

Ophiostoma ips asociado al insecto descortezador (*Dendroctonus adjunctus*) del pino de las alturas (*Pinus hartwegii*)

Omar Alejandro Pérez-Vera¹, Dionicio Alvarado-Rosales¹, Elizabeth Cárdenas-Soriano¹
Armando Equihua-Martínez², David Cibrián-Tovar³, José G. Álvarez-Moctezuma³
Dimas Mejía-Sánchez⁴ y Thomas C. Harrington⁵

¹Programa de Fitopatología y ²Programa de Entomología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Carretera México-Texcoco, Km 36.5, Montecillo, Estado de México, C.P. 56230. ³División de Ciencias Forestales (DICIFO) y ⁴Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, C.P. 56230, Chapingo, Estado de México; ⁵Department of Plant Pathology, Iowa State University, 221 Bessey Hall, Ames, Iowa 50011, USA

Ophiostoma ips associated with the bark beetle (*Dendroctonus adjunctus*) in hartweg pine

Abstract. In the "pino de las alturas" (*Pinus hartwegii* Lindl) it has been reported the presence of the bark beetle *Dendroctonus adjunctus* associated with the genus *Ophiostoma* spp., which causes the blue-stain of the wood. The objective of this study was to identify and characterize the *Ophiostoma* species associated with the bark beetle *D. adjunctus* in *P. hartwegii*. Galleries and insects were collected in the Zoquiapan Experimental Forest Station (ZEFS), of the Universidad Autónoma Chapingo, in Zoquiapan, Puebla. It was isolated from galleries and insects the morphologically identified fungi *Graphilbum* sp. and *Ophiostoma ips*, the latter from galleries only. In addition, molecular characterization was developed by the polymerase chain reaction technique (PCR). Molecular analysis confirmed the morphological identification. It was concluded that this fungus corresponds to *Ophiostoma ips* which is found on both stages, the teleomorph and its anamorph (*Graphilbum* sp.). This is the first report of *O. ips* in Mexico associated with *P. hartwegii*.

Key words: *Graphilbum*, fungi, insect, PCR.

Resumen. En el "pino de las alturas" (*Pinus hartwegii* Lindl) se ha reportado la presencia del descortezador *Dendroctonus adjunctus* asociado al género *Ophiostoma* spp., causante del manchado azul de la madera. El objetivo del presente estudio fue identificar y caracterizar la especie de *Ophiostoma* asociada al descortezador *D. adjunctus* en *P. hartwegii*. Se colectaron galerías e insectos en la Estación Forestal Experimental Zoquiapan (EFEZ) de la Universidad Autónoma Chapingo, en Zoquiapan, Puebla. Se aisló e identificó morfológicamente a *Graphilbum* sp. en galerías e insectos y *Ophiostoma ips* solamente en galerías. Además, se caracterizaron molecularmente mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El análisis molecular corroboró la identificación morfológica. Se concluye que el hongo corresponde a *Ophiostoma ips* (teleomorfo) y *Graphilbum* sp. su anamorfo. Este es el primer reporte en México de *O. ips* asociado a *P. hartwegii*.

Palabras clave: *Graphilbum*, hongo, insecto, PCR.

Received 5 November 2008; accepted 30 August 2009.

Recibido 5 de noviembre 2008; aceptado 30 de agosto 2009.

Autor para correspondencia: Omar Alejandro Perez
oalejandroversa@gmail.com

Introducción

El “pino de las alturas” (*Pinus hartwegii* Lindl) se encuentra distribuido en 15 estados de la República Mexicana con clima semifrío, a una temperatura media de 12°C, precipitaciones medias anuales de 850 a 1,500 mm y altitudes de 3,000 a 4,000 msnm. Esta especie también se ha reportado en Guatemala, Honduras y entre la frontera de Honduras-El Salvador (Musálem y Solís, 2000; Perry, 1991a). Los bosques de pino en México son atacados por los descortezadores *Dendroctonus adjunctus*, *D. approximatus*, *D. mexicanus*, *D. parallelocollis*, *D. valens*, *Ips bonansea*, *I. integer*, *I. mexicanus*, *Pissodes zitacuarensis* e *Hylurgus* spp., que se alimentan del floema y del cambium vascular del árbol (Cibrián *et al.*, 1995; Musálem y Solís, 2000). Este grupo de insectos son plagas en bosques de coníferas (Paine *et al.*, 1997) con excepción del último (Cibrián *et al.*, 1995). En particular, *D. adjunctus*, ataca a 16 especies de pino, dentro de los cuales está *P. hartwegii* y cuyo daño se acentúa especialmente en los Parques Nacionales del centro de México (Cibrián *et al.*, 1995).

La mayoría de las especies de insectos descortezadores actúan como vectores de hongos de los géneros *Ceratocystis* y *Ophiostoma* (Perry, 1991b; Harrington, 1993; Paine *et al.*, 1997). Muchos de ellos son patógenos primarios y agentes causantes del manchado azul de la madera (Harrington, 1988; Paine *et al.*, 1997). En el mundo se han reportado 189 especies de los géneros en diferentes hospedantes (Index Fungorum, 2008). Para el caso de México se han reportado *Ceratocystiopsis collifera*, *Ophiostoma picea*, *O. piliferum* y *Leptographium* sp. asociados a *Pinus hartwegii* (Marmolejo y Butin, 1993; Marmolejo, 1991) y otros 13 hongos ophiostomatoides en coníferas y latifoliadas (Marmolejo, 1989; Marmolejo y Butin, 1993; Zhou *et al.*, 2004 a; Cibrián *et al.*, 2007). Dada la poca información que existe de estos hongos en México y que

las especies del género *Ophiostoma* no son fáciles de identificar por características morfológicas y que solo *O. pulvinisporum* se ha identificado con comparaciones de secuencias de ADN (Zhou *et al.*, 2004 a), el presente estudio tuvo como objetivo identificar y caracterizar la especie de *Ophiostoma* asociada al descortezador *D. adjunctus* en *P. hartwegii*.

Materiales y métodos

Colecta de muestras

Las colectas se realizaron en la Estación Forestal Experimental Zoquiapan (EFEZ) de la Universidad Autónoma Chapingo, municipio de Zoquiapan, Puebla, México (Tabla 1). Se recolectaron 22 muestras de corteza de 10 x 10 cm² de *Pinus hartwegii*, con galerías de *Dendroctonus adjunctus*, además, se recolectaron 35 adultos del insecto descortezador. Todas las muestras se etiquetaron y trasladaron al laboratorio de Patología Forestal del Campus Montecillo- Texcoco, Edo. de México, donde se conservaron a 4°C para su posterior análisis.

Aislamiento del hongo

Las muestras de corteza se colocaron en cámaras con humedad relativa de 95 a 100% durante 30 días. Masas de conidios acumulados en la punta de conidióforos fueron cuidadosamente colectadas con una aguja de disección estéril y transferidas a cajas Petri con medio de cultivo selectivo extracto-malta-agar al 2% adicionado con cicloheximida (0.1 g) y sulfato de estreptomycin (0.02 g). De cada muestra se hicieron cinco siembras en dos cajas Petri con medio, en total se sembraron 44 cajas.

Los 35 insectos adultos se sembraron directamente en EMA adicionado con cicloheximida y sulfato de estreptomycin descrito anteriormente. Todas las cajas se

incubaron en luz natural a 25 ± 1 °C durante 15 días. 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 cubrieron con aceite mineral estéril.

Identificación morfológica

Microscopía de luz

Con el propósito de identificar a nivel género cada uno de los aislamientos obtenidos, se hicieron cultivos monoconidiales en agar-agua al 1.8% y se incrementaron en EMA al 2%. Los aislamientos de galerías e insectos se agruparon en base al sitio de colecta, coloración en medio de cultivo, tipo de crecimiento, tipo de micelio y presencia del teleomorfo o anamorfo para facilitar el uso de claves. Para este tipo de microscopía se seleccionaron al azar siete aislamientos de galerías (ZOQ1, ZOQ3, ZOQ4, ZOQ7, ZOQ10, ZOQ11 y ZOQ14) y tres de insectos (ZOQ18, ZOQ19 y ZOQ20). Los montajes permanentes se hicieron en glicerol a 50% acidificado con HCl y se midieron 200 ascosporas y conidios, 50 sinemas y 30 peritecios de cada aislamiento con objetivos de 100X y 10X, respectivamente. Las claves usadas para la identificación fueron las de Jacobs y Wingfield (2001); Upadhyay (1981) y Hunt (1956).

Microscopía de barrido

Para observar el tipo de conidiogénesis y forma de los conidios, se utilizó este tipo de microscopía; para esto se utilizaron cuatro cultivos monoconidiales de 15 a 20 días de edad (ZOQ1, ZOQ3, ZOQ4 y ZOQ19) cultivados en EMA al 2% (Tabla 1). Con un sacabocado, se tomaron discos de 0.5 cm de diámetro y se fijaron en glutaraldehído al 3% con pH 7.2 durante 24 h. Las muestras se lavaron tres veces con el amortiguador de fosfatos por un minuto. Después, cada muestra se deshidrató en una serie de soluciones graduales de etanol (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%); las últimas tres soluciones dos veces por 15 min en cada una. Las muestras se

secaron a punto crítico con CO₂ en una secadora Sandri-780A® (TOUSIMIS Research Corporation, Rockville, EUA), se colocaron sobre un portamuestras usando una cinta doble adhesiva de cobre (o carbón) y se recubrieron con oro durante 4 min en una ionizadora JFC-1100® (JEOL LTD, Tokio, Japón). Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido JSM-35C® (JEOL LTD, Tokio, Japón) en el laboratorio de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México.

Caracterización molecular

Diez aislamientos fueron utilizados para la caracterización molecular (Tabla 1), los cuales fueron primeramente agrupados e identificados morfológicamente. Los cultivos monoconidiales de *Graphilbum* en agar-agua al 1.8%, incrementaron en EMA al 2%. Cada aislamiento fue cultivado en matraces con 50 mL de medio líquido de extracto-malta al 2% a una temperatura de 25 °C y oscuridad por 25 días. La extracción de ADN fue con el método AP (Sambrook y Russell, 2001). La calidad del mismo se evaluó por electroforesis en gel de agarosa 1%. Las regiones internas ITS1 e ITS2 entre los genes ribosomales (rADN) 18S-5.8S y 5.8S-18S fueron amplificadas por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con los iniciadores ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGGAAGTAA-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). La reacción de PCR por muestra estuvo compuesta por: 12.5 µl agua libre de nucleasas, 2.5 µl de Buffer 5X, 2.5 mM de MgCl₂, 2.5 µl; 200 µM de dNTPs, 0.5 µl; 0.8 µM de cada uno de los iniciadores ITS1-F e ITS4, 1 µl; 2 U de Taq-DNA polimerasa (Promega, EUA), 0.5 µl y 10 ng de ADN problema, 2 µl. Se utilizó un termociclador Applied Biosystems™ (Mod. Thermal Cycler 2720) con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 59 seg; alineamiento a 55 °C por 59 s y extensión a 72 °C por 1 min, y una extensión final de 72 °C por 8 min (Zhou *et al.*, 2004a). Los productos amplificados se analizaron por

Tabla 1. Aislamientos de *Graphilbum* y *Ophiostoma ips* obtenidos de galerías y del insecto descortezador *Dendroctonus adjunctus* en *P. hartwegii* de la EFEZ, Puebla, México

Sitio	Hospedante/Insecto	Galerías/insectos en EMA	No. de Aislamientos ^a	Clave ^d
I. San Martín	<i>P. hartwegii</i>	8	31	ZOQ1
		1	4	ZOQ3 ^c
II. Cañada	<i>P. hartwegii</i>	1	6	ZOQ4
		6	43	ZOQ7
III. Área Semillera	<i>P. hartwegii</i>	2	20	ZOQ10
		2	20	ZOQ11
IV. Papayo	<i>P. hartwegii</i>	2	20	ZOQ14
Total:		22^b	144	
II. Cañada	<i>D. adjunctus</i>	35^c	12	ZOQ18
				ZOQ19
				ZOQ20

electroforesis en gel de agarosa al 1%, y se tiñieron con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron en un fotodocumentador (Bio-Imagen Systems Mini Bis Pro). Los productos de la PCR fueron tomados directamente del gel y purificados con Wizard SV (Promega, EUA). El producto de PCR fue secuenciado en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México con un secuenciador Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystem Corp).

Las secuencias obtenidas con el iniciador ITS1-F se alinearon con las secuencias disponibles en el banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de EUA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). De los valores cuantitativos generados, solo se bajaron las secuencias con el valor más alto para su comparación con las secuencias en estudio y otras secuencias de *Ophiostoma adjuncti*, *O. montium*, *O. pulvinisporum* que morfológicamente son similares (Tabla 2). Las secuencias fueron alineadas con Clustal W versión 1.6 y un análisis filogenético fue realizado con el software MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Tamura, *et al.* 2007) por el método de Neighbor-Joining, modelo Amino: Poisson correction. En el árbol se usó como raíz una secuencia de *O. quercus* del banco de genes con

número de acceso (AF493239). Las secuencias de este estudio fueron depositadas en el Banco de Genes para obtener su número de acceso (Tabla 2).

Resultados y discusión

Aislamientos

Se obtuvieron 156 aislamientos de galerías e insectos, de éstos, 144 fueron de galerías y el resto del cuerpo de *Dendroctonus adjunctus* (Tabla 1).

Identificación de los aislamientos

Caracterización morfológica

Los resultados de los estudios de microscopía de luz y microscopía de barrido indicaron la presencia del anamorfo *Graphilbum* sp. y el teleomorfo *O. ips* en galerías y cuerpo de insectos de *D. adjunctus* en *P. hartwegii* (Figura 1), un mayor porcentaje fue *Graphilbum* (galerías e insectos), y únicamente en la muestra de galerías de ZOQ3 se formó el teleomorfo y el anamorfo. Estos hongos, *Graphilbum*, *Hyalorhinocladia* y *Acremonium* son anamorfos reportados para *O. ips*, un hongo considerado pleomórfico

Tabla 2. Aislamientos del hongo Ophiostomatoide a partir de galerías y cuerpo del insecto descortezador *Dendroctonus adjunctus* en *Pinus hartwegii*

Especie	Aislamiento	No. de Acceso GenBank	Hospedante/ Insecto	Origen	
<i>Ophiostoma adjuncti</i> ^a	CMW135	AY546696	<i>P. ponderosa</i>	EUA	
<i>Graphilbum</i> sp.	ZOQ1^b	FJ178362	<i>P. hartwegii</i>	México	
<i>O. ips</i>	ZOQ3^b	FJ178363			
<i>Graphilbum</i> sp.	ZOQ4^b	FJ178364			
	ZOQ7^b	FJ178365			
	ZOQ10^b	FJ178366			
	ZOQ11^b	FJ178367			
	ZOQ14^b	FJ178368			
	ZOQ18^b	FJ178369	<i>D. adjunctus</i>		
	ZOQ19^b	FJ178370			
	ZOQ20^b	FJ178371			
	<i>O. ips</i> ^a	CMW312	AY546699	<i>P. resinosa</i>	EUA
		CMW5089	AY546701	<i>P. radiata</i>	Chile
CMW6402		AY546697			
CMW6418		AY546702	<i>P. elliotii</i>	Sudáfrica	
CMW6463		AY546703			
CMW9005		AY546698	<i>P. sylvestris</i>	Suecia	
CMW13217		AY546707	<i>P. resinosa</i>	Canadá	
MW13218		AY546708	<i>P. palustris</i>	EUA	
CMW13219		AY546709			
KUC2120		AY172021	<i>Pinus</i> sp.		
CCMA33	AY934507	<i>P. pinaster</i>	España		
<i>O. montium</i> ^a	CMW13220	AY546710	<i>P. contorta</i>	Canadá	
	CMW13221	AY546711	<i>P. ponderosa</i>	EUA	
	CMW13222	AY546712	<i>P. contorta</i>	Canadá	
<i>O. pulvinisporum</i> ^a	CMW13216	AY546717	<i>P. contorta</i>	Canadá	
	CMW9020	AY546713	<i>P. pseudostrobus</i>	México	
	CMW9022	AY546714			
	CMW9026	AY546715	<i>P. maximinoi</i>	México	
	CMW9493	AY546716			
<i>O. quercus</i> ^a	CMW7650	AF198238	<i>Quercus</i> sp.	Reino Unido	

^aSecuencias del banco de datos NCBI. ^b Aislamientos usados para el análisis de secuencias obtenidos de la Estación Experimental Forestal Zoquiapan, Universidad Autónoma de Chapingo, México.

(Upadhyay, 1981; Hutchison y Reid, 1988; Benade *et al.*, 1995). Harrington (1988) menciona a *Leptographium* y *Graphium* como anamorfos de *O. ips*. Otros han considerado a *Graphium* como sinónimo de *Pesotum*, sin embargo, Harrington *et al.* (2001) restringe a *Pesotum* al complejo de *O. picea*. Por otro lado, mientras que Hunt (1956) menciona que el anamorfo de *O. ips* es una transición entre *Leptographium* y *Graphium*. Sin embargo, en nuestros aislamientos únicamente se obtuvo a *Graphilbum* como anamorfo de *O. ips*. El crecimiento en medio de cultivo fue radial y alcanzó un diámetro de 8 cm en 12 días para los aislamientos de *Graphilbum* y *O. ips*. En *Graphilbum* la coloración de la colonia fue blanca cremosa a café claro a los tres días, tornándose a café amarillento en cultivos de mayor edad (Figura 1A). En los aislamientos con teleomorfo y anamorfo

juntos de *O. ips* la coloración fue color café oscuro a grisáceo y de café a café oscuro al reverso de la caja Petri (Figura 1B).

En *Graphilbum* el micelio fue de color café oscuro, septado, micelio aéreo hialino y escaso. Conidióforos sinematosos dominante en el medio de cultivo. En general, la masa de conidias es contenida en un mucílago de color cremoso viscoso con la edad. Hutchison y Reid (1988), Hunt (1956) y Upadhyay (1981), concuerdan en que *Graphilbum* presenta una variabilidad en coloración de la colonia de hialina, café claro, café amarillento, café oliváceo, gris claro o gris oscuro. Además, Hunt (1956) y Upadhyay (1981) mencionan abundancia de micelio inmerso y aéreo septado de color hialino a café. Hutchison y Reid (1988) reportan por primera vez la formación de clamidosporas y blastosporas del micelio, esto dependiendo del aislamiento y las condiciones de crecimiento *in vitro*.

Los conidióforos de *Graphilbum* fueron sinematosos, de (235-)296(-329) μm de largo incluyendo aparato conidiogénico (Figura 1C,D). Los sinemas fueron solitarios o agrupado de 2 a 6, hialinos a color crema a los tres a cuatro días y tornándose a café claro a los 10 a 12 días para aislamientos de galerías e insectos (Figura 1C). Los Conidióforos presentaron de 3 a 5 ramas. Las células conidiogénicas de proliferación percurrente, anelaciones de apariencia simpodial, cilíndrica e hialina de (8.5-)13.8(-14.5)x(0.8-)2.0(-2.2) μm (Figura 1E,F). La conidiogénesis de *Graphilbum* en este estudio, concuerda con lo descrito por Upadhyay y Kendrick (1975). Sin embargo, Benade *et al.* (1995) observaron con microscopía electrónica de barrido (MEB) y microscopía electrónica de transmisión (MET) una conidiogénesis percurrente de apariencia simpodial muy similar a *Hyalorhinocladiella*. Hutchison y Reid (1988), mencionan que la conidiogénesis es fialídica y percurrente para *Graphilbum*. Mientras que Wingfield y Marasas (1980) reportan que la conidiogénesis es fialídica de apariencia simpodial sin asignar un anamorfo. Los conidios son hialinos,

unicelulares, cilíndricos a ovoides, con el ápice redondeado y la base truncada de (3.6-)5.5(-8.9)x(1.0-)1.5(-2.6) μm (Figura 1E,F,G,H). La forma de los conidios fue similar a lo reportado por Hunt (1956) y Wingfield y Marasas (1980), pero Upadhyay (1981); Rumbold (1931) y Hutchison y Reid (1988) mencionan la presencia de conidios globulares, limoniformes, oblongos a elipsoides.

Ophiostoma ips es morfológicamente similar a *O. adjuncti*, *O. montium* y *O. pulvinisporum*. Estas especies presentan el ascocarpo oscuro, hifas ostiolares ausentes en el ápice y las ascosporas de tipo almohada en vista frontal y con diferentes formas de la cubierta mucilaginoso en cada una de las especies (Hunt, 1956; Upadhyay, 1981; Zhou *et al.*, 2004b; Davidson, 1978).

Los peritecios crecen superficialmente inmersos en medio de cultivo, desarrollándose a los 25 días solitarios o agrupados. Su base es globosa, oscuros, de 131 a 263 μm de diámetro usualmente ornamentados con hifas aseptadas de color café claro de (1.8-)3.7(-4.9) μm de ancho (Figura 1:I,J). El cuello del peritecio es café oscuro a negro de 301 a 766 μm de largo y (19-)24(-38) μm de ancho de la base. El ápice del cuello ligeramente curvado y más claro, de (10-)13(-21) μm de ancho e hifas ostiolares ausentes (Figura 1:J,K). A diferencia de Hutchison y Reid (1988), Wingfield y Marasas (1980), Hunt (1956), Upadhyay (1981) y Rumbold (1931) mencionan que la longitud del cuello y base del peritecio son mayores. Sin embargo, estas dimensiones son semejantes a las descritas por Marmolejo y Butin (1993). Las ascas son de tipo evanescentes. Ascosporas hialinas, aseptadas, de forma aparentemente rectangular o de forma de almohada, y provistas de una cubierta mucilaginoso, de 4.0-5.9 x 1.8-2 μm (Figura 1:L). En cuanto al tamaño de las ascosporas, en este estudio fue variable, comparado con Hutchison y Reid (1988), Wingfield y Marasas (1980), Hunt (1956), Upadhyay (1981), Rumbold (1931) y Marmolejo y Butin (1993).

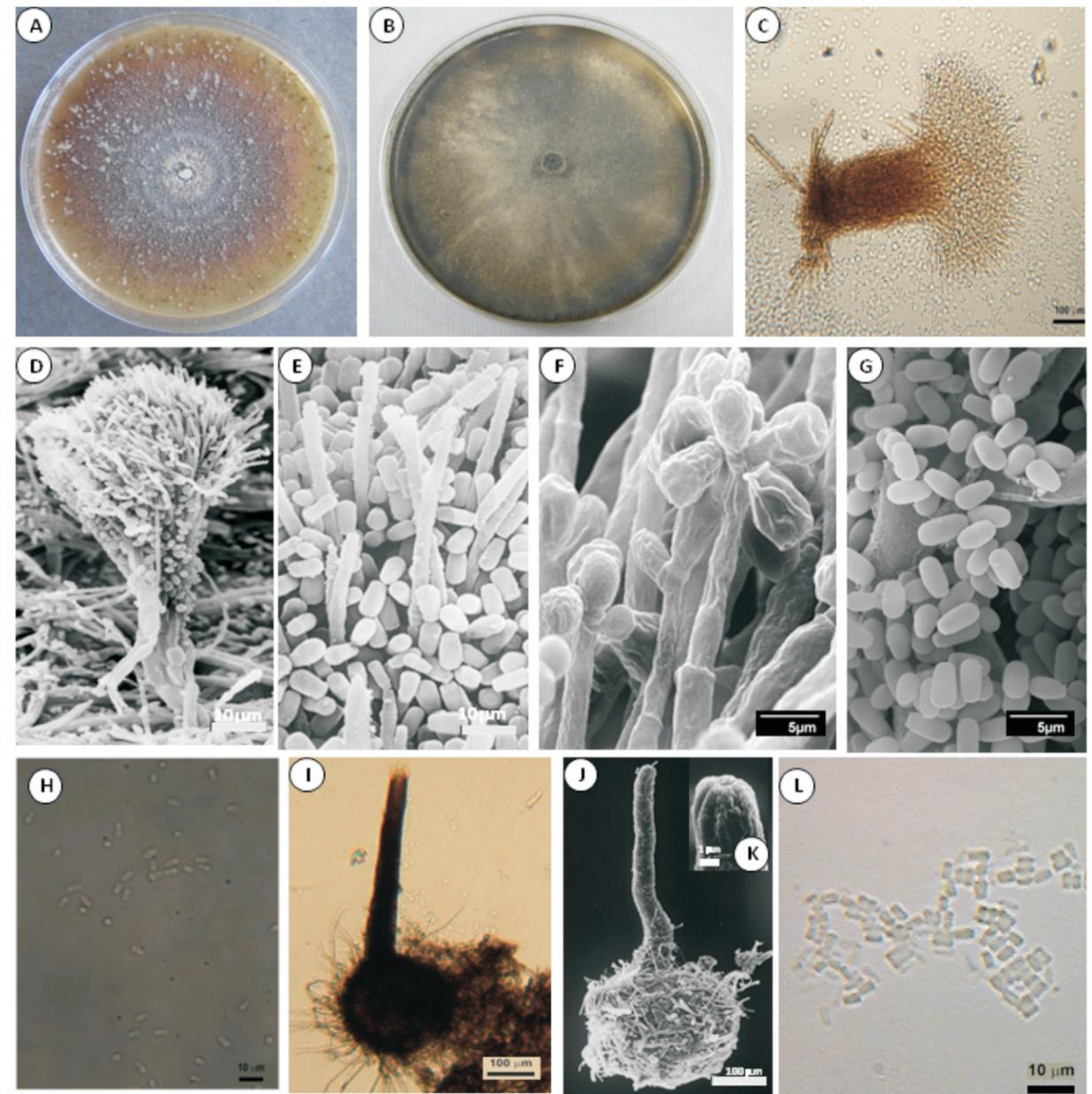


Figura 1. Características de cultivo y microscópicas (microscopía de luz y de barrido) de *Ophiostoma ips* y *Graphilbum* sp. A y B) Color café amarillento a gris oscuro en EMA al 2 %. C y D) Conidióforos sinematosos de *Graphilbum* sp. E y F) Células conidiogénicas de proliferación percurrente aparentemente simpodial. E, F, G y H) Conidias cilíndricas a ovoides. I, J y K) Peritecios sin hifas ostiolares. L) Ascosporas cuadrangulares.

Caracterización molecular

En general, la banda del producto de PCR fue de un peso aproximado de 700 pb con los primers ITS1-F e ITS4. Al comparar las diez secuencias de nucleótidos obtenidas de galerías y del cuerpo de *Dendroctonus adjunctus* identificadas morfológicamente, con las disponibles en el

GenBank resultó que los diez aislamientos correspondieron a *Ophiostoma ips*. Sin embargo, nueve aislamientos se alinearon con *O. ips* con número de acceso AY172021 y el aislamiento ZOQ10 se alineó con *O. ips* con número de acceso AY546697. En general, se presentó una identidad de 96 a 99%. Cada secuencia se depositó en el banco de genes y

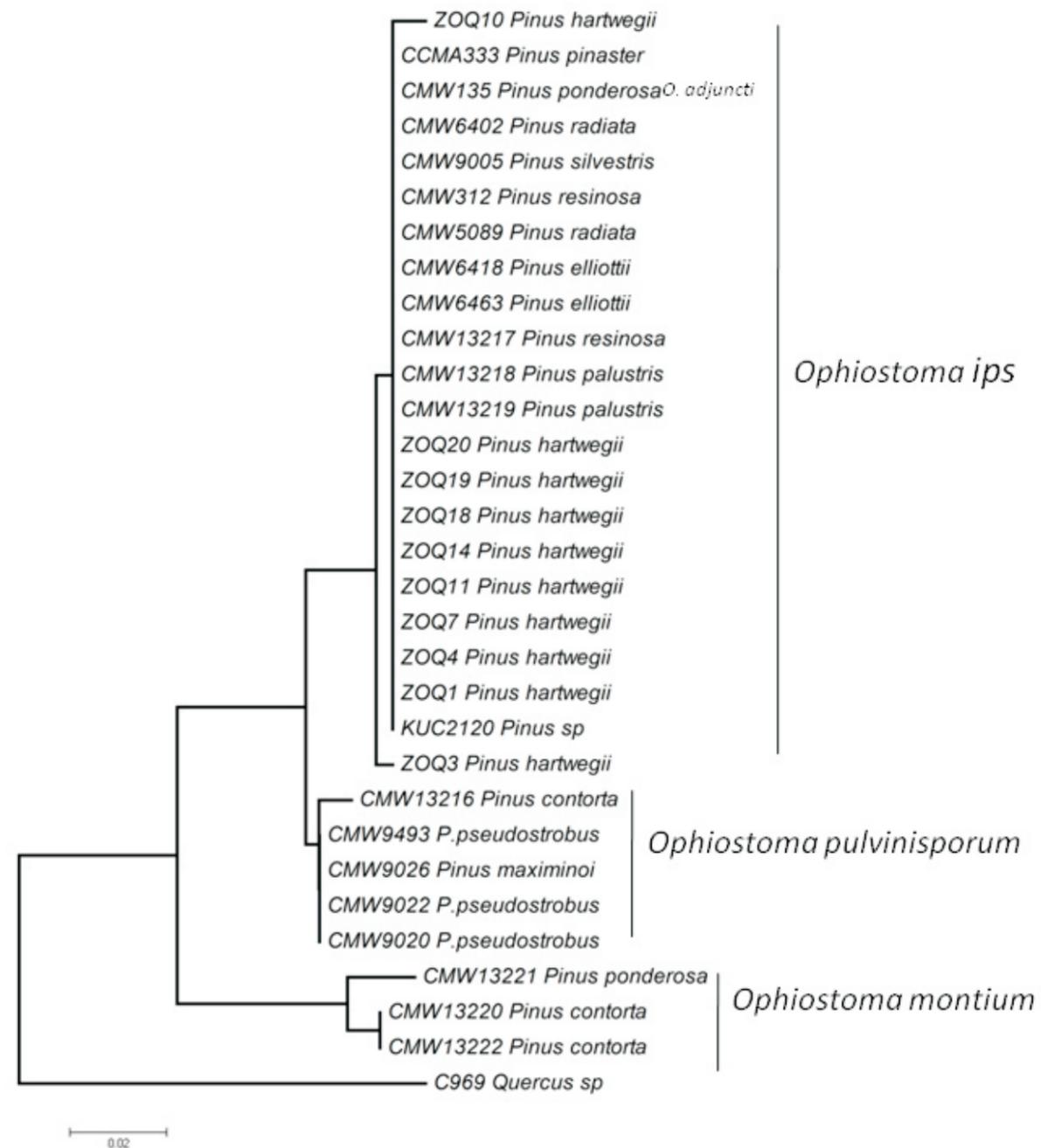


Figura 2. Árbol filogenético que muestra el agrupamiento del hongo ophiostomatoide asociado a *Dendroctonus adjunctus* en *Pinus hartwegii* amplificados por PCR-ITS rADN con los iniciadores ITS1-F e ITS4, y sus secuencias agrupadas con el software MEGA 4. El árbol filogenético se construyó con el método de Neighbor-Joining, modelo p-distance. 0.02 indica la distancia génica por el método Neighbor-Joining.

se obtuvo un número de acceso (Tabla 2). El resultado del alineamiento múltiple de las secuencias resultó en 803 pb para la construcción del árbol filogenético, usando la secuencia de *O. quercus* obtenida del banco del Banco de Genes con

número de acceso (AF198238). El árbol mostró un claro agrupamiento de tres grupos (Figura 2). El primer grupo correspondió a *O. ips*, con aislamientos de galerías e insecto de *D. adjunctus* en *P. hartwegii* en México y los aislamientos

de *O. ips* reportados en el banco de genes con hospedantes del subgénero *Pinus* (Perry, 1991a), en este grupo se incluye *O. adjuncti* (número de acceso CMW135), como única secuencia en el banco de genes lo que hace necesario realizar estudios genéticos más específicos que demuestren la separación de las dos especies. Además, se confirma la identificación morfológica donde se presentó el teleomorfo y *Graphilbum* considerado como anamorfo de *O. ips* (Hutchison y Reid, 1988 y Upadhyay, 1981). El segundo grupo corresponde a *O. pulvinisporium* con el subgénero *Diploxylo* (Perry, 1991a; Martínez, 1948). El tercer grupo lo constituye *O. montium* con los hospedantes de los subgéneros *Diploxylo* y *Pinus* (Perry, 1991a; Martínez, 1948).

O. ips ha sido reportado como patógeno en coníferas y asociado a varias especies de descortezadores (Zhou *et al.*, 2007). En el Hemisferio Norte, se ha reportado en *Pinus echinata*, *P. sylvestris* y *P. rigida* asociado a *Ips calligraphus* (Perry, 1991b). En el Hemisferio Sur se ha reportado en Australia en galerías de *Ips grandicollis* en *Pinus taeda* (Wingfield y Marasas, 1980; Zhou *et al.*, 2001), y en Nueva Zelandia en *Pinus elliottii* y *P. radiata* (Hutchison y Reid, 1988). En Sudáfrica asociado con *Orthotomicus erosus*, *Hylurgus angustatus* e *H. ligniperda* en *P. radiata*, *P. patula* y *P. elliottii* (Wingfield y Marasas, 1980; Zhou *et al.*, 2001). En Chile se ha asociado con *H. ligniperda* en *P. patula* (Zhou *et al.*, 2004b). En este estudio, el hongo fue aislado del cuerpo de *Dendroctonus adjunctus* y galerías en *Pinus hartwegii* y se identificó por características morfológicas y moleculares. En México, previamente se reportó a *O. ips* asociado con *D. mexicanus* e *Ips* sp., en *Pinus teocote* y *P. pseudostrobus* identificados morfológicamente (Marmolejo, 1989; Marmolejo y Butin, 1993).

Con base en los resultados morfológicos y análisis molecular de los aislamientos obtenidos de galerías e insecto descortezador *Dendroctonus adjunctus* en *Pinus hartwegii*, se concluye que el hongo corresponde a *Ophiostoma ips*, encontrándose el teleomorfo y anamorfo (*Graphilbum* sp.), el

cual se reporta por primera vez asociado a este insecto en *Pinus hartwegii* en México.

Literatura citada

- Benade, E., M.J. Wingfield, P.S. Van Wyk, 1995. Conidium development in the *Hyalorhinocladiella* anamorph of *Ophiostoma ips*. *Mycologia* 87:298-303.
- Cibrián, T.D., D.A. Rosales, S.E. García, 2007. Enfermedades Forestales de México. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Cibrián, T.D., J.T. Méndez, M. R.C. Bolaños, H.O. Yates III, J.F. Lara, 1995. Insectos Forestales de México. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Davidson, R., 1978. Staining fungi associated with *Dendroctonus adjunctus* in pines. *Mycologia* 70:35-41.
- Jacobs, K., M.J. Wingfield. 2001. *Leptographium* species: tree pathogens, insect associates, and agents of blue-stain. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Harrington, T.C., 1988. *Leptographium* species, their distributions, hosts and insect vectors. In: Harrington, T.C., F.W. Cobb (eds.), *Leptographium* root diseases on conifers. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minn. pp. 1-39.
- Harrington, T.C., 1993. Disease of conifers caused by species of *Ophiostoma* and *Leptographium*. In: Wingfield, M.J., K.A. Seifert, J.F. Webber (eds.), *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, ecology and pathogenicity. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minn. pp. 161-172.
- Harrington, T.C., D. McNew, J. Steimel, D. Hofstra, R. Farrell, 2001. Phylogeny and taxonomy of the *Ophiostoma piceae* complex and the Dutch elm disease fungi. *Mycologia* 93:111-136.
- Hunt, J. 1956. Taxonomy of the genus *Ceratocystis*. *Lloydia* 19:1-59.
- Hutchison, L.J., J. Reid, 1988. Taxonomy of some potential woodstaining fungi from New Zealand. *Ophiostomataceae*. *New Zealand Journal of Botany* 26: 63-81.
- Index fungorum, 2008. CABI Bioscience Databases. <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>.
- Marmolejo, J.G., 1991. El manchado azul de la Madera en Nuevo León. Reporte científico No. 27. Facultad de Ciencias Forestales, UANL, México. 59 p.
- Marmolejo, J.G., H. Butin, 1993. Las especies de *Ophiostoma* y *Ceratocystiopsis* (Ascomycetes, Microascales) conocidas de Nuevo León, México. Reporte científico especial No. 13. Facultad de Ciencias Forestales, UANL, México. pp. 155-170.
- Marmolejo-Moncivais, J.G., 1989. Forstpathologische untersuchungen zur Pilzflora Nordost-Mexikos. Tesis de Doctorado. Universität Göttingen.
- Martínez, M., 1948. Los pinos mexicanos. Segunda edición. Botas. México.
- Musálem, S.M.A., M.A. Solís, 2000. Monografía de *Pinus hartwegii*. SAGAR. INIFAP. CIRSE Campo Experimental Valle de México. Libro Técnico No. 3. Chapingo, Estado de México.
- Paine, T.D., K.F. Raffa, T.C. Harrington, 1997. Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. *Annual Reviews in Entomology* 42:179-206.
- Perry, J.P., 1991a. The pines of Mexico and Central America. Timber Press, Inc.
- Perry, T.J., 1991b. A Synopsis of the taxonomic revisions in the genus *Ceratocystis* including a review of blue-staining species associated with *Dendroctonus* bark beetles. General Technical Report. USDA, Forest Service. New Orleans, Louisiana.
- Rumbold, C.T., 1931. Two blue-stain fungi associated with bark beetle

- infestation of pines. *Journal of Agricultural Research* 43:847-873.
- Sambrook, J., D.W. Russell, 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Third edition. 1:1.32-1.34. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Tamura, K., J.N. Dudley, S. Kumar, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Upadhyay, H.P., 1981. A monograph of *Ceratocystis* and *Ceratocystiopsis*. University of Georgia Press. Athens, Georgia.
- Upadhyay, H.P., W.B. Kendrick, 1975. Prodrromus for a revision of *Ceratocystis* (Microascales, Ascomycetes) and its conidial states. *Mycologia* 67: 798-805.
- Wingfield, M.J., O.F.W. Marasas, 1980. *Ceratocystis ips* associated with *Orthomicus erosus* (Coleoptera: Scolytidae) on *Pinus* spp. in the Cape Province of South Africa. *Phytophylactica* 12:65-69.
- Zhou, X., I.T. Burgess, W. De Beer, F. Lieutier, A. Yart, K. Klepzig, A. Carnegie, M.J. Portales, D.B. Wingfield, M.J. Wingfield, 2007. High intercontinental migration rates and population admixture in the sapstain fungus *Ophiostoma ips*. *Molecular Ecology* 16:89-99.
- Zhou, X.D., W.Z. De Beer, B.D. Wingfield, M.J. Wingfield, 2001. Ophiostomatoid fungi associated with three pine-infesting bark beetles in South Africa. *Sydowia* 53:290-300.
- Zhou, X.D., Z.W. De Beer, D.C. Tovar, B.D. Wingfield, M.J. Wingfield, 2004a. Characterisation of *Ophiostoma* species associated with pine bark beetles from Mexico, including *O. pulvinisporum* sp. nov. *Mycological Research* 108:690-698.
- Zhou, X.D., Z.W. De Beer, R. Ahumada, B.D. Wingfield, M.J. Wingfield, 2004b. *Ophiostoma* and *Ceratocystiopsis* spp. associated with two pine-infesting bark beetles in Chile. *Fungal Diversity* 15:261-274.

