



## HISTOPATOLOGÍA DEL PINO DE LAS ALTURAS (*Pinus hartwegii* Lindl.) INOCULADO CON TRES HONGOS OPHIOSTOMATOIDES

### HISTOPATHOLOGY OF HARTWEG PINE (*Pinus hartwegii* Lindl.) INNOCULATED WITH THREE OPHIOSTOMATOID FUNGI

Omar Alejandro Pérez-Vera<sup>1</sup>; Elizabeth Cárdenas-Soriano<sup>1</sup>; Dionicio Alvarado-Rosales<sup>1</sup>; David Cibrián-Tovar<sup>3</sup>; Armando Equihua-Martínez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Carretera México-Texcoco, km 36.5, Montecillo, Estado de México, C.P. 56230.

<sup>2</sup>Programa de Entomología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Carretera México-Texcoco, km 36.5, Montecillo, Estado de México, C.P. 56230.

<sup>3</sup>División de Ciencias Forestales (DICIFO), Universidad Autónoma Chapingo, C. P. 56230. Chapingo, Estado de México. Correo-e: oalejandroversa@gmail.com

#### RESUMEN

El objetivo de este estudio fue identificar las alteraciones histológicas en el pino de las alturas (*Pinus hartwegii*) causadas por tres especies de hongos ophiostomatoides, por medio de microscopía de luz. En *Pinus hartwegii* hubo acumulación de resina en la zona de inoculación a los diez días, y el follaje se tornó de amarillo a café rojizo a los 60 días. En las inoculaciones con *Leptographium guttulatum* y *Ophiostoma olivaceapinii* se observó que inducen la metabolización de polifenoles, depositándose en las paredes de las células de la corteza, el floema, cambium vascular y en la médula se necrosaron. *O. ips* causó necrosis más severa en corteza, floema, cambium vascular y médula. En xilema, las hifas de los tres hongos penetran en las traqueidas y avanzan longitudinalmente por las puntuaciones aeroladas y se distribuyen radialmente por células parenquimatosas y radios.

Recibido: 11 de marzo, 2010  
Aceptado: 28 de septiembre, 2010  
doi: 10.5154/r.rchscfa.2010.03.006  
[http:// www.chapingo.mx/revistas](http://www.chapingo.mx/revistas)

**PALABRAS CLAVE:** Manchado azul, galerías, descortezadores, cambios estructurales.

#### ABSTRACT

The goal of this study was to identify the histological alterations in hartweg pine (*Pinus hartwegii*) caused by three species of ophiostomatoid fungi by means of light microscopy. There was an accumulation of resin in the inoculated zone within 10 days, and foliage of inoculated seedlings turned yellow and reddish-brown at 60 days. With inoculation of *Leptographium guttulatum* and *Ophiostoma olivaceapinii*, it was observed that they induce the metabolization of polyphenols, which were deposited on the cell walls of the inner bark, the phloem, vascular cambium and in the pith, where they became necrotic. Compared to *L. guttulatum* and *O. olivaceapini*, *O. ips* caused a more severe necrosis of the inner bark, cambium, and pith. In the xylem of inoculated seedlings, the hyphae of the three different fungi penetrated into the tracheids and moved through the bordered pits and radially through the parenchyma cells in the rays.

**KEY WORDS:** Blue-stain, galleries, bark beetles, structural changes.

#### INTRODUCCIÓN

El género *Ophiostoma* H. & P. Sydow causa el manchado azul de la madera y produce pérdidas económicas importantes en bosques de coníferas (Gibbs, 1993). El hongo se dispersa por insectos descortezadores (Coleóptera: Curculionidea, Scolytinae) que dañan el floema y el cambium vascular de coníferas (Farrell *et al.*, 2001); *Dendroctonus adjunctus* es la plaga descortezadora principal de coníferas en México y transporta esporas de *Ophiostoma* spp., en los micangios, la hembra de *D. adjunctus* dispersa las esporas por las galerías sinuosas que produce en el fuste del árbol y contribuye de manera

#### INTRODUCTION

The genus *Ophiostoma* H. & P. Sydow causes blue-stain in wood and produces important economic losses in forests of conifers (Gibbs, 1993). The fungus is dispersed by bark beetles (Coleoptera: Curculionidea, Scolytinae) that damage the phloem and vascular cambium of conifers (Farrell *et al.*, 2001); *Dendroctonus adjunctus* is the principal boring pest of conifers in Mexico and transports spores of *Ophiostoma* spp., in the mycangia, the female of *D. adjunctus* disperses the spores through the sinuous galleries that it produces in the stem of the tree and contributes importantly to the death of the tree in less than

importante a la muerte del árbol en menos de un año por el bloqueo del transporte de sustancias por los sistemas de conducción (Cibrián, 1995). Se ha reportado que en México existen cerca de 15,000 ha de pino atacadas por diferentes especies de descortezadores; de éstas, 3,902.82 ha con 16 especies de pino son atacadas por *D. adjunctus*, entre éstos el pino de las alturas *Pinus hartwegii* (CONAFOR, 2007; Cibrián, 1995).

En México se han reportado 17 hongos ophiostomatoides pertenecientes a los órdenes Ophiostomatales y Microascales en coníferas y latifoliadas (Cibrián et al., 2007). Se han realizado pruebas de patogenicidad con *Ophiostoma ips* en *Pinus radiata* y *P. elliotii* (Zhou et al., 2001); *P. ponderosa* con *Ceratocystis minor*, *C. clavigera* y *Leptographium terebrantis* (Harrington y Cobb, 1983; Owen et al., 1987). Jacobs y Wingfield (2001) reportan a *L. wagneri* como uno de los que causan la enfermedad de la mancha negra de la raíz en coníferas y *L. calophylli* como causante de una marchitez en *Calophyllum inophyllum*, ambos considerados como patógenos. Además consideran algunas especies donde no se ha definido su patogenicidad, como *L. serpens*, *L. terebrantis*, *L. lundbergii*, *L. procerum* en *Pinus* sp., pero pueden llegar a causar lesiones en el floema y matar a los árboles con inoculaciones artificiales. Únicamente se han observado cambios histológicos inducidos por *Ophiostoma ulmi* en *Ulmus americana*, *Prunus pensylvanica* y *Populus balsamifera* (Rioux y Quелlette, 1991). Para el caso de México, la información de las enfermedades forestales es escasa y sobre los daños causados por este grupo de hongos manchadores es nula. El objetivo de este estudio fue identificar las alteraciones histológicas en el pino de las alturas *Pinus hartwegii* causadas por tres especies de hongos ophiostomatoides.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal e inóculo

El material vegetal consistió de 42 árboles de *Pinus hartwegii* de tres años de edad y de una altura promedio de 30 cm, crecidos en bolsas de polietileno de 8 x 20 cm, obtenidos de la Estación Forestal Experimental Zoquiapan (EFEZ) de la Universidad Autónoma Chapingo, en Zoquiapan, Estado de México, trasladados a invernaderos de la División de Ciencias Forestales (DICIFO) y mantenidos durante 30 días a una temperatura de  $26 \pm 2$  °C como un periodo de acondicionamiento previo a la inoculación.

Los aislamientos se obtuvieron de la colección del laboratorio de Patología Forestal del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, veinte hongos ophiostomatoides puros y se incrementaron en extracto-malta-agar al 2 % (EMA) e incubaron a  $25 \pm 2$  °C durante 15 días. Estos hongos fueron: 10 *Ophiostoma ips* (ZOQ1, ZOQ3, ZOQ4, ZOQ7, ZOQ10, ZOQ11, ZOQ14, ZOQ18, ZOQ19 y ZOQ20), dos *Leptographium guttulatum* (ZOQ2 y ZOQ8), tres *Ophiostoma olivaceapinii* (ZOQ5,

a year through blockage of the transport of substances through the conduction systems (Cibrián, 1995). It has been reported that in Mexico there are nearly 15,000 ha of pine attacked by different species of bark beetles, of these, 3,902.82 ha with 16 species of pine are attacked by *D. adjunctus*, among them the high altitude pine *Pinus hartwegii* (CONAFOR, 2007; Cibrián, 1995).

In Mexico 17 ophiostomatoid fungi have been reported belonging to the orders Ophiostomatales and Microascales in conifers and broad leafed species (Cibrián et al., 2007). Tests of pathogenicity have been made with *Ophiostoma ips* in *Pinus radiata* and *P. elliotii* (Zhou et al., 2001); *P. ponderosa* with *Ceratocystis minor*, *C. clavigera* and *Leptographium terebrantis* (Harrington and Cobb, 1983; Owen et al., 1987). Jacobs and Wingfield (2001) report *L. wagneri* as one of those that cause the disease of black root stain in conifers, and *L. calophylli* as the cause of withering in *Calophyllum inophyllum*, both considered pathogens. In addition, they consider some species whose pathogenicity has not been defined, such as *L. serpens*, *L. terebrantis*, *L. lundbergii*, *L. procerum* in *Pinus* sp., but they may cause lesions in the phloem and kill the trees with artificial inoculations. Only histological changes induced by *Ophiostoma ulmi* in *Ulmus Americana*, *Prunus pensylvanica* and *Populus balsamifera* have been observed (Rioux and Quелlette, 1991). For the case of Mexico, the information of forest diseases is scant, and no data exists of the damage caused by this group of staining fungi. The objective of this study was to identify the histological alterations in the high altitude pine *Pinus hartwegii* caused by three species of ophiostomatoid fungi.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material and inoculum

The plant material consisted of 42 trees of *Pinus hartwegii* of three years of age and an average height of 30 cm, grown in polyethylene bags of 8 x 20 cm, obtained from the Estación Forestal Experimental Zoquiapan (EFEZ) of the Universidad Autónoma Chapingo in Zoquiapan, State of Mexico, transferred to greenhouses of the División de Ciencias Forestales (DICIFO) maintained during 30 days at a temperature of  $26 \pm 2$  °C as a conditioning period prior to inoculation.

The isolates were obtained from the collection of the laboratory of Patología Forestal of the Instituto de Fitosanidad of the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos, Texcoco, with twenty pure ophiostomatoid fungi and were incremented in malt-agar-extract at 2 % (EMA) and were incubated at  $25 \pm 2$  °C during 15 days. The fungi employed were: 10 *Ophiostoma ips* (ZOQ1, ZOQ3, ZOQ4, ZOQ7, ZOQ10, ZOQ11, ZOQ14, ZOQ18, ZOQ19 and ZOQ20), two *Leptographium guttulatum* (ZOQ2 and ZOQ8), three *Ophiostoma olivaceapinii* (ZOQ5, ZOQ15,

ZOQ15, ZOQ17), tres *Ophiostoma angusticollis* (ZOQ9, ZOQ13, ZOQ16), uno de *Ophiostoma nigrocarpum* (ZOQ12) y uno *Pesotum* sp. (ZOQ6). Los aislamientos ZOQ18, ZOQ19 y ZOQ20 provienen del cuerpo del insecto *Dendroctonus adjunctus*, y el resto de las galerías del descortezador en *Pinus hartwegii*.

### Inoculación de plantas

En total se inocularon cuarenta árboles (20 tratamientos) y dos testigos sin inoculación. Dos árboles fueron inoculados para cada aislamiento. La zona de inoculación se ubicó a los 5 cm de altura de la base del tallo de *Pinus hartwegii*; el área de 1 cm de longitud se desinfectó con alcohol al 70 % y se lavó con agua destilada tres veces. Posteriormente, con ayuda de un bisturí se hizo una herida de 0.5 cm<sup>2</sup> levantando la corteza y se depositó un disco de medio de cultivo con hongo. El disco se cubrió con la corteza, y ésta quedó sellada con algodón humedecido estéril, gasa estéril y Parafilm. La humedad del algodón se mantuvo por inyecciones cada cinco días con agua estéril dentro de las zonas selladas. Estas zonas se descubrieron cada tercer día para observar las reacciones del hospedante. Todos los árboles inoculados se cubrieron con bolsas de polipapel para mantener una humedad relativa. Después de 24 h, las bolsas se retiraron y la humedad del suelo se mantuvo con riegos cada 6 días durante dos meses y bajo las condiciones de temperatura ya mencionadas.

### Preparación de las muestras para microscopia de luz

Con el fin de conocer los daños ocasionados por los hongos inoculados en los árboles, se tomaron de cada árbol tres secciones de tallo de 5 mm de longitud aproximadamente de las partes alta y baja de la zona no inoculada, y la parte media de la zona inoculada a los 60 días después de la inoculación (ddi). Las muestras se fijaron en una solución Craf III durante 48 h. Todas las muestras se lavaron tres veces con agua corriente durante cinco minutos, se deshidrataron gradualmente en soluciones de alcohol de 50, 70, 96, 100 % y etanol absoluto-xileno (1:1) tres cambios de xileno y dos cambios de Paraplast (Sigma Chemical Co.) por tres horas en cada solución en un cambiador automático de tejidos Tissue-Tek® (Sakura Fingtechnical Co., mod. 4640-B). De cada muestra se obtuvieron tres bloques de parafina. Se hicieron cortes en serie de 10 µm de grosor, tanto longitudinales como transversales, en un micrótomos de rotación (American Optical Company, mod. Spencer 820); los cortes se pegaron a portaobjetos, colocándolos previamente en un baño de flotación con agua a una temperatura de 60 °C más grenetina (Johansen, 1940).

### Tinción

Para teñir los cortes se utilizó la tinción diferencial safranina-verde rápido (Johansen, 1940), para lo cual se eliminó primero el paraplast mediante tres cambios

ZOQ17), three *Ophiostoma angusticollis* (ZOQ9, ZOQ13, ZOQ16), one of *Ophiostoma nigrocarpum* (ZOQ12) and one *Pesotum* sp. (ZOQ6). The isolates ZOQ18, ZOQ19 and ZOQ20 are from the body of the insect *Dendroctonus adjunctus*, and the rest from the galleries of the bark beetle in *Pinus hartwegii*.

### Inoculation of plants

A total of forty trees were inoculated (20 treatments) and two controls without inoculation. Two trees were inoculated for each isolate. The inoculation zone was located at 5 cm of height from the base of the stem of *Pinus hartwegii*; the area of 1 cm length was disinfested with alcohol at 70 % and was washed three times with distilled water. Next, with the aid of a scalpel, a cut of 0.5 cm<sup>2</sup> was made, lifting the bark and depositing a disc of culture medium with fungus. The disc was covered with the bark, which was sealed with sterile moistened cotton, sterile gauze and Parafilm. The moisture of the cotton was maintained by injections every five days with sterile water within the sealed zones. These zones were uncovered every three days to observe the reactions of the host. All of the inoculated trees were covered with polypaper bags to maintain relative moisture. After 24 h, the bags were removed and the soil moisture was maintained with irrigations every 6 days during two months and under the previously mentioned temperature conditions.

### Preparation of the samples for light microscope

In order to know the damage caused by the fungi inoculated in the trees, three sections of stem of approximately 5 mm in length were taken from the high and low parts of the non-inoculated zone, and the middle part of the inoculated zone at 60 days after inoculation (dai). The samples were fixed in a solution of Craf III during 48 h. All of the samples were washed three times with running water during five minutes, and were gradually dehydrated in alcohol solutions of 50, 70, 96 and 100 % absolute-xylene ethanol (1:1) three changes of xylene and two changes of Paraplast (Sigma Chemical Co.) for three hours in each solution in a Tissue-Tek® automatic tissue changer (Sakura Fingtechnical Co., mod. 4640-S). Three blocks of paraffin were obtained of each sample. Cuts in series of 10 µm thickness were made, both lengthwise and transversally, in a rotation microtome (American Optical Company, mod. Spencer 820). The cuts were attached to slides, previously placing them in a floatation bath with water at a temperature of 60 °C plus grenatine (Johansen, 1940).

### Staining

To stain the cuts, the differential stain rapid safranin-green (Johansen, 1949) was used, for which the paraplast was first eliminated by means of three changes of xylene, and were hydrated in a gradual series of ethylic alcohol 100,

de xileno y se hidrataron en una serie gradual de alcohol etílico 100, 96, 70 y 50 % durante tres minutos en cada uno. Luego se tiñó con safranina al 1 % en alcohol etílico al 50 % durante 30 min; posteriormente se lavaron en una serie ascendente de alcohol etílico al 50, 70 y 96 % (3 min en cada uno); después se aplicaron dos a tres gotas de verde rápido al 1 % en alcohol etílico al 96 %, por 45 seg, se decantó el sobrenadante y se lavó con alcohol etílico al 96 y 100 % y tres cambios de xileno (3 min en cada uno). Finalmente, se montaron con resina sintética entre porta y cubreobjetos para su observación y se tomaron fotomicrografías de las preparaciones en un microscopio de luz Romano III (Carl Zeiss®) con una cámara digital Paxcam 3.

96 70 and 50 % during three minutes in each one. Then staining was made with safranin at 1 % in ethylic alcohol at 50 % during 30 min; later they were washed in an ascending series of ethylic alcohol at 50, 70 and 96 % (3 min in each one). Next, two to three drops of rapid green were applied at 1 % in ethylic alcohol at 96 % for 45 sec, the supernatant was decanted and washed with ethylic alcohol at 96 and 100 % and three changes of xylene (3 min in each one). Finally, they were mounted with synthetic resin between slides for their observation, and photomicrographs were taken of the preparations in a Romano III light microscope (Carl Zeiss®) with a Paxcam 3 digital camera.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Anatomía del tallo sano de *Pinus hartwegii*

En plantas testigo no inoculadas se observó a la peridermis conformada por una capa externa de células lignificadas, y debajo de ésta de dos a cuatro capas celulares con polifenoles castaños densos y capas de células largas con polifenoles granulosos rojizos con paredes lignificadas. La corteza estuvo compuesta por células parenquimatosas conteniendo polifenoles guindas granulosos o rojizos, amarillos granulosos y densos. Además, presentó canales resiníferos constituidos por células epiteliales con paredes delgadas y las células de la vaina con paredes relativamente gruesas, ambas sin lignificar. Las de la vaina se encontraron llenas de polifenoles rojizos e incluso en las epiteliales. Algunas células de parénquima con escasos granos de almidón (Figura 1A). El floema axial presentó células del parénquima con polifenoles amarillos granulosos y las del parénquima radial con abundantes gránulos de almidón (Figura 1B). Limitando el floema del xilema está el cambium; a veces éste se observa con sus células pequeñas y alineadas uniformemente (Figura 1B). El xilema constituido por traqueidas con punteaduras aeroladas en sección radial, radios uniseriados, canales resiníferos verticales y horizontales con la capa de células parenquimatosas epiteliales y las células de la vaina, y por lo regular cercanos a los radios. Ningún tipo de células del xilema contiene polifenoles (Figura 1B y C). La médula posee sus células con polifenoles del mismo color y apariencia que los de la corteza (Figura 1C). Las características coincidieron parcialmente con la descripción de Esau (1977); la diferencia puede ser por la edad del árbol.

### Anatomía del tallo inoculado de *Pinus hartwegii*

De los 20 aislamientos inoculados, sólo tres fueron los que presentaron síntomas a nivel de follaje y causaron alteraciones estructurales en *Pinus hartwegii*; éstos fueron: *Ophiostoma ips* (ZOQ19), *Leptographium guttulatum* (ZOQ2) y *O. olivaceapinii* (ZOQ5). Los 17 aislamientos

## RESULTS AND DISCUSSION

### Anatomy of the healthy stem of *Pinus hartwegii*

In non-inoculated control plants, the periderm was observed conformed by an external layer of lignified cells, and under it from two to four cell layers with dense brown polyphenols and layers of elongated cells with reddish granulated polyphenols with lignified walls. The cortex was comprised of parenchyma cells containing granular dark red or reddish, granular yellow and dense polyphenols. In addition, it presented resin canals comprised of epithelial cells with thin walls and the cells of the pod with relatively thick walls, both without lignifications. Those of the pod were found to be full of reddish polyphenols and even in the epithelial cells. Some parenchyma cells were found with scant grains of starch (Figure 1A). The axial phloem presented parenchyma cells with granular yellow polyphenols and those of the radial parenchyma with abundant starch granules (Figure 1B). Limiting the phloem of the xylem is the cambium; at times it is observed with small cells with uniform alignment (Figure 1B). The xylem is comprised of traqueids with bordered pits in radial section, uniseriaded rays, vertical and horizontal resin canals with the layer of epithelial parenchyma cells and the cells of the pod, and generally close to the rays. None of the cell types of the xylem contains polyphenols (Figure 1B and C). The pith has cells with polyphenols of the same color and appearance as those of the cortex (Figure 1C). The characteristics partially coincided with the description of Esau (1977); the difference may be due to the age of the tree.

### Anatomy of the inoculated stem of *Pinus hartwegii*

Of the 20 inoculated isolates, only three presented symptoms at the foliage level and caused structural alterations in *Pinus hartwegii*; *Ophiostoma ips* (ZOQ19), *Leptographium guttulatum* (ZOQ2) and *O. olivaceapinii* (ZOQ5). The other 17 isolates did not cause any external symptom at the foliage level, and only formed a small callous around the inoculation zone. The first reaction was

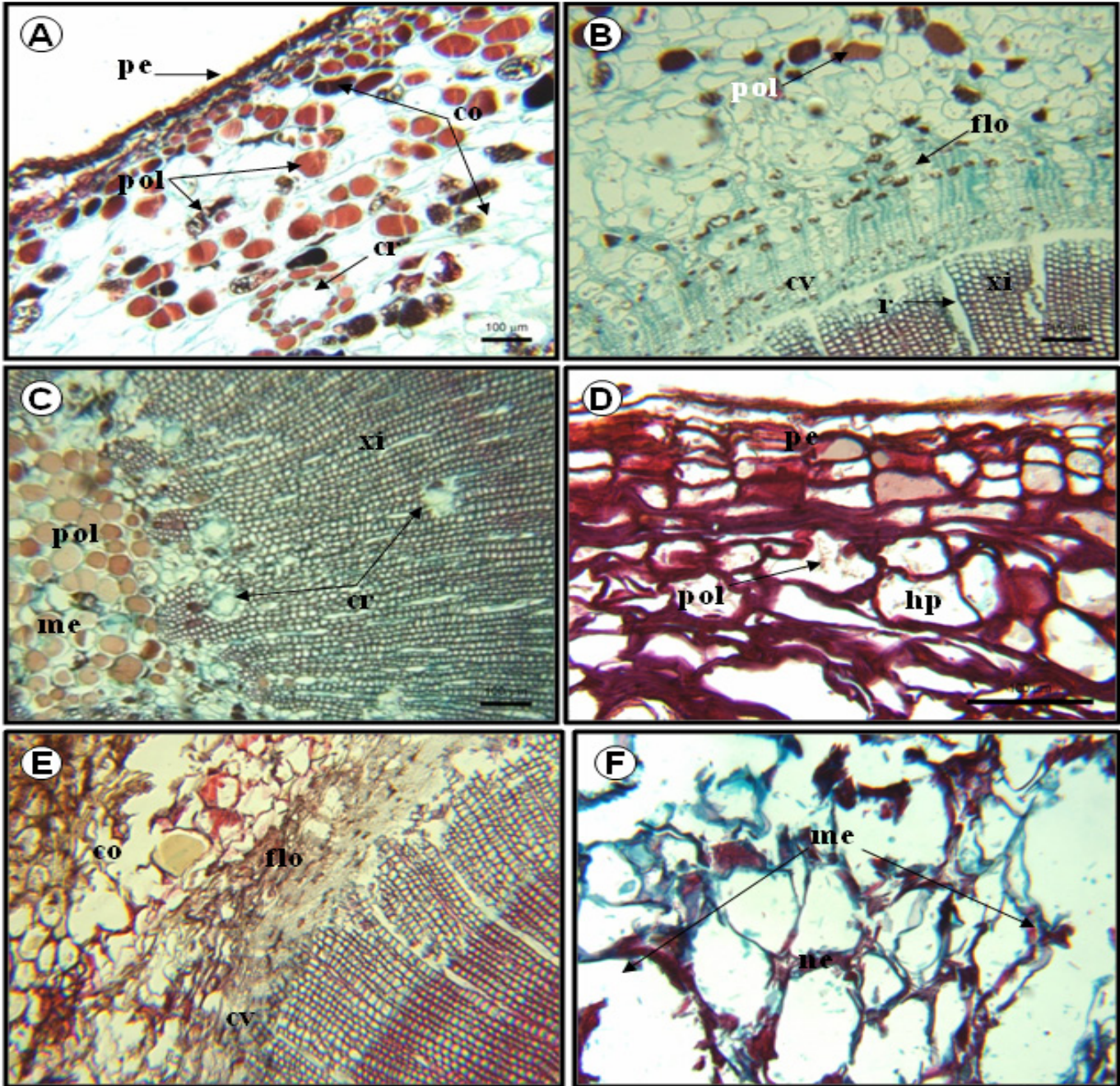


FIGURA 1. Fotomicrografías al microscopio de luz de cortes transversales de tallo sano de pino (*Pinus hartwegii*). A) Observe la peridermis (pe), corteza (co) y canales resiníferos (cr) conteniendo polifenoles (pol). B) Floema (flo) y cambium vascular (cv) con polifenoles, xilema (xi), rayos (r). C) Xilema con canales resiníferos, radios y médula (me) con polifenoles. D, E y F) Alteraciones de los tejidos del tallo de *P. hartwegii* inoculado (parte alta) con *Ophiostoma olivaceapinii* a los 60 días. D) Colapso de células e hipertrofia (hp) y degradación de polifenoles de color rojo en la corteza y la peridermis. E) Colapso en floema y cambium vascular. F) Necrosis en médula con presencia de hifas entre las células y no se observan polifenoles.

FIGURE 1. Photomicrographs of the light microscope of transversal cuts of healthy stem of pine (*Pinus hartwegii*). A) Observe the periderm (pe), cortex (co) and resin canals (cr) containing polyphenols (pol). B) Phloem (flo) and vascular cambium (cv) with polyphenols, xylem (xi), rays (r). C) Xylem with resin canals, rays and pith (me) with polyphenols. D, E, and F) Alterations of the stem tissues of *P. hartwegii* inoculated (upper portion) with *Ophiostoma olivaceapinii* at 60 days. D) Collapse of cells and hypertrophy (hp) and degradation of red colored polyphenols in the cortex and periderm. E) Collapse in phloem and vascular cambium. F) Necrosis in pith with presence of hyphae among the cells, and polyphenols are not observed.

restantes no causaron ningún síntoma externo a nivel de follaje, y únicamente se formó un pequeño callo alrededor de la zona de inoculación. La primera reacción fue la acumulación de resina en la zona de inoculación a los diez días ddi en *P. hartwegii*, lo que coincidió con Zhou *et al.* (2002), quienes reportan en la zona de inoculación la presencia de resina en *Pinus radiata* y *P. elliotii* al ser inoculados con *O. ips*, *L. lundbergii* y *L. serpens*. La formación de callo alrededor de la zona de inoculación en *P. hartwegii* se presenta como una primera medida de defensa al daño por los hongos inoculados (Klepzig y Walkinshaw, 2003). Además, hubo clorosis del follaje en la zona cercana de inoculación y tornándose el follaje amarillo, café cremoso a rojizo a los 15 días ddi. Los síntomas más severos los causó *O. ips* seguido por *L. guttulatum* y *O. olivaceapinii*; a los treinta días, el follaje fue de color amarillento, y a los 60 días la mayor parte del follaje en la rama inoculada se tornó café cremoso a rojizo; esto coincide con Lee *et al.* (2006), quienes observaron clorosis en *Pinus contorta* var. *latifolia* a los nueve meses de haber sido inoculado con *Leptographium longiclavatum* y *Ophiostoma clavigerum*. En el caso de *Pinus sylvestris* de 25 años de edad, el follaje se tornó verde amarillento a amarillo a los tres meses después de la inoculación (Fernández *et al.*, 2004). Cibrián (1995) menciona que el cambio de coloración del follaje es resultado del ataque del insecto descortezador asociado con hongos manchadores que colonizan a su hospedante. Dichas aseveraciones se corroboran en este estudio. Además, pueden influir la técnica de inoculación, la cantidad de inóculo y el estado fisiológico del árbol para que éste sea fácilmente colonizado (Klepzig *et al.*, 2005).

El manchado oscuro del floema y xilema en *Pinus hartwegii* que se observa macroscópicamente, es causado por la melanina del hongo (polímero 1,8 dihidroxinaphtaleno) o el ácido 2,3-dihidroxibenzoico y ceratenolone combinado con hierro (Seifert, 1993). Sin embargo, se puede inferir que también es por la metabolización de los polifenoles que normalmente contienen las células que conforman estos tejidos. En la zona de inoculación las ramas de *P. hartwegii* presentaron lesiones necróticas de 0.8 a 10 mm de longitud, esto dependiendo del aislamiento. En el interior del xilema de las ramas se presentó una coloración café claro a café oscuro. De acuerdo con Zhou *et al.* (2002), *Leptographium lundbergii*, *L. serpens* y *Ophiostoma ips* causan lesiones de 29.3, 27.8 y 33.3 mm, respectivamente, en *Pinus caribaea*, *P. elliotii* y *P. radiata* de dos años de edad en Sudáfrica sin presentar síntomas a nivel de follaje. Las lesiones necróticas alrededor de la zona de inoculación son el resultado de flujo de resina y la acumulación de compuestos fenólicos para prevenir el avance del hongo hacia el interior de los tejidos (Solheim, 1993).

En la zona de inoculación (parte alta) con *Ophiostoma olivaceapinii*, las células de la peridermis metabolizaron los polifenoles que contenían en su citoplasma e impregnaron

the accumulation of resin in the inoculation zone at ten days dai in *P. hartwegii*, which coincided with Zhou *et al.* (2002), who report in the inoculation zone the presence of resin in *Pinus radiata* and *P. elliotii* when inoculated with *O. ips*, *L. lundbergii* and *L. serpens*. The formation of callous around the inoculation zone in *P. hartwegii* appears as a first measure of defense against the damage by the inoculated fungi (Klepzig and Walkinshaw, 2003). Furthermore, there was chlorosis of foliage in the zone near the inoculation and the foliage turned yellow, whitish brown or reddish at 15 dai. The most severe symptoms were caused by *O. ips*, followed by *L. guttulatum* and *O. olivaceapinii*; at thirty days, most of the foliage in the inoculated branch turned whitish brown to reddish; this coincides with Lee *et al.* (2006), who observed chlorosis in *Pinus contorta* var. *latifolia* nine months after being inoculated with *Leptographium longiclavatum* and *Ophiostoma clavigerum*. In the case of *Pinus sylvestris* at 25 years of age, the foliage turned yellowish-green to yellow three months after inoculation (Fernández *et al.*, 2004). Cibrián (1995) mentions that the change in coloration of the foliage is the result of the attack of the bark beetle associated with staining fungi that colonize their host. These affirmations are confirmed in the present study. Furthermore, the inoculation technique, the amount of inoculum and the physiological state of the tree can have an influence in the tree being easily colonized (Klepzig *et al.*, 2005).

The dark staining of the phloem and xylem in *Pinus hartwegii* observed macroscopically, is caused by the melanin of the fungus (polymer 1,8 dehydroxynaphthalene) or 2,3-dihydroxybenzoic acid and ceratenolone combined with iron (Seifert, 1993). However, it can be inferred that it is also due to the metabolization of the polyphenols that are normally contained by the cells that comprise these tissues. In the inoculation zone, the branches of *P. hartwegii* exhibited necrotic lesions of 0.8 to 10 mm length, depending on the isolate. In the interior of the xylem of the branches, there was a light brown to dark brown coloration. According to Zhou *et al.* (2002), *Leptographium lundbergii*, *L. serpens* and *Ophiostoma ips* cause lesions of 29.3, 27.8 and 33.3 mm, respectively, in *Pinus caribaea*, *P. elliotii* and *P. radiata* of two years of age in South Africa, without presenting symptoms at the foliage level. The necrotic lesions around the inoculation zone are the result of the flow of resin and the accumulation of phenolic compounds to prevent the advance of the fungus toward the interior of the tissues (Solheim, 1993).

In the zone of inoculation (high portion) with *Ophiostoma olivaceapinii*, the cells of the periderm metabolized the polyphenols that they contained in their cytoplasm and impregnated in the walls (Figure 1D). The polyphenols of the cortex cells also metabolized and impregnated in the walls, and granular and dense polyphenols were no longer observed. Later, the cells collapsed, lost their form and their walls suffered breakage;

en las paredes (Figura 1D). Los polifenoles de las células de la corteza de igual manera se metabolizaron e impregnaron en las paredes, y ya no se observaron polifenoles granulados ni densos; posteriormente las células se colapsaron, perdieron su forma y sus paredes sufrieron rompimientos; algunas se hipertrofiaron. El floema y cambium fueron los más dañados; se observaron completamente colapsados sus componentes celulares y en ocasiones necrosados (Figura 1D y E). El xilema aparentemente no sufre daños, excepto los radios y canales resiníferos donde hubo colapso de células por presencia de hifas del hongo (Figura 1E). Las paredes de las células de la médula se observaron rotas e invadidas por el hongo (Figura 1F). Esto coincide con Forde (1995), quien reporta a la especie *Ophiostoma piliferum* creciendo en células parenquimatosas, ricas en azúcares, triglicéridos y ácidos grasos. En la parte media y baja de inoculación se observó también impregnación de polifenoles y colapso o desorganización celular. En las tres partes de la zona inoculada, debido a la fragilidad de las paredes del floema y del cambium, se observa en ocasiones a estos dos tejidos como si estuvieran macerados o con grandes cavidades por la desintegración de las células. En cortes tangenciales no se observó la forma de penetración y avance de *Ophiostoma olivaceapinii* en el xilema. Sin embargo, los hongos ophiostomatoides invaden las traqueidas a través de las puntuaciones y canales resiníferos distribuyéndose longitudinal y radialmente por células parenquimatosas de la corteza, floema, cambium y radios del xilema (Seifert, 1993; Gibbs, 1993).

En los cortes de la parte alta del tallo de *Pinus hartwegii* con *Leptographium guttulatum* se observó que los daños ocasionados en corteza, floema y cambium vascular fueron los mismos que en *Ophiostoma olivaceapinii* (Figuras 2A y B), excepto los canales resiníferos; éstos sufren necrosis en las células epiteliales; las células de la vaina están totalmente invadidas por hifas café oscuro del hongo (Figura 2B). En el xilema se nota que la infección se mueve radialmente a través de los radios unicelulares, y alcanza los canales resiníferos presentando necrosis (Figura 2B y C). Se observó que el hongo penetra por las puntuaciones y avanza longitudinalmente por las traqueidas, principalmente las cercanas a los radios; esto concuerda con Harrington y Cobb (1983), quienes reportan el avance de *Leptographium* en traqueidas y radios. En la parte media parece que el daño sólo fue en la zona de inoculación y no abarcó toda la circunferencia del tallo, y se observó impregnación de polifenoles y colapso o desorganización. En la parte baja los daños fueron similares que en la parte alta, y únicamente la médula estuvo más desintegrada (necrosada) y con hifas del hongo (Figura 2D). En un corte transversal del tallo inoculado se observó macroscópicamente una coloración café oscuro en la corteza, floema y xilema, lo que coincide con Jacobs y Wingfield (2001), quienes reportan a *L. guttulatum* como causante de un manchado de la madera

some of them hypertrophied. The phloem and cambium were the most damaged; it is observed that their cellular components are completely collapsed and occasionally necrotic (Figure 1D and E). The xylem apparently did not undergo damage, except the rays and resin canals where there was collapse of cells from the presence of hyphae of the fungus (Figure 1E). The cell walls of the pith were observed to be broken and invaded by the fungus (Figure 1F). This coincides with Forde (1995), who reports the species *Ophiostoma piliferum* growing in parenchyma cells, rich in sugars, triglycerids and fatty acids. In the mid and low part of the inoculation, impregnation of polyphenols was also observed, along with collapse or disorganization of cells. In the three parts of the inoculated zone, due to the fragility of the walls of the phloem and the cambium, occasionally these two tissues appear to be macerated or with large cavities from the disintegration of cells. In tangential cuts, the form of penetration was not observed, nor the advance of *Ophiostoma olivaceapinii* in the xylem. However, the ophiostomatoid fungi invade the traqueids through the pits and resin canals, distributing itself longitudinally and radially through parenchyma cells of the cortex, phloem, cambium and rays of the xylem, (Seifert, 1993, Gibbs, 1993).

In the cuts of the high portion of the stem of *Pinus hartwegii* with *Leptographium guttulatum*, it was observed that the damage caused in inner bark, phloem and vascular cambium were the same as in *Ophiostoma olivaceapinii* (Figures 2A and B).. except for the resin canals, which suffer necrosis in the epithelial cells. The cells of the pod are totally invaded by dark brown hyphae of the fungus (Figure 2B). In the xylem it is observed that the infection moves radially through the unicellular rays, and reaches the resin canals presenting necrosis (Figures 2B and C). It was observed that the fungus penetrates through the pits and advances longitudinally through the traqueids, principally those close to the rays. This agrees with Harrington and Cobb (1983), who report the advance of *Leptographium* in traqueids and rays. In the middle part it appears that the damage was only in the inoculation zone and did not include the entire circumference of the stem, and impregnation of polyphenols was observed along with collapse or disorganization. In the lower portion the damages were similar to those of the higher portion, and only the medulla was more disintegrated (necrotic) and with hyphae of the fungus (Figure 2D). In a transversal cut of the inoculated stem, a dark brown coloration was observed macroscopically in the cortex, phloem and xylem, which coincides with Jacobs and Wingfield (2001), who report *L. guttulatum* as the cause of a stain in wood of *Picea abies* and *Pinus sylvestris*. In this study alterations were observed in the tissues of *P. hartwegii* of three years of age caused by *L. guttulatum*. Although these fungi do not alter the mechanical properties in wood, they can influence in the loss of weight by consuming carbohydrates, fatty acids and triglycerids (Cibrián *et al.*, 2007). *L. wagneri* is reported

de *Picea abies* y *Pinus sylvestris*. En este estudio se observaron alteraciones en los tejidos de *P. hartwegii* de tres años de edad causadas por *L. guttulatum*; aunque estos hongos no alteran las propiedades mecánicas en la madera, pueden influir en la pérdida de peso al consumir carbohidratos, ácidos grasos y triglicéridos (Cibrián *et al.*, 2007). Se reporta *L. wagneri* con sus tres variedades como patógenos verdaderos por causar la pudrición negra de la raíces de *Pinus* en los Estados Unidos de América (Jacobs y Wingfield, 2001).

Las alteraciones causadas por *Ophiostoma ips*, obtenido del cuerpo del insecto, se observaron en la zona alta, media y baja de la corteza, floema y cambium, todos bastante colapsados y necrosados; sin embargo, aún se pudo ver el hongo (Figura 2E y F). El xilema poco lignificado, radios y canales resiníferos con necrosis y con el hongo (Figura 2G). Ligeramente presencia de polifenoles en radios y células del parénquima que rodean a los canales resiníferos. La médula necrosada y las paredes de las células rojizas con micelio del hongo (Figura 2H). En Sudáfrica se reporta a *O. ips* en *Pinus caribaea*, *P. elliotii*, *P. radiata* de dos años de edad causando lesiones de 30 mm sin presentar síntomas externos a nivel de follaje (Zhou *et al.*, 2002); la mayoría de las especies de *Ophiostoma* causan un manchado de la madera recién cortada (Seifert, 1993). Las especies reportadas de este género que causan la enfermedad del olmo holandés son: *O. ulmi* (Buism.) Nannf. y *O. novo-ulmi* Brasier con dos subespecies, *O. novo-ulmi* subsp. Americana y *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi* en *Ulmus americana* (Brasier y Kirk, 2001). Los cambios histológicos observados en *Ulmus americana* fueron la formación de estructuras alveolares, tilides, geles y zonas de barreras; algunas células exhiben autofluorescencia amarilla alrededor de los vasos del xilema que impide el avance del hongo (Et-Touil, *et al.*, 2005). En *Prunus pensylvanica* hay formación de burbujas en los miembros del vaso del xilema a los tres días de la inoculación y la formación de geles después de cinco días (Rioux y Quéllette, 1991). En *Populus balsamifera* hay formación de tilides ocho días de la inoculación y acumulación de compuestos fenólicos en las células del parénquima (Rioux y Quéllette, 1991). En el caso de *Ophiostoma ips* se considera un patógeno débil como *O. minus*, *Leptographium terebrantis* y *L. wingfieldii*, que pueden llegar a causar alguna lesión sobre el floema o pueden llegar a matar el árbol cuando son inoculadas en masa (Zhou *et al.*, 2002; Gibbs, 1993).

En este estudio no se observó el inicio de las primeras alteraciones causadas por hongos en los diferentes tejidos, debido a que los síntomas fueron evidentes a los 60 días ddi; generalmente se reporta muerte rápida de células y la acumulación de metabolitos secundarios en el sitio de daño que da como resultado una lesión necrótica (Nagy *et al.*, 2004). Los hongos manchadores al invadir células de sus hospedantes inducen la acumulación de compuestos

with its three varieties as true pathogens by causing black rot in roots of *Pinus* in the United States of America (Jacobs and Wingfield, 2001).

The alterations caused by *Ophiostoma ips*, obtained from the body of the insect, were observed in the high, middle and low zone of the cortex, phloem and cambium, all of which were markedly collapsed and necrotic. However, the fungus could still be seen (Figure 2E and F). The xylem was slightly lignified, rays and resin canals exhibited necrosis and presence of the fungus (Figure 2 G). There was a slight presence of polyphenols in rays and cells of the parenchyma that surround the resin canals. The pith was necrotic and the cell walls reddish with mycelia of the fungus (Figure 2H). In South Africa, *O. ips* is reported in *Pinus caribaea*, *P. elliotii*, and *P. radiata* of two years of age causing lesions of 30 mm without presenting external symptoms at the foliage level (Zhou *et al.*, 2002). Most of the species of *Ophiostoma* cause staining in recently cut wood (Seifert, 1993). The species reported of this genus that cause Dutch elm disease are: *O. ulmi* (Buism.) Nannf. and *O. novo-ulmi* Brasier with two sub-species; *O. novo-ulmi* subsp. Americana and *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi* in *Ulmus americana* (Brasier and Kirk, 2001). The histological changes observed in *Ulmus americana* were the formation of alveolar structures, tyloses, gels and barrier zones; some cells exhibit yellow autofluorescence around the vessels of the xylem that impede the advance of the fungus (Et-Touil *et al.*, 2005). In *Prunus pensylvanica* there is formation of bubbles in the members of the vessel of the xylem three days after inoculation and the formation of gels after five days (Rioux and Quéllette, 1991). In *Populus balsamifera* there is formation of tyloses eight days after inoculation and accumulation of phenolic compounds in the cells of the parenchyma (Rioux and Quéllette, 1991). In the case of *Ophiostoma ips*, it is considered a weak pathogen, such as *O. minus*, *Leptographium terebrantis* and *L. wingfieldii*, which can cause a lesion on the phloem or even kill the tree when they are inoculated in mass (Zhou *et al.*, 2002; Gibbs, 1993).

In this study, the onset was not observed of the first alterations caused by fungi in the different tissues, due to the fact that the symptoms were evident 60 days dai. Generally rapid cell death is reported along with the accumulation of secondary metabolites in the damage site which results in a necrotic lesion (Nagy *et al.*, 2004). The staining fungi induce the accumulation of secondary compounds when they invade cells of their hosts; such is the case of *Pinus sylvestris*, where there is presence of stilbenes (Pinosylvin and eter monomethylc pinosylvin) and a flavonoid (pinocembrin) when inoculated with *Leptographium wingfieldii*, *Ophiostoma brunneociliatum* and *O. ips* (Croisé *et al.*, 2001). The alterations in *Pinus hartwegii* were: collapse and necrosis as the result of the advance of the infection in cortex, phloem, cambium, rays and resin canals as far as the pith. These results agree



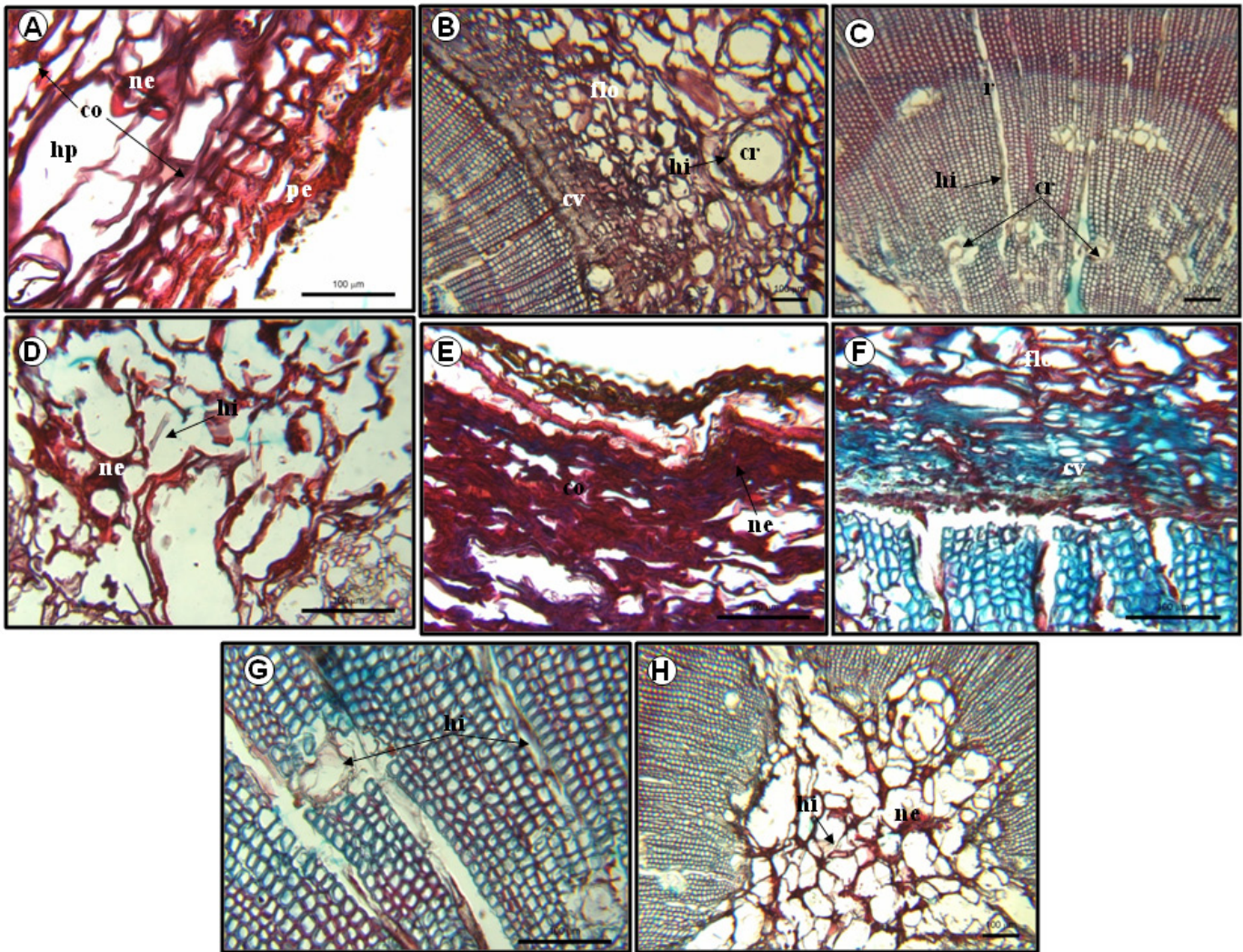


FIGURA 2. Fotomicrografías de las alteraciones de los tejidos del tallo del pino de las alturas (*Pinus hartwegii*) inoculado con dos hongos ophiostomatoides a los 60 días. *Leptographium guttulatum*. A) Necrosis (ne) e hipertrofia (hp) de células de la corteza. B) Colapso celular en floema (flo), cambium vascular (cv) y los canales resiníferos (cr) de la corteza invadidos con hifas del hongo (hi). C) Radios (r) y canales resiníferos (cr) del xilema invadidos por hifas del hongo. D) Necrosis (ne) en médula e hifas del hongo (hi). *Ophiostoma ips*. E) Peridermis, corteza necrosada. F) Necrosis en floema y cambium vascular. G) Radios del xilema y canales resiníferos invadidos por hifas del hongo (hi). H) Necrosis en medula con hifas del hongo.

FIGURE 2. Photomicrographs of the alterations of the stem tissue of high altitude pine (*Pinus hartwegii*) inoculated with two ophiostomatoid fungi at 60 days. *Leptographium guttulatum*. A) Necrosis (ne) and hypertrophy (hp) of the cortex invaded with hyphae of the fungus (hi). C) Rays (r) and resin canals (cr) of the xylem invaded by hyphae of the fungus. D) Necrosis (ne) in pith and hyphae of the fungus (hi). *Ophiostoma ips*. E) Peridermis, cortex necrosada. F) Necrosis in phloem and vascular cambium. G) Rays of the xylem and resin canals invaded by hyphae of the fungus (hi). H) Necrosis in pith with hyphae of the fungus.

secundarios; tal es el caso de *Pinus sylvestris*, donde hay la presencia de estilbenos (Pinosylvin y éter monometílico pinosylvin) y un flavonoide (pinocembrin) al ser inoculados con *Leptographium wingfieldii*, *Ophiostoma brunneo-ciliatum* y *O. ips* (Croisé *et al.*, 2001). Las alteraciones en *Pinus hartwegii* fueron: colapso y necrosis como resultado del avance de la infección en corteza, floema, cambium, radios y canales resiníferos hasta la médula; estos resultados concuerdan con Nagy *et al.* (2004) y Franceschi *et al.* (2000), quienes además observaron cambios morfológicos e incremento de fenoles en células parenquimatosas en *Picea abies* en respuesta al daño que causa *Ceratocystis polonica*. Además, hay reducción de la humedad interna, hidrólisis de almidón, poca adhesión de

with Nagy *et al.* (2004) and Franceschi *et al.* (2000), who also observed morphological changes and increment of phenols in parenchyma cells in *Picea abies* in response to the damage caused by *Ceratocystis polonica*. In addition, there is a reduction of internal moisture, hydrolysis of starch, weak adhesion of the cortex, resinosis, traumatism of the resin canals and production of new cambium and periderm (Nagy *et al.*, 2005).

The accumulation of hyphae of the fungi was observed around the resin canals and rays, both comprised of parenchyma cells (Forde, 1995). The longitudinal advance of the three fungi was by traqueids, as in the case of *Ophiostoma piliferum* (Gibbs, 1993), and

la corteza, resinosidad, traumatismo de los canales resiníferos y la producción de nuevo cambium y peridermis (Nagy *et al.*, 2005).

La acumulación de hifas de los hongos se observó alrededor de los canales resiníferos y radios, ambas constituidas por células parenquimatosas (Forde, 1995). El avance longitudinal de los tres hongos fue por traqueadas, como lo hace *Ophiostoma piliferum* (Gibbs, 1993), y penetrando a través de sus puntuaciones (Seifert, 1993). Otros autores, como Harrington y Cobb (1983), reportan hifas del hongo *Verticicladiella abietina* en traqueidas y *Verticicladiella procera*, *V. wagneri*, *Verticicladiella* spp y *Leptographium terebrantis* en traqueidas y radios del xilema en *Pinus ponderosa*. Hubert (1953) observó hifas largas café oscuro con anastomosis en xilema, invasión de células del radio y canales resiníferos en *Pinus monticola* inoculados con *Leptographium*. Estos estudios sugieren que todos los hongos ophiostomatoideos son similares en su crecimiento a través de las células del hospedante. Además, las células parenquimatosas y radios con fenoles son ricas en fenilalanina amonio liasa; ésta es una enzima clave para la síntesis de compuestos fenólicos; estos compuestos llegan a inactivar las enzimas pectolíticas que ayudan a los hongos a penetrar las paredes celulares (Franceschi *et al.*, 2000).

La mayoría de las especies de *Ophiostoma* y sus anamorfos son patógenos débiles o saprofitos, y se asocian con insectos descortezadores (Jacobs y Wingfield, 2001). Sin embargo, en este estudio *Ophiostoma ips* fue la más patogénica en relación a *O. olivaceapinii* y *Leptographium guttulatum* en árboles de *Pinus hartwegii* de tres años de edad. Lieutier *et al.* (1989) lo consideran como un ascomiceto débil por causar un manchado azul en la madera en coníferas; dentro de esta categoría están *O. minus*, *O. montia*, *O. penicillatum* y *O. picea* (Seifert 1993). En este estudio *O. ips* causó necrosis en los tejidos de la corteza, floema, cambium, y en el xilema creció en radios y canales resiníferos llegando a causar la muerte de la planta. Wingfield y Marasas (1980) reportan lesiones en el cambium y xilema en *Pinus pinaster* de diez años de edad. En general, los tres hongos inoculados penetraron en las punteaduras de las traqueidas y se establecieron en células parenquimatosas de la corteza, floema, cambium, canales resiníferos y radios causando muerte celular en los diferentes tejidos, y a pesar de haber necrosis, el hongo vive, eso debido a que es un hongo con hábitos saprofitos (Seifert, 1993; Gibbs, 1993).

---

### CONCLUSIONES

En *Pinus hartwegii* hubo acumulación de resina en la zona de inoculación con *Leptographium guttulatum*, *Ophiostoma ips* y *Ophiostoma olivaceapinii* a los diez días ddi y el follaje se tornó amarillo a café rojizo a los 60 días ddi. *Leptographium guttulatum* y *Ophiostoma olivaceapinii*

penetrating through its pits (Seifert, 1993). Other authors, such as Harrington and Cobb (1983) report hyphae of the fungus *Verticicladiella abietina* in traqueids and *Verticicladiella procera*, *V. wagneri*, *Verticicladiella* spp. and *Leptographium terebrantis* in traqueids and rays of the xylem in *Pinus ponderosa*. Hubert (1953) observed long dark brown hyphae with anastomosis in xylem, invasion of cells of the rays and resin canals in *Pinus monticola* inoculated with *Leptographium*. These results suggest that all of the ophiostomatooid fungi are similar in their growth through the cells of the host. Furthermore, the parenchymatous cells and rays with phenols are rich in phenylalanine ammonia lyase, which is a key enzyme for the synthesis of phenolic compounds. These compounds can inactivate the pectolytic enzymes that help the fungi to penetrate the cell walls (Franceschi *et al.*, 2000).

Most of the species of *Ophiostoma* and its anamorphs are weak or saprophytic pathogens, and are associated with bark beetles (Jacobs and Wingfield, 2001). However, in this study *Ophiostoma ips* was the most pathogenic with respect to *O. olivaceapinii* and *Leptographium guttulatum* in trees of *Pinus hartwegii* of three years of age. Lieutier *et al.* (1989) consider it to be a weak ascomycete, for causing blue-stain in the wood of conifers; within this category are *O. minus*, *O. montia*, *O. penicillatum* and *O. picea* (Seifert, 1993). In this study *O. ips* caused necrosis in the tissues of the inner bark, phloem, cambium and in the xylem it grew in rays and resin canals, causing death of the plant. Wingfield and Marasas (1980) report lesions in the cambium and xylem in *Pinus pinaster* of ten years of age. In general, the three fungi inoculated penetrated in the pits of the traqueids and became established in the parenchyma cells of the inner bark, phloem, cambium, resin canals and rays, causing cell death in the different tissues, and despite the existence of necrosis, the fungus lives, due to the fact that it is a fungus with saprophytic habits (Seifert, 1993; Gibbs, 1993).

---

### CONCLUSIONS

In *Pinus hartwegii* there was accumulation of resin in the inoculation zone with *Leptographium guttulatum*, *Ophiostoma ips* and *Ophiostoma olivaceapinii* at ten dai. *Leptographium guttulatum* and *Ophiostoma olivaceapinii* induce the metabolization of polyphenols, with dispositions in the cell walls of the inner bark, phloem, cambium and pith with disintegration of the cells. *O. ips* caused necrosis in inner bark, phloem, cambium and pith. In xylem, the hyphae of the three fungi penetrate and advance longitudinally through the pits of the traqueids and are distributed radially through parenchyma cells and rays. Of the fungi studied, *O. ips* had the greatest pathogenicity in *P. hartwegii*, although it is considered a weak pathogen.

*End of English Version*

---

inducen la metabolización de polifenoles depositándose en las paredes de las células de la corteza, floema, cambium y médula con desintegración de las células. Por su parte, *O. ips* causó necrosis en corteza, floema, cambium y médula. En xilema, las hifas de los tres hongos penetran y avanzan longitudinalmente por las puntuaciones de las traqueidas y se distribuyen radialmente por células parenquimatosas y radios. De los hongos estudiados, *O. ips* fue el que tuvo mayor patogenicidad en *P. hartwegii*, aunque se considera un patógeno débil.

### LITERATURA CITADA

- BRASIER, C. M.; KIRK, S. A. 2001. Designation of the EAN and NAN races of *Ophiostoma novo-ulmi* as subspecies. *Mycological Research* 105: 547-554.
- CIBRIÁN, T. D.; MÉNDEZ M., J. T.; CAMPOS B., R.; YATES III H. O.; FLORES L. J. 1995. Insectos Forestales de México. Universidad Autónoma Chapingo. SFFS-SARH, México; Forest Service USDA, E.U.A.; NRCA Forest Service, Canadá y Comisión Forestal de América del Norte, COFAN, FAO. Chapingo, México. 453 p.
- CIBRIÁN, T. D.; ALVARADO, R. D.; GARCÍA, D. S. E. 2007. Enfermedades forestales en México/Forest diseases in Mexico. Universidad Autónoma Chapingo; CONAFOR-SEMARNAT, México; Forest Service USDA, EUA; NRCAN Forest Service, Canadá y Comisión Forestal de América del Norte, COFAN, FAO. Chapingo, México. 587 p.
- CONAFOR. 2007. <http://www.conafor.gob.mx/>
- CROISÉ, L.; LIEUTIER, F.; COCHARD, H.; DREYER, ERWIN. 2001. Effects of drought stress and high density stem inoculations with *Leptographium wingfieldii* on hydraulic properties of young Scots pine trees. *Tree Physiology* 21: 427-436
- ESAU, K. 1977. Anatomy of seed plants. John Wiley and Sons. New York. 674 p.
- ET-TOUIL, A.; RIOUX, D.; MATHIEU, F. M.; BERNIER, L. 2005. External symptoms and histopathological changes following inoculation of elms putatively resistant to Dutch elm disease with genetically close strains of *Ophiostoma*. *Canadian Journal of Botany* 83: 656-667.
- FARRELL, B. D.; SEQUERIRA, A. S.; O'MEARA, B. C.; NORMARK, B. B.; CHUNG, J. H.; JORDAL, B. H. 2001. The evolution of agriculture in beetles (Curculionidae Scolytinae and Platypodinae). *Evolution* 55: 2011-2027.
- FERNÁNDEZ, M. M. F.; GARCÍA, A. E.; LIEUTIER, F. 2004. Effects of various densities of *Ophiostoma ips* inoculations on *Pinus sylvestris* in north-western Spain. *Forestry Pathology* 34: 213-223.
- FORDE, K. J. 1995. The effects of *Ophiostoma piliferum* on wood pulp: investigation of the impact of *Ophiostoma piliferum* on the strength properties of handsheets. Institute of Paper Science and Technology. Atlanta, Georgia, USA. 136 p.
- FRANCESCHI, V. R.; KROKENE, P.; KREKLING, P.; CHRISTIANSEN, T. E. 2000. Phloem parenchyma cells are involved in local and distant defense responses to fungal inoculation or bark-beetle attack in Norway spruce (Pinaceae). *American Journal of Botany* 87: 314-326.
- GIBBS, J. N. 1993. The biology of ophiostomatoid fungi causing sapstain in trees and freshly cut logs. In: WINGFIELD, M. J., SEIFERT, K. A.; WEBBER, J. F. (eds.), *Ceratocystis and Ophiostoma*. Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. pp. 153-160.
- HARRINGTON, T. C.; COBB, F. W. 1983. Pathogenicity of *Leptographium* and *Verticicladiella* spp. Isolated from roots of western North American conifers. *Phytopathology* 73: 596-599.
- HUBERT, E. E. 1953. Studies of *Leptographium* isolated from western white pine. *Phytopathology* 43: 637-641.
- JACOBS, K.; WINGFIELD, M. J. 2001. *Leptographium* species. Tree pathogens, insect associates, and agents of blue-stain. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 207 p.
- JOHANSEM, D. A. 1940. Plant Microtechnique, Mc. Graw-Hill Book Co., Inc., New York, N.Y. 523 p.
- KLEPZIG, K. D.; WALKINSHAW, H. C. H. 2003. Cellular Response of Loblolly Pine to Wound Inoculation with Bark Beetle-Associated Fungi and Chitosan. Resch. Pap. SRS-30. Asheville, NC: United States Department of Agriculture. Forest Service. Southern Research Station. 9 p.
- KLEPZIG, K. D.; J. ROBINSON, D.; FOWLER, G.; R. MINCHIN, P.; P. HAIN, F.; H. LEE, A. 2005. Effects of mass inoculation on induced oleoresin response in intensively managed loblolly pine. *Tree Physiology* 25: 681-688.
- LEE, S.; KIM, J. J.; BREUIL, C. 2006. Fungal diversity associated with the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* and infested lodgepole pines in British Columbia. *Fungal Diversity* 22: 91-105.
- LIEUTIER, F.; CHENICLET, C.; GARCÍA, J. 1989. Comparison of the defense reactions of *Pinus pinaster* and *Pinus sylvestris* to attacks by two bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) and their associated fungi. *Environmental Entomology* 18: 228-234.
- NAGY, N. E.; FOSSDAL, C. G.; KROKENE, P.; KREELING, T.; LÖNNEBERG, A.; SOLHEIM, H. 2004. Induced responses to pathogen infection in Norway spruce phloem: changes in polyphenolic parenchyma cells, chalcone synthase transcript levels and peroxidase activity. *Tree Physiology* 24: 505-515.
- NAGY, N. E.; FRANCESCHI, V. R.; SOLHEIM, H. K. H. 2005. Callus cultures and bark from Norway spruce clones show similar cellular features and relative resistance to fungal pathogens. *Tree Physiology* 19: 694-702.
- OWEN, D. R.; LINDAHL, K. Q.; WOOD, D. L.; PARMETER, J. R. 1987. Pathogenicity of fungi isolated from *Dendroctonus valens*, *D. brevicornis*, and *D. ponderosae* on Ponderosa Pine Seedlings. *Phytopathology* 77:631-636.
- RIOUX, D., OUELLETTE, G. B. 1991. Barrier zone formation in host and nonhost trees inoculated with *Ophiostoma ulmi*. I. Anatomy and histochemistry. *Canadian Journal of Botany* 69: 2055-2073.
- SEIFERT, K. A. 1993. Sapstain of commercial lumber by species of *Ophiostoma* and *Ceratocystis*. In: WINGFIELD, M.J., K.A. SEIFERT, J.F. WEBBER (eds.), *Ceratocystis and Ophiostoma*. Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. pp. 141-150.
- SOLHEIM, H. 1993. Ecological aspects of fungi associated with the spruce bark beetle *Ips typographus* in Norway. In: WINGFIELD, M.J., K.A. SEIFERT, J.F. WEBBER (eds.), *Ceratocystis and Ophiostoma*. Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. pp. 235-242.
- WINGFIELD, M. J.; MARASAS, O. F. W. 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. D.; DE BEER, W. Z.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. 2001. Ophiostomatoid fungi associated with three pine-infesting bark beetles in South Africa. *Sydowia* 53: 290-300.
- ZHOU, X. D.; DE BEER, W.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. 2002. Infection sequence and pathogenicity of *Ophiostoma ips*, *Leptographium serpens* and *L. lundbergii* to pines in South Africa. *Fungal Diversity* 10: 229-240.