

Resumen

El estudio consistió en identificación de microorganismos del genero *Phytophthora* que afecta a bosques naturales mixtos de *Pinus sp.* y *Quercus sp.* y a nivel de vivero que son de importancia socioeconómica en los departamentos de Guatemala y Sacatepéquez. Para el aislamiento de la especie de *Phytophthora* se procesaron muestras de suelo y tejido vegetal, utilizando la técnica del cultivo trampa propuesta por Erwin y Ribeiro, para el aislamiento de Oomicetos para especies de *Phytophthora* y *Pythium*, se utilizó manzana verde madura. En el departamento de Guatemala se obtuvieron de bosque natural un total cincuenta y cinco (55) muestras, diez (10) de *Quercus sp.* y cuarenta y cinco (45) de *Pinus sp.* A nivel de vivero se obtuvieron un total de noventa y nueve (99) muestras, once (11) de *Quercus sp.* y ochenta y ocho (88) de *Pinus sp.* En el departamento de Sacatepéquez se obtuvieron en bosque natural un total de sesenta y cuatro (64) muestras, quince (15) de *Quercus sp.* y cuarenta y ocho (48) de *Pinus sp.* En vivero se obtuvieron un total de ochenta y tres (83) muestras, cincuenta y ocho (58) de *Pinus sp.* y veinticinco (25) de *Quercus sp.* Después del procesamiento de las muestras se obtuvieron un total de trece positivas a la presencia de *Phytophthora sp.*, toda a nivel de vivero tanto en raíz como en suelo en *Pinus maximinoi* , diez (10) procedentes de viveros del departamento de Guatemala y tres (3) procedentes del departamento de Sacatepéquez. Los cultivos en PDA se obtuvieron cinco (5) colonias con crecimiento de tipo estolonífero, cinco (5) colonias con crecimiento tipo semipetaloide, una colonia con tipo de crecimiento estelado y dos colonias sin ningún tipo de patrón de crecimiento. De los ensayos de patogenicidad se utilizaron las especies de *Pinus caribaea*, *Pinus oocarpa*, *Pinus pseudostrobus Lindl*, *Pinus maximinoi* H.E. Moore y *Pinus tecunumanii*. Las pruebas de patogenicidad realizadas con la cepa VP16 mostraron un alta incidencia y severidad para las especies de *Pinus caribaea*, *Pinus oocarpa*, *Pinus pseudostrobus Lindl*, *Pinus maximinoi* H.E. Moore y en menor grado en *Pinus tecunumanii*. Se pudo observar en áreas de bosques muestreadas en

Sacatepéquez la presencia de insectos barrenadores, pero no se detectó la presencia de *Phytophthora sp.*, lo anterior demuestra que puede no podría existir una correlación entre la presencia de insectos y la presencia de *Phytophthora*. Debido a la falta de recursos económicos no se realizó la parte de la identificación a nivel molecular para determinar la especie. Esta parte se realizará durante el año 2014.

1. Introducción

En todo sistema de producción tanto a nivel agrícola como forestal la calidad del material de propagación tiene una vital importancia para obtener producciones de calidad y libres de enfermedades. Los viveros de plantas cultivadas como en este caso de viveros forestales tienen como función el obtener plántulas libres de microorganismos protegiendo el crecimiento de los árboles en sus primeras etapas para luego ser trasplantados. El mal del talluelo o damping off es un problema a nivel de la producción de plántulas forestales a nivel de vivero, asociada a Oomycetos (Singleton, L. et al 1992). Debido al escaso control en la producción de plántulas forestales a nivel de vivero y que se desconoce la presencia de microorganismos del género *Phytophthora* en plantaciones de bosques mixtos de *Pinus sp.* y *Quercus sp.* en los departamentos de Guatemala Sacatepéquez se realizó la esta investigación con la finalidad de identificar la presencia del género *Phytophthora* con el apoyo de la Facultad de Agronomía utilizando las instalaciones y equipo del Centro de Diagnostico Parasitológico del Universidad de San Carlos de Guatemala en donde se realizaron las pruebas de aislamiento y las pruebas de patogenicidad.

El estudio consistió en la identificación del microorganismo del género *Phytophthora* asociadas a especies forestales en bosques mixtos y viveros forestales de los departamentos de Guatemala y Sacatepéquez. La toma de muestras a nivel de campo y vivero fue de forma dirigida (French, 1980; Alvarez, 1988), siguiendo el criterio de asociación de síntomas visibles, y luego a nivel de

laboratorio se procedió al aislamiento siguiendo el proceso metodológico para Oomycetes.

Para el aislamiento de la especie de Phytophthora se procesaron muestras de suelo y tejido vegetal, utilizando la técnica del cultivo trampa propuesta por Erwin y Ribeiro, para el aislamiento de Oomicetos para especies de Phytophthora y Pythium, se utilizó manzana verde madura. En el departamento de Guatemala se obtuvieron de bosque natural un total cincuenta y cinco (55) muestras, diez (10) de *Quercus sp.* y cuarenta y cinco (45) de *Pinus sp.* A nivel de vivero se obtuvieron un total de noventa y nueve (99) muestras, once (11) de *Quercus sp.* y ochenta y ocho (88) de *Pinus sp.* En el departamento de Sacatepéquez se obtuvieron en bosque natural un total de sesenta y cuatro (64) muestras, quince (15) de *Quercus sp.* y cuarenta y ocho (48) de *Pinus sp.* En vivero se obtuvieron un total de ochenta y tres (83) muestras, cincuenta y ocho (58) de *Pinus sp.* y veinticinco (25) de *Quercus sp.* Después del procesamiento de las muestras se obtuvieron un total de trece positivas a la presencia de *Phytophthora sp.*, toda a nivel de vivero tanto en raíz como en suelo en *Pinus maximinoi*, diez (10) procedentes de viveros del departamento de Guatemala y tres (3) procedentes del departamento de Sacatepéquez. Los cultivos en PDA se obtuvieron cinco (5) colonias con crecimiento de tipo estolonífero, cinco (5) colonias con crecimiento tipo semipetaloides, una colonia con tipo de crecimiento estelado y dos colonias sin ningún tipo de patrón de crecimiento. De los ensayos de patogenicidad se utilizaron las especies de *Pinus caribaea*, *Pinus oocarpa*, *Pinus pseudostrobus* Lindl, *Pinus maximinoi* H.E. Moore y *Pinus tecunumanii*, solo se detectó la presencia de Phytophthora en *Pinus maximinoi* H.E. Moore. Se pudo observar en áreas de bosques muestreadas en Sacatepéquez la presencia de insectos barrenadores, pero no se detectó la presencia de *Phytophthora sp.*, lo anterior demuestra que puede no existir una correlación entre la presencia de insectos y la presencia de Phytophthora. Debido a la falta de recursos económicos no se realizó la parte de la identificación a nivel molecular para determinar la especie. Esta parte se realizará durante el año 2014.

2. Antecedentes

Los bosques mixtos son bastante comunes en el altiplano guatemalteco y son ecosistemas imprescindibles para la vida, con el avance de la frontera agrícola, crecimiento de áreas urbanas, la agricultura migratoria, incendios forestales, talas ilegales y el ataque de plagas y enfermedades cada día son más susceptibles a la pérdida de su diversidad biológica y podrían ser afectados por la introducción de nuevas especies y de microorganismos patógenos exóticos. Instituciones estatales y organismos no gubernamentales han establecidos programas a la reforestación con un fin social, comercial y ecológico.

Existen diversos viveros forestales de tipo comercial, municipal y comunales los cuales producen plántulas de diversas especies forestales las cuales utilizan formas de producción sin tomar en cuenta el origen del sustrato sobre el cual se producen las plántulas forestales existiendo una alta probabilidad de diseminar enfermedades al trasplantar éstas en el campo definitivo limitando su desarrollo y crecimiento y poniendo en riesgo poblaciones forestales adyacentes al introducir especies de microorganismos patógenos que pueden provocar epidemias afectando especies endémicas de la región.

Los bosques naturales mixtos del departamento de Guatemala y Sacatepéquez son de vital importancia para mantener un equilibrio ecológico para evitar erosión, contaminación de ríos y riachuelos, y tener siempre la función de captación del recurso agua para abastecer agua potable a poblaciones rurales y urbanas. Los países con cultura forestal están teniendo problemas con introducción de especies de patógenos forestales exóticas especialmente de tipo Oomyceto *Phytophthora* que a nivel mundial ha afectado el monocultivo de especies forestales teniendo un gran impacto económico a la destrucción de masas forestales de especies de importancia económica en Estados Unidos y Europa.

A nivel nacional no existe una entidad que certifique la calidad y la ausencia de microorganismos fitopatógenos en la producción artesanal y comercial de plantas forestales para reforestación. Así mismo, no existen laboratorios de diagnóstico fitopatológico que permitan la identificación rápida de microorganismos fitopatógenos especialmente a nivel de enfermedades virales y bacterias. Es importante el poder identificar la presencia o ausencia de microorganismos del tipo Oomycete especialmente del género *Phytophthora* que podrían llegar a provocar la muerte rápida de los bosques mixtos de *Pinus sp.* y *Quercus sp.*

3. Justificación

Las especies de *Phytophthora* son agentes fitopatógenos con características particulares, ciclo biológico con varias fases reproductivas, pueden sobrevivir por medio de estructuras de reposo, tienden a ser específicas a hospedantes y otras son omnívoras, causan severos daños a poblaciones de plantas en corto tiempo.

En Guatemala se tienen pocos registros de especies de *Phytophthora* asociadas a especies forestales, el proyecto FODECYT 1-2007, reporta la detección de *P. parasítica* en la especie palo blanco, *Rosedendrom donell smitthii* y *Phytophthora tropicalis*, en *Chile serrano*, *Capsicum annum*, clavel *Dianthus caryophyllus*, *Peperomia sp.*, *Pothos*, *Epipremnum pinnatum (L.) Engl.*, *Rosa*, *Rosa L.* y la importancia de este hallazgo es que estas especies causan problemas a especies forestales por lo que se hace necesario realizar una identificación de los mismos a nivel de especies forestales como *Quercus sp.* y *Pinus sp.*. Estas especies de *Phytophthora* se encuentran cuarentenadas en EEUU y Europa, debido a que se consideran un riesgo latente en países forestales, por lo que conocer y establecer la distribución de las mismas en Guatemala es de vital importancia con esta información podrá utilizarse como base para la formulación de planes de contingencia y manejo de masas forestales y viveros del país.

En los bosques naturales y bosques artificiales del país se ha observado la muerte progresiva de masas forestales, generalmente se le asocia a insectos barrenadores, pero no se ha estudiado de una forma sistémica la posible relación de plantas enfermas y la invasión de insectos.

Debido a la importancia que tienen los bosques en el país y en el caso de los departamentos de Guatemala y Sacatepéquez cuya trascendencia es de mayor relevancia debido a que funcionan como pulmones para la descontaminación urbana, regulan los ciclos lluviosos y son áreas de recarga hídrica para los mantos freáticos de donde se obtiene agua potable para la población urbana, la riqueza escénica y paisajista, así como el aprovechamiento en la industria maderera, refugios y conservación de vida silvestre ante el avance de la frontera urbana, y además proveen de espacios recreativos para los ciudadanos por lo que es necesario conservarlos y prevenir el apareamiento de enfermedades que puedan diezmar sus poblaciones y aumentar así el deterioro al que están expuestos por la presión social urbana.

La presente investigación pretende establecer en primera instancia la biodiversidad e incidencia de especies de *Phytophthora* asociada a muerte de arboles en bosques naturales de *Quercus sp.* y *Pinus sp.* y en viveros forestales, caracterizar síntomas y posibles socios ecológicos con otros organismos, establecer rango de hospedantes, registrar la distribución espacial y incidencia y patogenicidad.

La información obtenida será de utilidad por la detección de especies y su preferencia de hospedantes que pongan en riesgo el sistema forestal, servirá de base para transpolar la información a otras regiones del país y será de trascendencia para la formulación de planes de manejo en bosques y la prevención de la expansión por medio de plantas obtenidas en viveros lo que se traduce técnicamente en reducción de pérdidas económicas por muerte de plántulas en viveros y muerte de arboles trasplantados

La participación de la Universidad Estatal de Kansas permitirá realizar la identificación de los microorganismos del genero Phytophthora a través de análisis molecular, y permitirá dejar las bases para dar continuidad a la cooperación interinstitucional. De la misma manera se fortalecerán las relaciones con instituciones nacionales como el INAB y las municipalidades del departamento para la transferencia de los conocimientos y resultados que se obtengan de la investigación.

La utilización de técnicas modernas de identificación y diagnóstico utilizando métodos moleculares permitirá la identificación de estos microorganismos en forma rápida, eficiente y con un alto grado de confiabilidad.

4. Objetivos

4.1 General

Realizar la identificación de microorganismos del genero Phytophthora que afecta a bosques naturales mixtos de *Quercus sp.* y *Pinus sp.* de los departamentos de Guatemala y Sacatepéquez

4.2 Específicos

- a) Identificar a microorganismos del genero Phytophthora que afectan especies de *Quercus sp.* y *Pinus sp.* en bosques naturales y viveros forestales.
- b) Determinar por métodos morfomoleculares las especies de Phytophthora asociadas a bosques naturales de *Quercus sp.* y *Pinus sp.* y viveros forestales.
- c) Determinar la incidencia de las especies de Phytophthora.
- d) Realizar pruebas de patogenicidad de las especies de Phytophthora en las especies forestales que afectan.

- e) Establecer si se da la relación entre especies de *Phytophthora* y especies de insectos barrenadores por medio de la incidencia simultánea.

5. Metodología

5.1 Descripción del área bajo estudio

Las áreas seleccionadas para realizar esta investigación fueron plantaciones de bosques naturales y artificiales ubicadas en los departamentos de Guatemala y Sacatepéquez. Así como viveros forestales municipales encontrados en dichas áreas. La investigación se realizó en cinco fases:

5.1.1 Primera fase: Planificación

En el caso de bosques se tomó la metodología empleada en inventarios forestales, se emplearon mapas de uso de la tierra a escala 1:50000 de los departamentos de Guatemala y Sacatepéquez para determinar la cobertura de bosque mixto *Quercus sp.*, y *Pinus sp.*

Para obtener el número de muestras a nivel de bosque natural mixto se empleó el método simple aleatorio con la ecuación:

$$n = \frac{z^2 pq}{e^2}$$

Donde:

- n = tamaño de la muestra
- z = 1,645 para un nivel de confianza del 90%
- p = prevalencia esperada
- q = 1-p
- e = precisión o error admitido

Para la obtención de muestras a nivel de vivero se utilizó el método sistemático de acuerdo a la cantidad y forma de distribución de las plantas en los viveros, para el cálculo de plantas se utilizará la siguiente ecuación:

$$n = \frac{N Z^2 \sum N_n S_n^2}{N^2 e^2 + Z^2 \sum S_n^2 N_n S_n^2}$$

Donde:

- n = tamaño de la muestra
- z = 1,645 para un nivel de confianza del 90%
- Sn = Desviación estándar
- e = Precisión o error admitido
- Nn = Probabilidad de Ocurrencia

5.1.2 Segunda Fase: Muestreo

En bosques se priorizaron áreas como: bosques comunales, con potencial ecológico, parques o reservas naturales. Con el apoyo de técnicos y personal municipal, se realizaron caminamientos dirigidos hacia áreas previamente seleccionadas, la toma de muestras fue al azar, obteniendo suelo adyacente a raíces de árboles.

A nivel de vivero se obtuvieron muestras completas (suelo y raíces), se realizó un muestreo sistemático, las cuales fueron variables debido a la cantidad de plantas por vivero y forma de distribución de las mismas en vivero. Para la colecta se siguió el criterio de asociación de síntomas.

Las muestras se colocaron dentro de una bolsa de polietileno y se procedió a identificar con número de correlativo, especie colectada, localidad y coordenadas geográficas.

5.1.3 Tercera Fase: Laboratorio

Para determinar la presencia de microorganismos se procesaron muestras a partir del suelo y de tejido vegetal. Se utilizó la técnica del cultivo trampa

propuesta por Erwin y Ribeiro, para el aislamiento de Oomycetos específicamente especies de *Phytophthora* y *Pythium*, se utilizó manzana verde madura. El procedimiento utilizado fue el siguiente:

- a) Aislamiento a partir de Tejido Vegetal, Siembra Directa en medio Selectivo - PARPBH-
- b) Aislamiento de *Phytophthora* a partir de suelo: Se utilizó la técnica del cultivo trampa en este caso, manzana verde. Re-aislamiento en medio selectivo PARB con Himexazol y PARB sin Himexazol.
- c) Purificación: En medio papa dextrosa agar (PDA).
- d) Producción de estructuras sexuales y asexuales: Se realizó en medio agar jugo V-8 T (Erwin y Ribeiro, 1996).
- e) Conservación de los aislados: En frascos una mezcla de turba, arena y jugo V8, selladas con Parafilm y papel aluminio y a temperatura ambiente.
- f) Caracterización morfológica: La identificación se realizó de acuerdo a las características morfológicas de las colonias obtenidas en medio AMA, según la morfología del micelio, de los esporangios, y de las oosporas. La identificación se efectuó conforme las claves morfológicas de Watherhouse (1963), Newhook *et al.* (1978) y Erwin y Ribeiro (1996).

5.1.4 Cuarta Fase: Pruebas de patogenicidad

Se realizó la siembra de 5 especies de pino: Las semillas se colocaron en tubetes para la germinación. La inoculación se llevo a cabo a los 45 días de edad, colocando 2000 zoosporas/ml en la base del tallo. Por cada cepa a evaluar su patogenicidad se inocularon 6 plantas. Al grupo testigo se le aplico agua destilada estéril y se utilizó un modelo completamente al azar.

6. Resultados

6.1 Muestras

Durante la ejecución del proyecto, se analizaron trescientos un (301) muestras, procedentes de distintas áreas de bosque y viveros municipales, de los Departamentos bajo estudio Guatemala y Sacatepéquez. Divididas en ciento diecinueve (119) colectadas en bosque y ciento ochenta y dos (182) en vivero.

Mayormente se encontró Pino candelillo (*Pinus maximinoi* H.E. Moore), y *Quercus* sp. En bosques y viveros para la toma de muestras se asocio signos visibles como: amarillamiento, marchitamiento de la plántula, escaso desarrollo y pudrición radicular. En la figura 1, se puede observar el escaso desarrollo de *Pinus maximinoi* H.E. Moore en una plantación de alrededor de cinco años de edad y un amarillamiento incipiente. En la figura 2, se puede ver la muerte descendente, necrosis de los fascículos del pino y amarillamiento de plántulas de pino producidas a nivel de vivero.

Los muestreos en bosques se llevaron a cabo en áreas con presencia de barrenadores, de acuerdo a muestras tomadas en pastores Sacatepéquez.



Figura 1. Escaso desarrollo y amarillamiento en *Pinus maximinoi* en el Departamento de Sacatepéquez.

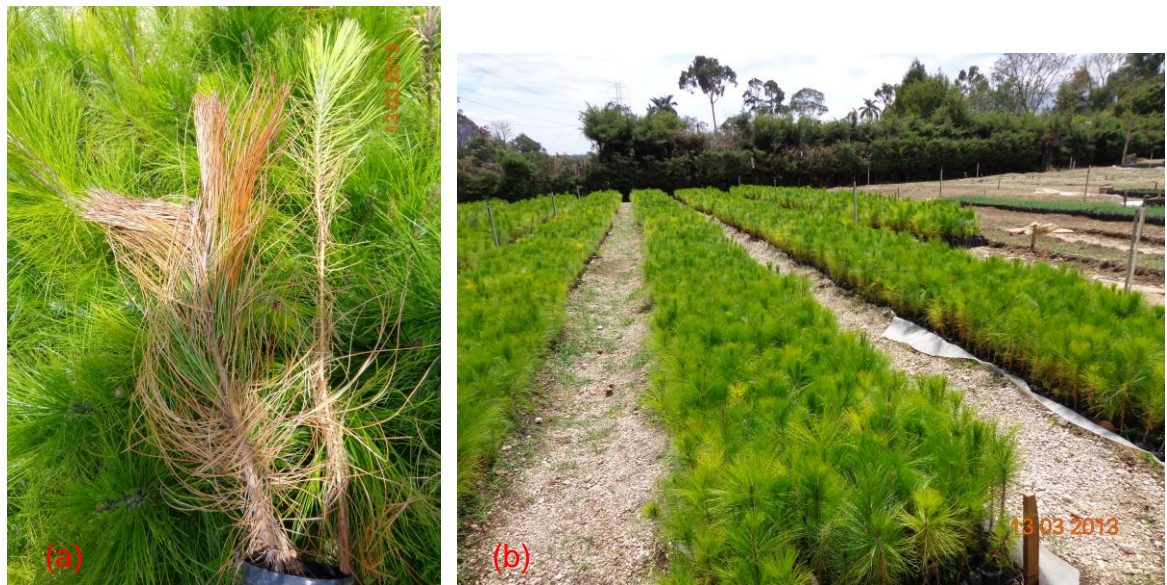


Figura 2. (a) Necrosis de las fascículos de pino y muerte descendente de la plántula. (b) Amarillamiento de la parte apical de las plantas y también de acículas necrosadas en la base del tallo.

En el Departamento de Guatemala se muestrearon los municipios: Amatitlán, Chinautla, Chuarrancho, Guatemala, Mixco, Palencia, San José del Golfo, San Juan sac., San Miguel Petapa, San Pedro Ayampuc, San Pedro Sac., San Raymundo, Villa Canales y Villa Nueva. Destacando áreas como El Parque Ecológico La Cerra, Parque Naciones Unidas y La Escuela Nacional Central de Agricultura ENCA. En bosque se obtuvo un total de cincuenta y cinco (55) muestras, diez (10) Quercus y cuarenta y cinco (45) de Pino. En vivero se colectó un total de noventa y nueve (99) muestras, once (11) de Quercus, y ochenta y ocho (88) de Pino.

En el Departamento de Sacatepéquez se muestrearon los Municipios Antigua Guatemala, Ciudad Vieja, Jocotenango, Pastores Sac., San Lucas Sac., San Miguel Dueñas, Santa Lucía Milpas Altas, Santa María de Jesús, Santiago Sac., y Santo Domingo Xenacoj. En bosque se obtuvieron sesenta y cuatro (64) muestras, quince (15) de Quercus, cuarenta y ocho (48) de Pino y una (1) de Ciprés Común. En vivero se obtuvieron ochenta y tres (83) muestras en total, cincuenta y ocho (58) de Pino y veinticinco (25) de Quercus.

6.2 Aislamiento



Figura 3. (a) Frutos de manzana inoculados con suelo, presentan síntomas de la presencia de Oomycetos. (b) La fruta con la lesión externa, a la izquierda la misma fruta cortada para ser procesada en el siguiente paso del aislamiento.

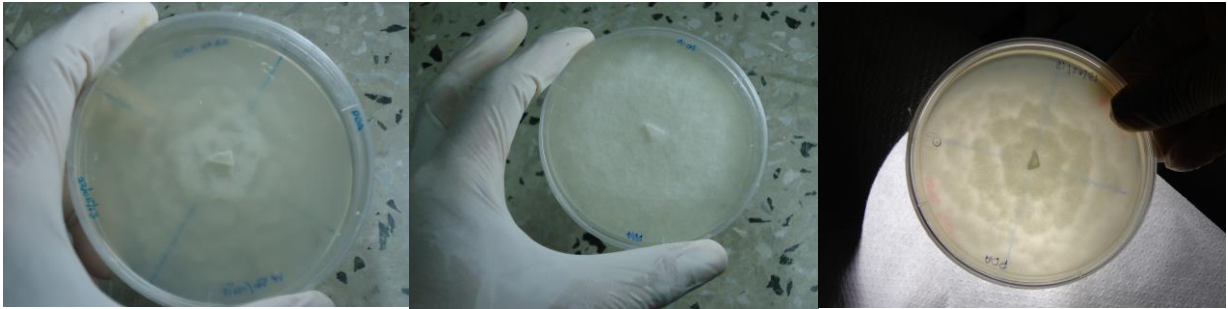


Figura 4. Resultados positivos con la presencia de *Phytophthora sp.* en medio de PDA, de cultivos procedentes de raíces y suelo en manzana.

En el cuadro 1 se puede observar que de todas las muestras procesadas solo trece (13) de ellas fueron positivas identificándose la presencia de *Phytophthora sp.* De los aislados positivos diez (10) fueron de muestras colectadas en viveros localizados en el departamento de Guatemala, tres (3), procedentes de viveros del departamento de Sacatepéquez.

Cuadro 1. Listado de aislados positivos con presencia de *Phytophthora*

No.	No. Correlativo laboratorio	Aislamiento a partir de donde	Especie	Descripción
1	VP16	suelo	<i>P. maximinoi</i>	Vivero Municipal San Miguel Petapa
2	VP89	raíz	<i>P. maximinoi</i>	vivero ENCA
3	VP47	raíz	<i>P. maximinoi</i>	vivero ENCA
4	VP82	suelo	<i>P. maximinoi</i>	vivero ENCA
5	VP62	raíz	<i>P. maximinoi</i>	vivero ENCA
6	VP03	suelo	<i>P. maximinoi</i>	Vivero Municipal San Miguel Petapa
7	VP56	raíz	<i>P. maximinoi</i>	vivero ENCA
8	VP08	suelo	<i>P. maximinoi</i>	Vivero Municipal San Miguel petapa
9	VP58	raíz	<i>P. maximinoi</i>	vivero ENCA

10	VP170	raíz	<i>P. maximinoi</i>	vivero ENCA
11	VP167	raíz	<i>P. maximinoi</i>	Vivero Municipal Pastores
12	VP164	raíz	<i>P. maximinoi</i>	Vivero Municipal Pastores
13	VP167	raíz	<i>P. maximinoi</i>	Vivero Municipal Pastores

En la figura 5 se detallan los puntos de los viveros donde se logro aislar *Phytophthora sp.* en el departamento de Guatemala. En la figura 6 se talla el punto del vivero de *Pinus maximinoi* donde se aisló *Phytophthora sp.*

Figura 5. Localización de puntos de muestreo con presencia de *Phytophthora sp.*, en el Departamento de Guatemala.

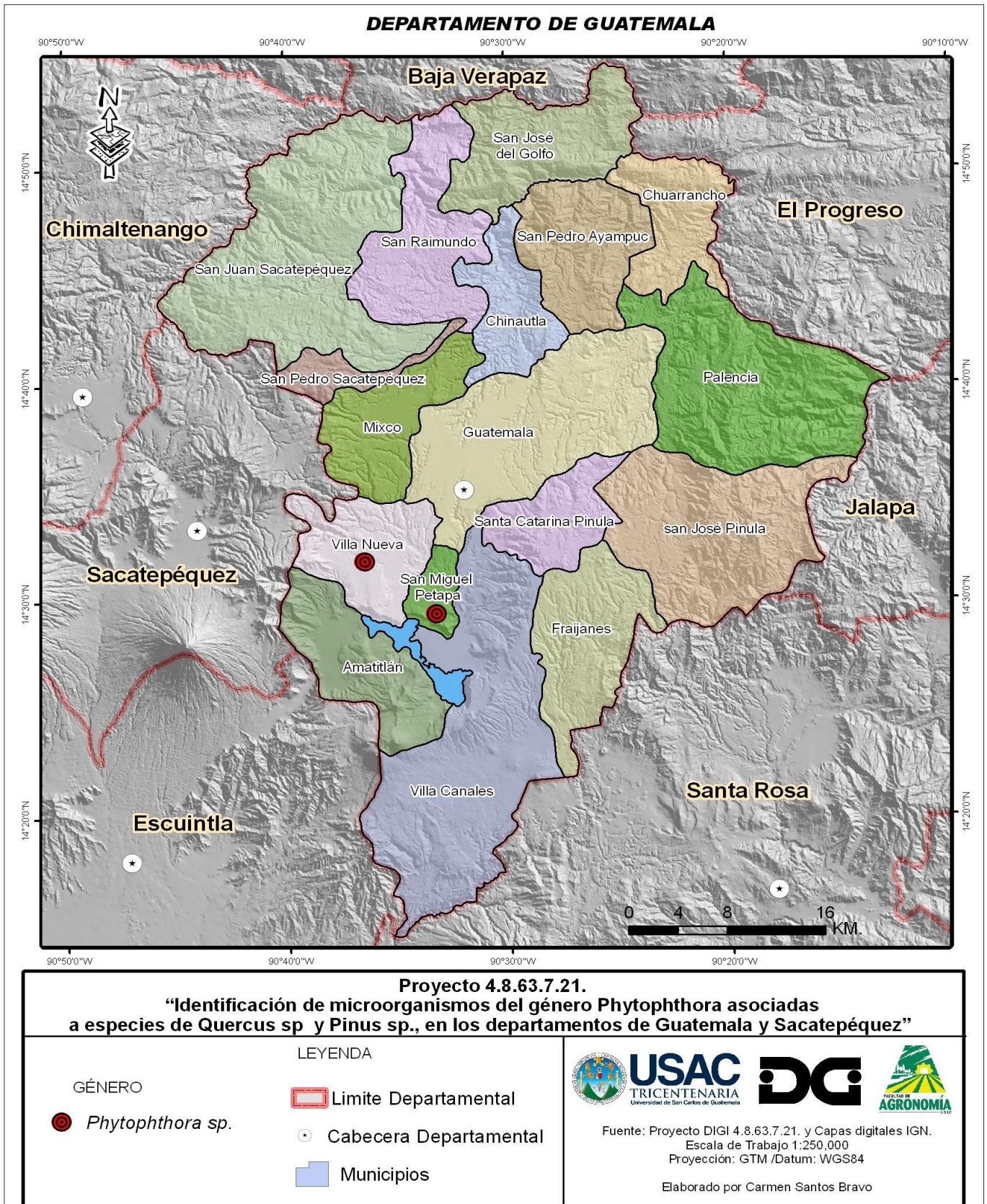
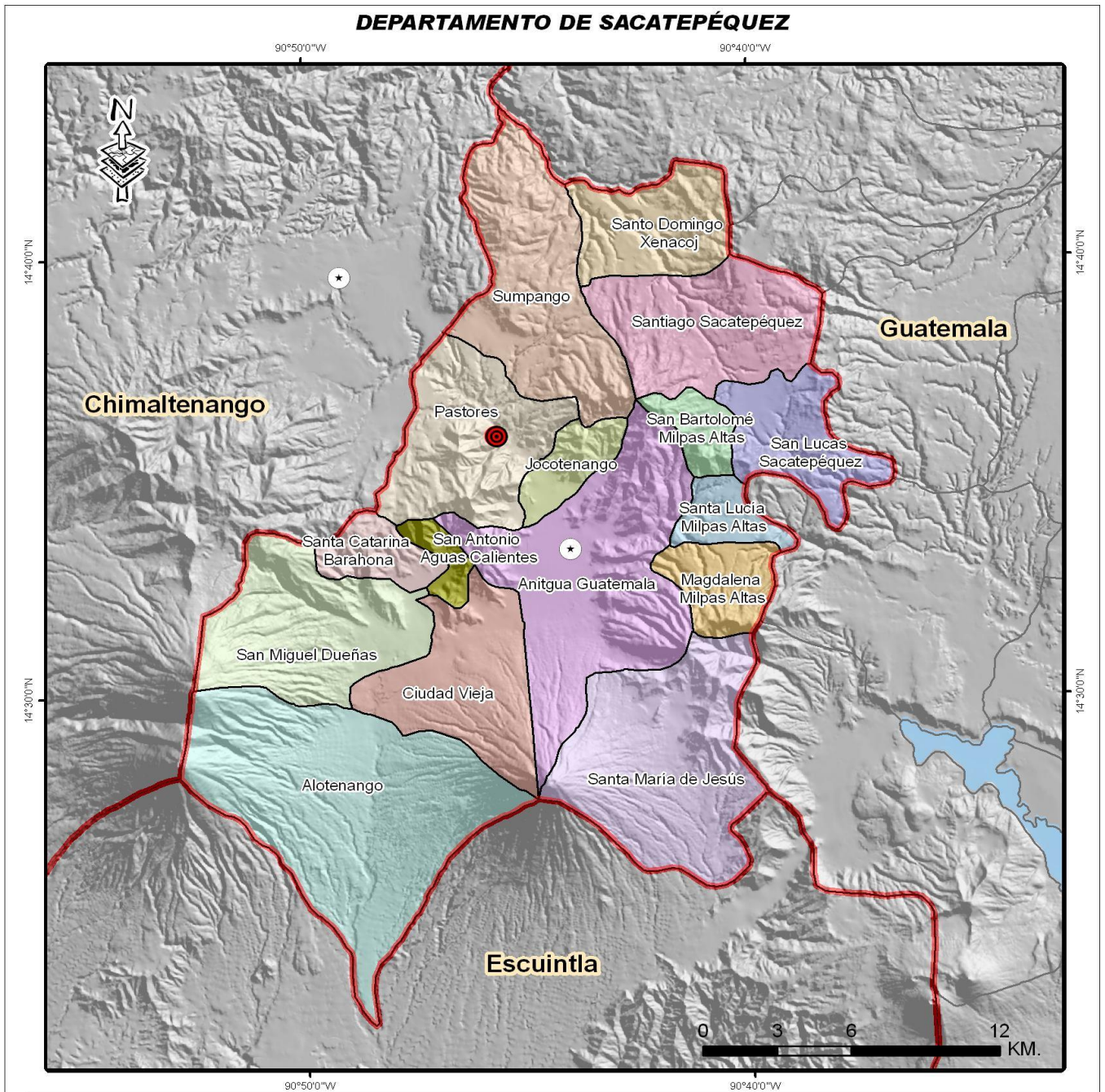



Figura 6. Localización de puntos de muestreo con presencia de *Phytophthora* sp., en el Departamento de Sacatepéquez.



Proyecto 4.8.63.7.21.
“Identificación de microorganismos del género *Phytophthora* asociadas a especies de *Quercus* sp y *Pinus* sp., en los departamentos de Guatemala y Sacatepéquez”

<p>GÉNERO</p> <p>● <i>Phytophthora</i> sp.</p>	<p>LEYENDA</p> <p>▭ Limite Departamental</p> <p>○ Cabecera Departamental</p> <p>▭ Municipios</p>	 <p>Fuente: Proyecto DIGI 4.8.63.7.21. y Capas digitales IGN. Escala de Trabajo 1:250,000 Proyección: GTM /Datum: WGS84 Elaborado por Carmen Santos Bravo</p>
--	--	--

Siguiendo la técnica de aislamiento para las cepas positivas, donde se observo el crecimiento miceliar en los diferentes medios de cultivo utilizados según metodología para el aislamiento, purificación y esporulación de estructuras sexuales. En medio agar patata dextrosa (PDA), se realizo la caracterización de patrones de crecimiento (Erwin y Riveiro, 1996). Así como medición de esporangios en medio avena agar V-8. El cuadro 2 contiene una descripción de las 13 aislamientos que dieron positivo a *Phytophthora sp.* procedentes de suelo y raíces de *Pinus maximinoi*, así también el tipo de crecimiento que del Oomycete en medio de PDA. La figura 7 muestra una descripción pictográfica de las características de crecimiento que se utilizan como uno de los parámetros para identificar especies de *Phytophthora* desarrolladas en medio PDA, según metodología Erwin D. Riveiro O. 1996.

Cuadro 2. Descripción de las características de los aislados de *Phytophthora sp.*

No.	Correlativo	Aislamiento a partir de	Especie forestal	PROCEDENCIA	CRECIMIENTO EN PDA	MEDIA ESPORANGIOS	
						LARGO	ANCHO
1	VP08	suelo	<i>P. Maximinoi</i>	Vivero San Miguel Petapa	Estolonífero	24.0093	19.3207
2	VP16	suelo	<i>P. Maximinoi</i>	Vivero San Miguel Petapa	Estolonífero	12.5853	11.1553
3	VP47	raíz	<i>P. Maximinoi</i>	Vivero ENCA	sin patrón	15.949	15.045
4	VP54	raíz	<i>P. Maximinoi</i>	Vivero ENCA	semipetaloide	19.2313	17.738
5	VP56	raíz	<i>P. Maximinoi</i>	Vivero ENCA	semipetaloide	18.2413	16.438
6	VP58	raíz	<i>P. Maximinoi</i>	Vivero ENCA	semipetaloide	15.266	14.069
7	VP62	raíz	<i>P. Maximinoi</i>	Vivero ENCA	sin patrón	24.641	20.337
8	VP82	suelo	<i>P. Maximinoi</i>	Vivero ENCA	semipetaloide	26.6767	20.3813
9	VP89	raíz	<i>P. Maximinoi</i>	Vivero ENCA	semipetaloide	16.58	15.805
10	VP164	raíz	<i>P. Maximinoi</i>	Vivero pastores	Estolonífero	29.568	24.3073
11	VP167	raíz	<i>P. Maximinoi</i>	Vivero pastores	Estolonífero	47.966	40.4093
12	VP168	raíz	<i>P. Maximinoi</i>	Vivero pastores	Estolonífero	18.085	16.596
13	VP170	raíz	<i>P. Maximinoi</i>	Vivero ENCA	Estelado	16.168	15.5153

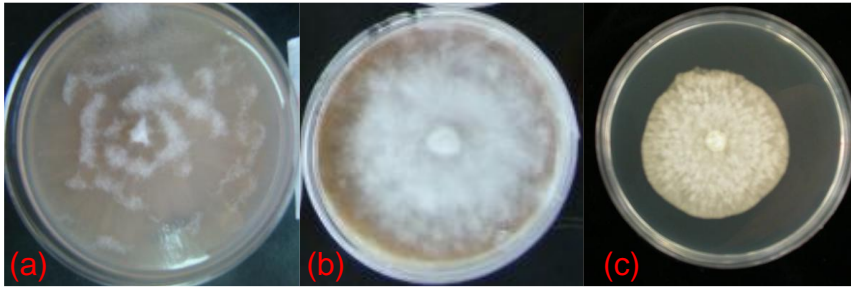


Figura 7. Descripción pictográfica de las características de crecimiento de *Phytophthora* sp. en medio PDA. (a) Semipetaloid. (b) Sin patrón y (c) Estolonífero.
Fuente: Propias y Erwin D. Riveiro O. 1996.

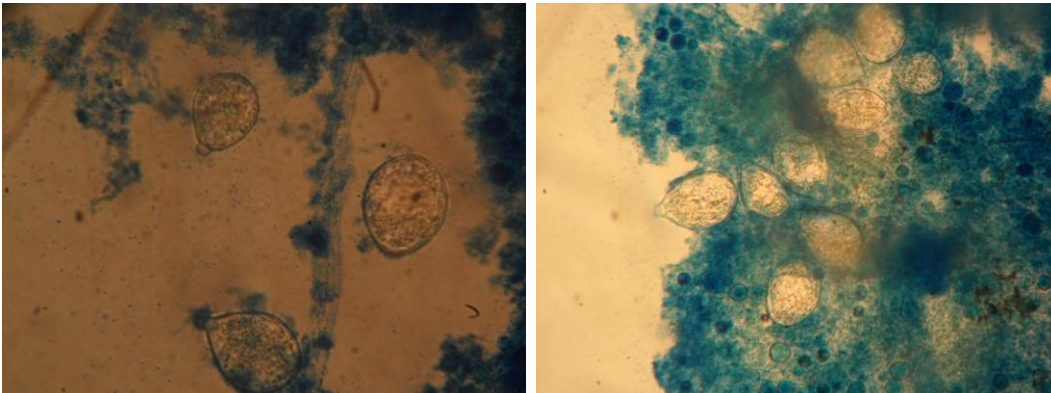


Figura 8. Esporangios de *Phytophthora* sp. forma u ovoide. Esporangios no papilados y no caducos

6.3 Ensayo de patogenicidad

En la figura 9, se observa el establecimiento del bioensayo bajo condiciones controladas un invernadero ubicado en el Centro Experimental Docente de la Facultad de Agronomía CEDA de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Se utilizaron semillas de *Pinus Caribaea* (P. Macho), *Pinus Oocarpa* (P. Amarillo o P. Avellano), *Pinus Pseudostrobus* Lindl (P. Blanco), *Pinus Maximinoi* H.E. Moore (P.

Candelillo), *Pinus Tecunumanii* (P. Pátula), para la obtención de plántulas sanas para su inoculación con aislamientos de *Phytophthora* sp.



Figura 9. Establecimiento de pruebas de patogenicidad en pino para verificar daños causados por el género *Phytophthora* en muestras procedentes de los muestreos en el departamento de Guatemala y Sacatepéquez.

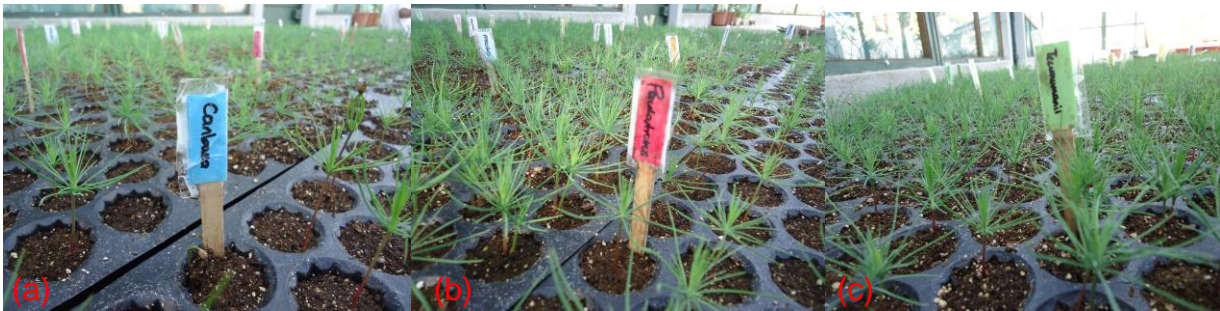


Figura 10. (a) Plántulas de *Pinus caribaea*. (b) Plántulas de *Pinus pseudostrobus*. (c) Plántulas de *Pinus tecunumanii*.

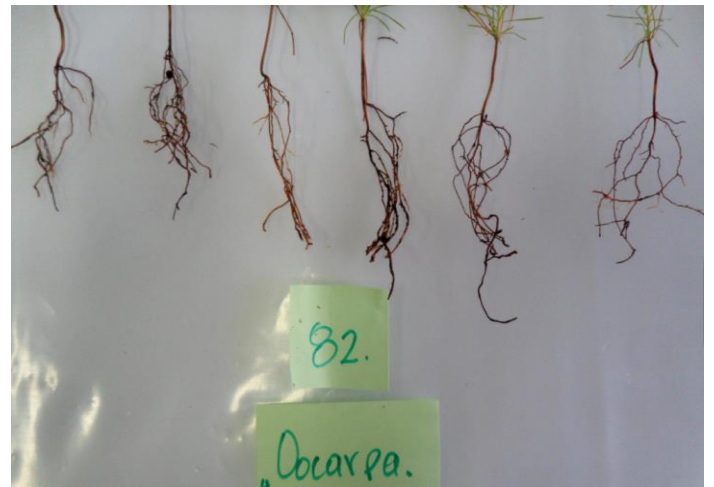


Figura 11. Testigos de *Pinus caribaea*, *Pinus pseudostrobus*, *Pinus maximinoi*, *Pinus Oocarpa* y *Pinus tecunumanii* con crecimiento normal de su sistema radical, sin ningún síntoma de la presencia de *Phytophthora sp.*



Figura 12. Las especies de *Pinus caribaea*, *Pinus pseudostrobus*, *Pinus maximinoi*, *Pinus Oocarpa* y *Pinus tecunumanii*, con reducción de sistema radicular debido a la presencia de *Phytophthora* sp.

Se seleccionó la cepa correlativo VP16 de vivero de San Miguel Petapa para realizar las pruebas de patogenicidad y así poder determinar la incidencia y severidad causadas por *Phytophthora sp.*

Cuadro 3. Resumen de datos de incidencia y severidad para el aislado VP16 obtenido de un vivero del departamento de Guatemala.

	Cepa	Especie forestal	Incidencia (%)	Severidad (%)
1	VP16	<i>P. Maximinoi</i>	80	85
2	VP16	<i>P. oocarpa</i>	70	69
3	VP16	<i>P. tecunumanii</i>	40	30
4	VP16	<i>P. pseudostrobus</i>	75	80
5	VP16	<i>P. caribaea</i>	40	35

7. Discusión

Santos Bravo, M. del C. (2008) reporta que muestras obtenidas en un vivero de Pastores, Sacatepéquez de *P. maximinoi* H.E. Moore dieron negativo a la presencia de *Phytophthora sp.* aunque las plantas presentaban síntomas característicos provocados por *Phytophthora sp.* como síntomas de muerte vascular y pudrición radicular. Esto contradice los resultados obtenidos en este estudio en donde muestras de raíces de *P. maximinoi* H.E. Moore dieron positivo a la presencia de *Phytophthora sp.* Es importante resaltar que Santos Bravo, M. del C. (2008) reporta la presencia de *P. cinnamomi* en *P. maximinoi* H.E. Moore, en Tecpan y San Andrés Itzapa lo cual de alguna razón podría tener relevancia debido a que Alvarez Valenzuela, G. A. (2007) reporta la presencia de *Phytophthora sp.* en *Persea americana*, la cual es una especie frutal que se cultiva y crece en forma natural en cerca de los bosque mixtos de Guatemala. Santos Bravo, M. del C. (2008), encontró *Phytophthora sp.* en pino triste *Pinus*

pseudostrobus Lindl, en San Miguel Petapa, municipio de Guatemala. Así mismo al muestrear plantas de *P. maximinoi* H.E. Moore en viveros de Bárcenas, en el 2008, no se detectó la presencia de *Phytophthora sp.*, lo cual contradice los resultados encontrados en este estudio donde se logró el aislamiento de *Phytophthora sp.* en las muestras VP47, VP54, VP56, VP58, VP62, VP82, VP89 y VP170. Estos resultados variables a través del tiempo pueden deberse a factores como variabilidad en el manejo de los viveros, y otros factores como origen del material que se utiliza como sustrato y la calidad de la procedencia de la semilla de estas especies. Debido a la falta de recursos económicos no se pudo avanzar en la utilización de análisis molecular para tener una mayor precisión en la determinación del agente causal. Esta determinación se estará realizando durante el año 2014. Con la detección de la presencia de *Phytophthora sp.* en viveros forestales demuestra que éstas se convierten en fuente de inóculo primario al momento de trasplante en el campo definitivo provocando la diseminación de la enfermedad en plantaciones recién establecidas y a otras especies forestales susceptibles.

La cepa VP16 que se utilizó para las pruebas de patogenicidad expresó su capacidad de producir severidad y un alto porcentaje de incidencia en la especie de la cual fue aislada en este caso *P. maximinoi* H.E. Moore, aunque los niveles de incidencia y severidad en *Pinus oocarpa* y *Pinus pseudostrobus* también reflejan valores altos. Presentando valores bajos en la especie de *Pinus tecunumanii*. Es importante resaltar que se evaluó una sola cepa, por lo que es imposible con este estudio poder determinar la variación genética patogénica de las 13 cepas.

8. CONCLUSIONES

La cepa VP16 aislada de viveros de San Miguel Petapa del departamento de Guatemala produjo los síntomas característicos que produce un ataque de *Phytophthora sp.* en plántulas de pino, como lo es la necrosis en la base del tallo,

amarillamiento y reducción el crecimiento normal de las plántulas de las 5 especies de pino inoculadas.

Los viveros forestales del departamento de Guatemala y Sacatepéquez son afectados por la presencia de *Phytophthora sp.* especialmente afectando a *Pinus maximinoi* H.E. Moore, la cual está asociada a síntomas como marchitez rápida, defoliación, amarillamiento, pudrición, ahorcamiento y decoloración.

Además no se pudo encontrar la presencia de *Phytophthora sp.* a nivel del bosque en árboles de otras especies de pino, de *Quercus sp.* y de ciprés común. Tampoco se pudo aislar *Phytophthora sp.* de plántulas de *Quercus sp.* a nivel de vivero en ninguna de las localidades muestreadas.

9. RECOMENDACIONES

- 9.1. El estado de Guatemala a través del Ministerio de Agricultura y Medio Ambiente deben normar la producción de plantas forestales y especies cultivadas con la finalidad de tener material de alta calidad y libre de enfermedades, con la finalidad de evitar la introducción y diseminación de enfermedades o patógenos exóticas, que en determinada situación provocar daño irreversible a especies forestales de importancia económica y para el sostenimiento de la vida humana.
- 9.2. Continuar con la identificación a nivel de especie utilizando técnica alternativa como el análisis molecular por extracción de ADN, para lograr definir si la especie es endémica o representa un peligro para las especies forestales del país.

- 9.3. Que el MAGA o el INAB acrediten y certifiquen los viveros que producen plantas forestales libres de enfermedades y así evitar la introducción de microorganismos exóticos.

10. Bibliografía

1. Agrios, GN. 2005. Plant pathology. US, Academic Press. 922 p.
2. Alvarado-Rosales D; Saavedra-Romero L; Alamzar-Sánchez A. 2008. Primer reporte de *Phytophthora cinnamomi* Rands: asociado al encino (*Quercus* spp.) en Tecoaapa, Guerrero, México (en línea). Agrocencia no. 45:565-572. Consultado 23 mayo 2011. Disponible en:<http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v42n5/v42n5a8.pdf>
3. Álvarez, C. V. 1988. Tamaño de muestra: procedimientos usuales para su determinación. Tesis MSc. Chapingo, México, Colegio de Post-Graduados. 176 p.
4. Brasier, C. 2003. *Phytophthoras* en los bosques europeos: muerte súbita del roble (en línea). St. Paul, Minnesota, US, APS. Consultado 4 mayo 2010. Disponible en http://www.scientificsocieties.org/aps/proceedings/sod/pdf/Brasier.pdf&usg=ALkJrhjtaZSVuCK_1dokr74fX0BXRTsHGg
5. Erwin, DC; Ribeiro, OK. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. St. Paul, Minnesota, US, The Am. Phytopath. Soc. 561 p.
6. French, ER; Herbert, TT. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. San José, Costa Rica, IICA. p. 3-7 (Serie Libros y Materiales Educativos no. 43).
7. Escalante-Estrada, Y.I. 2001. Variabilidad patogénica de *Phytophthora parasítica* Dastur en Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). Revista Mexicana de Fitopatología, enero-junio, año/vol.19,número 001. 84-89 pp.
8. New Disease Reports 2006. First record of *Phytophthora tropicalis* causing leaf blight in fruits in Brazil. Consultado 20 de marzo 2008. Disponible en: <http://www.bspp.org.uk/ndr/jan2006/2005-73.asp>
9. Newhook, F.J., Waterhouse, G.M., and Stamps, D.J. 1978. Tabular key to the species of *Phytophthora* de Bary. Mycol. Pap. **143**: 1–20.

10. North American Plant Protection Organization. 2006. Phytosanitary Alert System. *Phytophthora tropicalis*. Consultado 5 de abril de 2008. Disponible : <http://www.pestalert.org/viewNewsAlert.cfm?naid=14>
11. Rizzo D M; Garbelotto M; Davidson J M; Slaughter G W; Koike S T (2002). *Phytophthora ramorum* as the cause of extensive mortality of *Quercus* spp. and *Lithocarpus densiflora* in California. *Plant Disease* **86**, 205-214.
12. Rizzo, D.M.; Garbelotto, M. 2003. Sudden oak death: endangering California and Oregon forest ecosystems. *Frontiers in Ecology and Environment*. 1(5): 197–204.
13. Sánchez Hernández, ME; Sánchez Solana, JE; Navarro Cerrillo, RM; Fernández Rebollo, P; Trapero Casas, A. 2003. Incidencia de la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* en masas de *Quercus* en Andalucía (en línea). España, UCO, Helvia, Sanidad Vegetal no. 29 (junio 10, 2002). 108 p. Consultado 15 ago 2009. Disponible en: http://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/2434/Trapero_Casas_22.pdf?sequence=1
14. Santos Bravo, M del C. 2011. Bioprospección y diversidad de *Phytophthora* y *Phytium* asociados a especies forestales de importancia económica en la región central de Guatemala, en fase de viveros. Guatemala, FAUSAC / CONCYT. 98 p.
15. Torres, A *et al.* 2006. Qué papel juega el hongo *Phytophthora cinnamomi* en el desarrollo de la regeneración natural y las repoblaciones de encina y alcornoque (en línea). España, Universidad de Huelva, Departamento de Fitopatología, Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico, consejería de Agricultura y Medio Ambiente. no. 1. Consultado 8 abr 2010. Disponible en: <http://www.uhu.es/cideu/Boletin/Bol1CIDEU53-63.pdf>
16. Vázquez M, JP; Pintos V, C. 2007. Aislamiento de *Phytophthora cinnamomi* Rands en viveros forestales de *Pinus radiata* (en línea). In Congreso Nacional Forestal (2007, ES). España, Estación Fitopatológica “Do Areeiro”. Consultado 16 ago 2011. Disponible en: <http://www.efadip.org/comun/publicaciones/posters/antes/1997%20Pamplona/Posterph.pdf>
17. Waterhouse, GM. 1963. Key to the species of *Phytophthora* De Bary. *Mycol. Pap. Kew, UK, Commonw. Mycol. Inst.* 22 p.
18. Werres S; Marwitz R; Man in't Veld W A; De Cock A W A M; Bonants P J M; De Weerd M; Themann K; Ilieva E; Baayen R P (2001). *Phytophthora*

ramorum sp. nov., a new pathogen on Rhododendron and Viburnum.
Mycological Research 105, 1155-1165.

19. Wingfield, MJ. 2007. A new species of *Phytophthora* associated with dying pine needles in Chile (en línea). South África, Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI), University of Pretoria, Pretoria. Consultado 14 jul 2011. Disponible en: <http://www.fabinet.up.ac.za/tpcp/pinifolia>