Se encontró que la alimentación de los adultos de ambas especies generó lesiones en las acículas que consistían en una franja necrosada circundando el sitio de alimentación, que formaban un bandeado con alternancia de franjas verdes y necrosadas y que cubrían una parte o la totalidad de la longitud de la acícula, o bien, necrosis parcial o total de la acícula cuando el bandeado no era aparente.

Durante los recorridos de campo en los municipios de Tetela de Ocampo y Zautla, se observó que algunos adultos de *O. cerca fowleri* se alimentaban en las nervaduras centrales de hojas de herbáceas de hoja ancha, encinos y otras especies arbóreas, lo que

indica que el rango de hospedantes de los adultos es más amplio de lo que se pensaba en un principio.

El cambio de color del follaje de los pinos como consecuencia del daño causado por la alimentación de los adultos de *Ocoaxo* en las acículas, fue más evidente conforme transcurría el tiempo, de manera que para octubre, el cambio de color ya era muy evidente.

En noviembre, el cambio de color de las acículas de los pinos fue perceptible en diversas zonas boscosas con presencia de pinos.

El daño en áreas con pinos no fue homogéneo, observándose áreas con individuos con síntomas ligeros -copa de color verde alimonado- hasta áreas con individuos con síntomas muy severos -copa de color café-.

8. Monitoreo terrestre y detección temprana – trampeo de adultos de *Ocoaxo* cerca *fowleri*

Durante el periodo de uso de las trampas de luz (de julio a noviembre) en los municipios de Zacatlán de las Manzanas, Aquixtla, Tetela de Ocampo, Xochiapulco y Zautla, se obtuvieron 167 colectas, de las cuales, 14 corresponden a julio, 43 a agosto, 48 a septiembre, 40 a octubre y 22 a noviembre.

En total se capturaron 157 adultos en la trampa de Tetela, 138 en la de Zacatlán, 63 en la de Zautla, 31 en la de Aquixtla y 26 en la de Xochiapulco. La trampa que más tiempo estuvo en campo fue la de Zacatlán, seguida de las de Aquixtla y Tetela, Xochiapulco y Zautla.

La última fecha de captura en Zacatlán fue el 30 de septiembre, en Tetela fue el 21 de octubre, en Aquixtla fue el 26 de octubre, en Xochiapulco fue el 6 de octubre y en Zautla fue el 27 de octubre.

En la trampa de Zacatlán, donde además de las colectas se llevaba un registro de la precipitación, se observó que cuando ésta se incrementa, el número de adultos capturados se redujo y cuando la precipitación se redujo, el número de adultos se incrementó, lo que parece indicar que la precipitación es un factor ambiental que influye en los periodos de vuelo de los adultos.

9. Hongos de follaje involucrados en el proceso de declinación forestal

En julio se colectaron acículas con signos de infección de hongos de follaje en diversos sitios de los municipios de Zacatlán de las Manzanas, Aquixtla, Tetela de Ocampo y Xochiapulco.

Se realizó el aislamiento y descripción cultural de varios hongos del género *Lophodermium*. Como resultado de la caracterización molecular de los aislamientos, se determinó la identidad de *Lophodermium australe*.

Las colonias de hongos se utilizaron para realizar el ensayo de control con fungicidas, en el cual, el propiconazol, oxiclóruo de cobre y clorotalonil, a todas las dosis evaluadas (dos por fungicida), inhiben el crecimiento micelial del aislamiento de *Lophodermium* proveniente de Zacatlán

El 01 de noviembre de 2016, fueron inoculadas acículas de árboles de *P. oaxacana* con una suspensión de micelio de un aislamiento de *Lophodermium* de Zacatlán. Para obtener síntomas y signos del hongo y corroborar si es patogénico, se tendrá que esperar 12 meses.

En la evaluación de incidencia de *Lophodermium* efectuada en noviembre, se encontró que:

- En las acículas de pinos colectadas en Zacatlán, Tetela, Xochiapulco y Aquixtla, de mayor a menor presencia de histerotecios, de 35.008 a 20.070% de acículas tenían histerotecios y síntomas de daño por alimentación de adultos de *O. cerca fowleri*; mientras que en Xochiapulco solo el 5.333% de las acículas evaluadas tenían esta condición.
- Solo en Zacatlán se encontró un 1.818 % de acículas evaluadas con histerotecios y sin síntomas de daño por alimentación.

10. Actividades de difusión

El 26 de octubre, el Dr. David Cibrián Tovar expuso los avances del presente proyecto de investigación hasta ese momento, ante el Grupo de trabajo de insectos, enfermedades y plantas invasoras, de la Comisión Forestal de América del Norte, del que es miembro, durante un recorrido en campo por un área boscosa afectada por *O. cerca fowleri*, en la comunidad de San Nicolás Calapa, municipio de Tetela de Ocampo, en los que se observa el daño causado por la alimentación de los adultos de *O. cerca fowleri* y se hicieron notar la sintomatología del daño y la superficie afectada.

Durante el mes de diciembre se realizaron reuniones de difusión de las actividades de saneamiento y de los resultados del proyectos de investigación, en los municipios de

Tetela de Ocampo el 02 de diciembre, Nicolas Bravo el 05 de diciembre, Zautla y Xoxhiapulco el 06 de diciembre, Aquixtla el 08 de diciembre y Zacatlán el 09 de diciembre.

La organización de dichas reuniones de difusión estuvo a cargo de personal de la Unión Agroforestal de Puebla y de los técnicos en cada municipio.

La presentación de la información referente a las actividades de saneamiento estuvo a cargo de los técnicos responsables en cada municipio y de personal de la Unión Agroforestal de Puebla, sobre las acciones relacionadas con el seguimiento estuvo a cargo de personal de la CONAFOR y sobre los resultados del proyecto de investigación estuvo a cargo de miembros del equipo de trabajo de dicho proyecto.

INTRODUCCIÓN

El presente proyecto atiende la necesidad de combatir y estudiar algunas de las plagas y enfermedades existentes en los terrenos forestales de la zona de la Sierra Norte, Región de Libres-Serdán y Sierra Negra del Estado de Puebla, que pueden ser la causa de la declinación forestal.

Debido a que la superficie tratada en comparación con la afectada por la declinación forestal es considerablemente mayor, la **Unión Agroforestal de Puebla A.C.**, que integra a 12 Socios a nivel Estatal, entre Asociaciones Regionales de Silvicultores y Uniones de Ejidos, unió fuerzas y logró el consenso con diversas autoridades que representan el Gobierno Federal (CONAFOR, SEMARNAT), así como con algunos prestadores de Servicios Técnicos Forestales, para tomar medidas emergentes que combatan y contrarresten el daño causado por *Ocoaxo* cerca *fowleri*, *Ocoaxo assimilis* y *Lophodermium sp.* y así revertir el daño en los bosques afectados de Puebla.

Lophodermium puede infectar las acículas verdes que recién brotan de su fascículo y es común que produzca la caída prematura de las acículas enfermas o cloróticas, aunque esto no se ha demostrado en su totalidad. Los daños de este hongo ocurren normalmente en arbolado de más de dos años, por lo general en las ramas inferiores del árbol. Antes se le consideraba el causante de graves defoliaciones en viveros y repoblaciones jóvenes, aunque hoy se sabe que los daños son producidos por especies con similitud taxonómica.

A pesar de que Cercopidae es "la familia de insectos chupadores de savia del xilema más grande del mundo" (Silva-Carvalho, Morimasa-Sakakibara, & Webb, 2016) y algunos "son plagas de plantas, afectándoles ya sea por alimentarse de ellas, depositar sus huevecillos en ellas o por transmitirles patógenos como virus" (Dietrich, 2003; Mariño-Pérez, Pacheco-Rueda, & Dietrich, 2012), a nivel mundial no se ha presentado un caso similar en escala de daño como el causado por las dos especies de *Ocoaxo* en coníferas del Estado de Puebla, aunque en el Estado de Oaxaca se han registrado algunos casos esporádicos.

El género *Ocoaxo* cuenta con diversas especies distribuidas en varios Estados de la República mexicana, como son *O. punctus* (COOL, 2016; Fennah, 1968; Mariño-Pérez, et al., 2012; Metcalf, 1961), *O. bivittus* (COOL, 2016; Fennah, 1968; Metcalf, 1961), *O. confusus* (COOL, 2016; Fennah, 1968; Metcalf, 1961), *O. cruciatus* (COOL, 2016; Fennah, 1968; Metcalf, 1961), *O. femoratus* (COOL, 2016; Fennah, 1968; Metcalf, 1961), *O. fowleri* (COOL, 2016; Fennah, 1968; Metcalf, 1961), *O. inflexus* (COOL, 2016; Fennah, 1968; Metcalf, 1961), *O. lineatus* (COOL, 2016; Fennah, 1968; Metcalf, 1961), *O. nuptialis* (COOL, 2016; Fennah, 1968; Metcalf, 1961), *O. ornatipennis* (COOL, 2016; Fennah, 1968; Metcalf, 1961), *O. similis* (COOL, 2016; Fennah, 1968; Metcalf, 1961) y *O. varians* (COOL, 2016; Fennah, 1968; Metcalf, 1961).

De los cercópidos *O.* cerca *fowleri* y *O. assimilis* que se encuentran en la región contemplada en el presente proyecto de investigación, se estudiaron los estragos a los pinos, se evaluaron diversas medidas de control y se dio seguimiento a su ciclo biológico.

OBJETIVOS

El contrato de servicios celebrado entre la **Unión Agroforestal de Puebla (UNIÓN)** y la **Universidad Autónoma Chapingo (UACH)**, en el marco del proyecto general convenido entre la **CONAFOR** y la **UNIÓN**, de nombre "Plan Integral Estatal de Contingencia fitosanitaria para el combate de los principales actores que deterioran a las coníferas de Puebla", contempla al presente proyecto de investigación, considerado como un objetivo específico del mencionado proyecto general, y que incluye las actividades de "evaluación de los tratamientos de saneamiento en el proceso de declinación forestal, control de los chupadores de savia de género *Ocoaxo sp.* en los municipios de Zautla, Xochiapulco, Tetela de Ocampo y Aquixtla y además del estudio de los hongos del follaje en este proceso de declinación".

En cada una de las actividades anteriores se incluyó una serie de productos, mencionados a continuación, los cuales se encuentran mencionados en el contrato de servicios y que se cumplieron mediante un conjunto de actividades específicas, y cuya exposición de la metodología, resultados obtenidos y conclusiones en cada una de ellas, es objeto el presente informe.

Productos

Los productos del proyecto de investigación son:

- Diagnóstico general de estado fitosanitario forestal en los bosques en estos 5 municipios del Estado de Puebla.
- Generación de tratamiento de control químico y biológico para los patógenos e insectos relacionados con la caída foliar de los pinos.
- Descripción detallada y complementaria acerca de la aplicación de los tratamientos propuestos por los mismos investigadores.
- Documento integrado que plasme las condiciones del lugar de estudio (agente causal, daños consecuentes, enfermedades relacionadas, control y combate del agente causal de dicha enfermedad o problema).
- Alternativas de remediación de los daños observados en el fenómeno de caída foliar en los pinos.

Dichos productos se agruparon en tres productos entregables:

1. Evaluación de los tratamientos en proceso de declinación en la Sierra Norte de Puebla - evaluación de los tratamientos fitosanitarios aplicados contra *Lophodermium* en Zacatlán de las Manzanas durante la primera mitad de 2016-.

1.1. Esclarecimiento del efecto de las acciones de combate sugeridas por la SEMARNAT contra *Lophodermium* en la salud de sus hospedantes.

1.2. Reconocer el posible efecto de las acciones de combate ya realizadas en el fenómeno de declinación forestal, de manera indirecta contra *Ocoaxo*.

1.3. Reconocer que algunas de dichas acciones de combate pudieran ser consideradas como factibles de usar como medidas de control de algunos de los agentes que contribuyen al fenómeno de declinación forestal.

2. Acciones de control fitosanitario del agente causal (*Ocoaxo sp.*) en el bosque bajo contingencia.

2.1. Esclarecimiento del papel de estos insectos en el proceso de declinación y caída de acículas.

2.2. Reconocer el posible daño que causa este insecto en la vegetación.

2.3. De resultar plaga el insecto estudiado, se ofrecerá información útil para el control de estos insectos.

3. (El papel de) los hongos de follaje en el proceso de declinación forestal.

3.1. Determinación de los daños por hongos asociados al follaje de pino:

Reconocer el posible daño que causan estos hongos en el bosque de coníferas.

Reconocer la patogenicidad de estos hongos y generar los criterios que permitan tomar las decisiones en tiempo y forma para el control.

3.2. Determinar el efecto fungicida de productos químicos en la protección de acículas o en el desarrollo de colonias de hongos del género *Lophodermium*.

RESULTADOS

El presente proyecto de investigación se realizó de junio a diciembre del 2016.

Las actividades de seguimiento al ciclo biológico de *Ocoaxo* cerca *fowleri*, de los daños causado por los adultos y de los ensayos de control para esta especie de cercópido; de la determinación de la identidad de los hongos de follaje involucrados en el proceso de declinación forestal y de la evaluación de los tratamientos contra *Lophodermium* aplicados en Zacatlán de las Manzanas, incluyeron actividades en campo y en laboratorio, las cuales se realizaron entre julio y noviembre.

En octubre y diciembre del mismo año se realizaron diversas actividades de difusión de la información generada en el proyecto de investigación y de los resultados, hasta ese momento, de las actividades de combate.

En diciembre se colaboró con el equipo que realizó la aplicación de las actividades de combate, para la realización de eventos de difusión en Tetela de Ocampo, Nicolás Bravo, Xochiapulco, Zautla, Aquixtla y Zacatlán.

Cada una de las actividades desarrolladas en el proyecto de investigación que se describen a continuación, dieron cumplimiento a los objetivos del proyecto y forman parte de los productos entregables.



1. Talleres de capacitación



Se realizaron dos talleres de capacitación dirigidos a los técnicos y miembros de las brigadas de saneamiento; el primero se realizó el 03 de junio y el segundo el 30 de junio.

Ambos talleres estuvieron coordinados por el Ing. Juan Carlos Carrillo Fonseca, enlace de sanidad de la CONAFOR, y el Ing. Francisco Rivera Rico, de la Unión, y contaron con la intervención del Dr. David Cibrián Tovar, el M.C. Uriel M Barrera Ruiz y el Ing. Sergio Arturo Quiñónez Favila, del proyecto de investigación.

En el primer taller estuvieron presentes los miembros de la brigada del municipio de Zacatlán de las Manzanas, otros miembros del equipo de trabajo del proyecto general y el Lic. Humberto Aguilar Viveros, gerente de la CONAFOR de Puebla.

El taller estuvo compuesto de dos secciones, una consistió en una plática que se realizó en las instalaciones de la empresa Asesores en Manejo de Recursos Forestales, S.C., en Chignahuapan, y en una visita a campo en un sitio cercano a la carretera Zacatlán-Chignahuapan, para observar lo visto en la plática (ver Figura 2).

En la plática se realizó la identificación de *Lophodermium* y de las ninfas de *Ocoaxo* cerca *fowleri*, que fueron colectadas en la comunidad de San Miguel Tenango, municipio de Zacatlán, días antes del taller (ver Figura 2).

En campo se observó a las ninfas de *O. cerca fowleri* en el suelo (ver Figura 2).



Figura 2. Taller de capacitación del 03 de junio del 2016.

En el taller del 30 de junio participaron miembros de las brigadas de los municipios de Tetela de Ocampo, Aquixtla, Nicolas Bravo, Zautla, Xochiapulco y Zacatlán.

La brigada de este Zacatlán, aun cuando no forma parte del proyecto general, contribuyó en las actividades de evaluación de los tratamientos contra *Lophodermium* aplicados en Zacatlán, en la instalación del ensayo de control en campo y en el levantamiento de datos para la evaluación de éste, y en la colecta de follaje de pinos en Zacatlán, usado para determinar la identidad de los hongos del follaje involucrados en el proceso de declinación foliar en dicho municipio.

Este taller tuvo dos secciones: una plática en las oficinas de la Unión ubicadas en la carretera Zacatlán-Chignahuapan, en Zacatlán, Puebla, y una práctica en campo en la localidad de San Miguel Tenango, Zacatlán, Puebla; la organización de las actividades en campo estuvo encabezada por el doctor David Cibrián Tovar y su equipo de trabajo.

En la plática se expuso la información conocida hasta ese momento sobre *O. cerca fowleri*; la sintomatología del daño y características morfológicas generales, sobre el método de muestreo y un resumen del ensayo de control en campo (ver Figura 3).

En la práctica se visitó la zona donde se instalaron algunos de los sitios del ensayo de control en campo y se realizó una demostración de la instalación de sitios, barrido de acículas, aplicación de tratamientos y muestreo de ninfas en el suelo (ver Figura 3).



Figura 3. Plática y práctica del taller capacitación realizado el 30 de junio del 2016.



2. Evaluación de la efectividad de los tratamientos contra *Lophodermium* en el municipio de Zacatlán



La evaluación de la efectividad de los tratamientos contra *Lophodermium* se realizó inicialmente para determinar cuál fue el efecto de los tratamientos en *Lophodermium*, pero debido a que en los primeros recorridos en campo, los miembros de la brigada de Zacatlán encontraron a las ninfas de *O. cerca fowleri* en el suelo alimentándose en las raíces de varias especies de plantas, también se evaluó el efecto de los tratamiento en la población de ninfas.

2.1. Metodología

En la primera semana de julio se realizaron recorridos en los polígonos tratados contra *Lophodermium* y en zonas boscosas no tratadas (testigos) (ver Figura 4) para seleccionar las áreas en las que se instalaron los sitios de evaluación.



Figura 4. Brigada de trabajo de Zacatlán de las Manzanas y algunas de las ninfas encontradas.

Por cada tipo de tratamiento se seleccionó un polígono y fuera de ellos (testigos) (ver Cuadro 1).

Para la selección del sitio se consideró que la pendiente no fuera tan pronunciada, que tuviera una composición de especies similar a las otras áreas prospecto, con presencia de pinos con una altura preferentemente no mayor a 5 metro (este no fue un factor determinante para la selección), suelo con una capa de hojarasca cubriéndolo y que no estuvieran a más de 100 metros de algún camino.

Cuadro 1. Relación de polígonos seleccionados por tratamiento.

	Tratamiento	Polígono
1	Barrido-quema-fumigación	1
2	Barrido-fumigación	7
3	Barrido	8
4	Fumigación	13
5	Testigos	--

A cada sitio de 400 m² (20 metros de cada lado), se colocó una estaca en cada esquina, en el centro del sitio, al centro de cada lado y en el centro de cada uno de los cuatro cuadrantes que se formaron; estos puntos se geo-referenciaron (ver Figura 5).

El número de sitios por tratamiento fue de dos y el total de sitios fue de 10.



Figura 5. Proceso de instalación de sitios; fotografía tomada el 14 de junio del 2016.

La metodología para evaluar la presencia de ninfas de *O. cerca fowleri* en los sitios fue la siguiente:

- En cada uno de los cuadrantes del sitio se seleccionaron al azar 10 cuadros de 1 m².
- En el punto seleccionado se colocó un marco de pvc de 1 m por lado, se tomó al menos una fotografía inicial, se geo-referenció el centro del cuadro, se removió la hojarasca que cubría la superficie del suelo en el interior del cuadro, se identificó visualmente a los salivazos y a cada uno de ellos se le colocó en un costado una rondana de 3/8" pintada de color rojo o anaranjado, se removió parte de la "saliva" que cubría a los *Ocoaxo* para saber si era una ninfa o un adulto, se contó el número de salivazos y se tomó al menos una fotografía final.
- Los datos obtenidos se anotaron en formatos de registro y posteriormente se transcribieron a una base de datos.

El análisis de los datos se realizó una vez que se concluyó la evaluación de los sitios. En el análisis se tomó en cuenta el tipo de distribución (distribución de contagio) que muestra la población de ninfas de *O. cerca fowleri*.

Para la evaluación de *Lophodermium*, el 25 de agosto se realizó la recolecta de acículas formadas en 2015 y 2016; para ello se seleccionaron árboles en pie en los sitios instalados en los polígonos que se mencionan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Relación de polígonos de la evaluación efectividad de tratamientos contra *Lophodermium* realizados durante la primera mitad de 2016.

Tratamiento	Polígono	Número de sitio
1 Barrido-quema-fumigación	1	VII, VIII
2 Barrido-fumigación	7	III, IV
3 Barrido	8	I, II
4 Fumigación	13	IX, X
5 Testigos	--	V, VI

La metodología para coleccionar las muestras con las que se evaluó la presencia de *Lophodermium* en los sitios fue la siguiente:

- En cada sitio se seleccionaron seis árboles y de cada uno se cortó una rama seleccionada al azar.

- De las ramas cortadas se desprendieron alrededor de 300 fascículos (ver Cuadro 2), mismos que se almacenaron en una bolsa resellable por sitio; los fascículos de cada árbol se agruparon en un solo paquete y se les colocó un identificador con el número de árbol correspondiente.

La evaluación de la incidencia y nivel de daño se realizó con la siguiente metodología:

- Para cada sitio, de las acículas colectadas se seleccionaron 50 fascículos al azar por árbol, para dar un total de 300 fascículos por sitio.
- En los fascículos seleccionados se evaluó la presencia/ausencia de *Lophodermium* en las acículas; se consideró que un fascículo tenía presencia de *Lophodermium* cuando al menos una de las acículas que lo componían presentaba síntomas o signos (cuerpos fructíferos: histerotecios).

2.2.1. Resultados para *Lophodermium*

El hongo estuvo presente en follaje del 2015, con al menos 15 meses de edad, de *P. pseudostrabus* y *P. patula* en los 10 sitios.

Hubo presencia de histerotecios maduros y en proceso de formación en las acículas evaluadas (Figura 6a, b, c).

En 751 fascículos de un total de 3000 fascículos, en donde se incluyen los testigos, hubo presencia de histerotecios de *Lophodermium sp.* (Figura 7 y Cuadro 3); 1958 fascículos estaban totalmente colapsados y necrosados o presentaban al menos una de las acículas necrosadas y 291 fascículos presentaron inicios de necrosis causada por insectos chupadores (Cuadro 3).

El hongo se encontró en los sitios de los polígonos 8 (I y II; barrido), 7 (III y IV; barrido-fumigación), 1 (VII y VIII; barrido-quema-fumigación) y 13 (IX y X; fumigación) (ver Cuadro 3).

En el follaje de 2016 no hubo cambio de color causado por *Lophodermium*, pero hubo daños por la alimentación del adulto de *O. cerca fowleri*, el cual genera lesiones que rápidamente causan una clorosis alrededor del sitio de alimentación y un colapso del tejido (Figura 6d).

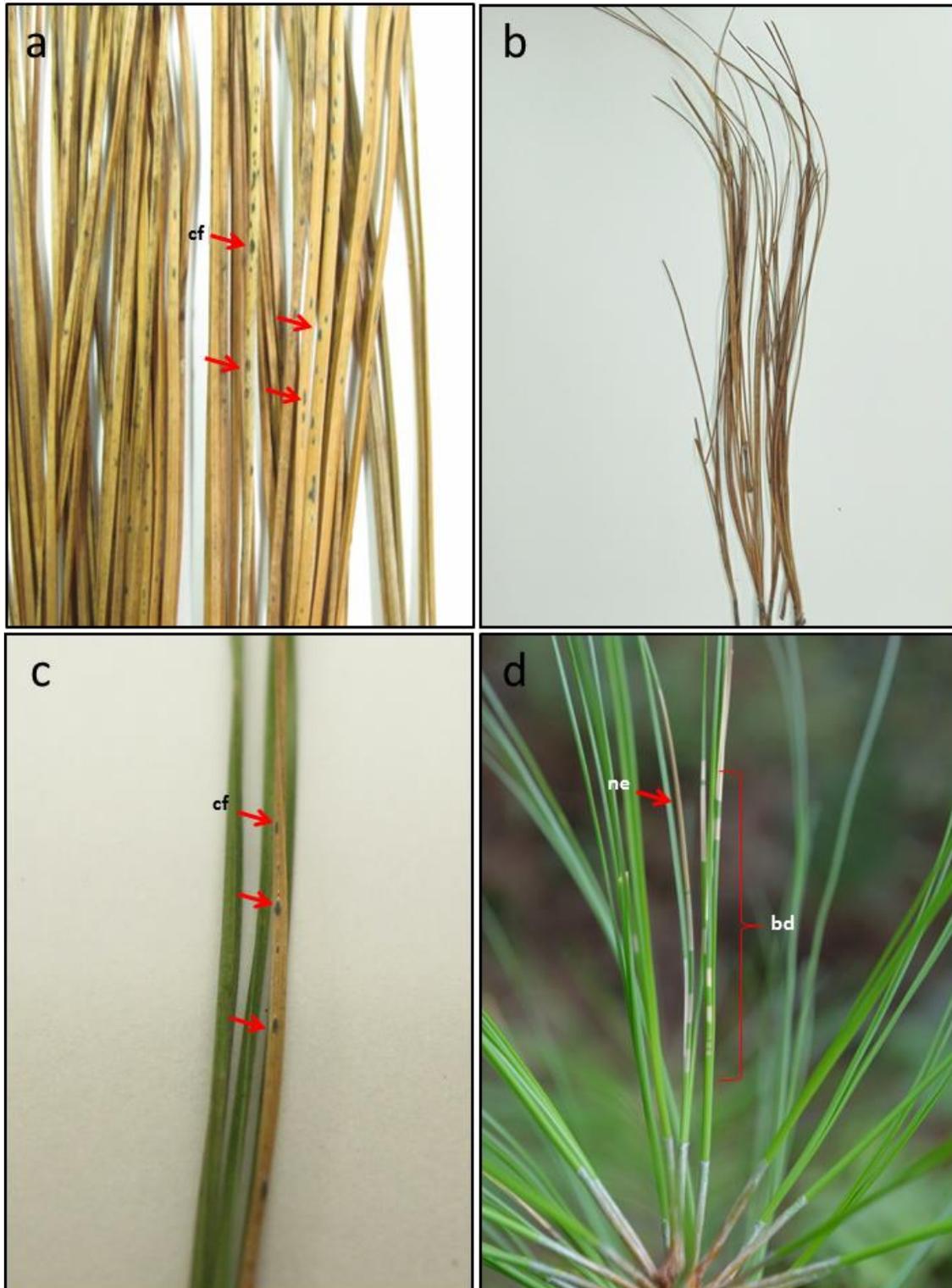


Figura 6. *Pinus pseudostrobus*. a) cuerpos fructíferos (cf) de *Lophodermium* en acículas de 2015; a, b) acículas con necrosis (ne); d) follaje nuevo de 2016 con necrosis (ne) y bandeado (bd) causado por *Ocoaxo* cerca *fowleri*.

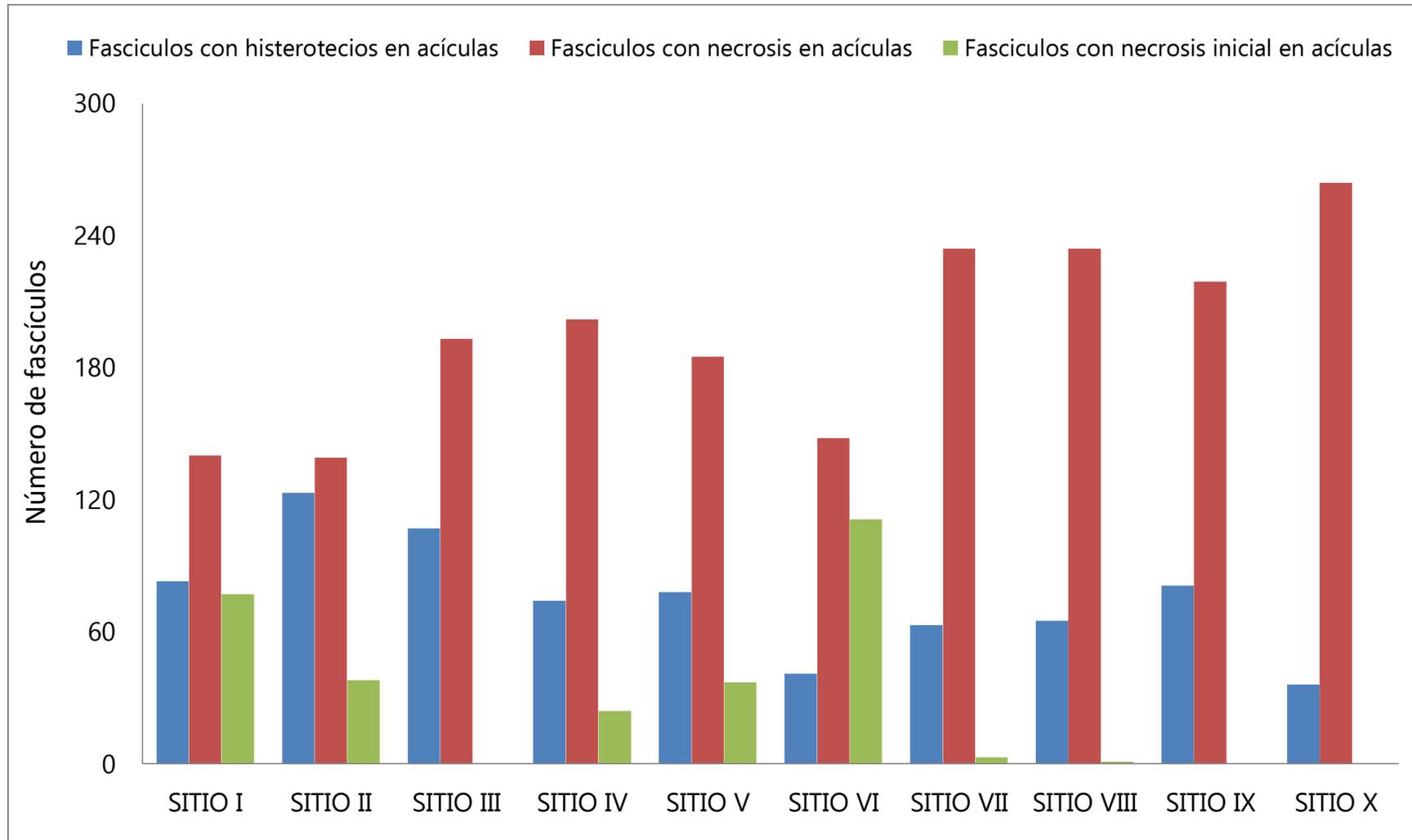


Figura 7. Número de fascículos del 2015 con síntomas/signos de *Lophodermium* y daños por *Ocoaxo cerca fowleri* en *Pinus pseudostrobus* y *Pinus patula* en Zacatlán de las Manzanas.

Cuadro 3. Resultados de la evaluación de *Lophodermium* en follaje de 2015 en Zacatlán de las Manzanas.

Polígono	Tratamiento	Sitio	Fascículos		
			Histerotecios	Necrosados	Inicio de necrosis
8	Barrido	SITIO I	83	140	77
		SITIO II	123	139	38
7	Barrido-Fumigación	SITIO III	107	193	0
		SITIO IV	74	202	24
1	Barrido-Quema-Fumigación	SITIO VII	63	234	3
		SITIO VIII	65	234	1
13	Fumigación	SITIO IX	81	219	0
		SITIO X	36	264	0
	Testigo	SITIO V ^β	78	185	37
		SITIO VI	41	148	111
			751	1958	291
Total:					3000 [€]

β: sitio con *P. patula*; € : total de fascículos evaluados.

Las lesiones generadas por la alimentación del cercópido pueden facilitar la entrada de *Lophodermium* en follaje nuevo dañado. En Zacatlán, se encontró a *Lophodermium* en follaje del año 2015 y no se encontraron síntomas y signos en follaje del 2016.

2.2.2. Resultados para *Ocoaxo cerca fowleri*

Si se grafica la frecuencia del número de ninfas por m² por tipo de tratamiento contra *Lophodermium*, ordenada de menor a mayor valor (ver Figura 8 y Figura 9), se observa que la distribución de la ninfas es de contagio.

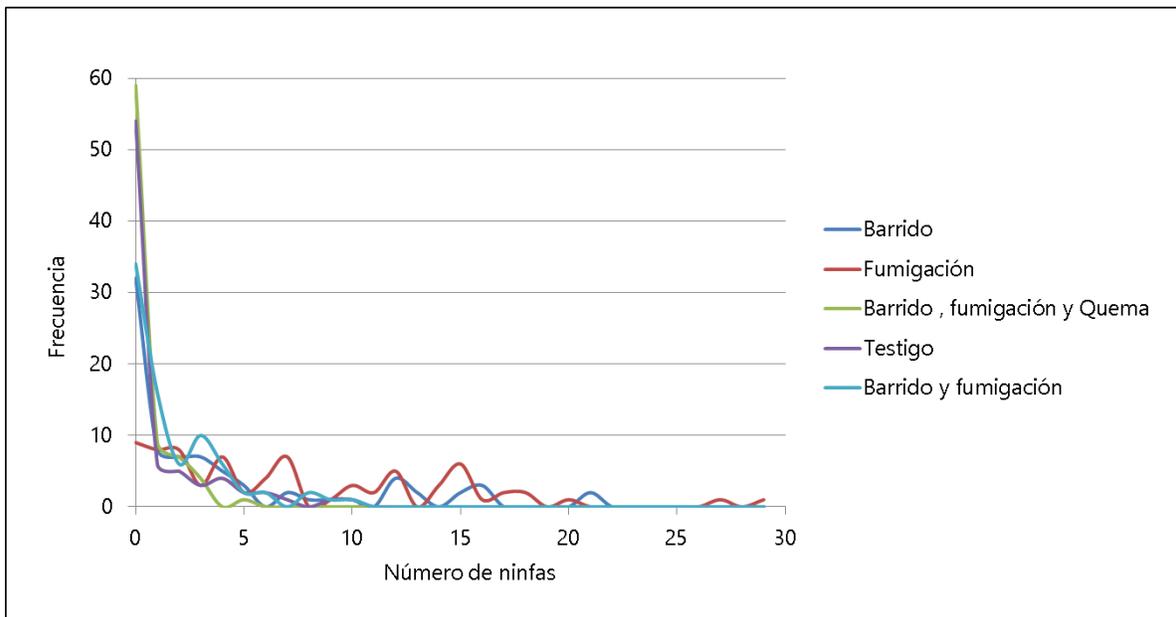


Figura 8. Gráfica de número de ninfas de *Ocoaxo cerca fowleri* por m² por tratamiento.

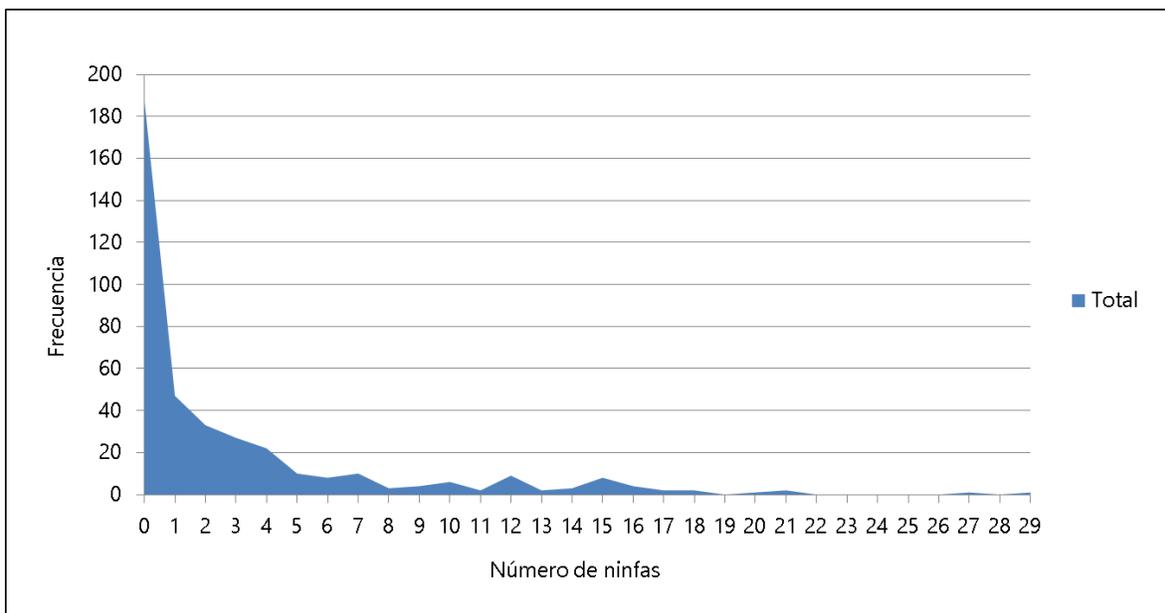


Figura 9. Gráfica de número total de ninfas de *Ocoaxo cerca fowleri* por m².

En la evaluación del efecto de los tratamientos de control contra *Lophodermium* en *O. cerca fowleri* (ver Cuadro 4), se encontró que entre mayor es la perturbación a la cubierta de hojarasca del suelo, mayor es el efecto en la mortalidad de las ninfas.

Cuadro 4. Promedio de ninfas m² por tratamiento.

Tratamiento	Promedio
Barrido , fumigación y quema	0.50
Barrido y fumigación	1.74
Barrido	3.91
Fumigación	7.36

Se encontró que las ninfas de *O. cerca fowleri* viven y se alimentan en la rizósfera, que los adultos jóvenes que aún se encuentran en el interior del salivazo permanecen debajo de la capa de hojarasca del suelo y que los adultos maduros buscan refugio contra factores ambientales en la capa de hojarasca, por lo que se puede considerar que es un insecto subterráneo, ya que éstos se definen como "cualquier insecto que en algún momento u otro, a lo largo de su desarrollo desde huevo hasta adulto maduro, un estado o estados de su periodo de vida transcurre en la superficie o enterrado en el suelo" (Ahmed, 2014; King, 1939).

"El suelo es un complejo de muchos factores que de forma separada y conjunta son de vital importancia para la vida de los insectos" (McColloch & Hayes, 1922) que habitan en él.

Algunos de los factores "más importantes son la topografía, textura, estructura, color, temperatura, humedad, evaporación, luz, presión, alimento, materia orgánica, contenido de arcillas, nitrógeno, dióxido de carbono, oxígeno y enemigos", de los que algunos son probablemente menos importantes y otros más importantes en la vida de los insectos (McColloch & Hayes, 1922).

En el suelo, las ninfas de *Ocoaxo* se pueden proteger por "largos o cortos periodos de condiciones ambientales desfavorables como bajas o altas temperaturas, viento, evaporación, luz y sequía" (Ahmed, 2014; King, 1939)

2.3. Conclusiones

El efecto de los tratamientos de combate contra *Lophodermium* en este hongo, se encontró que las actividades de control aparentemente no causaron una reducción en la incidencia de *Lophodermium* en las acículas de los pinos de los polígonos tratados.

El efecto de los tratamientos contra *Lophodermium* en *O. cerca fowleri* se encontró que el "Barrido, fumigación y quema" causó la mayor reducción del número de ninfas/m², es decir, entre mayor fue el grado de perturbación al suelo, mayor fue la reducción en el número de ninfas.

Toda actividad que modifique las condiciones del suelo, en este caso de la capa de hojarasca, conlleva un impacto ecológico, por lo que, si bien esta modificación al suelo genera un control de la población de ninfas de *O. cerca fowleri*, también se genera un impacto negativo en la cadena trófica y en el flujo de energía del ecosistema en un nivel que aún no se ha evaluado, pero que se puede suponer sería importante, de manera que es necesario sopesar los beneficios de la modificación de la cubierta del suelo con los daños ecológicos potenciales en el control del salivazo, antes de recomendarla.



3. Ensayo en campo de control de ninfas de *Ocoaxo cerca fowleri*



Se decidió evaluar la efectividad del planteamiento inicial de control que consistía en el uso de la cepa MaN1 de *M. anisopliae* proporcionada por el Dr. Francisco Hernández Rosas, del Colegio de Postgraduados - Campus Córdoba-, en las ninfas, mediante un ensayo de control en el que se evaluó, además del efecto la cepa MaN1, tres insecticidas comerciales y una formulación comercial de *M. anisopliae*, bajo condiciones de campo.

3.1. Metodología

A partir del recorrido realizado para la selección de sitios de la evaluación de la efectividad de los tratamientos contra *Lophodermium*, se seleccionaron áreas en las que se instalaron los sitios para éste ensayo de control.

El ensayo de control se hizo bajo un diseño experimental en bloques al azar. Los bloques fueron: con barrido de acículas y sin barrido de acículas; se evaluaron ocho tratamientos (ver Cuadro 5), cada uno con dos repeticiones.

Las dosis evaluadas fueron las recomendadas en el envase de los productos comerciales y por el Dr. Francisco Hernández Rosas, en el caso de la cepa MaN1 de *M. anisopliae*.

Se usó el surfactante-penetrante Inex-A (1 mL por litro) en los tratamientos 1, 2, 5 y 7 y el surfactante Freeway (0.5 mL por litro) en los tratamientos 3, 4 y 6. (Ver Cuadro 5).

Cada tratamiento tuvo dos repeticiones, de manera que el número total de repeticiones fue de 32. Cada repetición consistió en un sitio de 20 m por lado (400 m²) compuesto por cuatro cuadrantes de 100 m² cada uno.

En cada esquina y en el centro del sitio se colocó una estaca, estos puntos se georeferenciaron. Se seleccionó al azar uno de los cuadrantes y se delimitaron sus bordes.

A cada sitio se le asignó el tratamiento y el número de repetición de manera aleatoria. En los sitios con la condición de "barrido", la remoción de la capa de hojarasca se hizo de manera previa a la aplicación del tratamiento correspondiente, y la aplicación de éste se realizó inmediatamente, mientras que en las áreas "sin barrido", la aplicación se hizo sobre la capa de hojarasca.

Cuadro 5. Tratamientos del ensayo en campo de control de *Ocoaxo cerca fowleri*.

Con entomopatógenos:

- 1 *M. anisopliae* - formulación comercial (Spectrum Meta A®) - dosis alta (3.0 L/ha)
 - 2 *M. anisopliae* - formulación comercial - dosis baja (1.0 L/ha)
 - 3 *M. anisopliae* - Colegio de Postgraduados; dosis: 0.5 L/ha.
 - 4 *M. anisopliae* – Colegio de Postgraduados + Allectus; dosis: 0.5 L + 0.3 L por ha.
-

Con insecticidas químicos:

- 5 Sistémico – acefáto, nombre comercial: Orthene ultra; dosis alta: 1 kg/ha
 - 6 Allectus; dosis: 0.3 L/ha.
 - 7 De contacto – bifentrina, nombre comercial: Talstar 100 CE; dosis: 600 mL/ha.
-
- 8 Solo recibe agua en la misma dosis por unidad de superficie.
-

La aplicación de los tratamientos se llevó a cabo solamente en el cuadrante delimitado y se aplicó con bombas manuales (ver Figura 10 y Figura 11).

Los brigadistas que realizaron la aplicación de los tratamientos, así como el encargado de la preparación de las soluciones (tratamientos), utilizaron equipos de seguridad tales como guantes, overol, gafas y mascarilla (ver Figura 10 y Figura 11).

Durante la aplicación de los tratamientos, solo el aplicador y un ayudante, también con equipo de seguridad, permanecieron en el cuadrante tratado (ver Figura 10 y Figura 11).

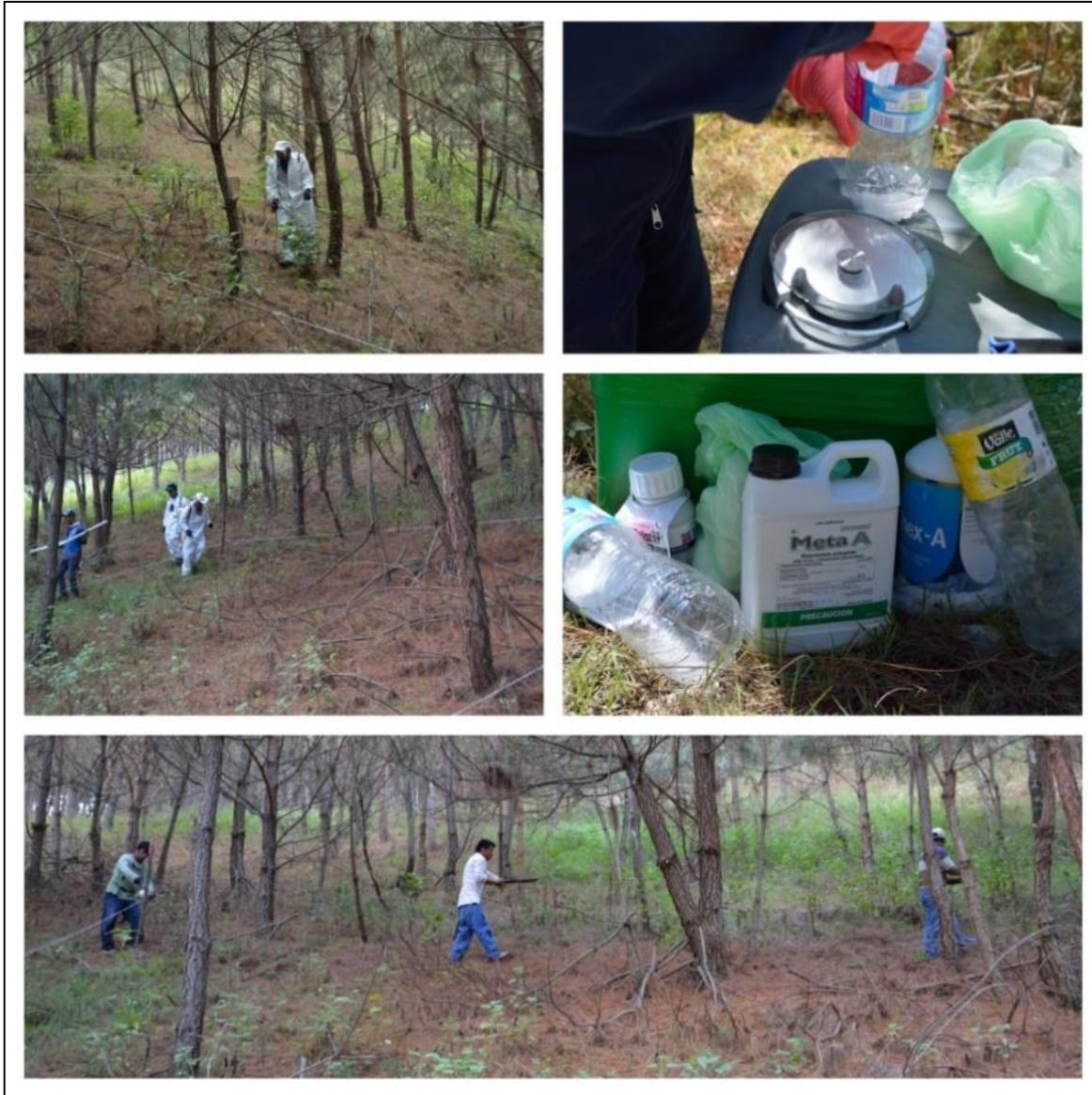


Figura 10. Proceso de aplicación de tratamientos contra *Ocoaxo cerca fowleri*; fotografías tomada el 16 de junio del 2016.



Figura 11. Aplicación de tratamientos realizada el 05-06 de julio del 2016.

De manera simultánea a la aplicación del tratamiento en el cuadrante seleccionado, en los tres cuadrantes no tratados se examinaron cuadros de 1 m² para evaluar la variable "salivazos por metro cuadrado", y se consideró como la evaluación inicial de los sitios tratados. La metodología usada fue la siguiente:

- Se seleccionaron al azar 12 puntos separados entre ellos por no menos de 0.5 metros.
- Se colocó un marco de 1 m por lado, se tomó al menos una fotografía inicial, se geo-referenció el centro del cuadro, se removió la hojarasca que cubría la superficie del suelo en el interior del cuadro, se identificó visualmente a los salivazos y a cada uno de ellos se le colocó a un costado una rondana de 3/8" de color rojo o anaranjado, se removió parte de la "saliva" que cubría a los *Ocoaxo* para saber si era una ninfa o un adulto, se contó el número de salivazos y se tomó al menos una fotografía final. (Ver Figura 12)

- Los datos obtenidos se anotaron en formatos de registro y posteriormente se transcribieron en una base de datos.



Figura 12. Proceso de evaluación inicial de los sitios tratados, 16 de junio.

Se realizaron dos evaluaciones posteriores.

En la primera evaluación, solo se evaluó el cuadrante tratado para lo cual se seleccionaron al azar cinco cuadros de 1 m² y se examinó la presencia de *Ocoaxo* con la misma metodología que en la evaluación inicial.

La evaluación de los sitios tratados con productos químicos se realizó el día siguiente a la aplicación de los tratamientos, mientras que la de los sitios tratados con entomopatógenos se hizo de una a dos semanas después de la aplicación de los tratamientos.

Para la segunda evaluación, realizada alrededor de un mes después de la aplicación, se evaluó el cuadrante tratado y uno de los no tratados, para lo cual se seleccionaron 20 puntos por cuadrante a no menos de 0.5 metros entre ellos y se contó el número de salivazos en cada uno, usando la metodología de evaluación de la evaluación inicial.

Los datos recabados en los formatos de registro se transcribieron a una base datos para su posterior análisis estadístico.

Durante la realización de la primera y segunda evaluación, se encontraron algunos adultos de *O. cerca fowleri* en el suelo, y en algunos sitios habían adultos volando y alimentándose de las acículas de los pinos (ver Figura 13).



Figura 13 Adultos de *Ocoaxo cerca fowleri* alimentándose de las acículas de pino; fotografía tomada el 21 de julio del 2016.

La brigada de San Miguel Tenango, Zacatlán, realizó la instalación de los sitios y la aplicación de los tratamientos bajo la supervisión del Ing. Fernando Galindo Ordoñez y la coordinación del M. C. Uriel M. Barrera Ruiz y del Ing. Sergio Arturo Quiñonez Favila, ambos bajo la dirección del Dr. David Cibrián Tovar.

La segunda evaluación de evaluación de control en campo se finalizó en las primeras dos semanas de agosto.

3.2 Resultados

3.2.1. Distribución de ninfas

Se agruparon los datos de frecuencia de ninfas por metro cuadrado del menor al mayor con la finalidad de ver a qué tipo de distribución se ajustaban los datos de la población de ninfas.

Como resultado, se observó que la superficie muestreada sin ninfas representa el 52.42% de la superficie total evaluada (ver Cuadro 6 y Figura 14), lo que parece indicar que la población de ninfas tienen una distribución de contagio, con mayor frecuencia de 1-3 individuos/m², que representó el 27.58% de cuadros evaluados; mientras que la frecuencia de 4-9 individuos/m² representó el 15.73% de cuadros evaluados y la de 10 o más individuos/m² representó el 4.27% de cuadros evaluados (ver Cuadro 6 y Figura 14).

Las frecuencias que representan de manera individual más de 1% del total de cuadros evaluados y que tienen al menos una ninfa, van de 1 a 9 individuos/m² y suman 43.31% de cuadros evaluados (ver Cuadro 6 y Figura 14). La cantidad mínima de ninfas por metro cuadrado que se registró fue cero (la más frecuente) y la máxima que fue 23.

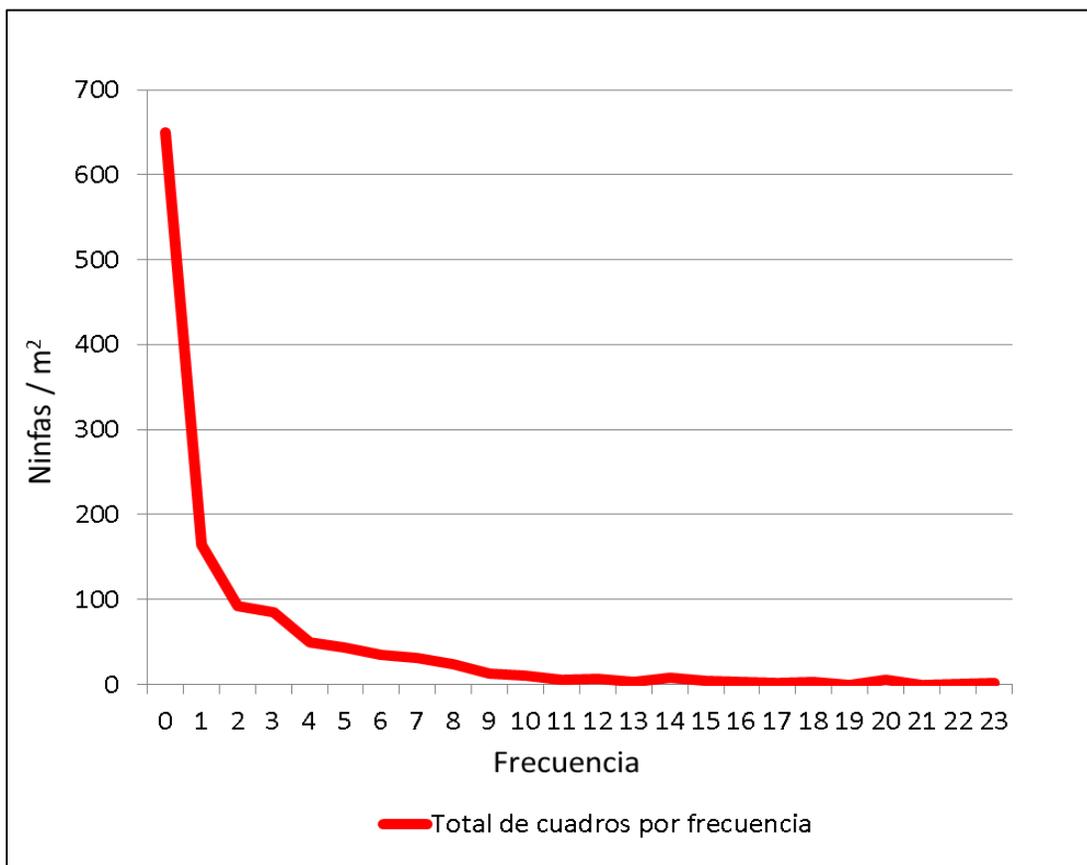


Figura 14. Gráfica de cuadros/individuos por m² de ensayo en campo de control de *Ocoaxo* cerca *fowleri*.

Cuadro 6. Tabla de frecuencias de ninfas por m²; ensayo en campo de control de ninfas de *Ocoaxo cerca fowleri*.

Ninfas por m ²	Unidades de muestreo de 1m ²	Porcentaje	Ninfas por m ²	Unidades de muestreo de 1m ²	Porcentaje
0	650	52.42	12	7	0.56
1	165	13.31	13	3	0.24
2	92	7.42	14	8	0.65
3	85	6.85	15	4	0.32
4	49	3.95	16	3	0.24
5	43	3.47	17	2	0.16
6	35	2.82	18	3	0.24
7	31	2.50	19	0	0.00
8	24	1.94	20	5	0.40
9	13	1.05	21	0	0.00
10	10	0.81	22	1	0.08
11	5	0.40	23	2	0.16
			Total	1240	100.00

Las observaciones en campo indican que la distribución de las ninfas está relacionada con la distribución de sus hospedantes, con el grosor de la capa de hojarasca y con la humedad del suelo.

“Se sabe que hay estocasticidad natural en la abundancia de insectos en escalas de tiempo cortas, vinculadas a su alta tasa de reproducción y a factores ambientales, como la temperatura, humedad, disponibilidad de alimento y textura del suelo y que la abundancia y distribución puede variar incluso entre especies cercanas” (Benefer, Ahmed, Blackshaw,

Sint, & Murray, 2016), de manera que la información sobre la distribución de *O. cerca fowleri* no se puede generalizar a *O. assimilis* hasta que se haga un trabajo similar en esta última especie.

Se observó que entre menor fue el grosor de la capa de hojarasca y la humedad del suelo y mayor la presencia de pastos en el sitio evaluado, la cantidad de ninfas de *O. cerca fowleri* tendía a ser menor, e incluso de cero.

Para el manejo de *Ocoaxo*, así como en otras plagas, “tener información de todos los factores importantes y de sus interacciones espacio-temporales puede ayudar en el modelado de predicciones de abundancia y distribución” (Benefer, et al., 2016), lo que permitiría reducir los daños y hacer una adecuada planeación y aplicación de estrategias de combate.

Es necesario generar la información de factores como la temperatura, humedad, disponibilidad de hospedantes, precipitación, características del suelo como textura, contenido de materia orgánica, espesor del horizonte orgánico, etc., entre otros.

La información recabada sobre *Ocoaxo* en el presente proyecto puede contribuir en el diseño una metodología de muestreo secuencial de ninfas para estimar la cantidad de individuos en un sitio y la etapa más adecuada para la realización de actividades de control de manera eficiente y oportuna, o en la elaboración de modelos de predicción que permitan predecir la distribución y daños, aunque aún es limitada, de manera que se requiere más investigación.

3.2.2. Efecto de los tratamientos

En los cuadrantes tratados con *M. anisopliae* comercial en dosis baja y con acefato, ambos con barrido, hubo una reducción en el número de individuos de *O. cerca fowleri*, en comparación con los cuadrantes testigo (ver Figura 15).

Los tratamientos con los que se obtuvo una reducción en el número de individuos de *Ocoaxo*, pero que no fue tan marcada, fueron el *M. anisopliae* del CP con barrido, el *M. anisopliae* comercial en dosis alta con y sin barrido, y el *M. anisopliae* comercial en dosis baja sin barrido (ver Figura 15).

Los tratamientos con los que no se obtuvo una reducción en el número de individuos de *Ocoaxo* fueron el acefato sin barrido, el allectus con y sin barrido, la bifentrina con y sin barrido, el *M. anisopliae* del CP sin barrido y el *M. anisopliae* del CP + allectus con y sin barrido (ver Figura 15).

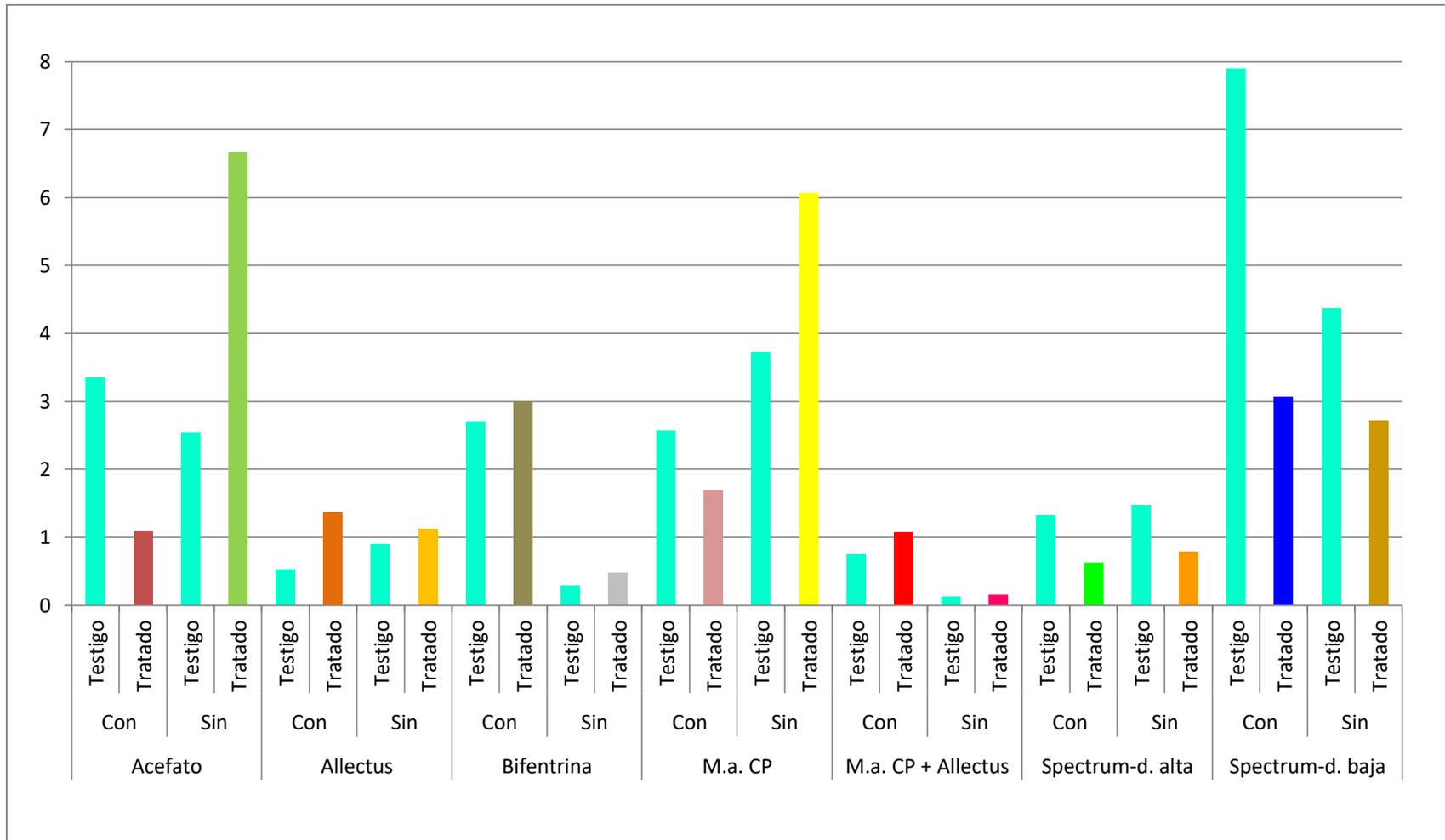


Figura 15. Promedio de individuos por metro cuadrado en cada tratamiento.

3.2.3. Aislamiento de *Metarhizium anisopliae* de productos evaluados

Se evaluó la viabilidad de los productos biológicos aplicados en el ensayo en campo de control.

Los dos cepas se obtuvieron a partir de cultivos monospóricos en agar-agua (AA); un producto comercial y el otro fue donado por el Colegio de Postgraduados Campus Córdoba a través del Dr. Francisco Rosas.

Los aislamientos crecieron en el medio de cultivo agar-sabouraud-dextrosa (ASD: 20 g de dextrosa, 10 g de peptona, 18 de agar y 1000 ml de agua destilada) donde se reporta un buen desarrollo y esporulación del hongo *Metarhizium sp.* (Cañedo & Ames, 2004). Las cepas se incubaron a temperatura ambiente a 25 ± 2 °C durante 10 días (Figura 16).

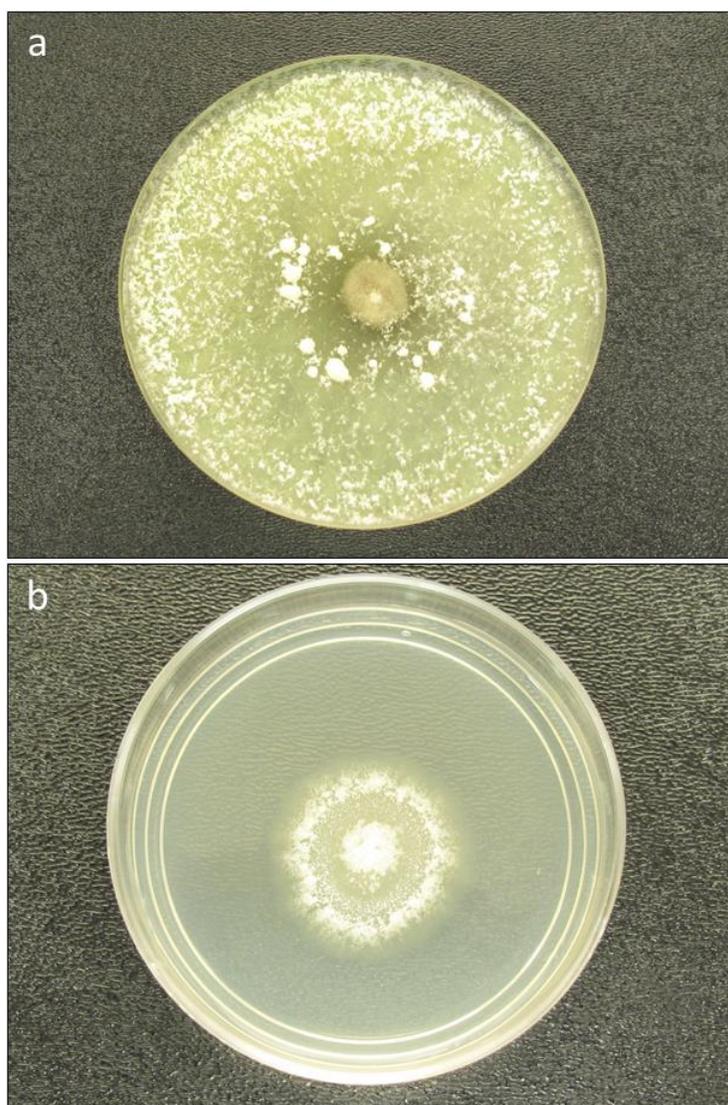


Figura 16. *Metarhizium anisopliae* en medio de cultivo; a) Aislamiento de producto comercial, b) aislamiento del Colegio de postgraduados.

3.3. Conclusiones

Se encontró que en el 52.42% de la superficie evaluada no había ninfas de *O. cerca fowleri*. De acuerdo a los datos, la distribución espacial de las ninfas sigue un patrón de contagio.

Se observó que entre menor fue el grosor de la capa de hojarasca y la humedad del suelo y mayor la presencia de pastos en el sitio evaluado, la cantidad de ninfas de *O. cerca fowleri* tendía a ser menor, e incluso de cero.

Lo anterior implica que para diseñar la metodología de muestreo (secuencial) y control, deben tomarse en cuenta el tipo de distribución de las ninfas, además de la de sus hospedantes y de las condiciones ambientales en las que se ha visto que proliferan.

De manera general, la aplicación de tratamientos biológicos y químicos al suelo produce un control deficiente de ninfas de *O. cerca fowleri*, como el obtenido con acefato, el *M. anisopliae* comercial en dosis alta y baja y el *M. anisopliae* del CP, o no tiene ningún efecto de control.

Dicho control deficiente en los productos biológicos no se debe a la viabilidad, ya que al evaluarla se encontró que tanto el producto comercial como la cepa MaN1 del CP eran viables.



4. Ensayo in vitro de control de adultos de *Ocoaxo cerca fowleri*



4.1. Primer ensayo

Debido a que no se obtuvo un resultado satisfactorio en el ensayo en campo, se decidió realizar un ensayo *in vitro* de los mismos tratamientos, con la finalidad de determinar si los resultados obtenidos fueron consecuencia de factores ambientales o porque los productos evaluados tuvieron una actividad biológica limitada sobre *O. cerca fowleri*.

El 24 de agosto se instaló en el laboratorio de Parasitología Forestal de la División de Ciencias Forestales (DICIFO), en la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), el ensayo *in vitro* de control de adultos de *O. cerca fowleri* con entomopatógenos e insecticidas químicos.

4.1.1. Metodología

En el ensayo *in vitro* se realizó la aplicación de cinco tratamientos (ver Cuadro 7) y en cada uno de ellos se trató a 10 adultos de *O. cerca fowleri* (repeticiones) (ver Figura 17), los cuales se capturaron pocos días antes en una zona boscosa del municipio de Tetela de Ocampo.

Las cajas Petri, el papel filtro y las acículas que se emplearon en el ensayo se esterilizaron con la finalidad de evitar fuentes de contaminación que modificaran el efecto de los tratamientos o que provocaran una interpretación errónea de los mismos, siguiendo la metodología que se describe a continuación:

- Se cortaron círculos de papel filtro y aluminio del tamaño de la circunferencia interna de las cajas Petri, se envolvieron en papel destraza y se esterilizaron en autoclave.
- Se recolectaron brotes de *P. oaxacana* del bosque situado en las inmediaciones del edificio principal de la DICIFO, UACH.
- Se desprendieron las acículas de los brotes.
- Cada acícula se cortó en segmentos de 5 cm, los cuales se desinfectaron en cloro al 3% durante 3 minutos y se enjuagaron 3 veces con agua destilada, para finalmente sellar los extremos de cada segmento con cera o parafina y evitar que se pierda el agua de sus tejidos.

De cada tratamiento se prepararon 10 mL de solución a las dosis indicada en el Cuadro 7 y se le adicionó 0.01 mL de INEX-A.



Figura 17. Adultos empleados en la evaluación de control; fotografía tomada el 24 de agosto del 2016.

Dentro de la caja Petri, se acomodó un círculo de sanita húmeda ligeramente húmeda y enseguida un círculo de papel aluminio, al final se colocaron sobre éste acículas desinfectadas (de las que el insecto se alimentó durante el periodo de duración del ensayo) y un adulto (ver Figura 18).



Figura 18. Preparación de cajas Petri; fotografía tomada el 24 de agosto del 2016.

Una vez preparadas las 10 cajas Petri por tratamiento, a cada adultos se le aplicó 50 μ L (microlitros) de la solución correspondiente en la región ventral (ver Figura 19).

La cantidad estimada de conidios para la dosis alta, dosis baja y *M. anisopliae* del CP se muestra en el Cuadro 7.

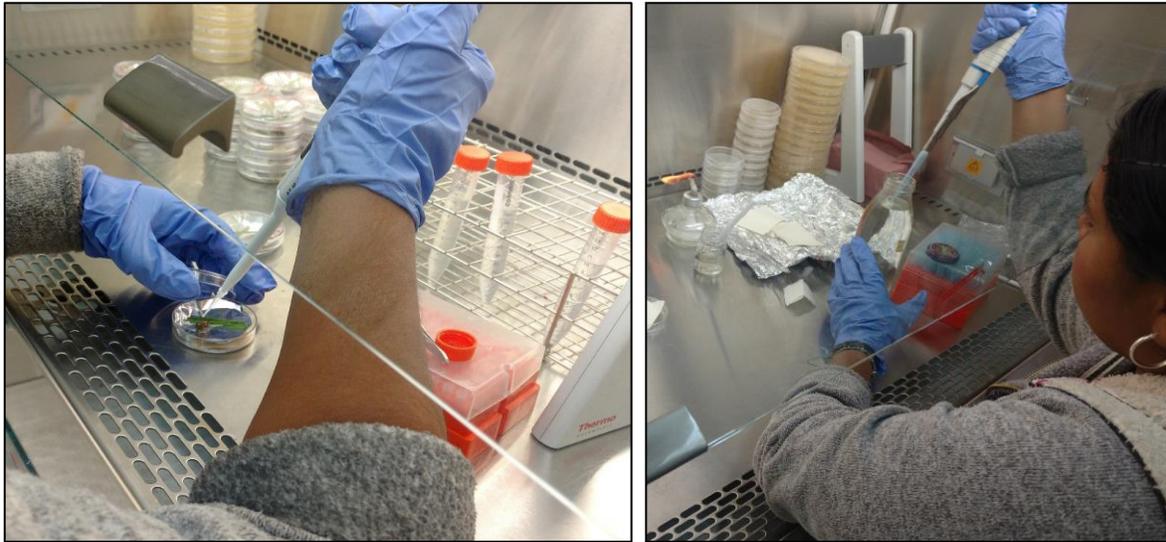


Figura 19. Aplicación de tratamientos; fotografía tomada el 24 de agosto del 2016.

Cuadro 7. Dosis de producto comercial empleado en la evaluación de control.

Tratamiento	Dosis por hectárea	Conidios por L	Volumen de solución / hectárea	Dosis para 10 mL de solución	Conidios en 10 mL de solución	Conidios en 50 µL de solución
Acefato	1 kg		300 L	0.033 gr		166.67 microgramos de ingrediente activo
<i>Metarhizium anisopliae</i> comercial - dosis alta	3 L	3.00x10 ¹¹	300 L	99.0 µL	1.00 x 10 ⁷	5.00 x 10 ⁴ conidios
<i>Metarhizium anisopliae</i> comercial - dosis baja	1 L	1.00x10 ¹¹	300 L	33.0 µL	3.33 x 10 ⁶	1.67x10 ⁴ conidios
<i>Metarhizium anisopliae</i> del CP	0.5 L	1.00x10 ¹²	300 L	16.7 µL	3.33x10 ⁷	1.67x10 ⁵ conidios
Testigo (agua estéril)			300 L			

Una vez aplicado el tratamiento en el insecto, se selló la caja Petri con parafilm y se almacenó en una caja con tapa. Las 10 cajas Petri de un tratamiento se almacenaron juntas. (Ver Figura 20)

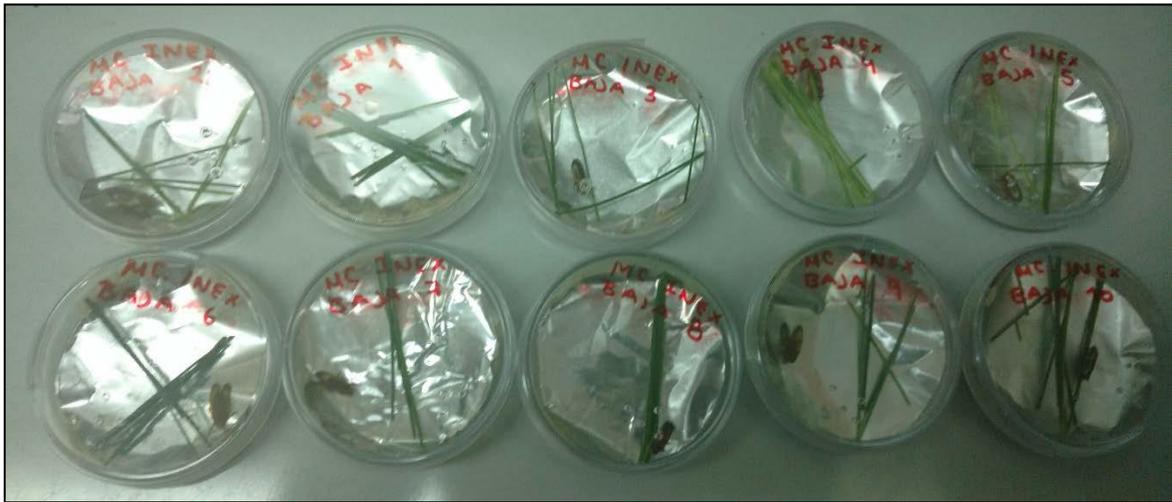


Figura 20. Cajas Petri con adultos tratados; fotografía tomada el 24 de agosto del 2016.

Los tratamientos se evaluaron del 24 al 30 de agosto y las variables respuesta fueron "adultos muertos" y "presencia de micelio de *M. anisopliae*".

Adicionalmente a la evaluación de control en laboratorio, se hizo la disección de los adultos tratados con alguno de los productos con *M. anisopliae*, para identificar si hubo desarrollo de micelio en el exterior e interior de la cavidad del cuerpo del insecto y así determinar si la muerte ocurrió por toxemia o como resultado directo de la infección del hongo entomopatógeno.

4.1.2. Resultados

A las 3 horas de aplicados los tratamientos, el acefato causó la mortalidad del 100% de los adultos tratados y el *M. anisopliae* comercial-dosis alta causó la del 20% (ver Figura 21 y Cuadro 8).

A las 18 horas de aplicados los tratamientos, en el testigo murió el 20% de adultos tratados, en *M. anisopliae* comercial-dosis baja murió el 50% de adultos y en *M. anisopliae* del CP murió el 30% de adultos (ver Figura 21 y Cuadro 8).

Con el testigo, el acefato y el *M. anisopliae* del CP, hasta las 139 horas no se observaron adultos con desarrollo de micelio en su cuerpo (ver Figura 21 y Cuadro 8).

En la variable respuesta "presencia de micelio de *M. anisopliae*", se prestó especial atención a los adultos expuestos a los tratamientos a base de *M. anisopliae*.

A las 49 horas, en el 90% de los adultos muertos del tratamiento *M. anisopliae* comercial-dosis alta se observó micelio en las patas, mientras que en los de la dosis baja, el 75% de los adultos muertos (6 de 8) tenían micelio en las patas.

A las 81 horas, en la dosis alta el 100% de adultos estaban cubiertos de micelio y en la dosis baja, los adultos con micelio de la revisión anterior también estaban cubiertos, es decir, el 60% de los adultos tratados (ver Figura 21 y Cuadro 8).



Figura 21. De izquierda a derecha, de arriba a abajo: adulto tratado con acefato, con *Metarhizium anisopliae* del CP, con *M.anisopliae* comercial-dosis baja, con *M. anisopliae*-dosis alta y Testigo.

Cuadro 8. Número de adultos vivos por tratamiento/día de agosto/hora de revisión, del primer ensayo *in vitro* de control de adultos de *Ocoaxo* cerca *fowleri*.

Tratamiento	24	24	25	25	26	26	29	30
\Día-hora	15:00	18:00	09:00	18:00	09:00	16:00	12:00	10:00
Horas después de la aplicación	0	3	18	27	42	49	117	139
Acefato	10	0	0	0	0	0	0	0
<i>Metarhizium anisopliae</i> comercial - dosis alta	10	8	4	0	0	0	0	0
						Micosis en 9 adultos	Micosis en 10 adultos	
<i>Metarhizium anisopliae</i> comercial - dosis baja	10	10	5	4	2	2	0	0
						Micosis en 6 adultos		
<i>Metarhizium anisopliae</i> del CP	10	10	7	6	3	3	0	0
Testigo	10	10	8	6	5	3	0	0

Los resultados del presente ensayo de control apuntan a que *O. cerca fowleri* tiene cierto grado de tolerancia a la infección de *M. anisopliae*, ya que con la dosis baja del *M. anisopliae* comercial y con el *M. anisopliae* del CP, no se observó una mortalidad significativa asociada a los hongos entomopatógenos, caso contrario a lo sucedido con la dosis alta del *M. anisopliae* comercial.

En algunos insectos no sociales se ha demostrado que presentan una profilaxis dependiente de la densidad, en algunos casos cuando se crían bajo condiciones de alta densidad (Wilson & Reeson, 1998), en cuyo caso, este incremento en la resistencia parece estar relacionado con la melanización cuticular, por ejemplo, por la formación del pigmento melanina por polimerización de compuestos fenólicos (Charnley, 1984; Jacobson, 2000), mientras que en otros casos parece estar relacionado con el incremento en la actividad antimicrobiana (Wilson et al., 2002). (Vega, Meyling, Luangsa-ard, & Blackwell, 2012)

Se desconoce porque la cepa MaN1 de *M. anisopliae* no provocó una mortalidad significativa en adultos de *O. cerca fowleri*, aunque se cree que la especificidad hacia salivazos de la caña de azúcar, que son los insectos para los que está enfocada dicha cepa, afectó su capacidad de infectar a *O. cerca fowleri*, aun cuando ambas especies se ubican taxonómicamente en la familia Cercopidae.

Si la alta especificidad de la cepa MaN1 de *M. anisopliae* pudo ser la causa de la baja mortalidad observada, la poca especificidad de la cepa comercial de *M. anisopliae* pudo ser la causa de que ésta tuviera mayor capacidad de infectar y matar a los adultos.

En uno de los adultos tratados con *M. anisopliae* comercial-dosis alta se encontró desarrollo del hongo entomopatógeno en el interior de la cavidad del cuerpo del insecto y en otro la micosis solo ocurrió en el exterior del cuerpo, lo que parece indicar que la muerte de los adultos pudo ser resultado de la infección de *M. anisopliae* (se desarrolla micelio sobre el cuerpo) o de una toxemia causada por el mismo agente (no se observa desarrollo externo de micelio).

Los hongos entomopatógenos, además de los metabolitos primarios, producen diversos metabolitos secundarios algunos de los cuales participan en la patogénesis, aunque su papel no es claro aún (Vega, et al., 2012).

Algunos de los metabolitos de *Metarhizium spp.* son las destruxinas, que también son ciclodepsipéptidos producidos por varios hongos, las citocalasinas, miroridinas, swainsoina, viridoxina, ácido helvólico, 12-hidroxi-ovalicina, hidroxifungerinas, análogos de fusarina, serinociclinas, aurovertinas, macrolidos y tirosina betaina (Vega, et al., 2012).

De las 38 destruxinas o destruxinas análogas, algunas han mostrado ser insecticidas (Pedras, Zaharia, & Ward, 2002; Schrank & Vainstein, 2010), al parecer por abrir los canales de calcio en los músculos de los insectos (Samuels, Reynolds, & Charnley, 1988). (Vega, et al., 2012)

Durante el periodo de evaluación de resultados de la evaluación de control se encontraron hembras que habían expulsado huevos.

En frascos de plástico con tapa, con un fragmento de sanita ligeramente humedecido en el fondo y algunas acículas, se colocó a una hembra y dos machos (por frasco), con la finalidad de evaluar si las hembras ovipositaban en esas condiciones. Se encontró que las hembras insertan los huevos en la sanita (ver Figura 22).



Figura 22. Huevos de *Ocoaxo cerca fowleri*; fotografías tomadas el 30 de agosto del 2016.

La forma de los huevos es elipsoidal, más anchos al centro y ahusados hacia los extremos, con las puntas redondeadas.

Al principio, cuando tienen poco tiempo de ovipositados, son de color blanquecino y posteriormente se tornan color amarillo cremoso.

De los huevo ovipositados en los frascos de plástico, se observó su desarrollo para determinar si el estadio que hiberna es el de huevo o el de ninfa.

Resultados preliminares indican que los huevos entran en hibernación varios días después de ovipositados y que antes de entrar en ese estado requieren permanecer en un ambiente húmedo para sobrevivir.

Haematoloma dorsatum y *Aphrophora corticea* son dos especies de cercópidos que se alimentan de *Pinus sylvestris*; en *H. dorsatum* es la ninfa es la que hiberna, mientras que en *A. corticea* es el huevo (Nickel & Remane, 2002), al igual que en *O. cerca fowleri*.

4.1.3. Conclusiones

De los resultados obtenidos en el primer ensayo *in vitro* de control se puede decir que los tratamientos con los mejores resultados de control fueron el acefato y el *M. anisopliae* comercial en dosis alta.

En el *M. anisopliae* comercial en dosis baja, el *M. anisopliae* del Colegio de Postgraduados y en el testigo se observó una proporción similar de adultos muertos a lo largo de las evaluaciones, por lo que se puede decir que si tuvieran un efecto en la mortalidad de adultos, sería reducido.

Se encontró que el huevo es, al parecer, el estadio hibernante.

4.2. Modificación del planteamiento de control de adultos de *Ocoaxo cerca fowleri*

Debido a los resultados deficientes observados en los ensayos de control *in vitro* de adultos de *O. cerca fowleri* y de campo de ninfas y de adultos de la misma especie de cercópido, se planteó una modificación al planteamiento de control en común acuerdo entre el Dr Francisco Hernández Rosas y el Dr. David Cibrián Tovar.

Dicha modificación consistió en la aplicación de:

- 250 gr de acefato.
- 1 L de *Metarhizium anisopliae* comercial (con 1×10^{11} UFC por litro).
- 500 ml de *Beauveria bassiana* (con 1×10^{12} esporas por 500 ml).
- 100 mL del surfactante-penetrante Inex-A por cada 100 L de agua.

La modificación al planteamiento de control se evaluó en el segundo ensayo *in vitro* de control, realizado en septiembre, con una metodología similar a la del primer ensayo *in vitro* de control.

4.2. Segundo ensayo

El 15 de septiembre se instaló el ensayo *in vitro* en el que se evaluó el efecto de los tratamientos que se muestran en el Cuadro 9, en la supervivencia de los adultos de *O. cerca fowleri*, en el Laboratorio de Parasitología forestal, en la DICIFO, UACH.

4.2.1. Metodología

Los productos (tratamiento) y las dosis utilizadas se muestran en el Cuadro 9. Para el cálculo de las dosis de los tratamientos en 100 L de agua se consideró un gasto por hectárea de 300 L.

De los individuos colectados en campo y que se tenían confinados en las cajas de emergencia en las que se evaluó el daño causado por los adultos de *O. cerca fowleri* y *O. assimilis* durante agosto y septiembre, se recolectaron 60 ejemplares de *O. cerca fowleri*. Por cada tratamiento se trataron 10 adultos, cada adulto constituyó una repetición.

Se esterilizaron las cajas Petri de 60x15 mm, las acículas, el papel filtro y el aluminio que se emplearon en el ensayo, con la metodología que se describe a continuación y que es la misma que se utilizó en el primer ensayo *in vitro*:

- Se cortó el papel filtro y el aluminio en círculos del tamaño de la circunferencia interna de la caja Petri, se envolvieron en papel destraza y se esterilizaron en autoclave.
- Se recolectaron brotes de *P. oaxacana* del bosque situado a un lado del edificio principal de la División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo.
- De los brotes se desprendieron las acículas.
- Cada acícula se cortó en segmentos de 5 cm, los cuales se desinfectaron en cloro al 3% durante 3 minutos y se enjuagaron 3 veces con agua destilada y finalmente, se sellaron los extremos de cada segmento con cera o parafina para evitar que se pierda el agua de sus tejidos.

A cada caja Petri se le realizaron 6 orificios en la tapa, todo dentro de una campana de flujo, se colocó el papel filtro, se le aplicó 200 µL de agua destilada para mantener la humedad dentro de la caja, se colocó el papel aluminio encima y las acículas selladas, que sirvieron como alimento para los insectos; los segmentos de acícula se prepararon con poco tiempo de antelación.

De cada tratamiento se prepararon 10 mL de solución a la dosis indicada en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Descripción cuantitativa de tratamientos de evaluación de control 2 de *Ocoaxo* en laboratorio.

Tratamiento	Dosis	gr de i.a. o UFC*/ dosis	Volumen de solución	Dosis / 10 mL	i.a. o UFC / 10 mL	i.a. o UFC / 50 µL
1 Testigo	-	-	100 L	-	-	-
2 Acefato	0.25 kg	242 gr	100 L	2.5×10^{-2} gr	2.495×10^{-2} gr	1.25×10^{-4} gr
3 <i>Metarhizium anisopliae</i> comercial- d. alta	1.0 L	1.00×10^{11} UFC	100 L	100.00 µL	1.00×10^7 UFC	5×10^4 UFC
4 Acefato+ <i>M. anisopliae</i> comercial- d. alta	0.25 kg + 1.0 L	242 gr + 1.00×10^{11} UFC	100 L	2.5×10^{-2} gr + 100.00 µL	2.495×10^{-2} gr + 1.00×10^7 UFC	1.25×10^{-4} gr + 5×10^4 UFC
5 <i>M. anisopliae</i> + <i>Beauveria bassiana</i> + <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> comercial	0.67 L	6.67×10^7 UFC	100 L	66.67 µL	6.67×10^3 UFC	3.33×10^1 UFC
6 Acefato+(<i>M. anisopliae</i> + <i>B. bassiana</i> + <i>P. fumosoroseus</i> comercial)	0.25 kg + 0.67 L +	242 gr + 6.67×10^7 UFC	100 L	2.5×10^{-2} gr + 66.67 µL	2.495×10^{-2} gr + 6.67×10^3 UFC	1.25×10^{-4} gr + 3.33×10^1 UFC

* Para acefato, i.a.: ingrediente activo; Para *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *P. fumosa*, UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

Se colocó un adulto en el interior de cada caja Petri y se le aplicó 50 μ L de la solución correspondiente en la región ventral; se agitó la solución (tratamiento) de manera previa a la toma de la alícuota correspondiente para cada adulto tratado.

Una vez aplicado el tratamiento, se selló la caja Petri con parafilm y se almacenó en una caja con tapa. Las 10 cajas Petri de cada tratamiento se almacenaron juntas y de manera independiente a los otros tratamientos.

Después de aplicados los tratamientos, se hizo la revisión de los adultos de manera periódica.

Las variables que se evaluaron fueron "adultos vivos" y "adultos micosados".

En cada evaluación, para la variable "adultos vivos" se hicieron anotaciones sobre los cambios en el comportamiento de los adultos y para la variable "adultos micosados" se hicieron anotaciones sobre los cambios de color del hongo.

En el caso de "adultos micosados", se anotó el porcentaje del cuerpo cubierto por micelio, para lo cual se usaron las siguientes escalas visuales:

- 25% si el micelio solo cubre las patas.
- 50% si el micelio cubre patas y abdomen.
- 75% si el micelio cubre patas, cabeza y abdomen.
- 100% si el micelio cubre el cuerpo completo.

4.2.2. Resultados

Los resultados obtenidos son los siguientes:

- En los tratamientos que contenían acefato [acefato, (acefato + *M. anisopliae* comercial), y acefato + (*M. anisopliae* + *B. bassiana* + *P. fumosoroseus* comercial)] se observó la muerte de todos los adultos a las 3 horas de aplicados los tratamientos (ver Figura 23).
- En los tratamientos *M. anisopliae* comercial y *M. anisopliae* + *B. bassiana* + *P. fumosoroseus* comercial se observó que la muerte de adultos fue más lenta que en los tratamientos con acefato, pero más rápida que en Testigo (ver Figura 23).
- La muerte del último adulto en el tratamiento *M. anisopliae* comercial se registró a las 42 horas de aplicado, mientras que en el tratamiento *M. anisopliae* + *B. bassiana* + *P. fumosoroseus* comercial se registró hasta las 54 horas (ver Figura 23).
- Si se considera la presencia de micelio en la superficie del cuerpo de los insectos como signo del desarrollo de la infección del entomopatógeno, *M. anisopliae* comercial se desarrolló con mayor rapidez que *M. anisopliae* + *B. bassiana* + *P. fumosoroseus* comercial. En los tratamientos en donde se combinó el acefato con alguno de los insecticidas biológicos, la tendencia observada fue la misma (ver Figura 23).

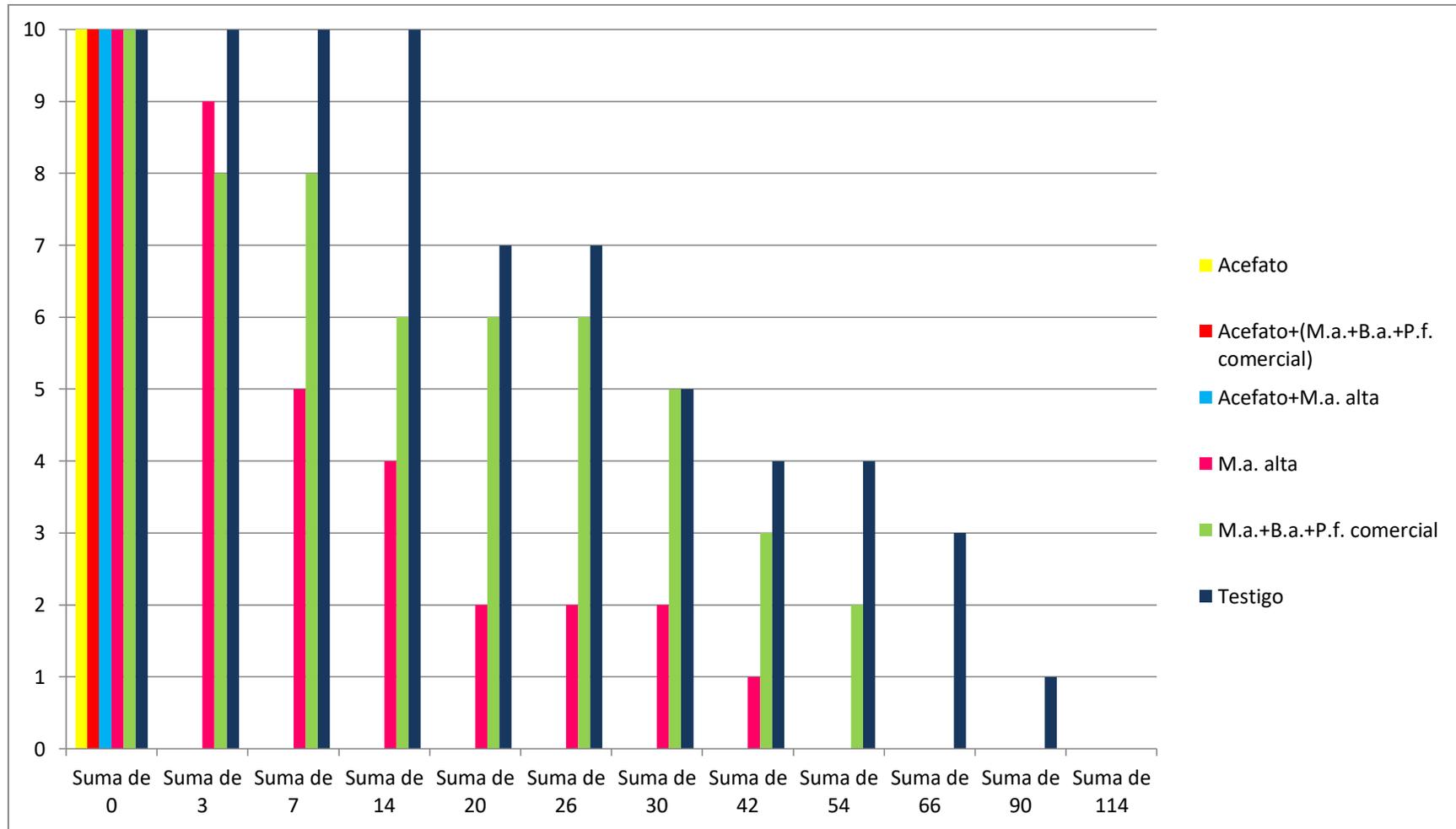


Figura 23. Número de adultos vivos/ horas después de aplicado el tratamiento; resultados del segundo ensayo *in vitro* de control de adultos de *Ocoaxo cerca fowleri*.

- Si se comparan los resultados de los insecticidas biológicos solos con los aplicados en combinación con acefato, a las 90 horas de la aplicación no se observa una diferencia significativa en el desarrollo de micelio en el cuerpo de los insectos, pero a las 114 horas, en los tratamientos que incluían acefato, los entomopatógenos se habían desarrollado más que en los que se aplicó solo el insecticida biológico (ver Figura 24).

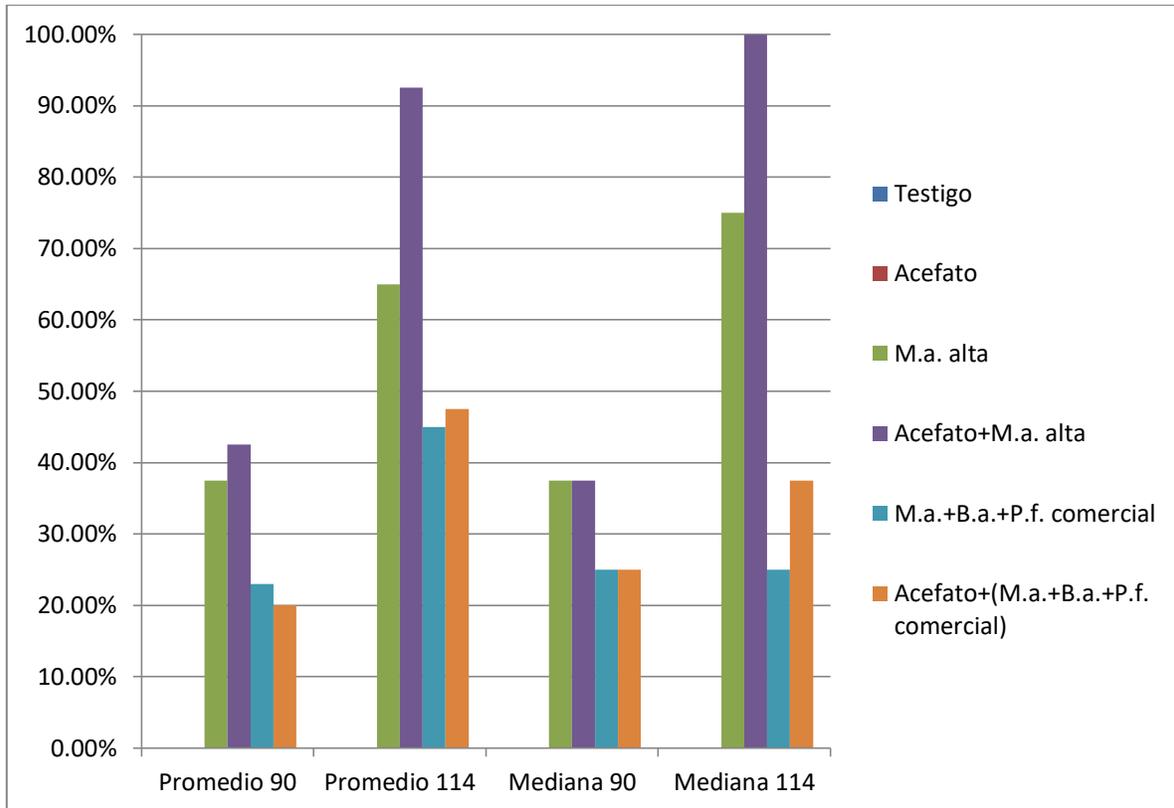


Figura 24. Promedio y mediana de porcentaje de desarrollo de micelio sobre adultos/tratamiento, a las 90 y 114 horas de aplicados los tratamientos.

Lo anterior parece indicar que, de alguna manera, el acefato propicia o acelera el desarrollo de la infección de los entomopatógenos de los dos insecticidas biológicos probados; el mecanismo por el que sucede lo anterior se desconoce, pero es posible que el efecto neurotóxico del acefato afecte la resistencia de los insectos adultos a la infección de entomopatógenos al afectar la respuesta del sistema inmunológico.

4.3.3. Conclusión

Se concluye que la aplicación de acefato, solo o en combinación con alguno de los insecticidas biológicos comerciales evaluados, provocó la muerte de los adultos de *O. cerca fowleri* en menor tiempo que cuando se aplicaron los insecticidas biológicos comerciales solos, además de provocar una reducción en el tiempo de desarrollo de los

hongos entomopatógenos en los insectos, por lo que se puede recomendar el uso del acefato en combinación con algunos de los insecticidas biológicos comerciales evaluados, en particular de *M. anisopliae*.

Los resultados indican que es posible que la modificación a la formulación para el control de adultos - propuesta en el informe parcial de agosto- sea acertada y que haya tenido un control adecuado de adultos de *O. cerca fowleri* en los sitios donde se aplicó.



5. Determinación del daño de *Ocoaxo cerca fowleri* y *Ocoaxo assimilis* al follaje de los pinos, su efecto en la caída foliar y en la declinación forestal



Con las observaciones en campo y en laboratorio durante el mes de agosto, se describió el comportamiento y hospedantes del estado ninfal y de los adultos de *O. cerca fowleri*, además de la alimentación y la sintomatología del daño causado por los adultos en individuos de *P. pseudostrobus* y *P. patula*.

En septiembre y octubre se dio seguimiento al desarrollo de los síntomas en campo y en laboratorio. En laboratorio se instalaron cajas de emergencia con individuos de *P. oaxacana* para observar el desarrollo de la sintomatología del daño por alimentación de adultos, tanto de *O. cerca fowleri* como de *O. assimilis*.

5.1. Desarrollo de sintomatología en laboratorio

En agosto, en el invernadero del Laboratorio de Parasitología forestal de la División de Ciencias Forestales se colocaron cajas de emergencia con múltiples (1-4) árboles de *P. pseudostrobus* y *P. patula*, en las que se introdujeron adultos de *O. cerca fowleri* colectados en Zacatlán y Tetela de Ocampo.

En una primera fase, en cuatro cajas de emergencia se colocaron adultos colectados el día 5 de agosto en Zacatlán de las Manzanas, en una segunda fase, en cuatro cajas de emergencia se colocaron adultos colectados el día 12 de agosto en Zacatlán y en una tercera etapa, en tres cajas de emergencia se colocaron los adultos colectados el 18 de agosto en Tetela de Ocampo.

En todas las ocasiones se observó que una vez que los adultos fueron liberados en el interior de las cajas de emergencia, éstos comenzaban a alimentarse casi inmediatamente.

En los días posteriores a la liberación de los adultos, se observó que éstos se alimentaban en acículas, ramillas, base de fascículos y en raíces.

Los adultos de la primera fase permanecieron vivos del 5 de agosto al 25 del mismo mes, es decir, la longevidad de los adultos en laboratorio fue de 20 días, aunque es posible que en campo sea mayor.

Durante el tiempo que los adultos permanecieron alimentándose, en las plantas de las cajas de emergencia se desarrolló la sintomatología que se describe a continuación:

Se encontró una gota, al parecer de mielecilla o savia, debajo del sitio de alimentación (ver Figura 25). Al parecer, los adultos producen dichas gotas durante su alimentación (Hamilton, 1982); esto implica que además de la savia de la que se alimentan los adultos, hay savia que se pierde en forma de dichas gotas, por lo que el daño es mayor.

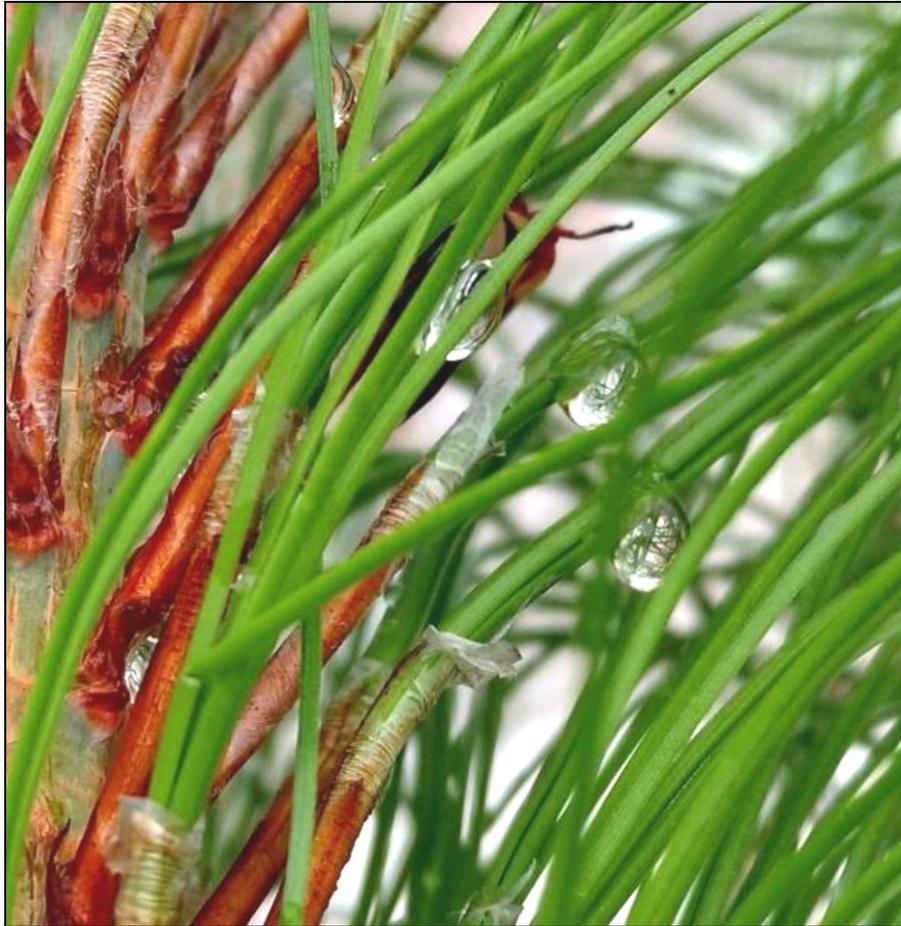


Figura 25. Gotas de mielecilla o savia que adultos de *Ocoaxo cerca fowleri* expulsan durante su alimentación; fotografía tomada el 11 de agosto del 2016.

Los daños por la alimentación de los adultos en las acículas comenzaron a aparecer a partir del día 3 después de que se registró la alimentación, en forma de una franja clorótica circundando el sitio de alimentación, el cual estaba a la mitad de esta (ver Figura 26).

La franja de tejido inicialmente clorótico se tornó color blanquecino y posteriormente café. En algunos casos, algunos días después de tornarse café, adquirían una tonalidad rojiza. (Ver Figura 26)

Cuando los sitios de alimentación no eran contiguos se formaba un patrón de bandeado verde y café, y cuando eran contiguos se formaba una franja continua de color café que podía cubrir desde la base de la acícula hasta su extremo apical (ver Figura 26 y Figura 27). El color café fue posiblemente causado por la necrosis del tejido.

En los fascículos en los que se observó que los adultos se alimentaban en la región de la vaina, se observó que un cambio de color limitado a la base de las acículas, en cambio, en las ramillas y en las raíces en las que se alimentaron adultos, no se observó ningún cambio de color, aunque no se puede asegurar que la alimentación de los adultos no haya tenido algún efecto en la conducción de nutrientes y en la integridad de los tejidos.

Aún hace falta estudiar con más detalle el daño que provoca la alimentación de los adultos en los tejidos y las alteraciones que provoca en su funcionamiento.



Figura 26. Secuencia de daños de adultos, de esquina superior izquierda hacia la derecha, hacia abajo y a la izquierda.



Figura 27. Diversos niveles de daño provocados por la alimentación de los adultos de *Ocoaxo cerca fowleri* en árboles de las cajas de emergencia.

Algunos de los daños por alimentación de los adultos se muestran en la Figura 28.



Figura 28. Daños en acículas por alimentación de adultos de *Ocoaxo cerca fowleri*; fotografía tomada el 25 de agosto del 2016.

H. dorsatum provoca una sintomatología de daño por alimentación de adultos en *Pinus pinaster* (Cobos, 1995) similar a la causada por *O. cerca fowleri* y *O. assimilis* en *P. pseudostrobus*, *P. patula* y *P. oaxacana*.

Los resultados de la alimentación de los adultos de *O. cerca fowleri* después de 13 y 20 días se muestran en la Figura 29 y Figura 30.



Figura 29. Daños al follaje de pinos en invernadero. Izquierda: los dos pinos de la izquierda estuvieron sometidos al ataque de adultos de *Ocoaxo cerca fowleri*, el de la derecha no. Derecha: detalles de los daños por alimentación en el follaje de los pinos. Fotografías tomadas el 18 de agosto del 2016.



Figura 30. Daño causado por 25 adultos de *Ocoaxo cerca fowleri* durante 20 días.

Se observó a los adultos alimentándose entre las 10 y las 14 horas. Durante la alimentación, los adultos se sujetan con las patas medias y posteriores, mientras que levantaban las patas delanteras y el aparato bucal estaba insertada en el tejido ya sea de las acículas, ramillas o raíces (ver Figura 31).



Figura 31. Postura de alimentación de los adultos de *Ocoaxo cerca fowleri*.

En septiembre, en cajas de emergencia se colocaron árboles de *P. oaxacana* de aproximadamente 80 cm de altura, junto con adultos de *O. cerca fowleri* en unas y *O. assimilis* en otras.

Los adultos de *O. cerca fowleri* se colectaron en áreas cercanas a áreas tratadas con barrido en el municipio de Zautla el día 14 de septiembre (ver Figura 32), mientras que los adultos de *O. assimilis* se colectaron en el municipio de Nicolás Bravo el día 10 del mismo mes (ver Figura 33). En ambos casos, se colocó a los adultos en las cajas de emergencia con individuos de *P. oaxacana* lo más pronto posible.



Figura 32. Sitio de colecta de adultos de *Ocoaxo* cerca *fowleri* en el municipio de Zautla; fotografía tomada el 14 de septiembre del 2016.



Figura 33. Adultos de *Ocoaxo assimilis* y áreas boscosa con daño en follaje en Nicolás Bravo; fotografías tomadas el 10 de septiembre del 2016.

La alimentación de los adultos de *O. cerca fowleri* en las acículas generó lesiones similares a las observadas en *P. patula* y *P. pseudostrobus*, es decir, áreas necróticas circundando el sitio de alimentación, desde pequeñas franjas necrosadas que formaban un bandeoado en el que se alternan franjas verdes con franjas necrosadas y que cubrían una parte o la totalidad de la longitud de la acícula, hasta la necrosis completa de ésta (ver Figura 34).



Figura 34. Síntomas de daño por alimentación de adultos de *Ocoaxo cerca fowleri* en laboratorio; fotografías tomadas el 30 de septiembre del 2016.

El daño en las acículas causado por *O. assimilis* fue similar al causado por *O. cerca fowleri*.

En octubre se realizó la colecta de adulto de *O. cerca fowleri* en Zautla y se colocaron en las cajas de emergencia con los individuos de *P. patula* y *P. pseudostrobus* que estuvieron sujetos al daño por adultos de salivazo de la misma especie de cercópido en agosto, para evaluar el efecto de dos periodos continuos de daño.

Se observó el desarrollo de la sintomatología de daño por alimentación de adultos de *Ocoaxo* en las acículas más jóvenes y en acículas de más edad en las que se alimentaron los adultos en septiembre, pero en menor magnitud (ver Figura 35).



Figura 35 Individuos de *Pinus patula* y *Pinus pseudostrobus* sometidos a dos periodos de alimentación de adultos de *Ocoaxo cerca fowleri*; fotografías tomadas el 13 de octubre del 2016.

5.2 *Ocoaxo cerca fowleri*. sintomatología en campo

El día 25 de agosto se observó que en diversas áreas boscosas de San Miguel Tenango, Zacatlán con *P. pseudostrobus*, había adultos alimentándose de las acículas (ver Figura 36).



Figura 36. Adultos de *Ocoaxo cerca fowleri* alimentándose en campo; fotografía tomada el 25 de agosto del 2016.

Además de la alimentación de los adultos, se ha observado en campo y en las cajas de emergencia, el apareamiento y la cópula de los mismos (ver Figura 37).



Figura 37. Adultos de *Ocoaxo cerca fowleri* apareándose; fotografías tomadas entre el 4 y el 12 de agosto.

El día 12 de septiembre del 2016 se realizó un recorrido por diversas áreas boscosas de los municipios de Aquixtla, Tetela de Ocampo y Zacatlán de las Manzanas, de Xochiapulco el día 13 y de Zautla el día 14 del mismo mes.

Los municipios en donde se observa un cambio más evidente de color del follaje de los pinos fueron Tetela de Ocampo y Zacatlán. En el resto de municipios, si bien el fenómeno de cambio de color del follaje no fue tan evidente, los técnicos encargados en dichos municipios comentan que si se observa el fenómeno.

En Tetela de Ocampo se observó que en pinos solitarios o agrupados en pequeños grupos o manchones rodeados por otras especies arbóreas de hoja ancha, el cambio de color es más evidente que en aquellas áreas en las que la cantidad de individuos de pino es mayor (ver Figura 38 y Figura 39).



Figura 38. Aspecto de algunos de los árboles que mostraron cambio de color del follaje; municipio de Tetela de Ocampo.



Figura 39. Aspecto de algunas áreas que mostraron cambio de coloración del follaje; municipio de Tetela de Ocampo.

En Zacatlán se observaron áreas extensas con cambio de color en el follaje, síntoma asociado al daño por alimentación de *O. cerca fowleri* (ver Figura 40).



Figura 40. Árboles de *Pinus pseudostrobus* fuertemente afectados por *Ocoaxo cerca fowleri*; municipio de Zacatlán de las Manzanas.

Además de la alimentación de los adultos, también se observó el apareamiento de éstos, tanto en agosto (ver Figura 37) como en septiembre (ver Figura 41), en campo y en laboratorio.

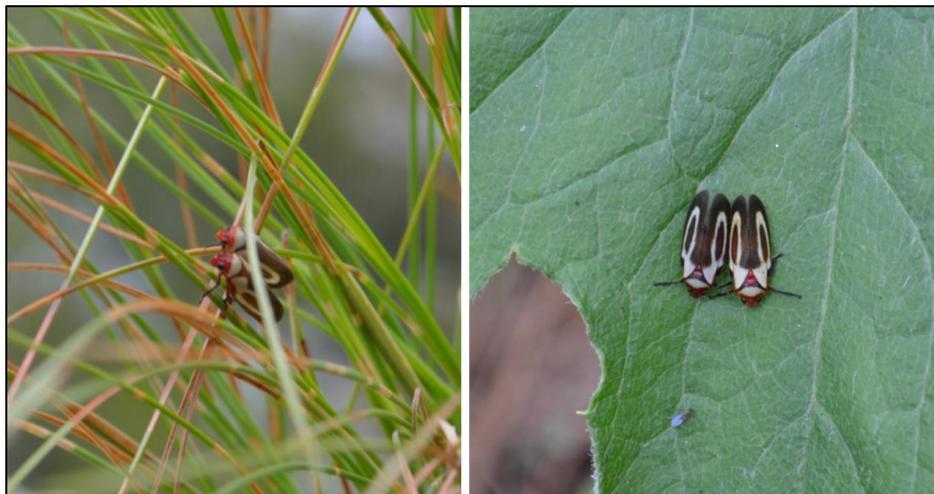


Figura 41. Adultos apareándose; fotografías tomadas el 12 de septiembre del 2016.

Del 7 al 8 de octubre se realizó un recorrido en campo por los municipios de Zacatlán, Tetela, Aquixtla, Xochiapulco y Zautla, para observar el desarrollo de la sintomatología del daño por alimentación de los adultos de *O. cerca fowleri* en los pinos.

Se observó que el síntoma de cambio de color en el follaje como consecuencia del daño por la alimentación de *O. cerca fowleri*, está presente en las áreas boscosas de los municipios, aunque al parecer, los municipios con la mayor superficie con daño son Tetela y Zacatlán; es necesario determinar la superficie con daños por *O. cerca fowleri*.

Del 23 al 25 de noviembre se realizó el último recorrido en campo por los municipios de Zacatlán, Tetela, Aquixtla, Xochiapulco y Zautla, para observar el desarrollo de la sintomatología del daño por alimentación de los adultos de *O. cerca fowleri* en los pinos.

Se encontró que en Zacatlán, Tetela, Aquixtla y Zautla, había extensas franjas boscosas con pinos de follaje verde-alimonado hasta café, siendo el más común este último. Estas observaciones. En Tetela y Zacatlán se dio seguimiento al desarrollo de la sintomatología del daño causado por los adultos al alimentarse (ver Figura 42 y Figura 43))



Figura 42. Desarrollo del cambio de color de septiembre a noviembre en Zacatlán de las Manzanas; fotografías del 12 de septiembre (superiores), 7 de octubre (intermedias) y 23 de noviembre (inferiores) del 2016, del mismo sitio.



Figura 43. Desarrollo del cambio de color de septiembre a noviembre en Tetela de Ocampo; fotografías del 12 de septiembre (superiores), 7 de octubre (intermedias) y 24 de noviembre (inferiores) del 2016, del mismo sitio.

5.3. Hospedantes de *Ocoaxo cerca fowleri*

Los cercópodos pueden tener varios hospedantes e ir de oligófagos a ampliamente polífagos; la selección y uso de plantas hospedantes es influenciado por factores como el hábitat, la morfología y la fisiología de la planta. Tanto las ninfas como los adultos de cercópodos se alimentan de la savia del xilema. (Peck, 1998)

5.3.1. Ninfas

Como resultado de las observaciones realizadas en campo en los municipios de Zacatlán, Tetela, Aquixtla, Xochiapulco y Zautla, en las evaluaciones de los tratamientos contra *Lophodermium* y en el ensayo en campo de control de ninfas y adultos en Zacatlán, se encontró que durante el estadio ninfal, *O. cerca fowleri* se alimentaba en las raíces de varias especies de herbáceas de hoja ancha, helechos, latifoliadas y pinos, principalmente en sitios en donde el grosor de la capa de hojarasca permitía una humedad alta en el suelo sin que la pendiente tuviera algún impacto aparente (ver Figura 44 y Figura 45).



Figura 44. Ninfas de *Ocoaxo cerca fowleri* en la raíz de sus hospedantes.



Figura 45. Ninfas de *Ocoaxo cerca fowleri* en la raíz de sus hospedantes.

Se encontró que en los sitios con vegetación de encino-pino o pinos, con presencia de helechos, eran los sitios en los que se encontraron las mayores poblaciones de ninfas.

5.3.2. Adultos

En Tetela de Ocampo, el 12 de septiembre, y en Zautla, el 14 de septiembre, se observó que algunos adultos de *O. cerca fowleri*, además de alimentarse de las acículas y brotes de los pinos, también se alimentaban de plantas herbáceas de hoja ancha (ver Figura 46 y Figura 47).

En Tetela se observó a los adultos alimentándose en una especie de herbácea, mientras que en Zautla se encontró en dos especies; aún no se determina la identidad de las plantas herbáceas. El personal de las brigadas, tanto los técnicos como los brigadistas, reportan observaciones similares en encinos y otras herbáceas de hoja ancha en las áreas donde han realizado actividades de saneamiento.

Debido a que en el sitio en dónde se observaron a los adultos (ver Figura 46 y Figura 47) había pinos y una buena parte de la población de adultos de *Ocoaxo* se alimentaban de ellos (Figura 48), se puede considerar que los adultos no escogen a las plantas herbáceas por falta hospedantes, lo que indicaría que de manera general, los adultos de *O. cerca fowleri* prefieren alimentarse de pinos, es decir, son los hospedantes primarios, mientras que las herbácea son los hospedantes secundarios.

Para explotar el recurso que ofrecen otros hospedantes diferentes a los habituales, los adultos deben penetrar una capa de tejido diferente del de su hospedante habitual mientras se exponen en un microhabitat inusual (Peck, 1998).



Figura 46. Adultos de *Ocoaxo cerca fowleri* alimentándose en plantas herbáceas; fotografía tomada el 10 de septiembre del 2016 en Zautla, Puebla.



Figura 47. Adultos de *Ocoaxo cerca fowleri* alimentándose de herbáceas; fotos tomadas el 12 de septiembre (superior) en Tetela de Ocampo y el 14 de septiembre (media e inferior) en Zautla.



Figura 48. Adulto de *Ocoaxo* cerca *fowleri* alimentándose de una acícula de *Pinus pseudostrobus*.

Hay pocas especies de cercópidos cuyos hospedantes de los adultos sean pinos; *H. dorsatum* y *A. corticea* son algunas de ellas. Los adultos de estas especies tienen como hospedante a *P. sylvestris*, mientras que los hospedantes de las ninfas de *H. dorsatum* son miembros de la familia Poaceae y los de *A. corticea* son arbustos enanos (Nickel & Remane, 2002). Algunos autores indican que *H. dorsatum* también tiene como hospedante a *P. pinaster* (Cobos, 1995).

H. dorsatum se distribuye en la región del Mediterráneo, en Europa, y *A. corticea* en la región Eurosiberiana, que comprende zonas boscosas de coníferas y árboles deciduos de Siberia y Europa (Nickel & Remane, 2002).

El encontrar que los adultos de *O. cerca fowleri* tienen otros hospedantes además de los pinos, implica que cualquier programa de manejo que se proponga debe tomarlos en cuenta.

5.4. *Ocoaxo assimilis*: sintomatología en campo

El 10 de septiembre, se realizó un recorrido por diversos puntos en las áreas boscosas del municipio de Nicolás Bravo, Puebla, con el fin de observar el desarrollo de *O. assimilis*, coleccionar adultos y observar los daños causados por este insecto en el follaje de los pinos.

En una primer parada, alrededor del mediodía, se observó una aglomeración de adultos sobre árboles de *P. oaxacana*, los cuales estaban refugiándose o alimentándose.

En este sitio se realizaron dos pequeñas fogatas con la finalidad de producir una gran cantidad de humo y evaluar el efecto de éste sobre el comportamiento de los adultos. Se observó que dentro de la zona de influencia el humo, los adultos se trasladaban hacia la hojarasca del suelo y arbustos.

En este sitio, también se observó que el viento causa que los adultos, en su mayoría, dejen de volar.

En la segunda parada, también alrededor del mediodía, se observaron las trampas de color colocadas por el Dr. Francisco Hernández Rosas y a adultos de *O. assimilis* adheridos a ellas.

En la tercera parada, alrededor de las 13 horas, se llegó a un sitio en el que se colectaron ninfas y adultos de *O. assimilis* con ayuda de los miembros de dos brigadas.

La dinámica de trabajo fue la siguiente:

- Se trabajó por equipos de dos personas.
- Cada equipo removía la capa de hojarasca y buscaba ninfas y adultos, los cuales se colectaban.
- Cuando los individuos aún se encontraban en el interior del salivazo, se colectaba éste y una porción del suelo que lo rodeaba, y los adultos que ya habían emergido, se colectaban con un poco de hojarasca; en ambos casos, se colocaban inmediatamente en el interior de una bolsa de plástico, la cual no se dejó en ningún momento bajo el rayo del sol, para evitar que se calentarán.
- Los individuos colectados se trasladaron posteriormente al invernadero de la DICIFO, y se introdujeron en las cajas de emergencia con individuos de *P. oaxacana* (esta actividad corresponde a la determinación de la sintomatología del daño por alimentación en laboratorio).

En una cuarta parada, se visitó el sitio que se propuso para instalar la trampa de luz.

El 15 de octubre se realizó un recorrido por algunas de las áreas boscosas con pinos con síntomas de daño alimentación por *O. assimilis*, en el municipio de Nicolás Bravo.

Se observó que los árboles afectados tenían copas de coloración verde alimonado, anaranjado, café-rojizo o café, en función del grado de daño sufrido en su follaje. (Ver Figura 49)



Figura 49. Áreas boscosas de Nicolas Bravo con síntomas de daño por alimentación de adultos de *Ocoaxo assimilis*; fotografías tomadas el 15 de octubre del 2016.

Al examinar la copa de algunos árboles con follaje verde alimonado y anaranjado, se observó que las acículas tenían áreas aún de color verde, mientras que en los árboles con follaje color café-rojizo o café, las áreas necrosadas a causa del daño por la alimentación de los adultos de *O. assimilis* era mayor, cubriendo casi la totalidad de la longitud de las acículas con síntomas, y la gran mayoría de acículas de la copa. (Ver Figura 50)



Figura 50. Pino con cambio evidente de color de follaje; fotografía tomada el 15 de octubre del 2016.

En nivel de daño en el follaje aumento conforme aumentó la superficie necrosada en las acículas, es decir, cuando la copa de los árboles era de color verde alimonado o hubo un cambio de color poco evidente, el nivel de daño fue bajo, cuando era color anaranjado el daño fue intermedio, cuando era color café-rojizo el daño fue severo y cuando era color café el daño era muy severo. (Ver Figura 51)



Figura 51. Tres niveles de cambio de color en follaje: poco evidente, intermedio, completo; fotografías tomadas el 15 de octubre del 2016.

En esta fecha todavía se observaron adultos de *O. assimilis* volando y alimentándose de los pinos en los sitios visitados.

5.5. Conclusiones

Basándose en las observaciones tanto en campo y en laboratorio sobre el ciclo biológico de *O. cerca fowleri*, la alimentación y comportamiento de los adultos de este cercopido y el desarrollo de la sintomatología del daño por la alimentación de éstos, esto último tanto para *O. cerca fowleri* como para *O. assimilis*, nos permite concluir que:

Ambas especies de cercópidos causan afectaciones severas al follaje de los pinos de los que se alimentan.

Tienen buena capacidad de vuelo, lo que les permite moverse verticalmente, afectando toda la copa de árboles de todas las edades, y horizontalmente, abarcando extensas superficies de bosque.

Cuando los árboles están en sitios con condiciones ambientales favorables y están en un grupo grande de otros pinos, soportan mejor los daños causados por la alimentación de *Ocoaxo*, lo que se refleja en un cambio de color del follaje, como síntoma principal del daño, más tardío que aquellos individuos en condiciones ambientales menos favorables y en grupos más pequeños, condición que hace que el daño sufrido sea mayor ya que, al ser menos individuos, el daño que sufrió cada individuo pudo ser mayor.



6. Monitoreo terrestre - trampeo



El 08 de julio se instaló una trampa de luz en la comunidad de San Miguel Tenango, Zacatlán de las Manzanas (ver Figura 52), el 19 en la comunidad La Soledad, Tetela de Ocampo (ver Figura 53), el 20 en el paraje La Arenita, comunidad de Ayocuantla, Aquixtla (ver Figura 54) y el jueves 28 en la comunidad de Xahuiteno, Xochiapulco (ver Figura 55).

La trampa correspondiente al municipio de Nicolás Bravo se le entregó al ingeniero Francisco Javier Rivera Rico para su posterior instalación.



Figura 52. Trampa de luz en la comunidad San Miguel Tenango, Zacatlán; foto tomada el 08 de julio del 2016.



Figura 53. Trampa de luz en la comunidad La Soledad, Tetela de Ocampo; fotografía tomada el 19 de julio del 2016.



Figura 54. Trampa de luz en la comunidad Ayocuantla, Aquixtla; fotografía tomada el 20 de julio del 2016.



Figura 55. Trampa de luz en la comunidad Xahuinteno, Xochiapulco; fotografía tomada el 28 de julio del 2016.

6.1. Metodología

Se ha dado seguimiento al trapeo en los municipios de la Sierra Norte de Puebla (Zacatlán, Aquixtla, Tetela de Ocampo, Xochiapulco y Zautla).

La colecta de los artrópodos que caen en las trampas de luz, la selección de los adultos de *O. cerca fowleri* y el conteo y registro de los datos lo han realizado los encargados de las trampas (Guillermo Cruz Hernández- Aquixtla; Rubén López Márquez- Zacatlán; Jorge Cruz Solano- Tetela; Aurelio Juárez Huasteco- Xochiapulco; Marbel Contreras González-Zautla), mientras que la revisión del material en laboratorio ha estado a cargo del Ing. Alberto Lara Beltrán.

Cabe señalar que en el municipio de Nicolás Bravo, el cuidado y uso de la trampa de luz ha estado a cargo del Dr. Francisco Hernández Rosas y de su equipo de trabajo.

La metodología de colecta fue la siguiente (ver Figura 56):

- Se separa el depósito de colecta de la trampa de luz.
- Con un colador se recogen los artrópodos y se revisan minuciosamente en busca de adultos de *Ocoaxo*.
- Los adultos de *Ocoaxo* se separan, limpian, cuentan y depositan en frascos con alcohol etílico, a los que se les coloca en su interior una etiqueta con los datos de colecta (fecha, hora, número de adultos de *Ocoaxo*, colector). Adicionalmente, se llevó un registro del número de adultos por fecha de colecta.



Figura 56. Pasos de colecta de adultos en trampas de luz.

- Se vuelve a colocar el depósito de colecta con anticongelante en la trampa de luz. Si hace falta anticongelante para llegar al nivel adecuado en el depósito, se agrega el necesario, y si está sucio en exceso, se cambia en su totalidad y se rellena el depósito con líquido nuevo.

6.2. Resultados

Durante el periodo de uso de las trampas de luz (de julio a noviembre) en los municipios de Zacatlán de las Manzanas, Aquixtla, Tetela de Ocampo, Xochiapulco y Zautla, se obtuvieron 167 colectas, de las cuales, 14 corresponden a julio, 43 a agosto, 48 a septiembre, 40 a octubre y 22 a noviembre (ver Cuadro 10).

En total se capturaron 157 adultos en la trampa de Tetela, 138 en la de Zacatlán, 63 en la de Zautla, 31 en la de Aquixtla y 26 en la de Xochiapulco (ver Cuadro 10). La trampa que más tiempo estuvieron en campo fue la de Zacatlán, seguida de las de Aquixtla y Tetela, Xochiapulco y Zautla.

La última fecha de captura en Zacatlán fue el 30 de septiembre, en Tetela fue el 21 de octubre, en Aquixtla fue el 26 de octubre, en Xochiapulco fue el 6 de octubre y en Zautla fue el 27 de octubre.

Cuadro 10. Número de adultos de *Ocoaxo* cerca *fowleri* por mes, por municipio.

Mes	Tetela de Ocampo Ad./col.	Zacatlán Ad./col.	Aquixtla Ad./col.	Xochiapulco Ad./col.	Zautla Ad./col.
Julio	16/4	39/7	0/3	--	--
Agosto	78/9	85/15	4/9	8/5	7/5
Septiembre	60/9	14/15	15/7	16/9	29/9
Octubre	3/6	0/7	12/9	2/9	27/9
Noviembre	0/4	0/3	0/7	0/1	0/7
Total	157/32	138/46	31/35	26/24	63/30

Ad.= número de adultos; col.= número de colectas.

Si se considera solo las trampas de Zacatlán y de Tetela de Ocampo, que son las que tienen mayor número de adultos colectados, se tiene que:

- En la trampa de Tetela (ver Figura 57) se observa una fluctuación poblacional (ver Figura 58) que se sospecha puede atribuirse a algún fenómeno ambiental como la precipitación, la temperatura o la velocidad del viento, pero no se cuenta con la información necesaria para confirmarlo.



Figura 57. Trampa de luz en Tetela de Ocampo.

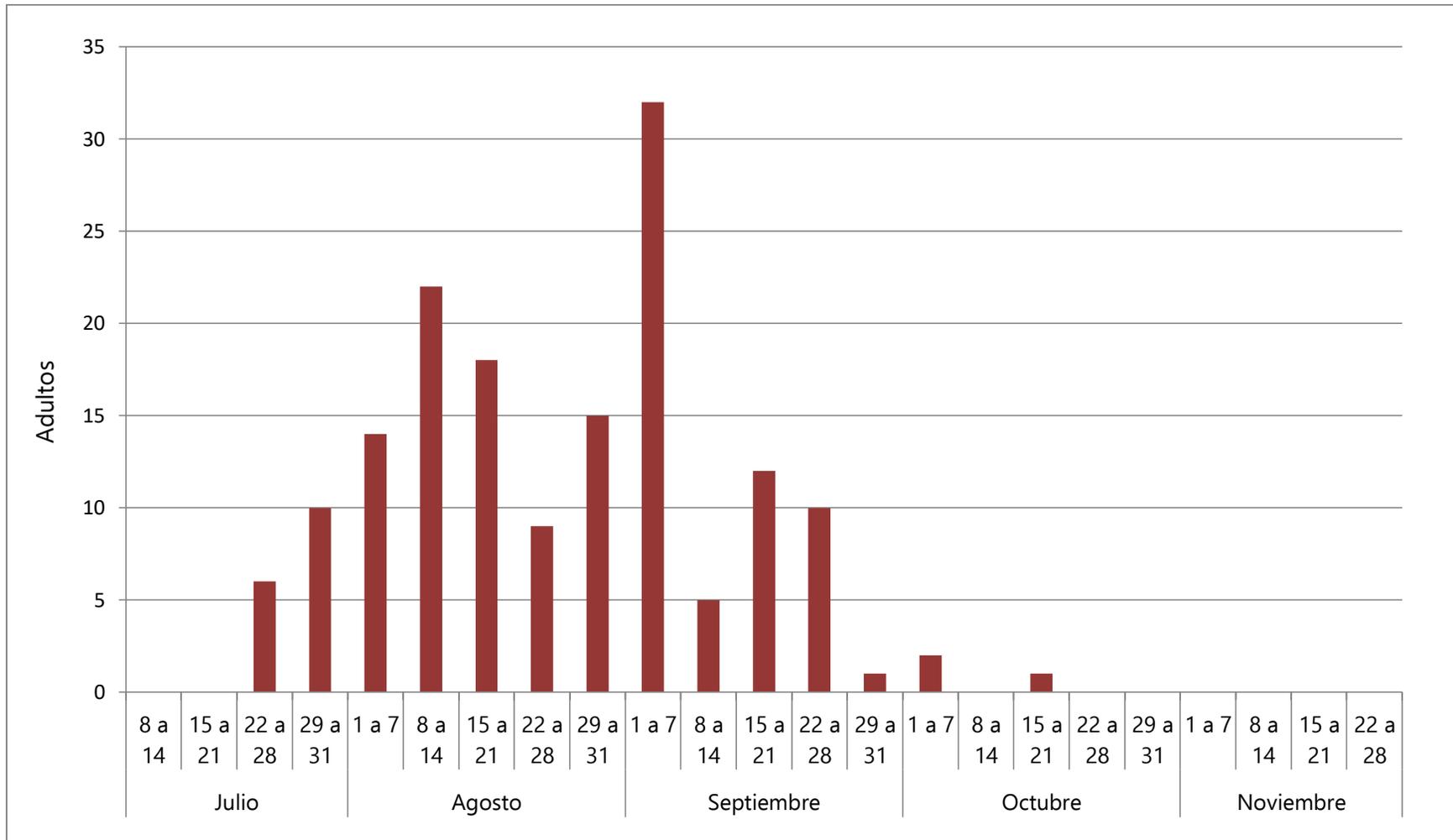


Figura 58. Gráfica de adultos colectados en la trampa de luz de Tetela de Ocampo.

- En la trampa de Zacatlán (ver Figura 59) se observó una fluctuación en el número de adultos colectados, que en general coincide con los periodos de precipitación (ver Figura 60). Se observó que cuando la precipitación se incrementó drásticamente la captura de adultos se redujo drásticamente, mientras que cuando la precipitación se reduce la captura se incrementa.
- En Zacatlán, es posible que la mayor captura de adultos coincida con el periodo de mayor presencia de adultos de *O. cerca fowleri* (ver Figura 60).



Figura 59. Trampa de luz en Zacatlán de las Manzanas.

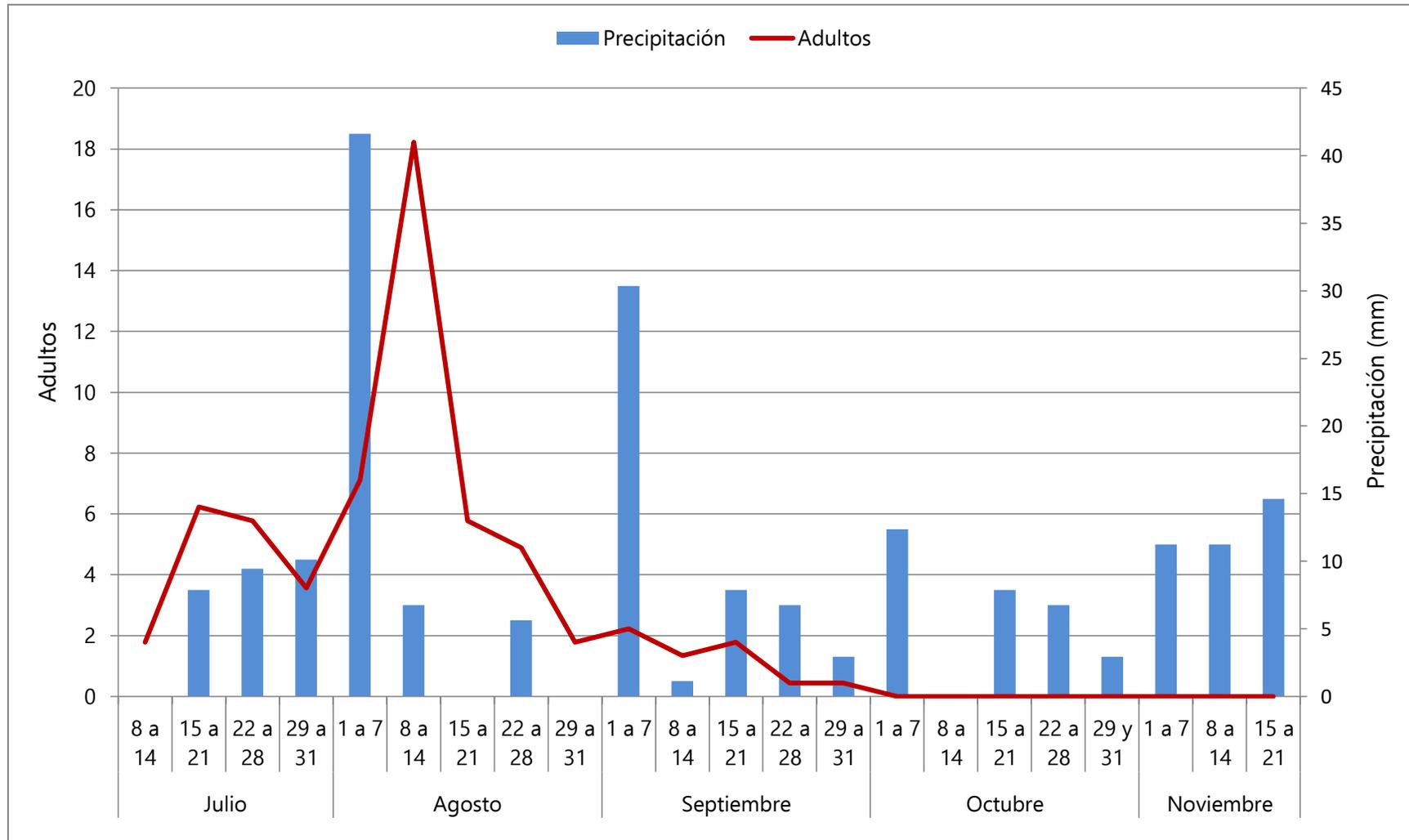


Figura 60. Gráfica de adultos capturados/precipitación registrados en la trampa de luz de Zacatlán de las Manzanas.

6.3 Conclusiones

El número de insectos colectados (ver Cuadro 10) indica que quizá Tetela sea el municipio con la mayor población de *O. cerca fowleri*, seguido de Zacatlán; de los otros tres municipios no se pueden hacer inferencias ya que el comportamiento de las capturas en las trampas de luz no corresponde a lo observado en campo, por lo que las estimaciones no serían válidas

De acuerdo con la información de la trampa de luz de Zacatlán, la lluvia es un factor importante en la movilidad de los adultos, reduciéndola cuando está presente.

De acuerdo a los registros de las capturas de las trampas de luz en los cinco municipios, Zacatlán es el municipio en donde los adultos de *O. cerca fowleri* comenzaron su periodo de vuelo, antes que en Tetela y Xochiapulco, Aquixtla y Zautla.

Es necesario estudiar el efecto de la temperatura, la humedad relativa, la lluvia, la hora del día, entre otros, en los patrones de vuelo de los adultos, ya que esta información es importante al momento de diseñar una metodología de muestreo de adultos.



7. Identidad de los hongos de follaje involucrados en el proceso de declinación forestal y evaluación de control



7.1. Identificación de daños en campo

En el mes de julio, en los municipios de Aquixtla, Tetela de Ocampo, Xochiapulco y Zacatlán de las Manzanas se muestrearon diversos sitios en los que se encontró la presencia de acículas con signos de *Lophodermium*.

Las coordenadas de los sitios de colecta se muestran en el Cuadro 11

Cuadro 11. Coordenadas de los sitios de colecta en Puebla.

Municipio	Sitio	Hospedante	Coordenadas
			Latitud N / Longitud O
Aquixtla	A1	<i>Pinus pseudostrobus</i>	N19°46'57.86"/-97°52'56.91"
Tetela de Ocampo	T1	<i>P. oaxacana</i>	N19°50'35.77"/-97°51'24.66"
	T2	<i>P. pseudostrobus</i>	N19°48'1.40"/-97°48'42.75"
Zacatlan de las Manzanas	A	<i>P. pseudostrobus</i>	N19°53'51.71"/-97°56'39.03"
	H		N19°53'28.54"/-97°56'27.50"
	J		N19°53'32.16"/-97°56'28.06"
	K		N19°53'44.88"/-97°56'41.63"
	T		N19°53'44.88"/-97°56'41.63"
	2		N19°53'45.39"/-97°56'5.23"
Xochiapulco		<i>P. pseudostrobus</i>	N19°49'23.71"/ -97°38'49.04"

7.1.1. Signos y síntomas

En Aquixtla, Tetela de Ocampo y Zacatlán de las Manzanas se observó la presencia de cuerpos fructíferos en acículas de 2015 que aún se encontraban adheridas al árbol (Figura

72a, b, d, Figura 74a, b, Figura 76a, b). También hubo la alta incidencia del hongo en acículas depositadas en el suelo en los tres sitios de colecta (Figura 72c y Figura 76c).

El principal signo de este patógeno es la presencia de cuerpos fructíferos de forma elipsoide (histerotecios) que se encuentra bajo el tejido epidermal de la acícula cuando esta se muere (Figura 72e, Figura 74c y Figura 77b).

En los tres sitios de colecta se observó que el cuerpo fructífero se encontraba maduro y abierto en su parte media donde se liberaron las ascosporas causando nuevas infecciones.

Se aceptó que en *P. patula* y *P. pseudostrobus* este grupo de hongos es común en todas las áreas forestales, pero no se le reconoce patogenicidad en acículas nuevas, es posible que tenga un papel importante en las acículas senescentes y que contribuya de manera importante en su degradación, por lo observado hasta la fecha no se le asigna importancia económica en estas dos especies de árboles.

En *P. oaxacana* se reconoció una especie que puede ser patogénica en follaje nuevo, lo cual se estará estudiando en los siguientes meses.

El día 23 de noviembre se visitó la comunidad de San Miguel Tenango (Zacatlán de la Manzanillas) para evaluar la presencia del hongo *Lophodermium* en follaje de 2016; se visitaron cinco sitios donde se colectaron muestras de follaje en cinco árboles de *P. pseudostrobus* que presentaban necrosis en acículas y la presencia de estructuras fructíferas del hongo (ver Cuadro 12).

El día 24 de noviembre se realizó un recorrido en Aquixtla y Tetela de Ocampo, donde se colectaron follaje de *P. patula* y *P. pseudostrobus* (ver Cuadro 12) y el día 25 se colectó follaje en las dos especies de pinos mencionadas anteriormente en los municipios de Xochiapulco y Zautla.

En laboratorio se realizó el conteo de 100 fascículos por sitio y se evaluó las siguientes variables:

- "Acículas con daño de *O. cerca fowleri*"
- "Acículas con presencia de histerotecios de *Lophodermium*"

En algunos casos se encontró que una misma acícula tenía daño por el cercópido y la presencia de histerotecios del hongo.

7.1.1.1. Resultados

En los sitios muestreados de los municipios de Zacatlán de las Manzanillas, Aquixtla y Tetela de Ocampo se observó en septiembre la presencia de *O. cerca fowleri* alimentándose en follaje del 2016 e induciendo un ligero amarillamiento alimonado del follaje y no se observó la presencia de estructuras fructíferas de *Lophodermium*; sin embargo, en

noviembre se han detectado de 4 a 11 histerotecios de *Lophodermium* por acícula, en zonas necrosadas donde el insecto se estuvo alimentando (ver Cuadro 12).

Cuadro 12. Sitios de evaluación de daños causado por *Ocoaxo* cerca *fowleri* y por *Lophodermium* en *Pinus patula* y *P. pseudostrabus*.

Municipio	Sitios	Especie ^b	Insecto	Histerotecios	Con daño	Sanas [€]	Total
Zacatlán de las Manzanas	I	<i>P. pseudostrabus</i>	305	120	425	184	500
	II		100	120	220	177	500
	III		290	165	455	131	500
	IV		75	40	115	145	500
	V		260	70	330	172	500
Aquixtla	I	<i>P. pseudostrabus</i>	250	60	310	190	500
	II		390	75	465	35	500
	III	<i>P. patula</i>	210	60	270	30	300
	IV		205	60	265	35	300
	V	<i>P. pseudostrabus</i>	320	80	400	100	500
Tetela de Ocampo	I	<i>P. pseudostrabus</i>	220	96	316	184	500
	II		325	88	413	177	590
	III		331	38	369	131	500
	IV		237	118	355	145	500
	V		232	96	328	172	500
Xochiapulco	I	<i>P. patula</i>	137	63	200	37	237

	II		45	20	65	415	480
	III	<i>P. pseudostrobus</i>	20	10	30	260	290
	IV		25	0	25	265	290
	V		25	5	30	265	295
Zautla	I	<i>P. pseudostrobus</i>	239	1	240	260	500
	II		292	10	302	198	500
	III		279	18	297	203	500
	IV		344	18	362	138	500
	V		222	30	252	248	500

^β Especie de pino. [¶] Número de acículas dañadas por el Insecto-hongo. [§] Número de acículas con presencia de histerotecios del hongo *Lophodermium*. [€] Acículas sanas de pino.

En la Figura 61 se observa que solo en el sitio II de Zacatlán, el número de acículas con histerotecios supera el de acículas con daño por *O. cerca fowleri*, esto se puede explicar debido a que el 100% de acículas con daño por este último agente presentó histerotecios y el 1.818% solo presentó histerotecios (ver Cuadro 13).

En el resto de municipios, las acículas en donde se encontraron histerotecios tenían síntomas de daño por alimentación de adultos de *O. cerca fowleri* pero no todas las acículas con daños por *Ocoaxo* tenían histerotecios.

En la Figura 61, "Hongo/insecto" indica la proporción entre acículas con histerotecios de *Lophodermium* en relación con las acículas con daños por alimentación de adultos de *O. cerca fowleri*, es decir, entre mayor es el número de acículas con daño por *O. cerca fowleri* e histerotecios en relación con las acículas que solo tienen el daño de *O. cerca fowleri*, mayor será el valor; mientras que "Hongo/daño total" e "Insecto/daño total" hacen referencia a la proporción de acículas con presencia de daño por alimentación de *O. cerca fowleri* e histerotecios y acículas solo con daño por alimentación de *O. cerca fowleri*, es decir, entre mayor sea el número de acículas con éstas características respecto al número total de acículas con daño, mayor será el valor.

Tomando en consideración lo anterior y al Cuadro 13, Zacatlán es el municipio con la mayor presencia de *Lophodermium* en las acículas dañadas por los adultos de *O. cerca fowleri*, mientras que Zautla es el de menor presencia.

Se ha reportado que *Lophodermium australe* en *Pinus caribaea* fructificó principalmente "en acículas lesionadas por insectos y sobre otros agentes patogénicos como *Lophodermella cerina* y *Ploioderma (Hypoderma) lethale*" (Mohali, 1998).

El municipio con el mayor promedio de acículas con daño por *O. cerca fowleri* y presencia de histerotecios fue Zacatlán de las Manzanas (35.008%), mientras que el que tuvo el menor promedio fue Zautla (5.333%).

Lophodermium australe es la especie que se encuentra en los municipios de Zacatlán y Tetela, de acuerdo a los resultados de la caracterización molecular de los cultivos puros obtenidos a partir de acículas colectadas en estos municipios; es una especie considerada endófito-saprofita y común en acículas muertas de pino (Minter, 1981; Ortiz-García et al., 2003).

Si en Zacatlán estuviera presente una especie fitopatógena de *Lophodermium*, este sería el municipio con el mayor riesgo de afectación, seguido de Tetela, Xochiapulco y Aquixtla, aunque los resultados indican que *Lophodermium* funge como agente saprófito en las acículas en estos municipios, excepto quizás, por un bajo porcentaje (1.818 % de las acículas evaluadas) en Zacatlán.

Cuadro 13. Porcentaje de acículas dañadas por tipos de agente causal.

Municipio	Solo con daño por <i>Ocoaxo</i>	Con daños por <i>Ocoaxo</i> e histerotecios	Solo con histerotecios
Zacatlán de las Manzanas	64.992	35.008	1.818
Tetela de Ocampo	75.101	24.899	0.000
Xochiapulco	77.546	22.454	0.000
Aquixtla	79.930	20.070	0.000
Zautla	94.667	5.333	0.000

La mayor presencia de daños por *O. cerca fowleri* se presentó en Aquixtla, Tetela, Zacatlán y Zautla, y en menor cantidad en Xochiapulco (ver Cuadro 14).

En la Figura 61, "Sanas/daño total" indica la proporción de acículas sin daños en relación con las acículas dañadas, ya sea con presencia de daño *O. cerca fowleri*, con histerotecios de *Lophoderium* o ambos, es decir, entre mayor sea el valor, mayor es el número de acículas sin daños en comparación con el número de acículas con daños.

Lo observado en la Figura 61 coincide con el Cuadro 14.

Cuadro 14. Promedio de acículas con daño, por municipio.

Municipio	Con daño	Sin daño
Aquixtla	82.667	17.333
Tetela de Ocampo	68.720	31.280
Zacatlán de las Manzanas	61.800	38.200
Zautla	58.120	41.880
Xochiapulco	25.413	74.587

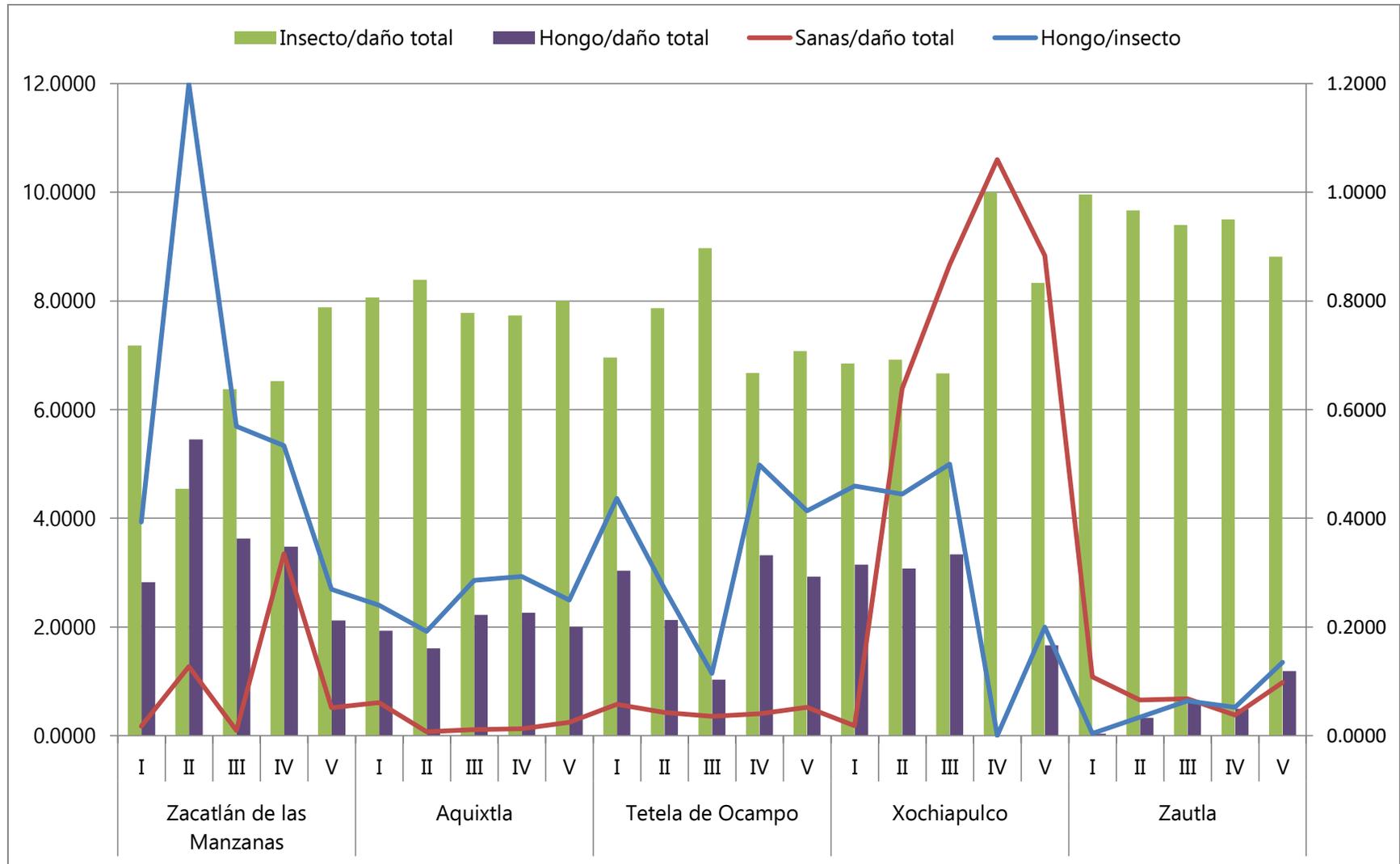


Figura 61. Gráfica de resultados de evaluación de daño, realizada con follaje colectado en noviembre del 2016.

En Zacatlán de las manzanas el follaje 2016 de *Pinus pseudostrobus* presentó una coloración café rojizo y con alta presencia de histerotecios de *Lophodermium* en las acículas (ver Figura 62).

El mayor número de acículas sin daños se encontró en los sitios IV, II, V, I y III (ver Figura 63).

El mayor número de acículas con daños por *O. cerca fowleri* en comparación con el de acículas con presencia de histerotecios de *Lophodermium*, se encontró en el sitio V seguido por los sitios I, IV, III y II (ver Figura 63).

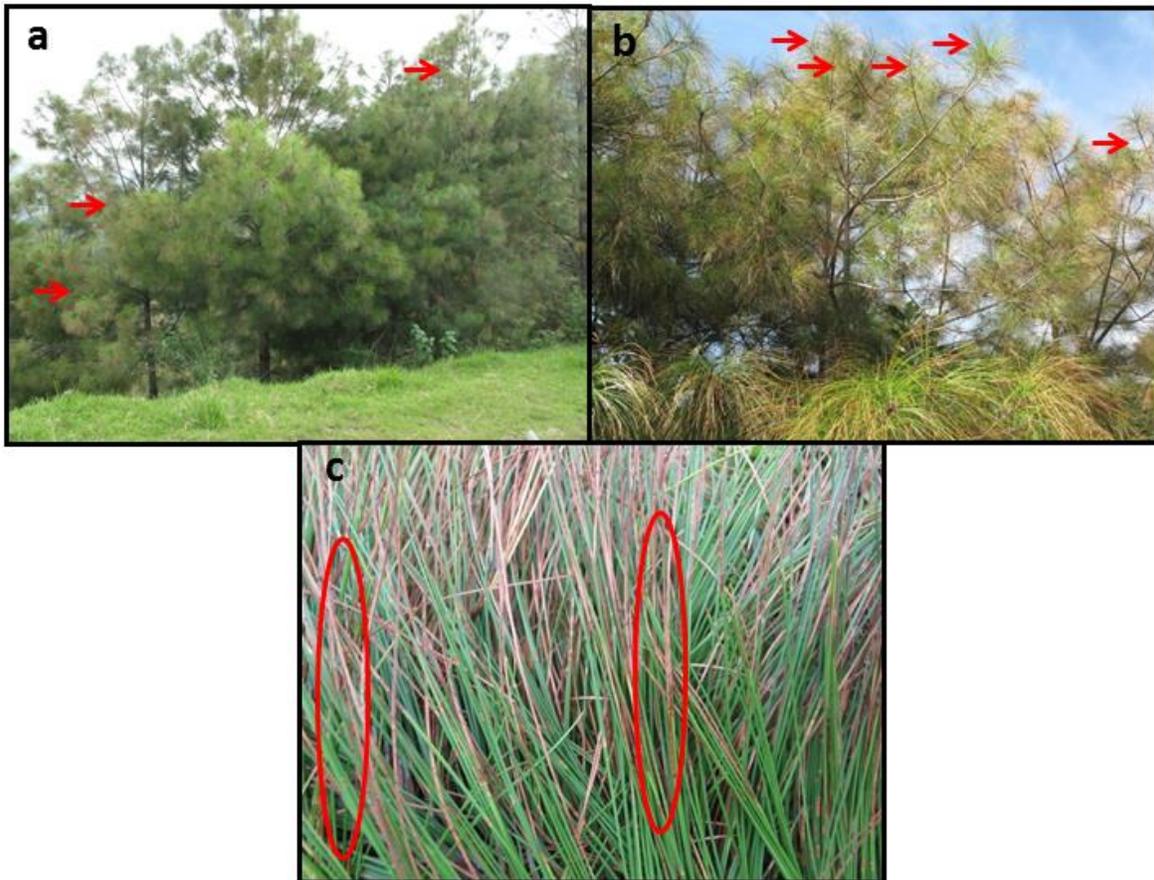


Figura 62. Bosque de pino en el municipio de Zacatlán de las Manzanas; a, b) caída de acícula de pino en *Pinus pseudostrobus* con presencia de *Lophodermium* en follaje del 2016 (flecha roja), c) histerotecios en acículas.

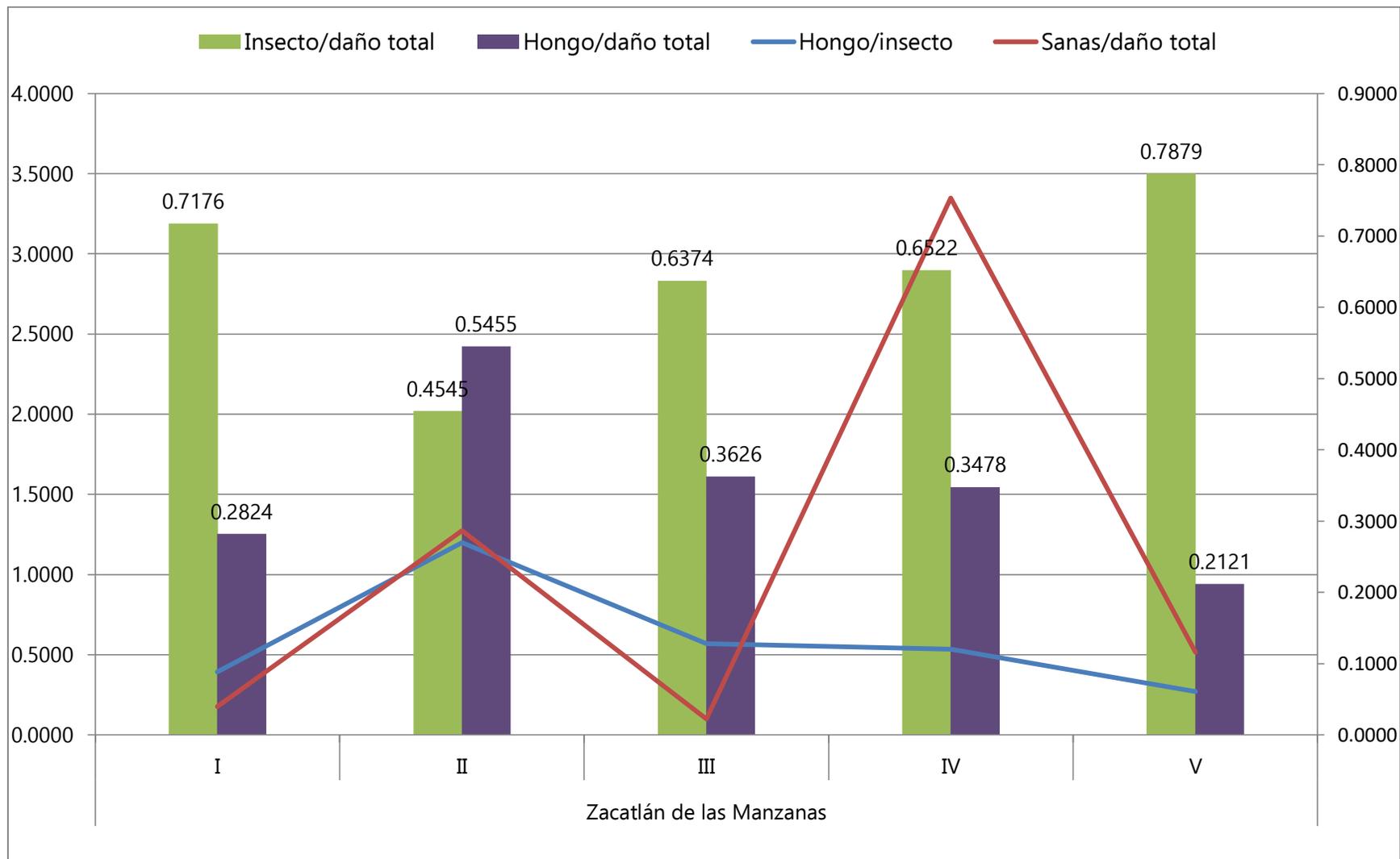


Figura 63. Proporción de acículas sanas, acículas con daño por *Ocoaxo* cerca *fowleri* + acículas histerotecios de *Lophodermium* y acículas solo con daños por *O. cerca fowleri* en *Pinus pseudostrobus* en Zacatlán de las Manzanas.

En Aquixtla, los cinco sitios mostraron necrosis en más del 50% del follaje causado por el insecto y el hongo en *Pinus patula* y *P. pseudostrobus* (ver Figura 64) y el resto del follaje tiene una apariencia sana o asintomático.

El mayor número de acículas sin daños se encontró en los sitios I, V, IV, III y II (ver Figura 65).

El mayor número de acículas con daños por *O. cerca fowleri* en comparación con el de acículas con presencia de histerotecios de *Lophodermium*, se encontró en el sitio II, seguido de los sitios V, IV, III y II (ver Figura 65).

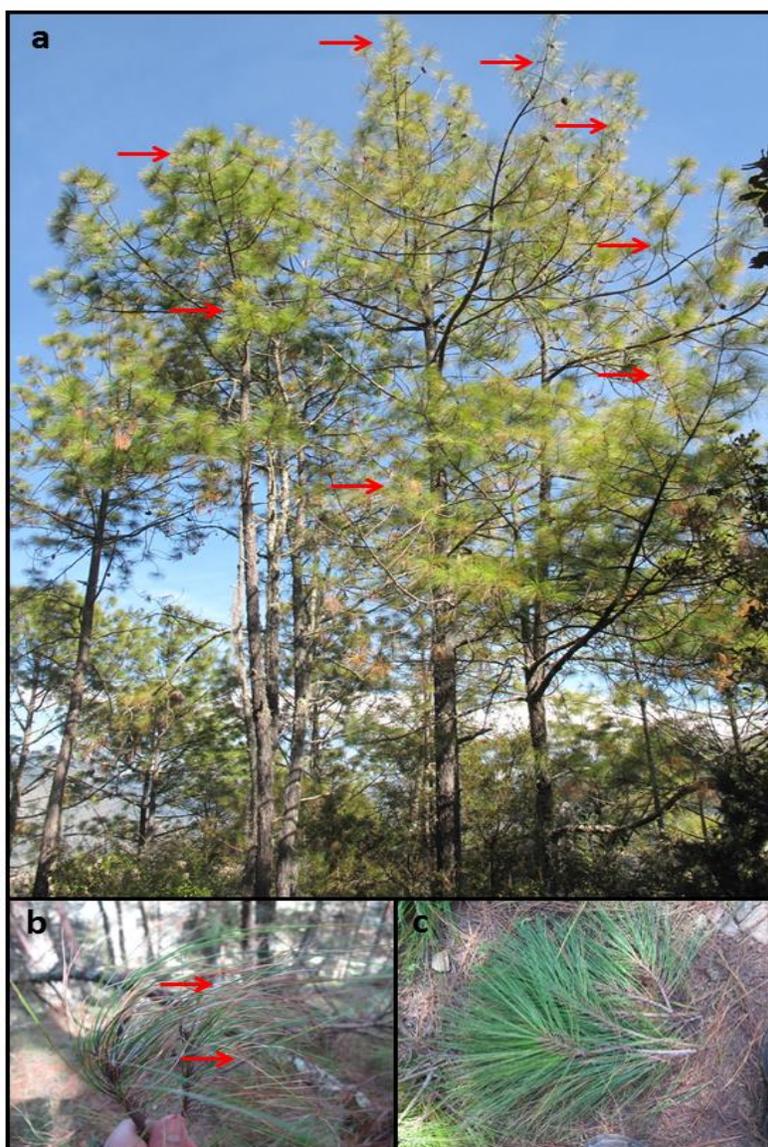


Figura 64. Bosque de pino en el municipio de Aquixtla; a) Caída de acículas en *Pinus pseudostrobus* con poca presencia de *Lophodermium* en follaje del 2016 (flecha roja); b, c) acículas necrosadas del 2016 con histerotecios (flecha roja).

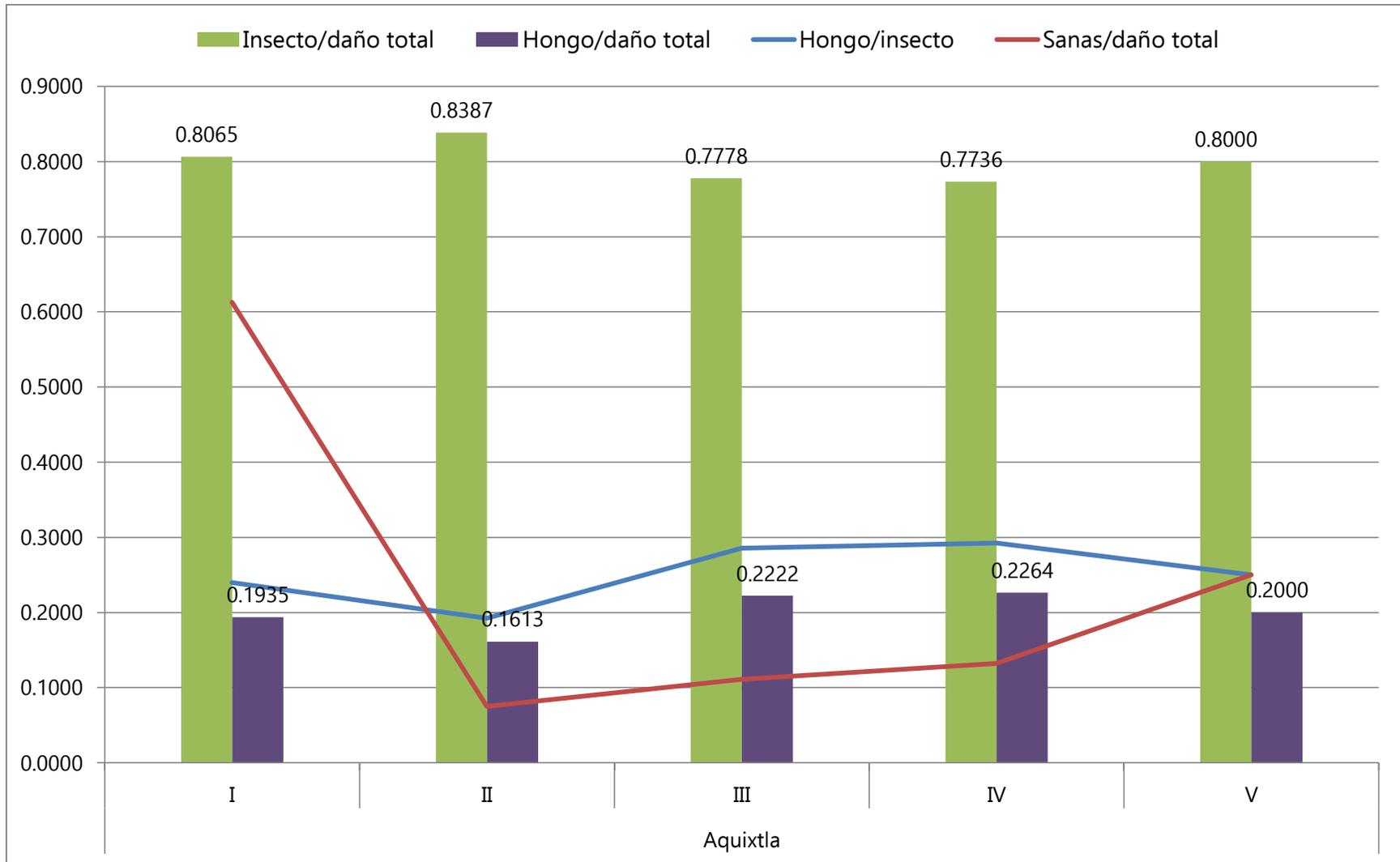


Figura 65. Proporción de acículas sanas, acículas con daño por *Ocoaxo cerca fowleri* + acículas histerotecios de *Lophodermium* y acículas solo con daños por *O. cerca fowleri* en *Pinus patula* y *Pinus pseudostrobus* en el municipio de Aquixtla.

En Tetela de Ocampo se observaron los mismos daños y porcentajes que en los municipios anteriores (ver Figura 66).

El mayor número de acículas sin daños se encontró en los sitios I, V, IV, II y III (ver Figura 67).

El mayor número de acículas con daños por *O. cerca fowleri* en comparación con el de acículas con presencia de histerotecios de *Lophodermium*, se encontró en el sitio III, seguido de los sitios II, V, I y IV (ver Figura 67).

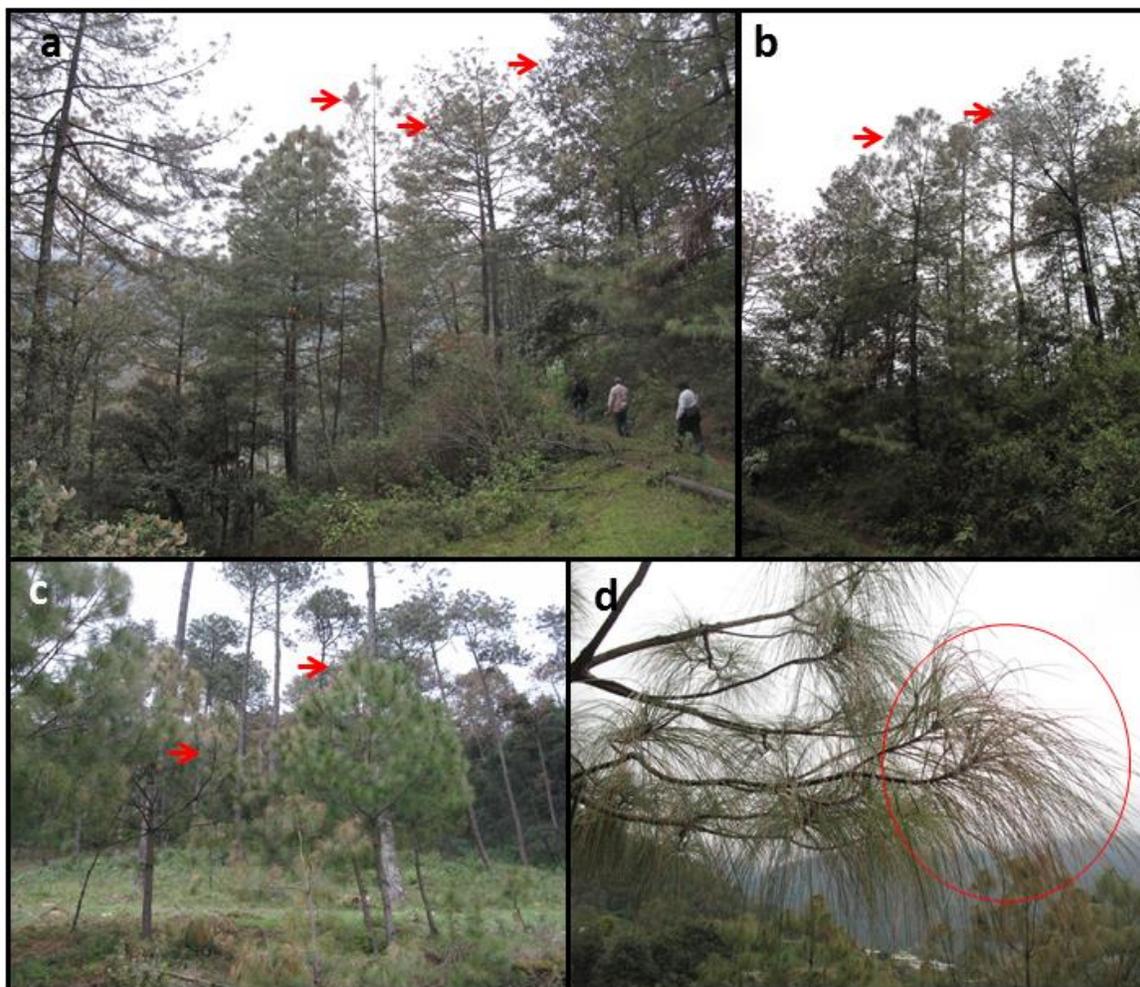


Figura 66. Bosque natural de pino en el municipio de Tetela de Ocampo; caída de acículas en *Pinus pseudostrobus* con presencia de *Lophodermium* en follaje del 2016.

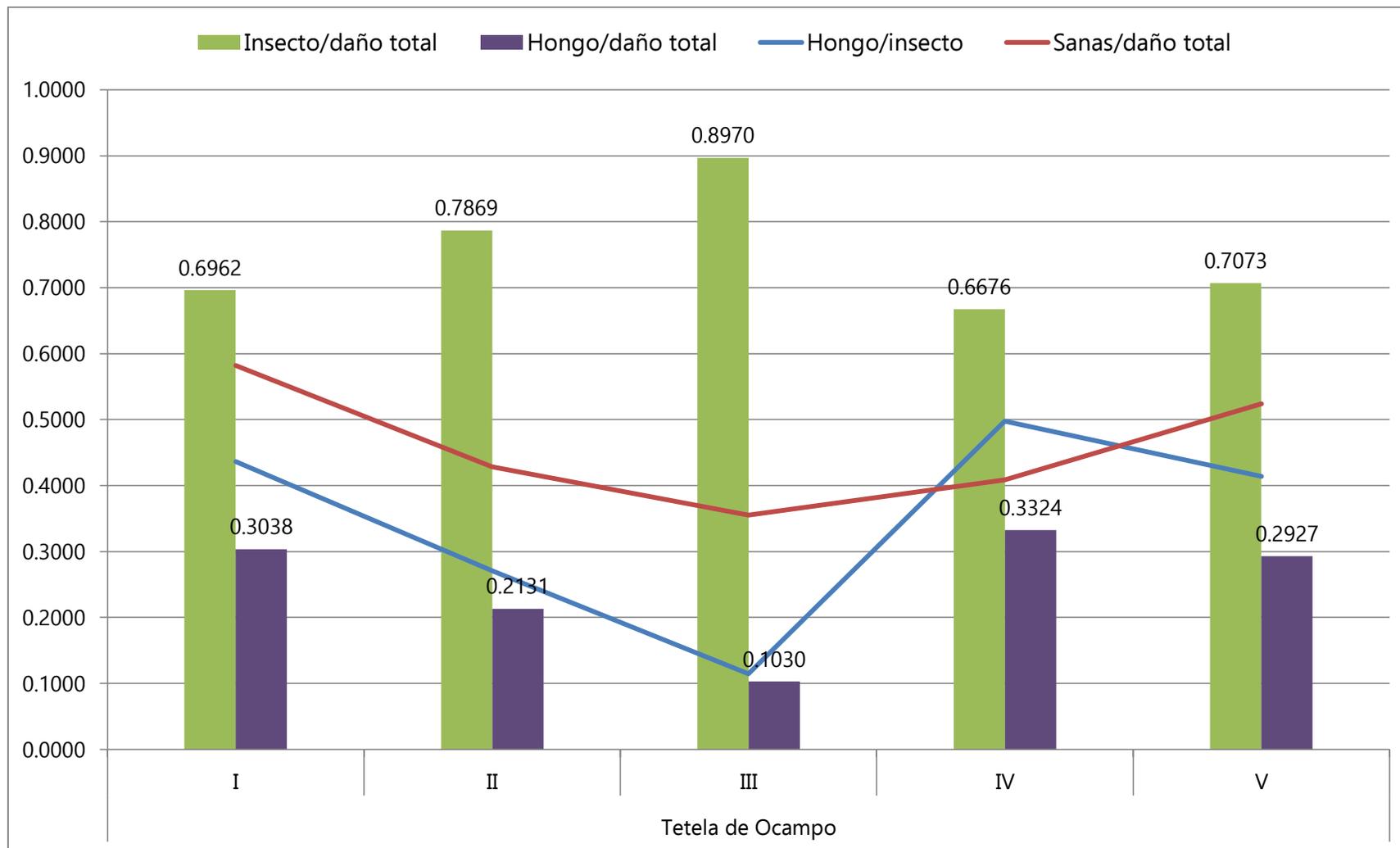


Figura 67. Proporción de acículas sanas, acículas con daño por *Ocoaxo* cerca *fowleri* + acículas histerotecios de *Lophodermium* y acículas solo con daños por *O. cerca fowleri* en *Pinus pseudostrobus* en el municipio de Tetela de Ocampo.

En el municipio de Xochiapulco, en general, mostró el menor daño causado por el insecto y por el hongo (ver Figura 68).

El mayor número de acículas sin daños se encontró en los sitios IV, V, III, II y I (ver Figura 69).

El mayor número de acículas con daños por *O. cerca fowleri* en comparación con el de acículas con presencia de histerotecios de *Lophodermium*, se encontró en el sitio IV, seguido de los sitios V, II, I y III (ver Figura 69).



Figura 68. Bosque natural de pino en el municipio de Xochiapulco; caída de acícula en *Pinus pseudostrabus* y *Pinus patula* con poca presencia de *Lophodermium* en follaje del 2016.

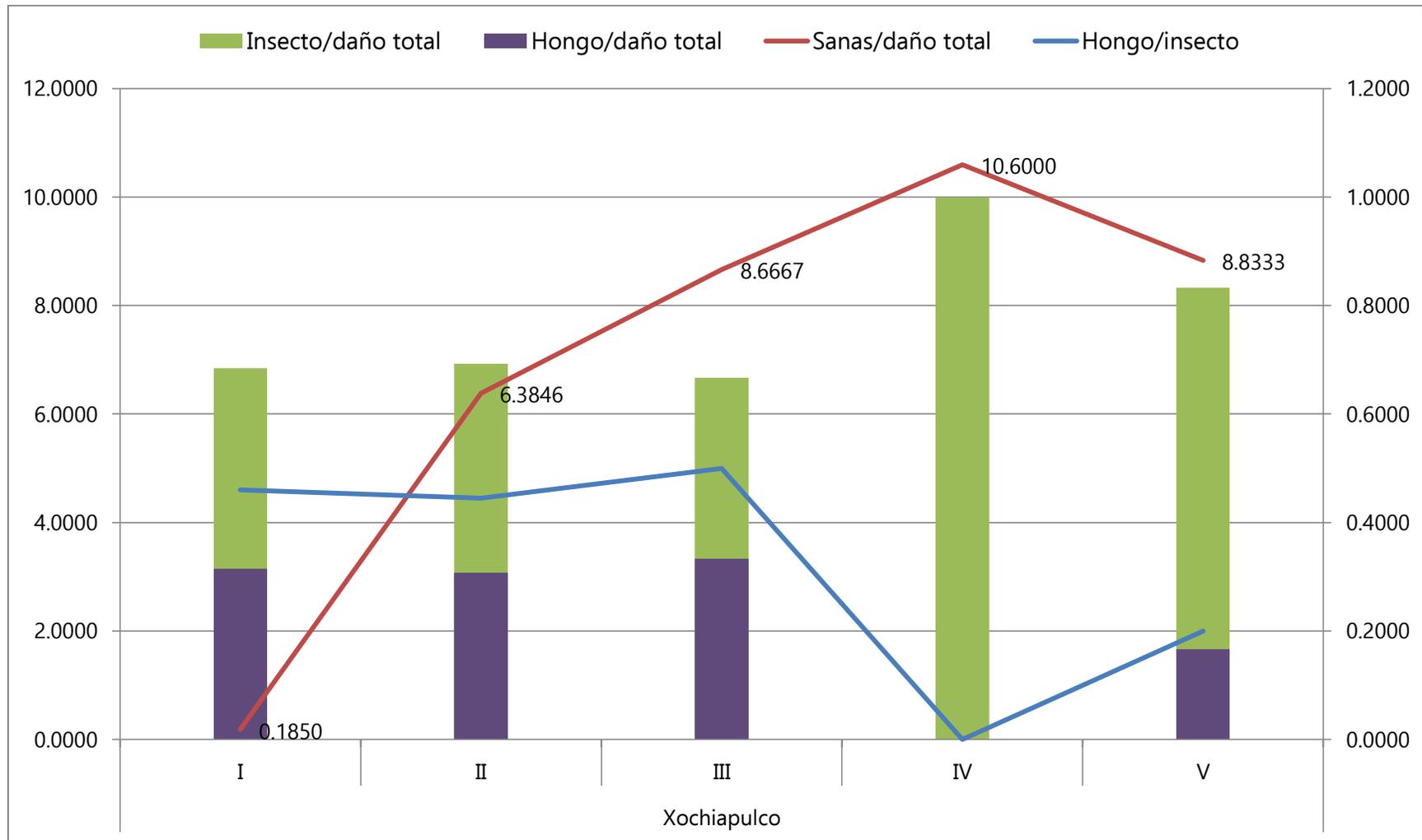


Figura 69. Proporción de acículas sanas, acículas con daño por *Ocoaxo cerca fowleri* + acículas histerotecios de *Lophodermium* y acículas solo con daños por *O. cerca fowleri* en *Pinus patula* y *Pinus pseudostrobus* en el municipio de Xochiapulco.

En el municipio de Zautla se encontró necrosis en follaje y poca presencia de *Lophodermium* en las acículas (ver Figura 70).

El mayor número de acículas sin daños se encontró en los sitios I, V, III, II y IV (ver Figura 71).

El mayor número de acículas con daños por *O. cerca fowleri* en comparación con el de acículas con presencia de histerotecios de *Lophodermium*, se encontró en el sitio I, seguido de los sitios II, IV, III y V (ver Figura 71).

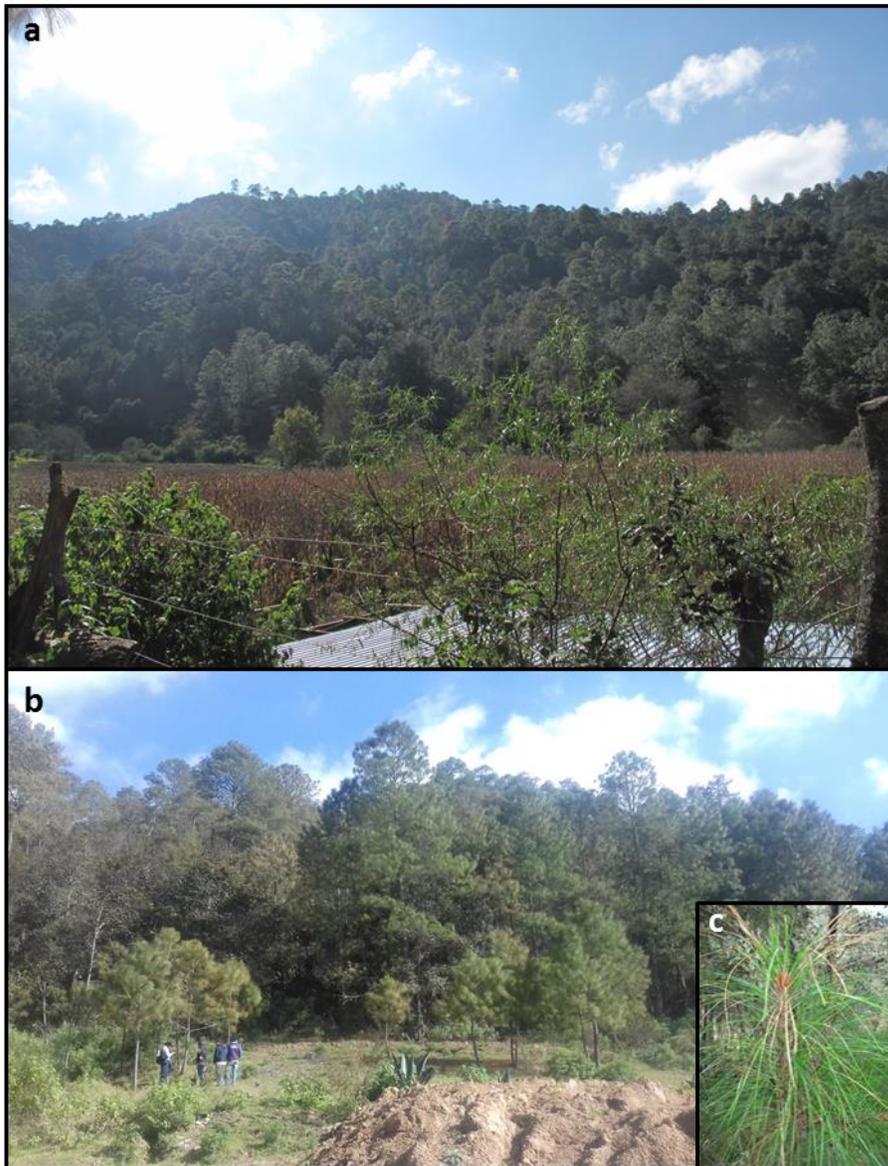


Figura 70. Bosque natural de pino en el municipio de Zautla; a, b) caída de acícula en *Pinus pseudostrobus* con poca presencia de *Lophodermium* en follaje del 2016; c) acículas necrosadas en brotes con ausencia del hongo.

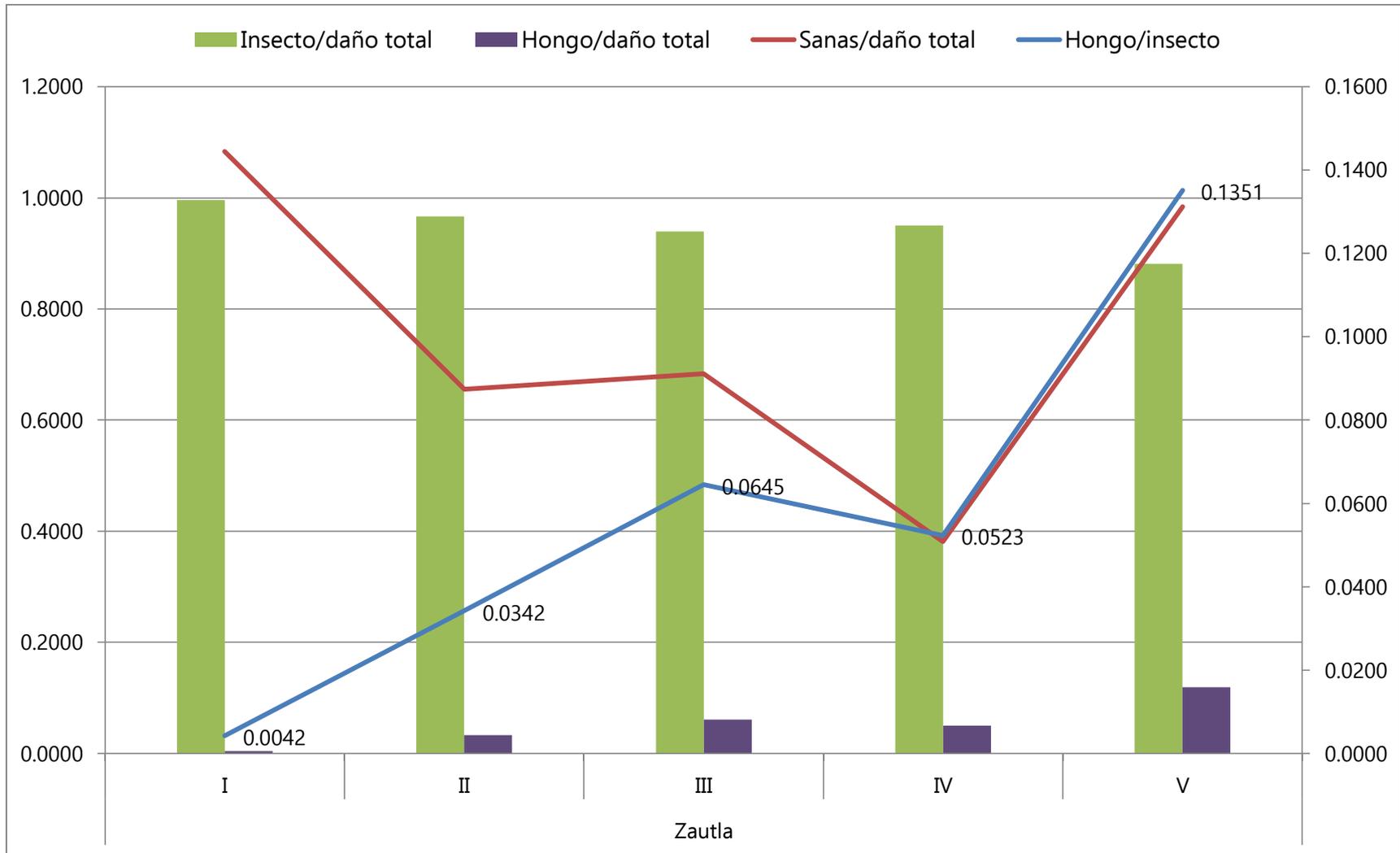


Figura 71. Proporción de acículas sanas, acículas con daño por *Ocoaxo cerca fowleri* + acículas histerotecios de *Lophodermium* y acículas solo con daños por *O. cerca fowleri* en *Pinus pseudostrobus* en el municipio de Zautla.

7. 2. Identificación de hongos del follaje

En el laboratorio de Parasitología Forestal de la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma Chapingo las muestras colectadas en julio, fueron procesadas.

En el laboratorio se seleccionaron acículas con cuerpos fructíferos del hongo para realizar cortes del ascoma del hongo y para su identificación con las claves de Minter (1981). Para el aislamiento del hongo se siguió la siguiente metodología.

Segmentos de acículas de 7 cm de longitud con histerotecios se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial al 5% durante cinco minutos, se lavaron en agua destilada estéril tres veces por 3 min en cada lavado, se secaron. Las muestras fueron colocadas en cámaras con humedad relativa de 90 a 100% durante 20 días (Figura 73a, Figura 75a y Figura 77a). Masas de ascosporas presentes en el interior del histerotecio fueron cuidadosamente colectados con una aguja de disección estéril y transferidas a cajas Petri con medio de cultivo selectivo extracto-malta-agar al 2%.

Las cajas de Petri se incubaron a 25 ± 2 °C por 20 días a 23 ± 2 °C en una incubadora de luz controlada (Prendo, INLC-11, México). Posteriormente, cada aislamiento fue purificado en EMA al 2%. Todos los aislamientos obtenidos para este estudio se conservaron en tubos inclinados con EMA al 2% y se cubrirán con aceite mineral estéril.

7.2.1. Características culturales de hongos aislados

En cámara húmeda los ascomas del hongo presentaron micelio creciendo sobre la superficie a los 11 días (Figura 73b, c y Figura 75b). En general el crecimiento del hongo en medio de cultivo extracto-malta-agar es de color blanco muy similar en Aquixtla y Zacatlán de las Manzanas (Figura 73f y Figura 77e) y solamente cambia un poco en la coloración en el aislamiento de Tetela de Ocampo donde se observa una coloración blanco a café en el centro de la caja de Petri (Figura 75e). En los cortes transversales se observa el cuerpo fructífero embebido en el tejido de la acícula y son de color café oscuro a negro. En la parte media de histerotecio se observa una abertura longitudinal y en el interior hay una masa gelatinosa conteniendo las ascas con ascosporas y parafisos (Figura 73d,e, Figura 75c,d y Figura 77c,d). Las ascas son de forma alargada y sus ascosporas filiformes. (Figura 73e, Figura 75d y Figura 77d).

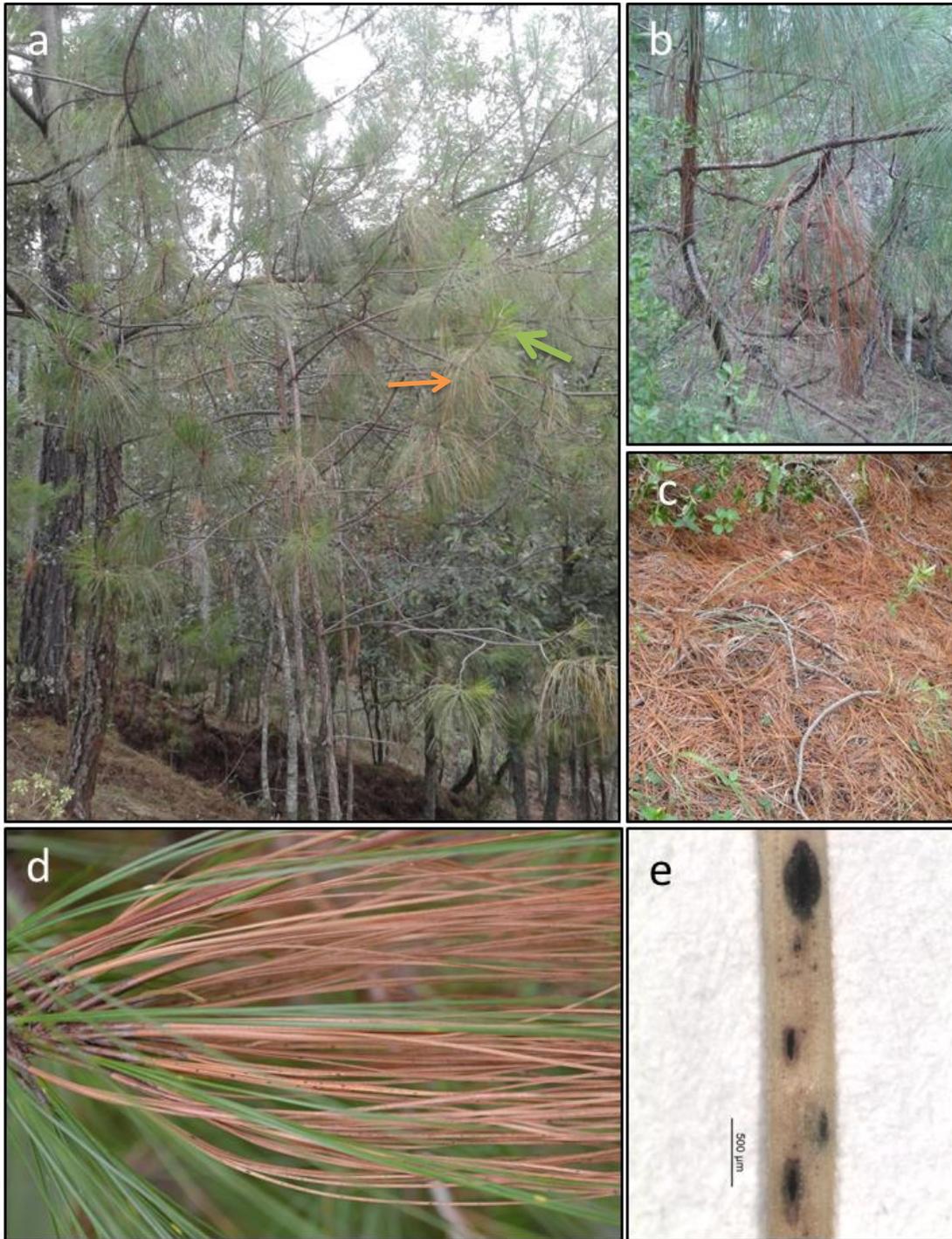


Figura 72. Caída de acícula de pino en *Pinus* en el municipio de Aquixta, Puebla. a) Bosque natural de *P. pseudostrobus*, note que las acículas café (flecha naranja) fueron formadas en 2015; en cambio, las de 2016 (flecha verde) se observan verdes. b) Acículas necrosadas del 2015. c) Acículas en suelo con hysterotecios maduros d) Hysterotecios en acículas de 2015. e) Hysterotecios.

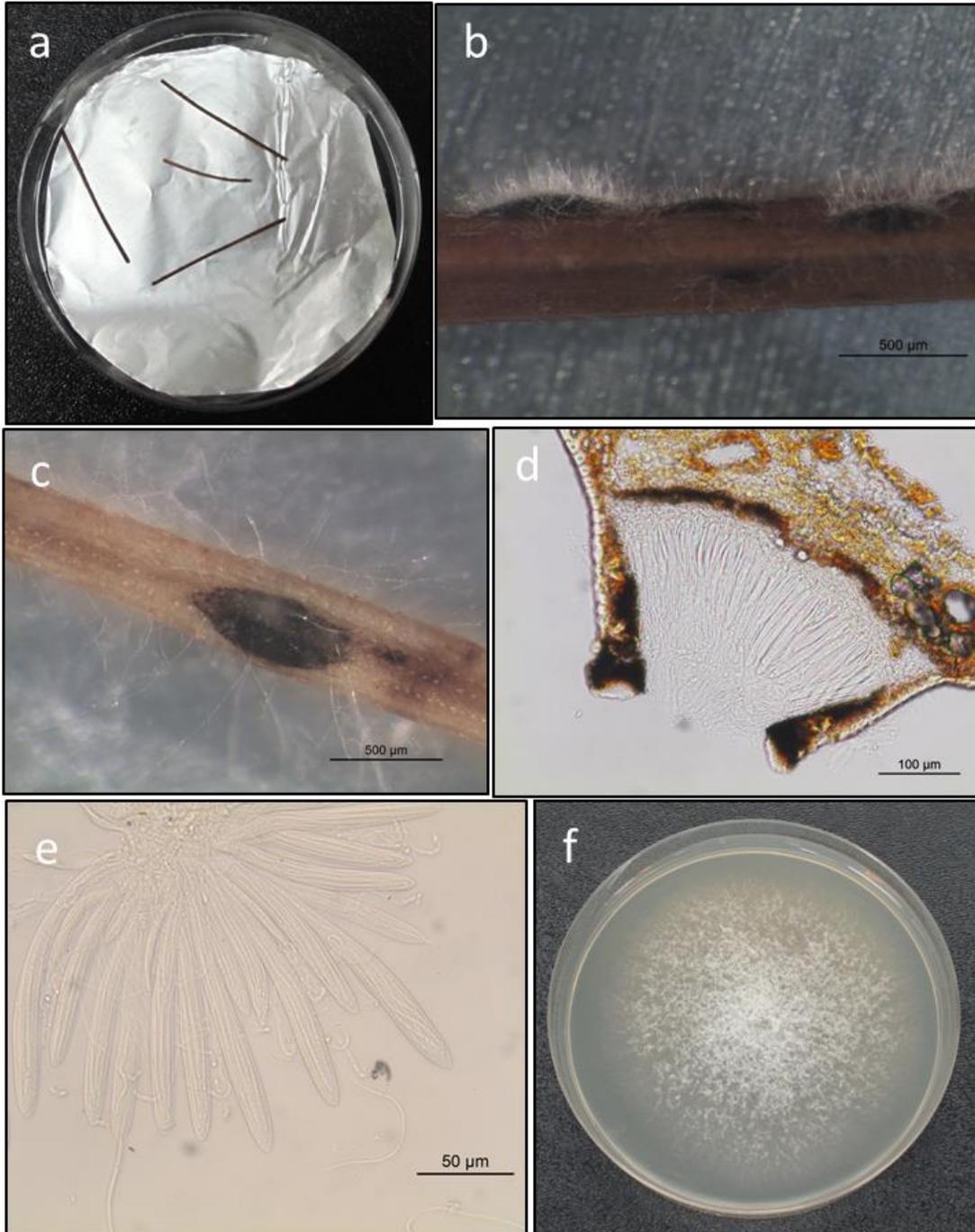


Figura 73. a) Acículas de *Pinus pseudostrobus* en cámara húmeda. b, c) Micelio emergiendo del interior del cuerpo fructífero de hongo. d) Corte transversal del cuerpo fructífero con ascas y parafisos. e) Ascas y ascosporas. f) colonia del hongo creciendo en MEA a.

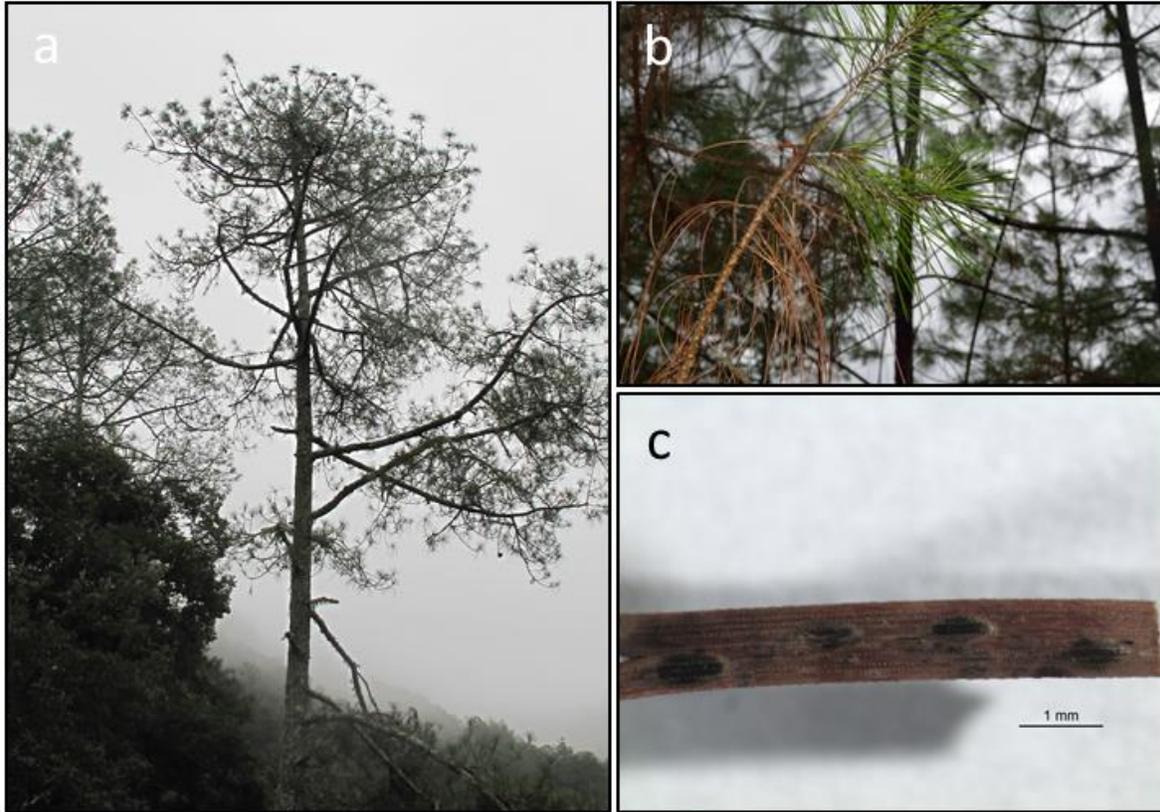


Figura 74. Caída de acícula de pino en *Pinus* en el municipio de Tetela de Ocampo, Puebla. a) Bosque natural de *P. oaxacana*. b) Acículas necrosadas se formaron en 2015. c) Histerotecios maduros.

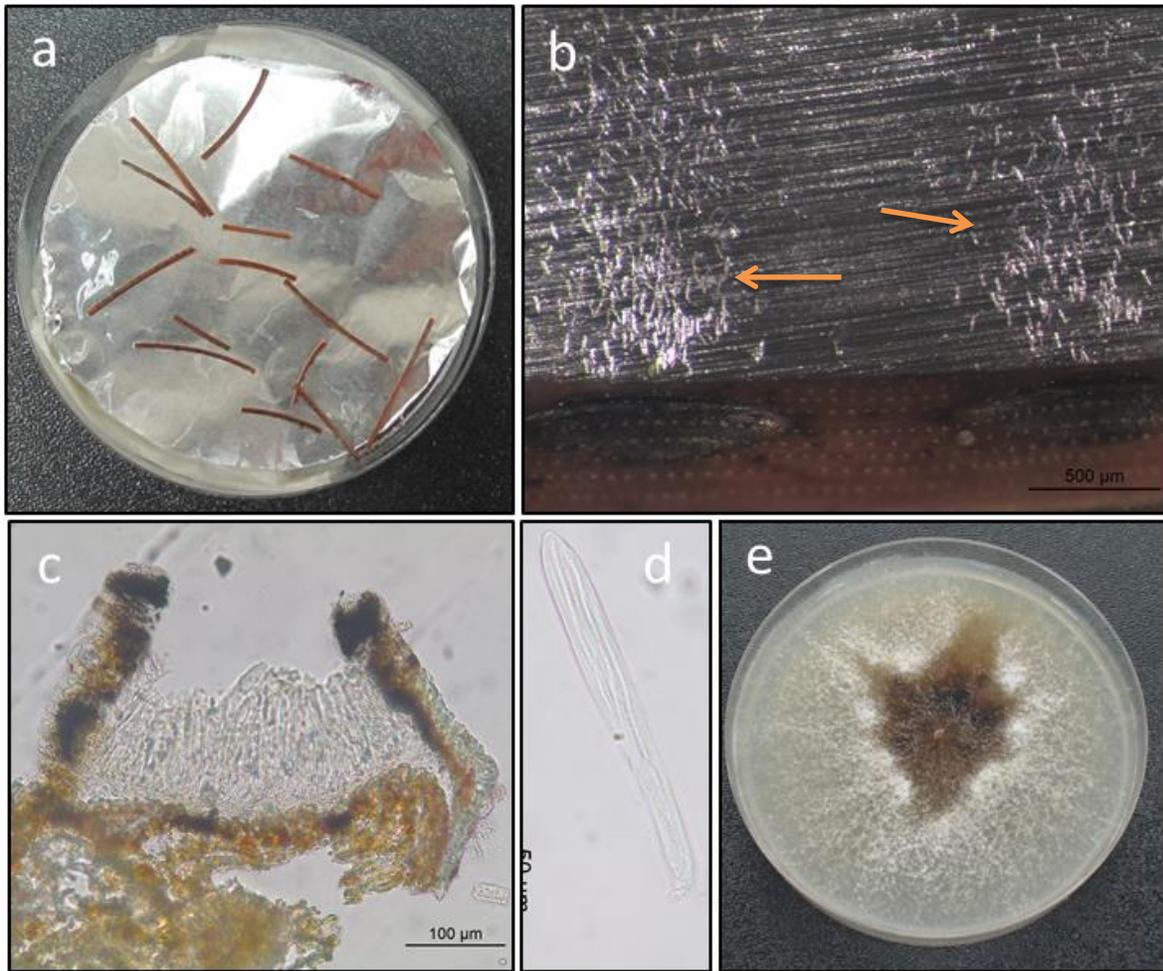


Figura 75. a) Acículas de *Pinus oaxacana* en cámara húmeda. b) Liberación de ascas y ascosporas desde el cuerpo fructífero (flechas). c) Corte transversal del cuerpo fructífero con ascas y parafisos. d) Ascas. e) colonia del hongo creciendo en MEA a los 20 días.



Figura 76. Caída de acícula de pino en *Pinus* en el municipio de Zacatlán de las Manzanas, Puebla. a) Bosque natural de *P. pseudostrobus*. b) Acículas necrosadas del 2015 (flecha), en contraste con las formadas en 2016, que lucen verdes. c) Acículas en suelo con cuerpos fructíferos maduros.

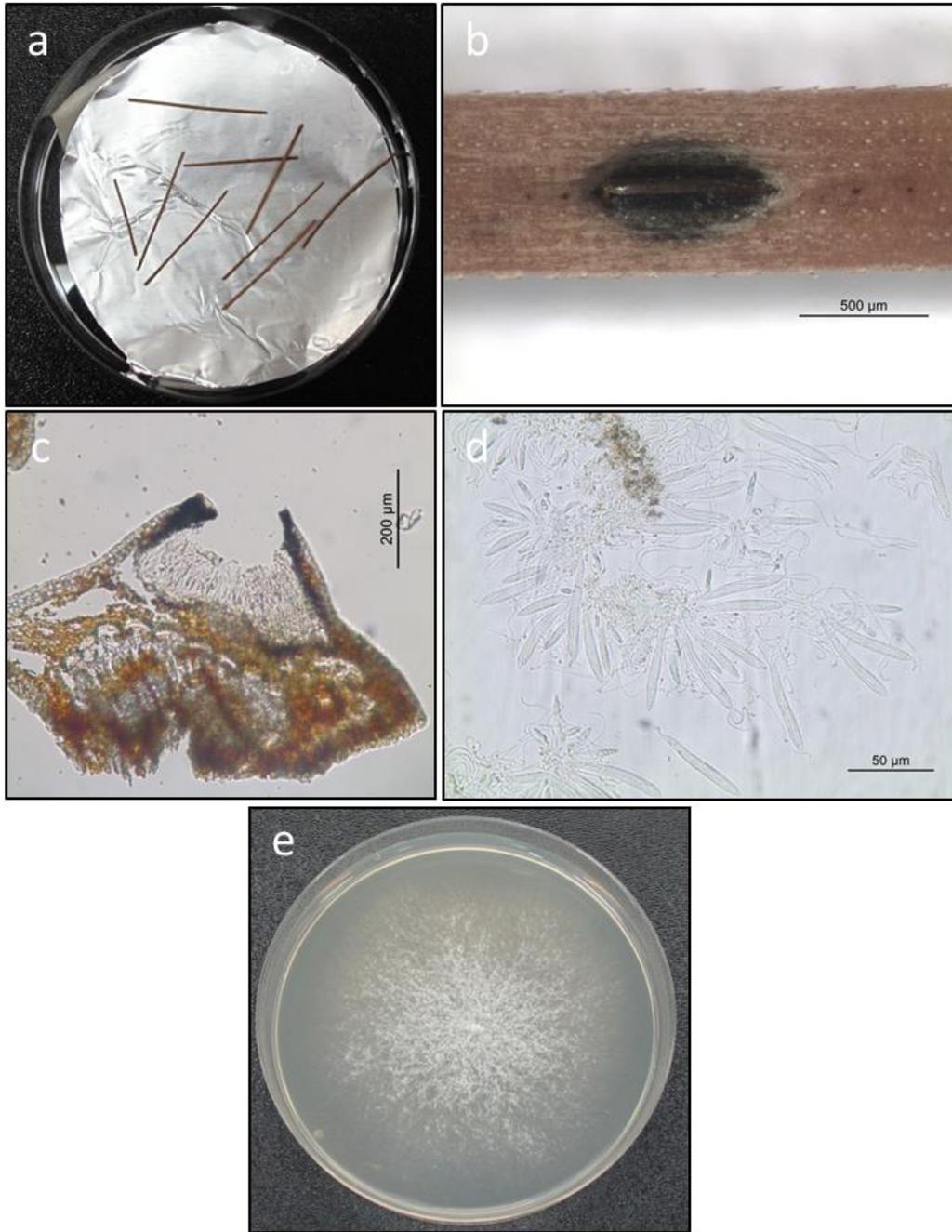


Figura 77. a) Acículas de *Pinus pseudostrobus* en cámara húmeda. b) Cuerpo fructíferos. c) Corte transversal del cuerpo fructífero con ascas y parafisos. d) Ascas y ascosporas. f) colonia del hongo creciendo en MEA a los 20 días.

7.1.4. Caracterización molecular del patógeno: Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

En agosto, se presentó una propuesta de protocolo para la identificación molecular de los distintos *Lophodermium* aislados:

El ADN se extraerá del micelio de los aislamientos (MA, AC, AC1, MT, FM y RA) con el protocolo de Dneasy® Plant Mini kit (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA)(Anexo 1). La amplificación de las regiones ITS1 e ITS2 de los genes ribosomales (RNAr) se efectuara por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando los iniciadores ITS4 (5´-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3´) e ITS5 (5´-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3´) (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990). Se utilizara un termociclador Multigene Gradient (modelo TC9600-9, Nueva Jersey, USA) con el siguiente programa: 1 ciclo 95 °C, 1 min; 35 ciclos a 94 °C, 1 min, 60 °C, 90 s 72 °C, 2 min; 1 ciclo 72 °C, 5 min. El producto amplificado se purificara con el Kit Wizard SV (Promega, USA) (Anexo 2) y se mandara a secuenciar en ambas direcciones en la compañía Macrogen (Seúl, Corea del Sur). Las secuencias se compararan con las reportadas en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov) por medio del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

7.1.4.1. Anexo 1

Protocolo de Dneasy® Plant Mini kit (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA):

- Pesar (≤ 20 mg peso húmedo o ≤ 20 mg de micelio liofilizado) y colocarlo en un mortero de porcelana para macerarlo con un pistilo.
- Una vez macerara la muestra pasarla a un tubo eppendorf de 2 ml.
- Adicionar 400 μ l del buffer AP1 y 4 μ l de RNasa A. Mezclar en un vortex e incubar por 10 minutos a 65 °C. Invertir el tubo 2 a 3 veces durante la incubación.
- Adicionar 130 μ l de Buffer P3. Mezclar e incubar por 5 minutos en hielo. Centrifugar el lisado por 5 minutos a 14 rpm.
- Pipetear el lisado en una columna (QIAAhredder Mini Spin Column) de 2 ml. Centrifugar por 2 minutos a 14 000 rpm.
- Transferir el filtrado a un nuevo tubo de 2 ml sin tocar la pastilla (pellet) si está presente en el fondo el tubo. Adicionar 1.5 volúmenes del Buffer AW1 y mezclar por pipeteo.
- Transferir 650 μ l de la mezcla a una nueva columna (DNeasy Mini Spin Column) de 2 ml. Centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm. Descartar el filtrado. Repetir el mismo paso para el resto de la muestra.
- Colocar la columna (DNeasy Mini Spin Column) dentro de un nuevo tubo colector de microcentrifuga de 2 ml. Adicionar 500 μ l del Buffer AW2 y centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm. Descartar el filtrado.
- Adicionar otros 500 μ l del Buffer AW2. Centrifugar por 2 minutos a 14 000 rpm.

- Transferir la columna (DNeasy Mini Spin Column) a un nuevo tubo de microcentrifuga de 2 ml.
- Adicionar 100 μ l del Buffer AE. Incubar por 5 min a temperatura ambiente (15 -25 $^{\circ}$ C). Centrifugar por 1 minuto a 8 000 rpm.
- Repetir el paso 11 (si considera necesario).
- Almacenar el ADN a 4 $^{\circ}$ C.

7.1.4.2. Anexo 2

Protocolo de purificación de ADN WIZARD[®] SV (Promega, USA):

- Cortar el gel y colocarlo en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL
- Adicionar 10 μ l de la solución Binding por cada 10 mg de gel. Agitar e incubar a 50-65 $^{\circ}$ C hasta que el gel se disuelva.
- Adicionar 700 μ l de solución de lavado. Centrifugar a 16, 000 g por 1 minuto. Descartar el filtrado y reinsertar la columna en un tubo colector. Repetir el paso 3 con 500 μ l de solución de lavado. Centrifugar a 16, 000 g por 5 minutos.
- Vaciar el tubo colector y centrifugar la columna por un minuto, descartar por evaporación todos los residuos de etanol
- Transferir cuidadosamente la mimicolumna a un tubo limpio de microcentrifuga de 1.5 mL.
- Adicionar 50 μ l de agua libre de nucleasas a la columna. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar a 16, 000 g por 1 minuto.
- Descartar la minicolumna y almacenar el DNA a -20 $^{\circ}$ C.

En septiembre, se extrajo ADN de aislamientos de 25 días de crecimiento a partir de micelio crecido en medio líquido de extracto de malta (Figura 78a). El micelio fue lavado con agua destilada estéril tres veces (Figura 78b) y posteriormente fue procesado con la metodología descrita en el anexo 1 con el kit comercial Dneasy[®] Plant Mini kit (Figura 78c y d).

Las muestras de ADN se colocaron en tubos de 1.5 mL (Figura 78e) y almacenados en un rack a -20 $^{\circ}$ C (Figura 78d). Se evaluó la presencia de ADN con un gel de agarosa al 1% que se preparó en un matraz donde se agregaron TBE 1X y agarosa y se agregó 1.2 μ l de gel red. Esta mezcla se vació en un soporte que va dentro de la cámara de electroforesis donde se colocó un peine para ayudar a formar pozos y se dejó enfriar aproximadamente 20 minutos (Figura 79a). El gel solido se colocó en una cámara de electroforesis y se cubrió con el amortiguador de corrida TB IX. En cada pozo se depositaron 5 μ l de ADN más 2 μ l de amortiguador de carga (Figura 79b). Las muestras se corrieron a 20 voltios por 20 minutos. La calidad de ADN se visualizó en un sistema de fotodocumentación (Gel Logic 200, Kodak) y se observó la presencia de ADN (Figura 79c y d). Las muestras de ADN se han almacenado a -20 $^{\circ}$ C para ser usadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

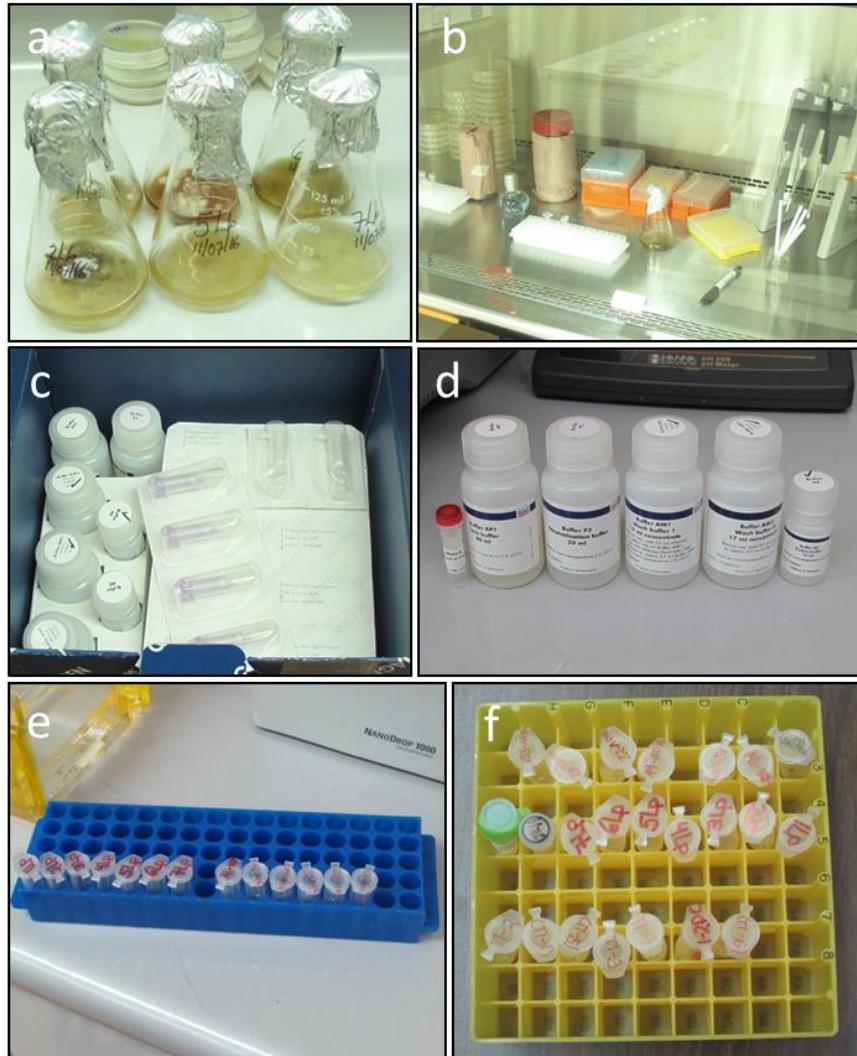


Figura 78. Extracción de ADN del hongo *Lophodermium*. a). medio liquido de extracto de malta de 25 días. b) Lavado de micelio con agua destilada estéril. c y d) kit comercial Dneasy® Plant Mini kit. e y f). Almacenamiento de ADN a -20 °C.

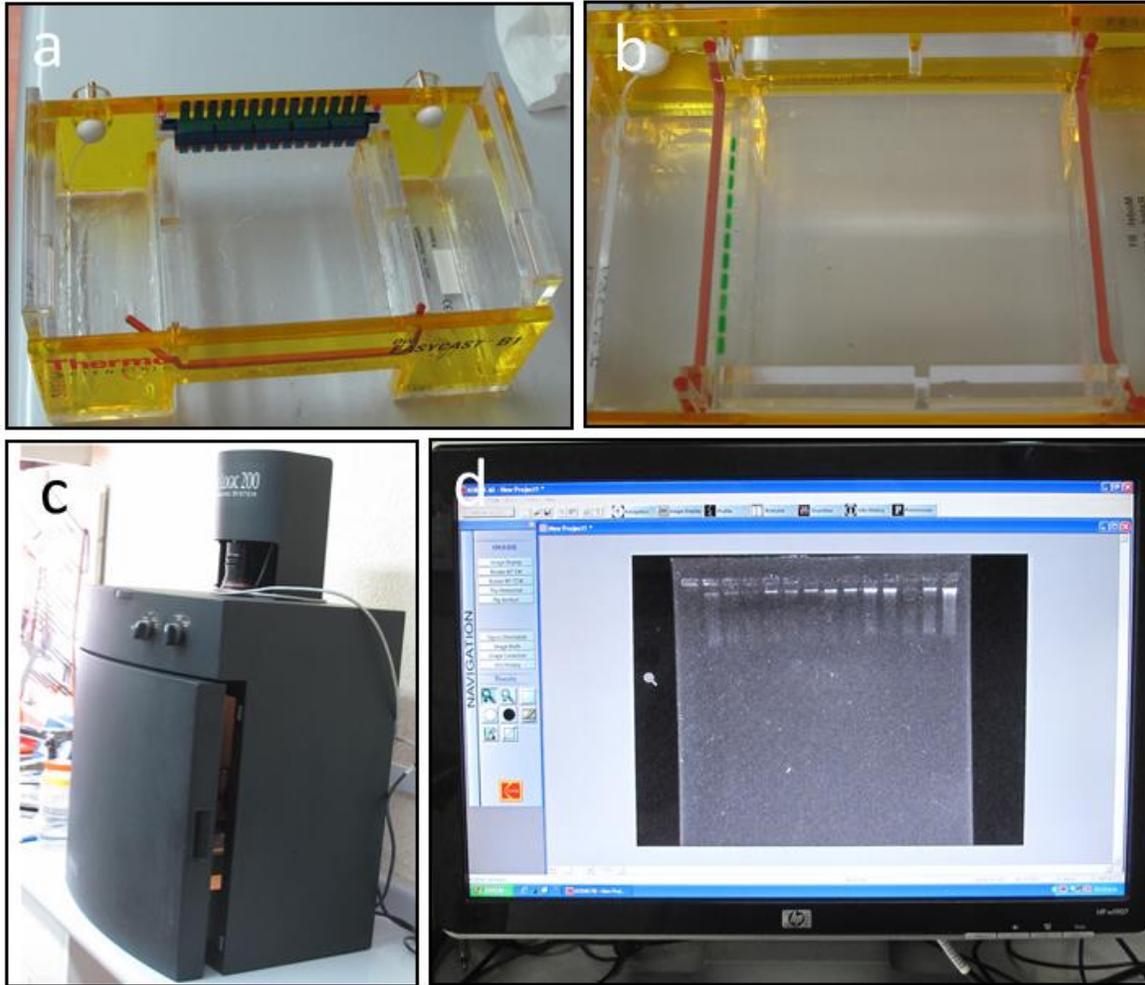


Figura 79. Visualización de ADN del hongo *Lophodermium*. a).Preparación del gel de agarosa. b) Llenado de pozos con producto de ADN. c) Sistema de fotodocumentación (Gel Logic 200, Kodak) para la captura de imágenes. d) Bandas de ADN en gel de agarosa al 1%.

Anexo 1. Protocolo de Dneasy® Plant Mini kit (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA)

1. Pesar (≤ 20 mg peso húmedo o ≤ 20 mg de micelio liofilizado) y colocarlo en un mortero de porcelana para macerarlo con un pistilo.
2. Una vez macerada la muestra pasarla a un tubo eppendorf de 2 ml.
3. Adicionar 400 μ l del buffer AP1 y 4 μ l de RNasa A. Mezclar en un vortex e incubar por 10 minutos a 65 oC. Invertir el tubo 2 a 3 veces durante la incubación.
4. Adicionar 130 μ l de Buffer P3. Mezclar e incubar por 5 minutos en hielo. Centrifugar el lisado por 5 minutos a 14 rpm.

5. Pipetear el lisado en una columna (QIAAhredder Mini Spin Column) de 2 ml. Centrifugar por 2 minutos a 14 000 rpm.
6. Transferir el filtrado a un nuevo tubo de 2 ml sin tocar la pastilla (pellet) si está presente en el fondo el tubo. Adicionar 1.5 volúmenes del Buffer AW1 y mezclar por pipeteo.
7. Transferir 650 µl de la mezcla a una nueva columna (DNeasy Mini Spin Column) de 2 ml. Centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm. Descartar el filtrado. Repetir el mismo paso para el resto de la muestra.
8. Colocar la columna (DNeasy Mini Spin Column) dentro de un nuevo tubo colector de microcentrifuga de 2 ml. Adicionar 500 µl del Buffer AW2 y centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm. Descartar el filtrado.
9. Adicionar otros 500 µl del Buffer AW2. Centrifugar por 2 minutos a 14 000 rpm.
10. Transferir la columna (DNeasy Mini Spin Column) a un nuevo tubo de microcentrifuga de 2 ml.
11. Adicionar 100 µl del Buffer AE. Incubar por 5 min a temperatura ambiente (15 -25 °C). Centrifugar por 1 minuto a 8 000 rpm.
12. Repetir el paso 11 (si considera necesario).
13. Almacenar el ADN a 4 °C.

Aún no se ha identificado la(s) especie(s) de *Lophodermium* obtenidas a partir de las acículas colectadas en Zacatlán, Tetela de Ocampo, Aquixtla y Xochiapulco.

Las especies del género *Lophodermium* viven dentro del hospedante esperando condiciones ambientales o fisiológicas del hospedante adecuadas para desarrollarse sobre la superficie de las acículas necrosadas o en acículas que están en el proceso de abscisión; y pueden llevar acabo su ciclo de vida en acículas adheridas en el hospedante o en acículas en suelo.

La mayoría de las especies de *Lophodermium* son endófitos-saprofitos, es decir, si éste es el caso, aunque el hongo esté presente en el follaje del 2015 no tienen gran impacto a la salud del arbolado, al menos en estas dos especies de pino (*P. pseudostrobus* y *P. patula*).

Sin embargo, existen reportes de especies de *Lophodermium* que tienen una importancia económica en bosque, viveros y plantaciones comerciales del mundo.

En Europa, *Lophodermium seditiosum* es considerado como el patógeno más importante de *Pinus sylvestris* en vivero (Bednarova, Dvorak, Janousek, & Jankovsky, 2013) y el único que ha causado problemas serios en viveros y plantaciones jóvenes en *P. sylvestris* en Suecia.

En África, *Lophodermium*, *Cyclaneusma* y *Dothistroma* son géneros reportados en muchos de los países con plantaciones de pino (Bednarova, et al., 2013).

En el hemisferio Norte de América, los tizones que generan un impacto económico en viveros forestales, plantaciones de árboles de navidad y en bosques son predominantemente *Lophodermium spp.*, *Mycosphaerella dearnessii* y *Mycosphaerella Pini* (Bednarova, et al., 2013).

L. seditiosum es agresivo en pinos de dos y tres acículas y algunas de cinco acículas, mientras que otras especies de *Lophodermium* son mayormente endófitos de hospedantes específicos de coníferas (Lilja & Poteri, 2013; Müller & Hallaksela, 1998; Sieber, 1988).

Otras especies de menor importancia son *Lophodermium conigenum*, *Lophodermium pinastri* en *P. sylvestris* (Bednarova, et al., 2013; Minter, 1981).

En México se han reportado a *Lophodermium australe* en *P. pseudostrobus* y *P. caribaea*, *Lophodermium baculiferum* en *Pinus montezumae*, *Lophodermium indianum* en *Pinus hartwegii*, *Lophodermium nitens* en *Pinus ayacahuite* y *Lophodermium sp.* en *Pinus ayacahuite*, *Pinus douglasiana*, *Pinus chiapensis* y *P. montezumae*, estos hongos son considerados endófitos-saprofitos y comunes en acículas muertas de pino (Minter, 1981; Mohali, 1998; Ortiz-García, et al., 2003).

7.1.4.3. Resultados

Por el momento se han obtenido parcialmente cinco secuencias de los productos de la PCR del hongo de las acículas en *P. pseudostrobus*, tres en Tetela de Ocampo y dos en el municipio de Zacatlán de las Manzanas (ver Cuadro 15).

Los resultados del alineamiento y comparación de las cuatro secuencias obtenidas de cultivos puros, con las disponibles en el GenBank mostraron una identidad con *Lophodermium australe*. Se continuará trabajando para corroborar la identidad de los hongos aislados por medio de características morfológicas y moleculares.

Cuadro 15. Secuencias de los ADNs amplificados con ITS.

<p>>Tetela de Ocampo 1 199 pb</p> <p>TCGCTGGAGATGATGCTCCCAGAGCTGTTTTCCGTAAGTTTCACCTACACCTTCCTTCACCCAA GATAAGCATTTTTGCTGCGTTCTACACA ACTATTTTGATCGGAATAGAACTAACTAGTATGCAG CTTCCATCGTCGGTCGTCCTCGTCACCATGGGTACGTATAGCACTGAATTCACATTTCCCCACT TTCTCCT</p>
<p>>Tetela de Ocampo2</p> <p>GAATAGAACTAACTAGTATGCAGCTTCCATCGTCGGTCGTCCTCGTCACCATGGGTACGTATA GCACTGAATTCACATTTCCCCACTTTCTCCTTGCAAGTTGGATTACAAGGCTGACAAAAATGT</p>

AGTATCATGATTG

>T1_ACT-783R 179 pb

AGCCCGGTTTCGCTGGTGACGATGCCCAAGAGCTGTTTTCCGTAAGTTCCCAATATCTCAT
TCCAGCCCAGATAAGCATCAATACGGCTGTTGACAGCCTCATATCAACATCAAAGTACAAG
AATTCTAGCTTCTATTGTCGGTCGTCCTCGCCATCATGGGTACGTTTATTACAA

>Zacatlan de las manzanas2 149 pb

GCATTTTTGCTGCGTTCTACATAACTATTTTTGATCGGAATAGAACTAACTGGTATGCAGCTTCC
ATCGTCGGTCGTCCTCCTCACCATGGGTACGTATAGCACTGAATTCACATTTCCCACTTTCTC
CTTGCAAGTTGGATTACAAGG

>Zacatlan de las manzanas2 169 pb

ATGTTGATTCCGTGCTATACGTACCCATGGTTGACGAGGACAACCGACGATGGAAGCTGCAT
GCTAGTTAGTTCTATTCCCATCAAATAGTTGTGTAGAACGCAGCAAAAATGCTTATCTATGG
GTGAAGGAAGGTGTAGGTGAACTTACGGAAAACAGCTCTGGGA

ACGT = Adenina, Citosina, Guanina y Timina.

7.3. Ensayo *in vitro* de *Lophodermium* con fungicidas

Los fungicidas Oxicloruro de cobre, Propiconazol y Clorotalonil (ver Figura 80) se evaluaron *in vitro* a las concentraciones recomendadas por el fabricante.

Los fungicidas se añadieron al medio de cultivo extracto de malta-agar (ver Cuadro 16) y posteriormente, el medio de cultivo se vacio en cajas de Petri de 8 cm de diámetro para su solidificación y uso.



Figura 80. a) fungicidas: Propiconazol, Clorotalonil y Oxidicloruro de cobre, b) medio de cultivo extracto-malta-agar (EMA) con fungicidas.

Se extrajeron discos de micelio de 8 mm de diámetro de colonias de 15 días de crecimiento y se colocaron en el centro de la caja Petri con medio de cultivo y fungicida (ocho repeticiones por tratamiento)

Se incubaron en condiciones de laboratorio (25 ± 2 °C) durante 20 días junto con un control positivo que consistió en un disco de micelio de *Lophodermium* sembrado en medio PDA con ausencia del ingrediente activo.

Las mediciones de radio del crecimiento micelial se realizaron durante 20 días y se reportan en milímetros.

Para evaluar el efecto que tiene los ingredientes activos en la inhibición del crecimiento de *Lophodermium*, se realizó el presente estudio mediante un diseño completamente al azar y se analizaron los datos del experimento.

Cuadro 16. Fungicidas comerciales utilizados en la prueba in-vitro para el control de *Lophodermium*.

Producto	Indrediente activo	Presentacion	Dosis	
			Comercial [†]	In vitro ^β
Tilt® 250CE	Propiconzol: 1-[2-(2,4-Diclorofenil-4-propil-1,3-dioxolan-2-metil] -1H-1,2,4-triazole (250 g i.a./L)	Concentrado emulsionable	0.4-0.75 L	2 -3.75 MI
Cupravit	Oxicloruro de cobre (500 g i.a./Kg)	Polvo humectable	300-400 g	1.5 2 g
Daconil	Clorotalonil: Tetracloroisofalonnitrilo (750 g i.a./Kg)	Polvo humectable	200-300 g	1-1.5 g

[†] Dosis comercial en 100 litros de agua.

^β Dosis en 500 Mililitros de medio de cultivo (extracto-malta agar).

7.3.1. Resultados y discusión

Los resultados de la variable respuesta "radio del crecimiento micelial" indican que hubo un efecto del propiconazol (sistémico), oxiclóruo de cobre (no sistémico) y clorotalonil (no sistémico) en la inhibición del crecimiento micelial del aislamiento de *Lophodermium* proveniente de Zacatlán, en comparación al testigo, que tuvo un crecimiento total de 5 cm de diámetro. Todas las dosis probadas de los fungicidas inhibieron el crecimiento del hongo en medio de cultivo durante todo el periodo de la evaluación (ver Figura 81, Figura 82 y Figura 83).

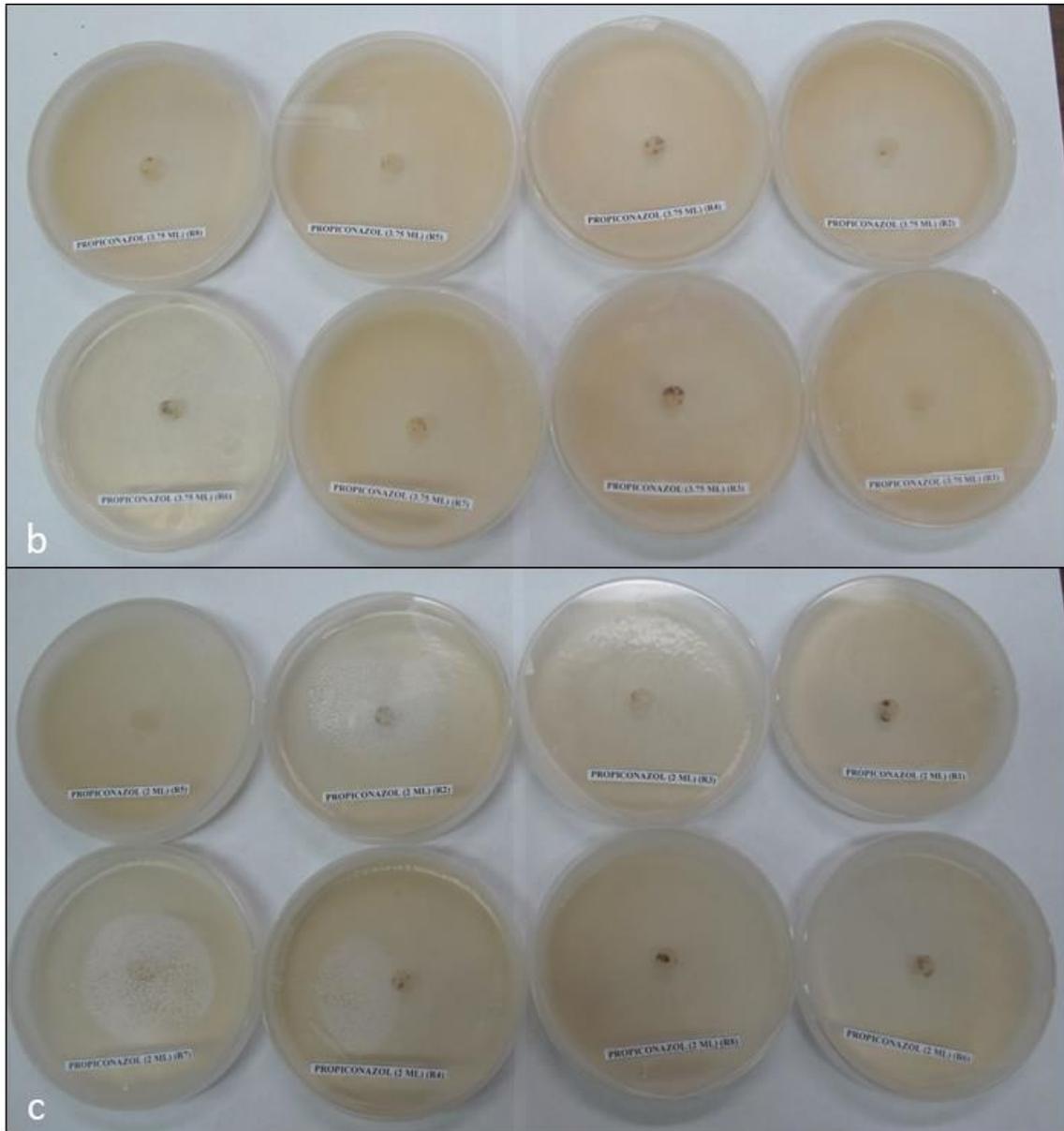


Figura 81. Efecto de dos dosis de propiconazol en el crecimiento micelial de *Lophodermium sp*; b) 3.5 ml, c) 2ml.

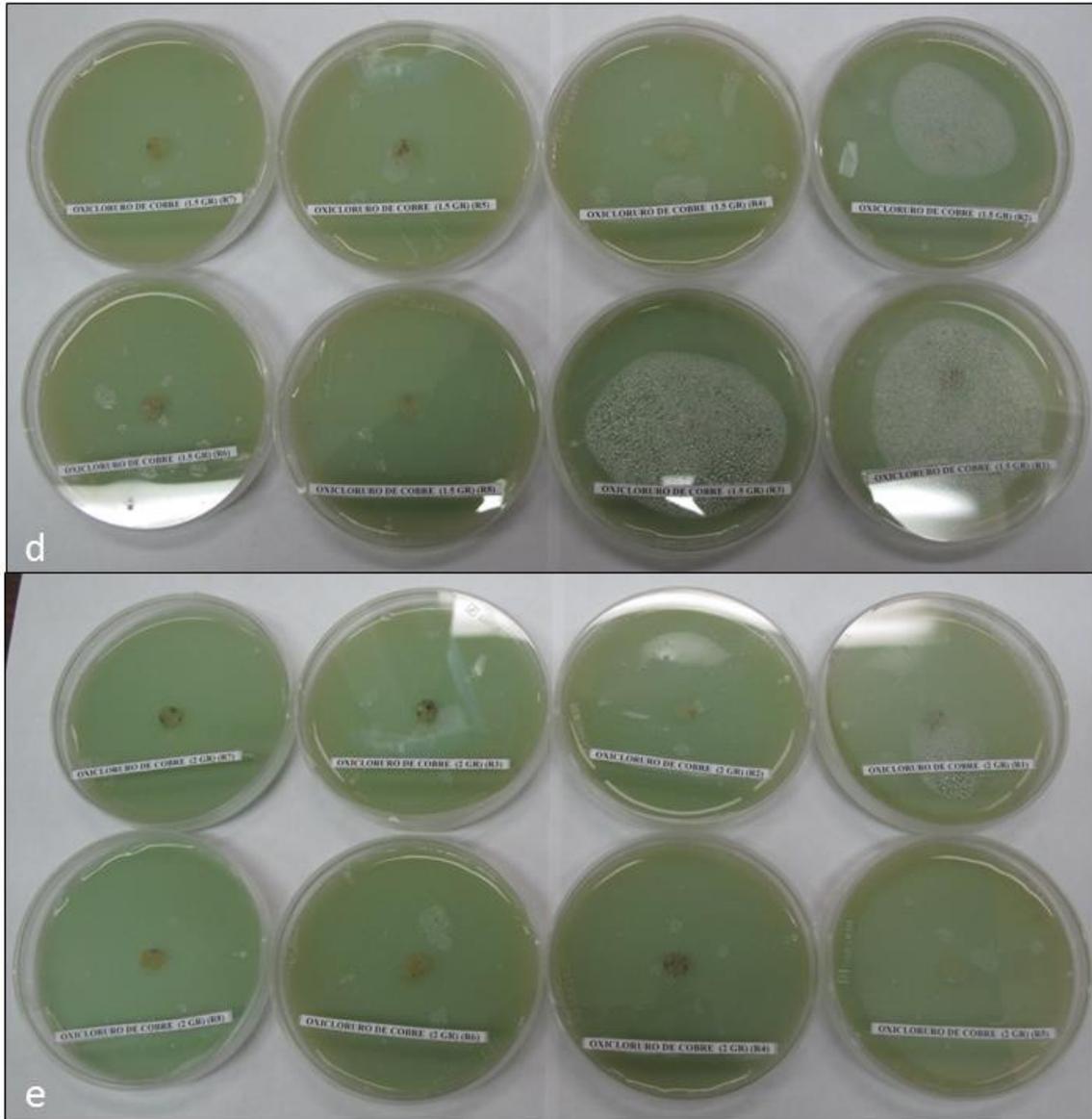


Figura 82. Efecto de dos dosis de oxiclورو de cobre en el crecimiento micelial de *Lophodermium sp.*; d) 1.5 gr, e) 2 gr.

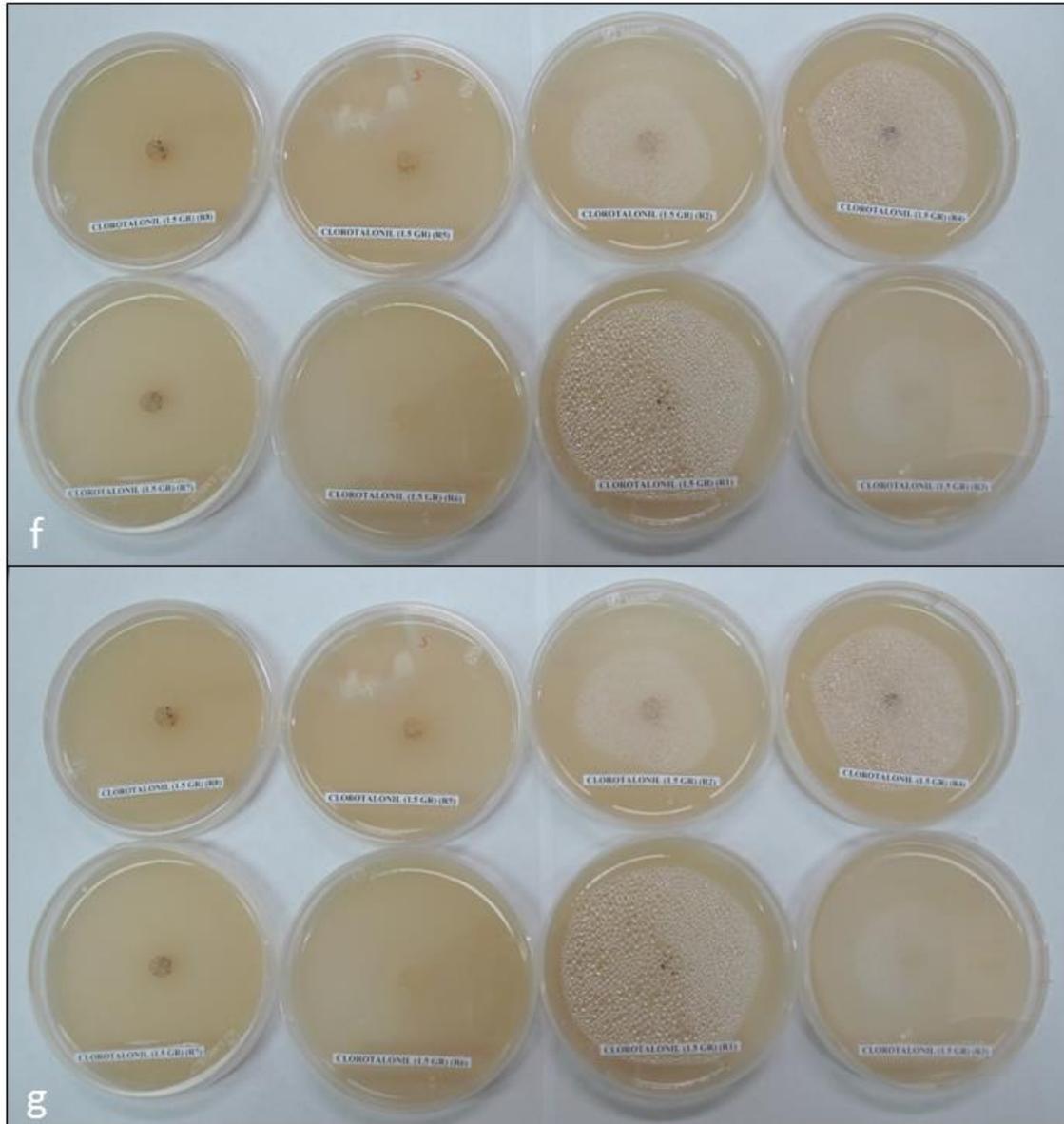


Figura 83. Efecto de dos dosis de clorotalonil en el crecimiento micelial de *Lophodermium* sp.; f) 1 gr, g) 1.5 gr.

La incidencia y severidad de *L. pinastri* se redujo con la aplicación de hexaconazole y carbendazim en comparación a clorotalonil y mancozeb que reducen menos la incidencia y severidad en una plantación de *Pinus wallichiana* en la India (Ahanger, Dar, Beig, & Sofi, 2015).

Algunos autores (Nicholls & Skilling, 1974) recomiendan tres aplicaciones de fungicidas para el control de *L. seditiosum*, la primera aplicación en julio cuando el histerotecio comienza a madurar, la segunda a mediados de agosto y la tercera aplicación en el septiembre.

Otros productos recomendados para el control de *L. seditiosum* son Azoxystrobin, mancozeb y triadimefon (Fulbright, O'Donnell, & Lizotte, 2015).

La aplicación de medidas de control contra *Lophodermium* depende de los resultados de las pruebas de patogenicidad, ya que solo se justificaría el uso de fungicidas si la especie de *Lophodermium* es patogénica, en cuyo caso se sugeriría iniciar la aplicación de productos fungicidas cuando los cuerpos fructíferos comienzan a madurar, por lo que se recomienda monitoriar continuamente donde se detecte la presencia del hongo; ambas actividades deben formar parte de una estrategia de manejo integral que busque evitar la dispersión del hongo a sitios no afectados.

La pendiente pronunciada en la mayoría de las zonas bosquesas de los municipios de Zacatlán, Tetela, Aquixtla, Xochiapulco y Zautla, donde se ha observado la presencia del hongo *Lophodermium*, dificultaría la aplicación manual de los fungicidas evaluados, por lo que se tendría que evaluar la aplicación de los fungicidas por otros medios.

7.4. Pruebas de patogenicidad

El día 01 de noviembre de 2016, fueron inoculados acículas de árboles de *Pinus oaxacana* con una suspensión de micelio de un aislamiento de *Lophodermium* proveniente de Zacatlán con 20 días de crecido en medio líquido de extracto de malta (EM) en condiciones de laboratorio. (Ver Figura 84)

Para obtener síntomas y signos del hongo y corroborar si este aislamiento de *Lophodermium* es patogénico, se tendrá que esperar 12 meses.

Con lo anterior se cubriría una de las primeras etapas del ciclo biológico del hongo *in vivo* en el laboratorio y faltaría determinar los aspectos biológicos en campo.



Figura 84. Pruebas de patogenicidad en *Pinus oaxacana*. a) Cepa de *Lophodermium* en medio de cultivo MEA. b) *P. oaxana* inoculado con suspensión de micelio micelio. c) árboles de pino con 15 días de inoculación.



8. Actividades de difusión



8.1. Mención del proyecto de investigación en la Comisión Forestal de América del Norte

Los días 26 y 27 de octubre, el Dr. David Cibrián Tovar expuso los avances del presente proyecto de investigación hasta ese momento en la reunión anual del Grupo de trabajo de insectos, enfermedades y plantas invasoras, de la Comisión Forestal de América del Norte, del que es miembro; dicha reunión se realizó del 25 al 27 de octubre en Puebla.

El día 26 de octubre se realizó un recorrido por algunos sitios boscosos de la comunidad de San Nicolás Calapa, municipio de Tetela de Ocampo, en los que se observa el daño causado por la alimentación de los adultos de *O. cerca fowleri* y se hicieron notar la sintomatología del daño y la superficie afectada. (Ver Figura 85)

El grupo de trabajo de insectos, enfermedades y plantas invasoras estuvo integrado por 16 personas, de las cuales, una estaba en representación de Canadá, dos en representación de Estados Unidos, y el resto en representación de México; de estos últimos, algunos eran miembros de instituciones del gobierno federal y otros de instituciones educativas. (Ver Figura 86)



Figura 85. Recorrido en campo de grupo de trabajo de insectos, enfermedades y plantas invasoras, de la Comisión Forestal de América del Norte; fotografías tomadas el 26 de octubre del 2016.



Figura 86. Reunión de grupo de trabajo de insectos, enfermedades y plantas invasoras, de la Comisión Forestal de América del Norte en Puebla, Puebla; fotografías tomadas el 27 de octubre del 2016.

8.2. Reuniones en municipios considerados en la contingencia y en Zacatlán de las Manzanas

Durante el mes de diciembre se realizaron reuniones de difusión de las actividades de saneamiento y de los resultados del proyectos de investigación, en los municipios de Tetela de Ocampo el 02 de diciembre (ver Figura 87), Nicolas Bravo el 05 de diciembre (ver Figura 89), Zautla (ver Figura 90) y Xoxhiapulco (ver Figura 91) el 06 de diciembre, Aquixtla el 08 de diciembre (ver Figura 92) y Zacatlán el 09 de diciembre (ver Figura 93).

También se realizó una reunión especial en la que estuvieron integrantes de CONAFOR, de la Unión, del Colegio de Postgraduados, de la Universidad Autónoma Chapingo y de medios de comunicación, con la finalidad de esta reunión fue exponer la información que se ha generado y los avances en las actividades de combate de las dos especies de Ocoaxo. (Ver Figura 88)

La organización de dichas reuniones de difusión estuvo a cargo de personal de la Unión Agroforestal de Puebla y de los técnicos en cada municipio.

La presentación de la información referente a las actividades de saneamiento estuvo a cargo de los técnicos responsables en cada municipio y de personal de la Unión Agroforestal de Puebla, sobre las acciones relacionadas con la organización y seguimiento estuvo a cargo de personal de la CONAFOR y sobre los resultados del proyecto de investigación estuvo a cargo de miembros del equipo de trabajo de dicho proyecto. (Ver Cuadro 17)

Cuadro 17. Participantes en las reuniones de difusión de resultados de campaña de contingencia fitosanitaria.

Dependencia	Nombre	Puesto
Comisión Nacional Forestal de Puebla	Lic. Humberto Aguilar Viveros	Gerente
	Ing. Misael García Hernández	Jefe de Protección Forestal
	Ing. Juan Carlos Carrillo Fonseca	Enlace de Sanidad Forestal
Unión Agroforestal de Puebla	C. Felipa Alicia Cid Tepole	Presidenta
	Ing. Francisco Javier Rivera Rico	Técnico de Nicolás Bravo
	Ing. Ana Laura Luna Pozos	Técnico de Zautla
	Ing. Manuel Cortina Martínez	Técnico de Xochiapulco
	Ing. Juan Luis García Lobato	Técnicos de Tetela de Ocampo
Universidad Autónoma de Chapingo	Biol. Moises Oronzor García	Técnico de Aquixtla
	M.C. Uriel M. Barrera Ruiz	Encargado de estudio de <i>Ocoaxo cerca fowleri</i>
	Dr. Omar Alejandro Pérez Vera	Encargado de estudio de <i>Lophodermium</i>
Colegio de Postgraduados	Dr. Francisco Hernández Rosas	Encargado de estudio de <i>Ocoaxo assimilis</i>



Figura 87. Reunión de difusión en Tetela de Ocampo; fotografías tomadas el 02 de diciembre del 2016.



Figura 88. Reunión entre medios de comunicación, autoridades de CONAFOR y miembros de la Unión Agroforestal de Puebla, Colegio de Postgraduados y la Universidad Autónoma Chapingo, en Tehuacán, Puebla; fotografías tomadas el 05 de diciembre del 2016.



Figura 89. Reunión de difusión en Nicolás Bravo; fotografías tomadas el 05 de diciembre del 2016.



Figura 90. Reunión de difusión en Zautla; fotografías tomadas el 06 de diciembre del 2016.



Figura 91. Reunión de difusión en Xochiapulco; fotografías tomadas el 06 de diciembre del 2016.



Figura 92. Reunión de difusión en Aquixtla; fotografías tomadas el 08 de diciembre del 2016



Figura 93. Reunión de difusión en Zacatlán; fotografías tomadas el 09 de diciembre del 2016.

CONCLUSIONES GENERALES

En la evaluación de la efectividad de los tratamientos contra *Lophodermium* realizados durante la primera mitad del 2016 en el municipio de Zacatlán de las Manzanas, se encontró que:

- Los tratamientos no tuvieron efecto en la reducción de la incidencia de *Lophodermium* en las acículas que comenzaron su desarrollo en 2015.
- Hubo diferencias en el número de ninfas de *O. cerca fowleri* entre los tratamientos; la reducción en el número de ninfas fue mayor en el tratamiento "Barrido, fumigación y quema" y menor en el de "Fumigación", por lo que se puede concluir que entre mayor fue la modificación de la capa de hojarasca del suelo, mayor fue la reducción del número de ninfas.

La modificación de la cubierta de hojarasca del suelo, ya sea por barrido o quemas controladas, se debe considerar como una alternativa limitada de control de ninfas, y que primero se deben explorar y considerar otras alternativas de combate, como es el uso del control biológico.

En el ensayo en campo de control de ninfas y adultos de *O. cerca fowleri*, se obtuvo un control deficiente en los tratamientos *M. anisopliae* comercial en dosis baja y alta, con y sin barrido, acefato con barrido y *M. anisopliae* del CP con barrido, mientras que en el resto de tratamientos el control fue nulo. Con el acefato y la dosis alta del *M. anisopliae* comercial se tuvo la mayor mortalidad.

Además, en el 52.42% de la superficie total evaluada no había presencia de ninfas y en el 47.58 % de la superficie total evaluada, las ninfas se encontraban solas o en grupos de 2-9 individuos, principalmente, es decir, la distribución de las ninfas se ajusta a un patrón de contagio.

El diseño de una metodología de muestreo, aún pendiente, debe tomar en cuenta esta característica de la población de ninfas. Se debe estudiar la distribución de las ninfas de *O. assimilis* para corroborar si una metodología de muestreo aplicable a *O. cerca fowleri* es aplicable a *O. assimilis*.

En el primer ensayo *in vitro* de adultos, solo se observó una mortalidad significativa con el acefato y con el *M. anisopliae* comercial en dosis alta y baja, y que la formulación de *M. anisopliae* del CP tiene un efecto mínimo de mortalidad de adultos de *O. cerca fowleri*. Estos resultados llevaron a modificar el planteamiento de control de adultos, el cual se evaluó en el ensayo *in vitro* de adultos realizado en septiembre.

También se observó la oviposición de las hembras, que éstas insertan los huevos en papel filtro humedecido cuando se confinaron en frascos y que éstos son el estadio hibernante.

En el ensayo de control de adultos de *O. cerca fowleri* realizado en septiembre, los tratamientos que incluían acefato tuvieron el mejor control de adultos.

De los tratamientos en los que se incluyó algún insecticida biológico, el tratamiento con la mayor mortalidad y desarrollo de micelio en los adultos, fue el acefato + *M. anisopliae* comercial, seguido del acefato + (*M. anisopliae* + *Beauveria bassiana* + *Paecilomyces fumosoroseus* comercial), del *M. anisopliae* comercial y del *M. anisopliae* + *Beauveria bassiana* + *Paecilomyces fumosoroseus* comercial.

En los árboles de *P. oaxacana* en las cajas de emergencia en la División de Ciencias Forestales, se observó un desarrollo similar de síntomas de daño por alimentación de adultos de *O. cerca fowleri* y *Ocoaxo assimilis*, al observado en *Pinus patula* y *Pinus pseudostrobus*, es decir, áreas necróticas adyacentes al sitio de alimentación; desde pequeñas franjas necrosadas que forman un patrón de bandeo, en el que se alternan franjas verdes con franjas necrosadas que cubren una parte o la totalidad de la longitud de la acícula, hasta la necrosis completa de la acícula.

En los recorridos de campo se encontró que los adultos no se alimentan exclusivamente de pinos, sino que su rango de hospedantes es más amplio de lo que se pensaba en un principio.

Los pinos son los hospedantes primarios de *O. cerca fowleri* y las otras plantas son sus hospedantes secundarios. Lo anterior implica que para plantear un programa de manejo también se deben considerar a los hospedantes secundarios de los adultos.

Se encontró que en Zautla, Aquixtla, Tetela y Zacatlán, había extensas franjas boscosas con pinos de follaje verde-alimonado hasta café, siendo el más común este último. Estas observaciones complementan a lo que se encontró en la evaluación de incidencia de *Lophodermium* realizada en noviembre, en donde más del 50% del follaje de los pinos de estos municipios tienen síntomas de daño por la alimentación de *O. cerca fowleri*.

La mayor presencia de daño por alimentación de los adultos de *O. cerca fowleri* se presentó en Aquixtla, Tetela, Zacatlán y Zautla, y en menor cantidad en Xochiapulco.

En cuanto a las trampas de luz, hasta el momento se cuenta con 167 colectas obtenidas con las trampas de luz instaladas en los municipios de Zacatlán de las Manzanas, Aquixtla, Tetela de Ocampo, Xochiapulco y Zautla, de las cuales, 14 son de julio, 43 son de agosto, 48 de septiembre, 40 de octubre y 22 de noviembre.

Se han colectado 157 adultos en la trampa de Tetela, 138 en la de Zacatlán, 63 en la de Zautla, 31 en la de Aquixtla y 26 en la de Xochiapulco. Los resultados indican que quizá Tetela sea el municipio con la mayor población de *O. cerca fowleri* y la mayor afectación, seguido de Zacatlán.

La trampa que más tiempo estuvieron en campo fue la de Zacatlán, seguida de las de Aquixtla y Tetela, Xochiapulco y Zautla.

De acuerdo con la información de la trampa de luz de Zacatlán, la lluvia es un factor importante que afecta la movilidad de los adultos, y de acuerdo con las observaciones

realizadas en campo, tanto por el equipo que realizó el presente proyecto de investigación como por los integrantes de las brigadas y personal de CONAFOR, el viento y la temperatura son otros factores que influyen en la movilidad de los adultos durante el día.

Es necesario estudiar el efecto de la temperatura, la humedad relativa, la lluvia, la hora del día, entre otros, en los patrones de vuelo de los adultos, ya que esta información es importante al momento de diseñar una metodología de muestreo de adultos.

Debido a las diferencias que se encontraron en la etapa de ciclo biológico en la que se encontró a *O. cerca fowleri* en los cinco municipios, en la captura de adultos en las trampas de luz y de la aparición de daños por alimentación de los adultos en el follaje de los pinos hospedantes, Zacatlán es el municipio en el que se cree que este cercópido inicia su desarrollo como ninfa más temprano en el año y por consiguiente, llega a la etapa de adultos, se alimenta en acículas y ramillas, se aparea y oviposita antes que los adultos en Tetela, Xochiapulco, Aquixtla y Zautla.

Lo anterior ayuda a explicar porque es Zacatlán el municipio en el que se observó primero el desarrollo de los síntomas de daño por alimentación de los adultos de *O. cerca fowleri*.

En cuanto a la presencia de los síntomas de daño por Ocoaxo, Aquixtla es el municipio con mayor daño estimado, con 82.667 % de follaje dañado, seguido de Tetela con 68.72 %, Zacatlán con 61.80 %, Zautla con 58.12 % y Xochiapulco con solo 25.413 %.

Zacatlán es el municipio con el mayor porcentaje de acículas que solo tenían daño por *O. cerca fowleri* (64.992 %) y acículas con daño de este cercópido y presencia de histerotecios de *Lophodermium* (35.008 %),

En cuanto a la presencia de *Lophodermium*, Zacatlán fue el único municipio en el que se encontraron acículas con histerotecios pero sin daño por *O. cerca fowleri*; corresponde a un solo sitio y representan el 9.091 % de las acículas con daño y el 4.00 % de las acículas evaluadas registrado en ese sitio, y en el conteo general solo representó el 1.818 %.

En cuanto a la identidad de los patógenos de follaje, en el laboratorio se hizo el aislamiento de algunos hongos y después se purificaron. Posteriormente, se realizó la descripción de las características culturales de los hongos aislados.

En lo referente a la identificación molecular de los hongos aislados, se ha propuesto un protocolo para los distintos *Lophodermium* aislados y ya se extrajo el ADN de aislamientos de 25 días de crecimiento a partir de micelio crecido en medio líquido de extracto de malta, y se almacena a -20 °C, para su posterior uso en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), actividad que aún falta realizar.

En la evaluación de control *in vitro* de *Lophodermium*, se propone un protocolo para evaluar los fungicidas oxiclورو de cobre, propiconazol y clorotalonil, en cajas Petri con un aislamiento de *Lophodermium* patogénico.

En diciembre se realizaron diversas reuniones de difusión de los resultados de las actividades de saneamiento y de investigación, en los municipios de Nicolás Bravo, Zautla, Xochiapulco, Aquixtla y Zacatlán, ante medios de comunicación y propietarios de predios forestales.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo brindado por los técnicos encargados de las brigadas, de los miembros de las mismas, y de los encargados de la revisión y colecta de insectos en las trampas de luz en los municipios de Aquixtla, Tetela de Ocampo, Xochiapulco y Zautla y de Zacatlán.

A continuación se enlista el personal de las brigadas que colaboró en algunas de las actividades del proyecto de investigación:

Nicolás Bravo

Ing. Francisco Javier Rivera Rico.

Brigadistas: Arturo Domínguez Dávalos, Alejo Cid Muñoz, Flavio Cesar Cid Domínguez, Humberto Domínguez Huerta, Gerardo Domínguez Dávalos, Raul Muñoz Domínguez, David Cid Romero, Jesus Cid Carrera.

Zautla

Técnicos: Ing. Ana Laura Luna Pozos.

Brigadistas: Carlos Aguilar Romero, Luis Romero Aguilar, Juan Arellano Méndez, José Sánchez Ortiz, Pedro Sánchez Ortiz, Hipolito Parra De Jesús, Cristian Duran Moreno, Sergio Jiménez Cuetzalteco.

Encargado de trampa de luz: Aurelio Juárez Huasteco

Xochiapulco

Técnico: Ing. Manuel Cadena Martínez

Brigadistas: Rafael Rosales Olaya, Antonio Fernández Domínguez, Ismael Ahucatitan Rodríguez, Martin Olaya Rosales, Armando Sánchez Lavin, Andres Romero Rosales, Jorge Parra Guerra, Aurelio Juárez Huasteco.

Encargado de trampa de luz: Marbel Contreras Juárez

Tetela de Ocampo

Técnico: Ing. Reyna Fabiola Padilla Díaz, Ing. Juan Luis García Lobato y Luis Rodríguez Trujillo.

Brigadistas: Gerardo Moreno Segura, Bernardino Vázquez Manzano, Inocencio Manzano Pérez, Javier Cruz Valeriano, Rafael Hernández Valeriano, Jose Luis Manzano Pérez, Oscar Moreno Sosa, Celia Hernández Becerril, Pablo Vázquez González, Lino Hernández López, Pedro Hernández Juárez, Uriel Moreno Sosa, Juan Cruz Solano, Eusebio Hernández Valeriano, Humberto Vázquez Manzano, Heron Eduardo Hernández Pérez, Abel

Martínez Cabrera, Gaudencio Muñoz Leal, Alfonso González Hernández, Zeferino Cruz Rosales, Sebastian Cruz Moreno, Jose Elio Ronquillo Castilla, Abraham González Hernández , Jose Fernando Carmona Fernández.

Encargado de trampa de luz: Jorge Cruz Solano

Aquixtla

Técnico: Biol. Moisés Oronzor García

Brigadistas: Marino González Cruz, Eduardo Hernández Sánchez, Patricia López Vargas, Jose Dario Carmona Cruz, Jose Angel Cortes Luna, Javier Pineda Sánchez, Antonio López Nájera, Samuel Vargas Cruz.

Encargado de trampa de luz: Guillermo Cruz Hernández

Zacatlán

Se agradece el apoyo brindado por el Ing. Manuel Morales Martínez, director técnico de la empresa Asesores en Manejo de Recursos Forestales S. C. (ASMARF), y por el Ing. Fernando Galindo Ordóñez, técnico en la misma, por el apoyo brindado en la realización de diversas actividades en el municipio de Zacatlán.

Brigadistas: Joel Nájera Méndez, Juan Daniel Hernández Fabián, Abraham Hernández Crisanto, Rubén López Márquez, José Ramón Villalba, Gerardo Escobedo Márquez, José Antonio Reyes Villalba González y Camilo López Pérez.

Encargado de trampa de luz: Rubén López Marquez

LITERATURA CITADA

- Ahanger, F. A., Dar, G. H., Beig, M. A., & Sofi, T. A. (2015). Management of needle blight (*Lophodermium pinastri*) disease in Blue pine trees in Kashmir, India. *Journal of Forestry Research*, 27(1), 185-192.
- Ahmed, K. S. D. (2014). *Spatial distribution of soil insects in grassland*. Research Master, University of Plymouth.
- Bednarova, M., Dvorak, M., Janousek, J., & Jankovsky, L. (2013). Other foliar diseases of coniferous trees. In P. Gonthier & G. Nicolotti (Eds.), *Infectious forest diseases*. (pp. 458-487). Wallingford, UK: CAB International.
- Benefer, C. M., Ahmed, K. S. D., Blackshaw, R. P., Sint, H. M., & Murray, P. J. (2016). The distribution of soil insects across three spatial scales in agricultural grassland. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 4(41), 1-9. doi: 10.3389/fevo.2016.00041
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. (pp. 62). Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP).
- Cobos, J. M. (1995). Nota sobre la presencia de *Haematoloma dorsatum* (Ahrens) en pinares del Sistema Central. *Bol. San. Veg. Plagas*, 21, 133-137.
- COOL. (2016). Ocoaxo Fennah, 1968., from <http://hemiptera-databases.org/cool/database.php?db=cool&lang=es&card=taxon&rank=genus&id=3274>
- Charnley, A. K. (1984). Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: a speculative review. In J. M. Anderson, A. D. M. Rayner & D. W. H. Walton (Eds.), *Invertebrate-microbial interactions*. (pp. 229-270). Cambridge: Cambridge University Press.
- Dietrich, C. H. (2003). Auchenorrhyncha (Cicadas, Spittlebugs, Leafhoppers, Treehoppers and Planthoppers). In V. H. Resh & R. Cardé (Eds.), *Encyclopedia of Insects* (pp. 66-74). San Diego, CA. EUA: Elsevier Science.
- Fennah, R. G. (1968). Revisionary notes on the new world genera of cercopid froghoppers (Homoptera; Cercopoidea). *Bulletin of Entomological Research*, 58, 165-190.
- Fulbright, D., O'Donnell, J., & Lizotte, E. (2015). Christmas tree disease control recommendations. In M. S. U. E. Bulletin (Ed.), (Vol. E-2676): Michigan State University.
- Hamilton, K. G. A. (1982). *The spittlebugs of Canada*. (Vol. 1740). Ottawa, Canada: Biosystematics Research Institute.

- Jacobson, E. S. (2000). Pathogenic roles for fungal melanins. *Clinical Microbiology Reviews*, 13, 708-717.
- King, K. M. (1939). Population studies of soil insects. *Ecological Monographs*, 9(3), 270-286.
- Lilja, A., & Poteri, M. (2013). Seed, seedling and nursery diseases. In P. Gonthier & G. Nicolotti (Eds.), *Infectious forest diseases*. (pp. 567-591). Wallingford, UK: CAB International.
- Mariño-Pérez, R., Pacheco-Rueda, I., & Dietrich, C. (2012). Listado preliminar de Auchenorrhyncha (Insecta: Hemiptera) de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, Distrito Federal, México. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)*, 28(2), 280-286.
- McColloch, J. W., & Hayes, W. P. (1922). The reciprocal relation of soil and insects. *Ecology*, 3(4), 288-301.
- Metcalf, Z. P. (1961). Part 2. Cercopidae. In M. Z. P. (Ed.), *General Catalogue of the Homoptera*. (Vol. Fascicule VII., pp. 1-607). Raleigh (United States of America): North Carolina State College.
- Minter, D. W. (1981). *Lophodermium on pines*. (Vol. 147). Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute.
- Mohali, S. (1998). Asociación de *Lophodermium australe* y *Phoma pomorum* en apículas de pino caribe. *Revista de Ecología Latino-Americana*, 5(3), 07-14.
- Müller, M. M., & Hallaksela, A.-M. (1998). Diversity of Norway spruce needle endophytes in various mixed and pure Norway spruce stands. *Mycological Research*, 102, 1183-1189.
- Nickel, H., & Remane, R. (2002). Artenliste der Zikaden Deutschlands, mit Angabe von Nährpflanzen, Nahrungsbreite, Lebenszyklus, Areal und Gefährdung (Hemiptera, Fulgoromorpha et Cicadomorpha) / Check list of the planthoppers and leafhoppers of Germany, with notes on food plants, diet width, life cycles, geographic range and conservation status. *Beiträge zur Zikadenkunde*, 5, 27-64.
- Nicholls, T. H., & Skilling, D. D. (1974). Control of *Lophodermium* needlecast disease in nurseries and christmas tree plantations. In U. Forest (Ed.), *Service Research Paper* (Vol. Nc-110, pp. 14).
- Ortiz-García, S., Gernandt, D. S., Stone, J. K., Johnston, P. R., Chapela, I. H., & Salas-Lizana, R. (2003). Phylogenetics of *Lophodermium* from pine. *Mycologia*, 96(5), 846-859.
- Peck, D. C. (1998). Use of alternative food plants exclusively by adult male froghoppers (Homoptera: Cercopidae). *Biotropica*, 30(4), 639-644.

- Pedras, M. S. C., Zaharia, L. I., & Ward, D. E. (2002). The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. *Phytochemistry*, *59*, 579-596.
- Samuels, R. I., Reynolds, S. E., & Charnley, A. K. (1988). Calcium channel activation of insect muscle by destruxins, insecticidal compounds produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*, *90*, 403-412.
- Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2010). *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, *56*(1267-1274).
- Sieber, T. N. (1988). Endophytische Pilze in Nadeln von gesunden und geschädigte Fichten (*Picea abies* (L.) Karsten) [Endophytic fungi in needles of healthy-looking and diseased Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karsten)]. *European Journal of Forest Pathology*, *18*, 321–342.
- Silva-Carvalho, G., Morimasa-Sakakibara, A., & Webb, M. D. (2016). Two new species of the Neotropical spittlebug genus *Monecphora* Amyot & Serville (Hemiptera: Cercopidae) with key and notes of species of the genus. *Zootaxa*, *4078*(1), 143-152. doi: <http://doi.org/10.11646/zootaxa.4078.1.13>
- Vega, F. E., Meyling, N. V., Luangsa-ard, J. J., & Blackwell, M. (2012). Fungal entomopathogens. In F. E. Vega & H. K. Kaya (Eds.), *Insect Pathology*. London, UK: Elsevier Inc.
- Wilson, K., & Reeson, A. F. (1998). Density-dependent prophylaxis: evidence from Lepidopterae baculovirus interactions?. *Ecological Entomology*, *23*, 100-101.
- Wilson, K., Thomas, M. B., Blanford, S., Doggett, M., Simpson, S. J., & Moore, S. L. (2002). Coping with crowds: density-dependent disease resistance in desert locusts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*, 5471-5475. doi: 10.1073/pnas.082461999