

# HONGOS OPHIOSTOMATOIDES DE GALERIAS DE *Dendroctonus adjunctus* Blandford EN *Pinus hartwegii* Lindl.

## OPHIOSTOMATOID FUNGI OF GALLERIES OF *Dendroctonus adjunctus* Blandford IN *Pinus hartwegii* Lindl.

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

### RESUMEN

Los descortezadores (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) son vectores del hongo *Ophiostoma* spp., causante del manchado azul de la madera que contribuye a la muerte de árboles en coníferas y angiospermas. En México, *Dendroctonus adjunctus* es una de las principales plagas de los bosques de pino, pero se desconocen los hongos simbioses que introduce en sus galerías. El objetivo del presente estudio fue identificar los hongos ophiostomatoides asociados al pino de las alturas (*Pinus hartwegii*). Se colectaron 20 muestras de corteza con galerías del insecto en la Estación Forestal Experimental Zoquiapan (EFEZ) de la Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México. Las muestras se desinfectaron con hipoclorito de sodio, se colocaron en cámaras con alta humedad relativa e incubaron a  $25 \pm 2$  °C en oscuridad durante 30 días, para el desarrollo de estructuras reproductivas. Los hongos fueron aislados en extracto-malta-agar al 2%; se hizo su caracterización morfológica y molecular, esta mediante la amplificación de la región intergénica (ITS) de los genes ribosomales rADN, con la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se registraron cinco hongos: *Leptographium guttulatum*, *Ophiostoma angusticollis*, *O. nigrocarpum*, *O. olivaceapini* y *Pesotum* sp., con la presencia del teleomorfo y del anamorfo en el medio de cultivo. Los análisis moleculares corroboraron las identificaciones, sin embargo, *O. nigrocarpum* y *O. angusticollis* mostraron una homología con el género *Sporothrix* (anamorfo) en un 99% y *Pesotum* un 98% con *Ophiostoma* (teleomorfo). Las secuencias se depositaron en el Banco de Genes del NCBI.

**Palabras clave:** Descortezador, *Leptographium guttulatum* M.J. Wingf. & K. Jacobs, *Ophiostoma angusticollis* (E.F. Wright & H.D. Griffin) M. Villarreal, *Ophiostoma nigrocarpum* (R.W. Davidson) de Hoog, *Ophiostoma olivaceapini* (R.W. Davidson) Seifert & G. Okada, *Pesotum* J.L. Crane & Schokn.

### ABSTRACT

Bark beetles (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) are vectors of *Ophiostoma* fungi species which cause the blue-stained wood disease and contribute to the death of conifer and angiosperm trees. In Mexico, *Dendroctonus adjunctus* is one of the major pests of pine forests; however, most of the symbiotic fungi introduced into its galleries are unknown. The main objective of the present study was to identify and characterize ophiostomatooid fungi associated with hartwegii pine (*Pinus hartwegii*). Twelve bark beetle galleries were collected in the Zoquiapan Experimental Forest Station (EFEZ by its acronym in Spanish) from the Universidad Autonoma Chapingo in Zoquiapan, State of Mexico. Samples were disinfected with sodium hypochlorite, placed in chambers with high relative humidity and incubated at  $25 \pm 2$  °C in darkness during 30 days for the development of reproductive structures. Fungi were isolated on 2% agar-malt extract; its identification was done using morphological characters and were molecularly characterized by means of amplification of the internal transcribes spacer (ITS) region of the ribosomal rDNA genes using the Polymerase chain reaction (PCR) technique. Five fungi were identified: *Leptographium guttulatum*, *Ophiostoma nigrocarpum*, *O. angusticollis*, *O. olivaceapini* and *Pesotum* sp. The molecular analysis confirmed that *O. nigrocarpum* and *O. angusticollis* showed 99% homology levels with the genus *Sporothrix* (anamorph), whereas *Pesotum* had 98% homology levels with *Ophiostoma* (teleomorph). The sequences were deposited in the Gene Bank of the NCBI.

**Key words:** Bark beetle, *Leptographium guttulatum* M.J. Wingf. & K. Jacobs, *Ophiostoma angusticollis* (E.F. Wright & H.D. Griffin) M. Villarreal, *Ophiostoma nigrocarpum* (R.W. Davidson) de Hoog, *Ophiostoma olivaceapini* (R.W. Davidson) Seifert & G. Okada, *Pesotum* J.L. Crane & Schokn.

Fecha de recepción: 20 de agosto de 2010.

Fecha de aceptación: 23 de diciembre de 2011.

<sup>1</sup> Programa de Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Correo-e: oalejandrovera@gmail.com.

<sup>2</sup> División de Ciencias Forestales (DICIFO), Universidad Autónoma Chapingo.

<sup>3</sup> Programa de Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

## INTRODUCCIÓN

*Ceratocystis sensu lato* Ellis & Halst. pertenecen al grupo de los ophiostomatoides e incluyen más de 110 especies de ascomicetes que presentan características morfológicas similares y están adaptados a dispersarse por artrópodos, como los insectos del género *Dendroctonus* (Upadhyay, 1993; Malloch y Blackwell, 1993). Varios taxa de ophiostomatoides son patógenos importantes de coníferas y angiospermas (Wingfield, 1993; Jacobs y Wingfield, 2001), otros pueden causar un manchado en troncos y en la madera recién cortada (Wingfield, 1993) o afectar cultivos como algodón, camote, cacao, café, caña de azúcar, guayaba, mango, piña, plátano, tabaco y zanahoria (Kile, 1993).

Las esporas de estos hongos se producen en las galerías de insectos y son transportadas en el exoesqueleto, micangios o aparato digestivo del descortezador (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae); dicho grupo fúngico tiene un efecto nutricional mutualista o antagonista, o bien ninguno sobre el insecto (Paine *et al.*, 1997; Ayres *et al.*, 2000). Se ha consignado que ayudan a matar al árbol, por la reducción de agua, azúcares y acumulación de monoterpénoides potencialmente tóxicos en el floema y xilema (Popp *et al.*, 1995; Croisé *et al.*, 2001).

En América del Norte y Europa se tiene identificado a *Ophiostoma ulmi* (Buisman) Nanf. y *O. novo-ulmi* Brasier como responsables de la enfermedad del olmo Holandés (Wingfield, 1993). *Leptographium wageneri* var. *wageneri* (W. B. Kendr.) M. J. Wingf. se han observado en pinos piñoneros (*Pinus monophylla* Torr. & Frém. y *P. edulis* Engelm.), *L. wageneri* (W. B. Kendr.) M. J. Wingf. var. *pseudotsugae* T. C. Harr. & F. W. Cobb en *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco y *L. wageneri* (T. C. Harr. & F. W. Cobb) var. *ponderosum* T. C. Harr. & F. W. Cobb en pinos duros (*P. ponderosa* Laws., *P. contorta* (Balf.) Critchfield y *P. jeffreyi* Murr). Además son los agentes causales de la enfermedad del teñido oscuro de raíces, en Estados Unidos y Canadá (Harrington, 1988; Wingfield y Knox- Davies, 1980).

En México se han registrado 17 hongos ophiostomatoides asociados con insectos que se alimentan del floema y cambium vascular: *Conophthorus cembroides* Woods, *Dendroctonus adjunctus* Blandford, *D. mexicanus* Hopkins, *D. valens* LeConte, *Ips calligraphus* Germar y *Pseudohylesinus* spp. Blandford (Marmolejo, 1991; Marmolejo y Butin, 1993; Zhou *et al.*, 2004; Cibrián *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2009).

Los taxa más frecuentes que provocan manchado en la madera son *Ophiostoma piliferum* (Fr.) Syd. & P. Syd. y *O. ips* (Rumbold) Nanf. (Marmolejo y Butin, 1993; Marmolejo, 1991; Pérez *et al.*, 2009). *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halst. se cita como un hongo vascular en *Hevea brasiliensis* Muell. Arg., cuya presencia induce la muerte del árbol, o manchados en la madera recién cortada y reduce la cosecha de goma en

## INTRODUCTION

*Ceratocystis sensu lato* Ellis & Halst. belong to the ophiostomatoid group and include more than 110 species of ascomycetes that have similar morphological features and are adapted for dispersion by arthropods, such as the *Dendroctonus* insects (Upadhyay, 1993; Malloch and Blackwell, 1993). Several taxa of ophiostomatoides are important softwood and hardwood pathogens (Wingfield, 1993; Jacobs and Wingfield, 2001), and others can cause staining of logs or wood recently cut (Wingfield, 1993) or damage crops such as cotton, sweet potato, cacao, coffee, sugar cane, mango, pineapple, banana, tobacco and carrot (Kile, 1993).

The spores of these fungi are produced in the galleries of insects and are transported in the exoskeleton, mycangia or digestive system of the barkbeetle (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae); such fungi group has a nutritional mutualistic or antagonistic effect, or non over the insect (Paine *et al.*, 1997; Ayres *et al.*, 2000). It has been put in the record that they help to kill a tree as they shorten the availability of water, sugar and monoterpenoid accumulation potentially toxic for the phloem and xylem (Popp *et al.*, 1995; Croisé *et al.*, 2001).

In North America and Europe *Ophiostoma ulmi* (Buisman) Nanf. and *O. novo-ulmi* Brasier have been detected as responsible for the Dutch elm disease (DED) (Wingfield, 1993). *Leptographium wageneri* var. *wageneri* (W. B. Kendr.) M. J. Wingf. has been observed in *Pinus monophylla* Torr. & Frém. and *P. edulis* Engelm.; *L. wageneri* (W. B. Kendr.) M. J. Wingf. var. *pseudotsugae* T. C. Harr. & F. W. Cobb in *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco and *L. wageneri* (T. C. Harr. & F. W. Cobb) var. *ponderosum* T. C. Harr. & F. W. Cobb in *P. ponderosa* Laws., *P. contorta* (Balf.) Critchfield and *P. jeffreyi* Murr. Also, they are the causing agents of the black stain root disease in the United States of America and Canada (Harrington, 1988; Wingfield and Knox- Davies, 1980).

In Mexico, 17 ophiostomatoid fungi associated with *Conophthorus cembroides* Woods, *Dendroctonus adjunctus* Blandford, *D. mexicanus* Hopkins, *D. valens* LeConte, *Ips calligraphus* Germar and *Pseudohylesinus* spp. Blandford, which are insects that feed from the phloem and vascular cambium, have been reported by Marmolejo, 1991; Marmolejo and Butin, 1993; Zhou *et al.*, 2004; Cibrián *et al.*, 2007 and Pérez *et al.*, 2009.

The most common taxa that cause wood staining are *Ophiostoma piliferum* (Fr.) Syd. & P. Syd. and *O. ips* (Rumbold) Nanf. (Marmolejo and Butin, 1993; Marmolejo, 1991; Pérez *et al.*, 2009). *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halst. has been quoted as the vascular fungus of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg., and its presence leads to the death of the tree, or recently cut wood staining and lowers gum harvest in forest plantations (Cibrián *et al.*, 2007). The three species have been reported

plantaciones forestales (Cibrián *et al.*, 2007). Las tres especies han sido registradas como patógenas en muchas partes del mundo (Seifert, 1993). Se han aislado de insectos y de sus galerías y su identificación se ha hecho con base en sus características morfológicas aunque, la ausencia del estado sexual dificulta su separación taxonómica (Zhou *et al.*, 2001).

Las secuencias de las regiones ITS de los genes ribosomales (rADN) se han usado con éxito para determinar las relaciones filogenéticas entre los hongos ophiostomatoideos, ya que la morfología de sus ascosporas es un carácter taxonómico no confiable (Hausner *et al.*, 1993; Wingfield *et al.*, 1994). Zhou *et al.* (2001) amplificaron las regiones internas ITS de los genes rRNA y con ese método identificaron a *Ophiostoma pulvinisporum* X. D. Zhou & M. J. Wingf. y *Sporothrix* sp. Hektoen & C. F. Perkins) en México. El objetivo del presente trabajo fue identificar hongos ophiostomatoideos asociados a *Pinus hartwegii* Lindl.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo en campo

Se colectaron 20 muestras de corteza de *Pinus hartwegii* con galerías del insecto descortezador *Dendroctonus adjunctus* en la Estación Forestal Experimental Zoquiapan (EFEZ) de la Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México. El material se etiquetó, colocó en bolsas de polipapel y se trasladó al Laboratorio de Patología Forestal del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo-Texcoco, Estado de México, donde se conservaron a 4 °C hasta su posterior análisis.

### Aislamiento del hongo

Las muestras se lavaron con agua destilada, se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial al 1.5% durante 2 min, se lavaron tres veces con agua destilada estéril, se secaron con papel estéril y finalmente se colocaron en cámaras húmedas. Estas se incubaron a 25 ± 2 °C en oscuridad durante 30 días para inducir la formación de estructuras sexuales o asexuales. Las masas de ascosporas o conidios presentes en el ápice de las estructuras reproductivas se transfirieron con una aguja de disección estéril a cajas de Petri con extracto-malta-agar al 2% (EMA), cicloeximida (0.1g) y sulfato de estreptomycin (0.02g) e incubaron a 25 ± 2 °C en luz natural durante 20 días. Se transfirieron fragmentos del hongo desarrollado a cajas Petri con EMA (2%) e incubaron en las mismas condiciones del aislamiento. Los cultivos monoconidiales o monoascospóricos se realizaron en cajas Petri con agar-agua (AA) y se incubaron a 25 ± 2 °C durante 24 h. Las conidias y ascosporas germinadas se colocaron, individualmente, en cajas de Petri con EMA (2%) y se incubaron hasta que se formara la estructura sexual o asexual. Todos los aislamientos se conservaron en tubos de ensayo inclinados con EMA (2%) y cubiertos con aceite mineral.

as pathogens in many parts of the world (Seifert, 1993). They have been isolated from insects and their galleries and their identification has been based on their morphological characteristics, even though the absence of a sexual stage makes it difficult for taxonomic endings (Zhou *et al.*, 2001).

The ITS sequences of the ribosomal genes (rDNA) have been successfully used to determine the phylogenetic relations among ophiostomatoid fungi, since the morphology of their ascospores is a non-reliable taxonomic feature (Hausner *et al.*, 1993; Wingfield *et al.*, 1994). Zhou *et al.* (2001) increased the internal ITS regions of the rRNA genes and with that method identified *Ophiostoma pulvinisporum* X. D. Zhou & M. J. Wingf. and *Sporothrix* sp. Hektoen & C. F. Perkins) in México. The aim of this study was to identify ophiostomatoid fungi associated with *Pinus hartwegii* Lindl.

## MATERIALS AND METHODS

### Sampling in the field

20 *Pinus hartwegii* bark samples with insect galleries of *Dendroctonus adjunctus* were collected at the Zoquiapan Forest Experimental Station (EFEZ) that belongs to Universidad Autónoma Chapingo, at Mexico State. The material was labeled and placed into polypaper bags and was taken to the Forest Pathology Laboratory off the Graduate Studies College, Montecillo-Texcoco, where they were preserved at 4 °C for its further analysis.

### Fungus isolation

Samples were washed with distilled water, disinfected with 1.5% commercial sodium hypochloride for 2 min; they were rinsed thrice with sterile distilled water, were dried on sterile paper and finally were put into moist chambers. They were incubated at 25 ± 2 °C in darkness for 30 days in order to induce sexual or asexual structure formation. Ascospore masses or conidia present on the apex of reproductive structures were transferred with a sterile dissection needle to Petri boxes with 2% MAE (malt-agar-extract), 0.1g cycloheximide and 0.02 g streptomycin sulfate and incubated at 25 ± 2 °C under natural light for 20 days. Then, fragments of the fungus developed in Petri boxes with 2% MAE were transferred and incubated under the same isolation conditions. Monoconidial or monoascosporic culture were made in Petri boxes with water-agar and were incubated at 25 ± 2 °C for 24 h. Germinated conidia and ascospores were individually put into Petri boxes with 2% MAE and were incubated until the sexual or asexual structure was formed. All of the isolations were preserved in leaning assay tubes with 2% MAE and covered with mineral oil.

## Identificación morfológica

A partir de 10 cultivos puros (monoconidiales o monoascopóricos) en EMA (2%) a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e incubados durante 40 días se identificaron los hongos a nivel de género con las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1972) y Hanlin (2001), y para las especies se emplearon las de Upadhyay (1981) y Jacobs y Wingfield (2001). Además, se observó la forma de crecimiento, color de la colonia, tipo de micelio, formación de estructuras reproductivas, tipo y forma de conidios o ascosporas, en las que se midieron en micras 200 ascosporas y conidios y 30 peritecios o sinemas. El seguimiento al desarrollo de conidios y tipo de ascosporas se hizo con microscopía de barrido; para ello se tomaron discos con crecimiento fungal de 5 mm de diámetro. Las muestras se fijaron en glutaraldehído al 3% con amortiguador de fosfatos Sorensen 0.1M, pH 7.2, durante 24 h. Posteriormente, se lavaron tres veces con el amortiguador de fosfatos Sorensen por un minuto y se deshidrataron en una serie de soluciones de etanol (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%, las últimas tres soluciones se usaron dos veces) por 15 min. en cada cambio. Los discos se colocaron en una secadora de punto crítico de  $\text{CO}_2$  Samdri-780A® (TOUSIMIS Research Corporation, Rockville, EUA) a  $31.1^\circ\text{C}$  y 1073 psi; enseguida, los discos se pegaron en un portamuestras de latón de 9 mm de diámetro con cinta adhesiva-conductiva de cobre y se recubrieron con oro durante 4 min en una ionizadora JFC-1100® (JEOL LTD, Tokio, Japón). Las muestras se revisaron en un microscopio electrónico de barrido JSM-35C® (JEOL LTD, Tokio, Japón) operado a 15 Kv en el laboratorio de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados.

## Caracterización molecular

Los 10 aislamientos de hongos puros utilizados para extraer el ADN se cultivaron en matraces con 50 mL de medio líquido de extracto de malta (EM: 20 g de extracto de malta, 1,000 mL de agua destilada estéril), a una temperatura de  $25^\circ\text{C}$  y oscuridad por 25 días. La extracción del ADN se hizo de acuerdo al método AP (Sambrook y Russell, 2001). Su calidad se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. La amplificación de las regiones internas ITS1 e ITS2 de los genes ribosomales (rADN), localizados entre la subunidad pequeña 18S.58S y la subunidad larga 5.8S-28S se realizó mediante la técnica de PCR con los iniciadores universales ITS1-F (5'-CTTGGTCATTAGAGGGAAGTAA-3') e ITS4 (5'-TCC TCCGCTTATTGATATGC-3').

La mezcla de reacción de PCR estuvo compuesta de: 12.5  $\mu\text{L}$  agua libre de nucleasas, 2.5  $\mu\text{L}$  solución amortiguadora Buffer 1X, 2.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  a 2.5 mM, 0.5  $\mu\text{L}$  de dNTPs a 10 mM, 0.5  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleótido, 2 U de Taq-DNA polimerasa (Invitrogen) y 2  $\mu\text{L}$  de DNA (10 ng), con un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ . Se utilizó un termociclador Applied Biosystems<sup>MR</sup> (Mod. Termal Cycler 2720) con el siguiente programa: desnaturalización

## Morphologic identification

From the 10 pure cultures (monoconidial or monoascoporic) in 2% MAE at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  and incubated for 40 days, at a genus level, fungi were determined by following the taxonomic keys of Barnett and Hunter (1972) and Hanlin (2001), and for species those of Upadhyay (1981) and Jacobs and Wingfield (2001). Also, the way they grew, the color of the colony, the type of mycelium, reproductive structure formation, type and form of conidia and ascospores were observed, in which 200 ascospores and conidia and 30 peritecia or synnemas were measured in microns. The follow-up of the development of conidia and type of ascospores was made by electron microscopy; for that ending, fungal growth discs of 5 mm in diameter were taken. Samples were fixed in 3% glutaraldehyde with 0.1M Sorensen phosphate buffer, pH 7.2 or 24 h. Afterwards, they were rinsed thrice with the Sorensen phosphate buffer for one minute and were dehydrated with a series of ethanol solutions (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100%; the three last were used twice) for 15 min in every change.. The discs were placed into a Samdri-780A® (TOUSIMIS Research Corporation, Rockville, USA) kiln at the critical point of  $\text{CO}_2$  at  $31.1^\circ\text{C}$  and 1073 psi; right away, the discs were fixed on a 9 mm diameter brass sampler with a copper conductive-adhesive tape and were covered with gold during 4 min in a JFC-1100® (JEOL LTD, Tokio, Japan ioniziner). Samples were reviewed with a JSM-35C® (JEOL LTD, Tokio, Japan) electron microscope operated at 15 Kv in the Electronic Microscopy laboratory of the Graduate Studies College.

## Molecular Description

The ten pure fungi isolations used to extract DNA were cultivated in 50 mL flasks of liquid medium of malt extract (ME: 20 g of malt extract + 1,000 mL of sterile distilled water) at  $25^\circ\text{C}$  in darkness for 25 days. DNA extraction was made according to the AP method (Sambrook and Russell, 2001). Its quality was assessed by electrophoresis in agarose gel at 1%. The amplification of the ITS1 and ITS2 internal regions of the ribosomal (rDNA) genes, located between the 18S.58S small subunit and the 5.8S-28S long subunit was made by the PCR technique with ITS1-F (5'-CTTGGTCATTAGAGGGAAGTAA-3') and ITS4 (5'-TCC TCCGCTTATTGATATGC-3') universal initiators.

The reaction mixture of PCR was made up by 12.5  $\mu\text{L}$  water free of nucleases, 2.5  $\mu\text{L}$  Buffer solution of 1X, 2.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  at 2.5 mM, 0.5  $\mu\text{L}$  of dNTPs at 10 mM, 0.5  $\mu\text{L}$  of each oligonucleotide, 2 U of Taq-DNA polymerase (Invitrogen) and 2  $\mu\text{L}$  of DNA (10 ng), with a final volume of 25  $\mu\text{L}$ . An Applied Biosystems<sup>TM</sup> (Thermal Cycler 2720 model) thermal cycler was used with the following program: initial desnaturalization at  $95^\circ\text{C}$  for 3 min; 35 desnaturalization cycles of  $94^\circ\text{C}$  for 59 sec; alignment at  $55^\circ\text{C}$  for 59 sec and extension at  $72^\circ\text{C}$  for 1 min and a final extension of  $72^\circ\text{C}$  for 8 min (Zhou *et al.*, 2004).

inicial a 95 °C por 3 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 59 seg; alineamiento a 55 °C por 59 seg y extensión a 72 °C por 1 min, y una extensión final de 72 °C por 8 min. (Zhou *et al.*, 2004).

Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, se tiñeron con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron en un fotodocumentador (Bio-Imagen Systems Mini Bis Pro). Los productos de la PCR fueron tomados directamente del gel y purificados con Wizard SV (Promega, USA).

Estos últimos fueron secuenciados en ambas direcciones (5' a 3' y 3' a 5') con los mismos iniciadores ITS, en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México con un secuenciador Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystem Corp). Las secuencias se compararon por alineamiento con la información disponible en la base de datos del GenBank (NCBI: National Center for Biotechnology Information), mediante el método BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aislamientos e identificación

Se obtuvieron 10 aislamientos de galerías del insecto descortezador *Dendroctonus adjunctus* de *Pinus hartwegii*. Se identificaron cuatro hongos a nivel especie: *Leptographium guttulatum* M.J. Wingf. & K. Jacobs, *Ophiostoma angusticollis* (E.F. Wright & H.D. Griffin) M. Villarreal, *O. nigrocarpum* (R.W. Davidson) de Hoog y *O. olivaceapini* (R.W. Davidson) Seifert & G. Okada y una del género *Pesotum* J. L. Crane & Schokn.

*Leptographium guttulatum* tuvo un crecimiento de 80 mm a los 10 - 12 días en EMA (2%), a una temperatura de 26 ± 1 °C, en condiciones de laboratorio; coloración de color café claro a café oliváceo y al reverso de la caja tonalidad café oscuro. El micelio del hongo inmerso en el medio de cultivo fue de color café claro a café oliváceo y micelio aéreo hialino, cuando joven (Figura 1A). Conidióforos simples de color café oliváceo de (210-) 500.33 (-815.60) µm de longitud y sin rizoides emergiendo del medio de cultivo. Estípite café oliváceo, cilíndrico con siete septas de (115.20-) 270.40 (-650.60) µm de longitud y 5.5 a 11 µm de ancho. Células apical y basal no hinchadas. Aparato conidiogénico de (62.55-) 150 (-195.80) µm de longitud con ramificación tipo B con 2 a 4 ramas (Figura 1B). Células conidiogénicas de proliferación percurrente, cilíndricas de 2 a 3, con el ápice ligeramente angosto y redondeado. Conidias hialinas, aseptadas, oblongas a ovoides con gúttulas prominentes de (5.59-) 6.74 (-11.62) × 2.0-3.0 µm, de apariencia simpodial en la base de las células conidiogénicas (Figura 1C). Las conidias están contenidas en una gota mucilaginosa y transparente que cubre todo el aparato

The amplified products were analyzed by agarose gel electrophoresis at 1%; they were stained with ethidium bromide and bands were visualized in a photo-documenter (Bio-Imagen Systems Mini Bis Pro). The PCR products were directly taken from gel and purified with SV Wizard (Promega).

The latter were sequenced in both directions (5' to 3' and 3' to 5') with the same ITS initiators at the Cell Physiology Institute of the National University of Mexico (UNAM) with a Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystem Corp) sequencer. Sequences were compared by alignment with available information in the data base of GenBank (NCBI: National Center for Biotechnology Information) by the BLAST method (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Isolation and identification

Ten isolations of insect galleries of *Dendroctonus adjunctus* bark-beetle of *Pinus hartwegii* were obtained. At the species level four fungi were identified: *Leptographium guttulatum* M.J. Wingf. & K. Jacobs, *Ophiostoma angusticollis* (E. F. Wright & H. D. Griffin) M. Villarreal, *O. nigrocarpum* (R. W. Davidson) de Hoog and *O. olivaceapini* (R. W. Davidson) Seifert & G. Okada and one of the *Pesotum* J. L. Crane & Schokn genus.

*Leptographium guttulatum* grew 80 mm after 10 to 12 days in 2% MAE at 26 ± 1 °C, in laboratory conditions; from light brown to olive brown and at the other side of the box, dark brown. The mycelium of the fungi immersed in the culture medium, light brown to olive- brown and hyaline aerial mycelium, when young (Figure 1A). Olive-brown simple conidiophores (210-) 500.33 (-815.60) µm long and without rhizoids emerging from the culture medium. Olive- brown stipe, cylinder shaped, with seven septa (115.20-) 270.40 (-650.60) µm long and 5.5 to 11 µm wide. Non-swollen apical and basal cells. Conidiogenic apparatus of (62.55-) 150 (-195.80) µm long with B type ramification of 2 to 4 branches (Figure 1B) of percurrent proliferation, cylinder shaped from 2 to 3, with the apex slightly narrow and rounded. Hyaline conidia, aseptated, oblong to ovoid with (5.59-) 6.74 (-11.62) × 2.0-3.0 µm prominent guttules, of sympodial aspect at the base of the conidiogenic cells (Figure 1C). Conidias are contained in a mucilaginous and transparent drop that covers all the conidiogenic apparatus, in young isolations of 10 to 20 days and in isolations elder than 30 days, the mucilaginous drops become cream color.

These morphologic characteristics agree with the descriptions of Jacobs *et al.* (2001) and Jacobs and Wingfield (2001). Barras and Perry (1971) isolated *Leptographium* sp. (Lagerb and Melin Svenska) from the micangio of *Dendroctonus adjunctus*. From their morphology, Six and Paine (1996) determined mtDNA sequences and RFLP of the micangial fungus *Leptographium*

conidiogénico, en aislamientos jóvenes de 10 a 20 días y en aislamientos mayores de 30 días las gotas mucilaginosas se tornan de color crema.

Estas características morfológicas correspondieron a las descripciones de Jacobs *et al.* (2001) y Jacobs y Wingfield (2001). Barras y Perry (1971) aislaron del micangio de *Dendroctonus adjunctus* a *Leptographium* sp. (Lagerb y Melin Svenska). Six y Paine (1996) identificaron por características morfológicas, secuencias de ADNmt y RFLP al hongo micangial *Leptographium pyrinum* R.W. Davidson asociado a *D. adjunctus*. *L. pyrinum* puede distinguirse de otras especies de *Leptographium* por la conidia ovoide y la presencia de material granular sobre las hifas (Jacobs y Wingfield, 2001).

*Ophiostoma angusticollis* registró un crecimiento radial de 26 mm de diámetro a los 15 días, a una temperatura de  $26 \pm 1$  °C, en medio de cultivo EMA (2%); coloración blanca cremosa y al reverso de la caja de Petri, blanca (Figura 1D). Los peritecios crecen superficiales o ligeramente inmersos en el medio de cultivo a los 15 o 20 días. Su base es globosa, oscura, de (84.60-) 96.30 (-115.20)  $\mu\text{m}$  de diámetro. El cuello del peritecio es café oscuro a negro, de 225 a 507  $\mu\text{m}$  de largo y (12.00-) 15.60 (-21.30)  $\mu\text{m}$  de ancho de la base. El ápice del cuello rojo, más claro, de (1.85-) 3.24 (-6.30)  $\mu\text{m}$  de ancho e hifas ostiolares ausentes (Figura 1E). Las ascas son evanescentes. Ascosporas hialinas, unicelulares, reniformes de (2.00-) 3.50 (-4.70)  $\times$  (1.0-) 1.6 (-2.0)  $\mu\text{m}$  (Figura 1F). La masa de ascosporas está contenida en un mucílago blanco cremoso, en el ápice del cuello del peritecio (Figura 1G). La descripción anterior concuerda con las de Olchowecki y Reid (1974), Upadhyay (1981) y Aghayeva *et al.* (2004).

En el micelio de *O. angusticollis* se observó un tipo de célula conidiogénica de apariencia denticulada, similar a su anamorfo *Sporothrix* y con conidios hialinos, unicelulares, ovoides, de (2.0-) 3.5 (-7.0)  $\times$  (1.0-) 1.2 (-2.0)  $\mu\text{m}$ , con desarrollo simpodial (Upadhyay, 1981). Morfológicamente *Ophiostoma angusticollis* (E.F. Wright & H.D. Griffin) M. Villarreal M. Villarreal, Arenal, V. Rubio & De Troya son muy parecidos. Sin embargo, el anamorfo de *O. sejunctum* es *Hyalorhinocladiella* H.P. Upadhyay & W.B. Kendrick (Villarreal *et al.*, 2005); además, *O. angusticollis* contiene la masa de ascosporas en un mucílago, a diferencia de *O. sejunctum* (Olchowecki y Reid, 1974). Se ha aislado *O. angusticollis* y otros *Ceratocystis sensu lato* de la cámara pupal de un cerambícido asociado con *Bursaphelenchus xylophilus* Steiner *et* Buhner; así como, del nemátodo de la madera del pino en *Pinus resinosa* Aiton y *P. banksiana* Lamb. (Wingfield, 1987).

*Ophiostoma nigrocarpum* presentó un crecimiento radial en medio de cultivo EMA (2%) y alcanzó un diámetro de 30 mm, a los 15 días. La coloración de la colonia fue de blanca a gris oscuro, en función la edad del cultivo

*pyrinum* R.W. Davidson asociado a *D. adjunctus*. *L. pyrinum* can be distinguished from other *Leptographium* species for the ovoid conidia and granular matter over hyphae (Jacobs and Wingfield, 2001).

*Ophiostoma angusticollis* had a radial growth of 26 mm of diameter after 15 days at  $26 \pm 1$  °C in MAE at 2%; creamy white color and on the other side of Petri boxes, white color (Figure 1D). Perithecia have a superficial growth or lightly immerse in the culture medium after 15 to 20 days. Its base is globose, dark, (84.60-) 96.30 (-115.20)  $\mu\text{m}$  in diameter. The neck of the perithecium is dark brown to black, 225 to 507  $\mu\text{m}$  long and (12.00-) 15.60 (-21.30)  $\mu\text{m}$  wide at the base. The apex of the neck is blunt, lighter in color, (1.85-) 3.24 (-6.30)  $\mu\text{m}$  wide and absent ostiolar hyphae (Figure 1E). Ascae are evanescent. Hyaline ascospores, unicellular, reniform, (2.00-) 3.50 (-4.70)  $\times$  (1.0-) 1.6 (-2.0)  $\mu\text{m}$  (Figure 1F). The ascospore mass is contained in a creamy white mucilage in the apex of the neck of the perithecium (Figure 1G). The previous description agrees with those of Olchowecki and Reid (1974), Upadhyay (1981) and Aghayeva *et al.* (2004).

In the mycelium of *O. angusticollis* it was observed a type of conidiogenic cell of denticulate appearance, similar to its anamorphic *Sporothrix* and with hyaline conidia, one-cell, ovoid, (2.0-) 3.5 (-7.0)  $\times$  (1.0-) 1.2 (-2.0)  $\mu\text{m}$  with sympodial development (Upadhyay, 1981). Morphologically, *Ophiostoma angusticollis* (E.F. Wright & H.D. Griffin) M. Villarreal M. Villarreal, Arenal, V. Rubio & De Troya are very similar. However, the anamorphic of *O. sejunctum* is *Hyalorhinocladiella* H.P. Upadhyay & W.B. Kendrick (Villarreal *et al.*, 2005); also, *O. angusticollis* has the ascospore mass in a mucilage, in contrast to *O. sejunctum* (Olchowecki and Reid, 1974). *O. angusticollis* and other *Ceratocystis sensu lato* have been isolated from the pupal chamber of a cerambycidae associated with *Bursaphelenchus xylophilus* Steiner *et* Buhner, as well as from the nematode of the wood of *Pinus resinosa* Aiton and *P. banksiana* Lamb. (Wingfield, 1987).

*Ophiostoma nigrocarpum* showed a radial growth in 2% MAE and reached a 30 mm diameter after 15 days. The colony was white to dark grey, depending on the age of the culture (Figure 1H). One-cell conidia, ovoid, ellipsoidal or cylindrical, (2.0-) 3.5 (-7.0)  $\times$  (1.0-) 1.2 (-2.0)  $\mu\text{m}$  and in a white mycelium, similar to the *Sporothrix* genus (Figure 1I). Perithecia grew on the surface or lightly immersed in the culture and develop after 10 to 15 days (Figure 1). Globose dark base, (188-) 107.82 (-84.6)  $\mu\text{m}$  diameter (Figure 1K). Perithecium neck dark brown to black, 180 to 210  $\mu\text{m}$  long and (18-) 22 (-36)  $\mu\text{m}$  wide at the base; apex is lighter, (15-) 13 (-21)  $\mu\text{m}$  wide and ostiolar hyphae, asepted, light brown, (1.5-) 3.2 (-3.8)  $\mu\text{m}$  wide. Ascae are evanescent. Hyaline ascospores, unicellular, moon-shape, (2.90-) 3.50 (-4.90)  $\times$  (1.0-) 1.6 (-2.0)  $\mu\text{m}$  (Figure 1K and L). The ascospore mass is contained in a creamy

(Figura 1H). Conidios unicelulares, ovoides, elipsoides a cilíndricos de (2.0-) 3.5 (-7.0)  $\times$  (1.0-) 1.2 (-2.0)  $\mu\text{m}$  y contenidos en micelio blanco, similar al del género *Sporothrix* (Figura 1I). Los peritecios crecen superficiales o ligeramente inmersos en el medio de cultivo, desarrollándose a los 10 - 15 días (Figura 1J). Su base es globosa, oscura, de (188-) 107.82 (-84.6)  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 1K). Cuello del peritecio café oscuro a negro, de 180 a 210  $\mu\text{m}$  de largo y (18-) 22 (-36)  $\mu\text{m}$  de ancho de la base; el ápice es más claro, de (15-) 13 (-21)  $\mu\text{m}$  de ancho e hifas ostiolares, aceptadas, de color café claro de (1.5-) 3.2 (-3.8)  $\mu\text{m}$  de ancho. Ascas de tipo evanescente. Ascosporas hialinas, unicelulares, de forma lunada, de (2.90-) 3.50 (-4.90)  $\times$  (1.0-) 1.6 (-2.0)  $\mu\text{m}$  (Figura 1K y L). La masa de ascosporas está contenida en un mucilago blanco cremoso en el ápice del cuello del peritecio. Esta descripción morfológica coincide con las de Upadhyay (1981) y Aghayeva *et al.* (2004)

En *Ophiostoma olivaceapinii* se registró un crecimiento radial en medio EMA (2%), con un diámetro de 45 mm, a los 15 días y a una temperatura de  $26 \pm 1$  °C. La coloración de la colonia fue café claro, café oscuro en cultivos jóvenes y café grisáceo a los 30 días. El micelio inmerso de color café (Figura 2A). Conidióforos sinematosos café a café oscuro, de 480 a 560  $\mu\text{m}$  de largo incluyendo el aparato conidiogénico. Sinemas solitarios o agrupados (2 a 6), de color café a café oscuro, a los 10 o 12 días (Figura 2B). Células conidiogénicas aparentemente con proliferación percurrente y anelaciones de apariencia sympodial, cilíndrica y hialina. Conidios hialinos, unicelulares, elipsoides a ovoides, de (7.64-) 4.82 (-1.97)  $\times$  (5.33-) 2.65 (-1.37)  $\mu\text{m}$ . La masa de conidios contenida en un mucilago hialino a grisáceo en el ápice del sinema, dependiendo de la edad del cultivo. Los peritecios crecen superficiales o ligeramente inmersos en el medio de cultivo y se desarrollan a los 25 días, solitarios o agrupados (Figura 2C); base globosa, oscuros, de 190 a 200  $\mu\text{m}$  de diámetro. El cuello del peritecio café oscuro a negro de 250 a 618  $\mu\text{m}$  de largo sin incluir hifas ostiolares, de (20-) 26 (-38)  $\mu\text{m}$  de ancho de la base, de (13-) 16 (-21)  $\mu\text{m}$  de ancho del ápice y ápice del cuello ligeramente curvo. Hifas hialinas, de 20 a 25  $\mu\text{m}$  de largo y de (1-) 1.5 (-2.0)  $\mu\text{m}$  de ancho. Las ascas son de tipo evanescentes. Ascosporas hialinas, reniformes (Figura 2D). Estas características concuerdan con las descripciones de Barnett and Hunter (1972); Upadhyay (1981) y Mouton *et al.* (1993).

*Pesotum* sp. (sinónimo de *Graphium corda* creció 80 mm en 15 días en EMA (2%), a una temperatura de  $26 \pm 1$  °C; su coloración fue café, café olivo a gris a los 70 días, al reverso de la caja es café oscuro (Figura 2E). Micelio inmerso café y micelio aéreo hialino. Sinemas café oscuro a negro oscuro de (450.16-) 236.99 (-150.40)  $\times$  (37.60-) 22.65 (-9.40)  $\mu\text{m}$  (Figura 1F). Célula conidiogénica percurrente, anélida, cilíndrica y hialina. Conidia holoblástica, hialina, unicelular, elipsoide a ovoide de (7.64-) 4.82 (-1.97)  $\times$  (6.33-) 2.65 (-1.37)  $\mu\text{m}$  y la masa de conidias se acumula en el ápice del sinema (Figura 1G). La descripción anterior coincide con las descripciones de Barnett and Hunter (1972) y Upadhyay (1981).

white mucilage in the apex of the neck of the perithecium. This morphologic description is consistent with that of Upadhyay (1981) and Aghayeva *et al.* (2004).

*Ophiostoma olivaceapinii* had a radial growth on 2% MAE, media with a diameter of 45 mm, after 15 days at  $26 \pm 1$  °C. The colony was light brown, dark brown in young cultures and greyish brown after 30 days. Immersed mycelium, brown (Figure 2A). Synnematosous conidiophore brown to dark brown, of 480 to 560  $\mu\text{m}$  long including the conidiogenic apparatus. Single and clumped synnemas (2 to 6), brown to dark brown, after 10 to 12 days (Figure 2B). Conidiogenic cells apparently with percurrent proliferation and annelides of sympodial, barrel-shaped and hyaline look. (7.64-) 4.82 (-1.97)  $\times$  (5.33-) 2.65 (-1.37)  $\mu\text{m}$  hyaline, one-celled, ellipsoidal or ovoid conidia. Conidia mass in a hyaline or greyish mucilage at the apex of the synnema, according to the age of the culture. Perithecia grow at the surface or lightly immersed into the culture medium and develop after 25 days, single or clumped (Figure 2C); globose base, dark, 190 a 200  $\mu\text{m}$  of diameter. Neck of the perithecium, dark brown to black, 250 to 618  $\mu\text{m}$  long, without ostiolar hyphae (20-) 26 (-38)  $\mu\text{m}$  wide at the base, (13-) 16 (-21)  $\mu\text{m}$  wide at the apex and apex of the neck lightly curved. Hyaline hyphae, 20 to 25  $\mu\text{m}$  long and (1-) 1.5 (-2.0)  $\mu\text{m}$  wide. Ascae are evanescent. Hyaline ascospores, reniform (Figure 2D). These descriptions agree with those of Barnett and Hunter (1972), Upadhyay (1981) and Mouton *et al.* (1993).

*Pesotum* sp. (*Graphium corda* synonym) grew 80 mm after 15 days in 2% MAE, at  $26 \pm 1$  °C; brown, olive-brown to grey after 70 days, and at the back of the box, dark brown (Figure 2E). Immersed mycelium, brown and aerial mycelium, hyaline. Dark brown to dark black synnema, (450.16-) 236.99 (-150.40)  $\times$  (37.60-) 22.65 (-9.40)  $\mu\text{m}$  (Figure 1F). Percurrent conidiogenic cell, annelid, cylindric and hyaline. Holoblastic conidia, hyaline, unicelular, ellipsoid to ovoid, (7.64-) 4.82 (-1.97)  $\times$  (6.33-) 2.65 (-1.37)  $\mu\text{m}$  and the conidia mass clumped at the apex of the synnema (Figure 1G). The former description agrees with those of Barnett and Hunter (1972) and Upadhyay (1981).

## Molecular description

The PCR product of the ITS1 e ITS2 internal regions of the (rADN) ribozosomal genes was 700 pb (pair bases). The ZOQ2 y ZOQ8 sequences of *Leptographium guttulatum*; ZOQ5, ZOQ15, ZOQ17 of *Ophiostoma olivaceapinii*; ZOQ9 and ZOQ16 of *O. angusticollis* aligned with the sequences of the same species at the NCBI Gene Bank (Table 1), with a 98 to 100% homology, except for the *Pesotum* (ZOQ6) genus that aligned with *Ophiostoma* sp. (Access number: AY649781), with a 98% homology, considering its teleomorph (Harrington *et al.*, 2001).

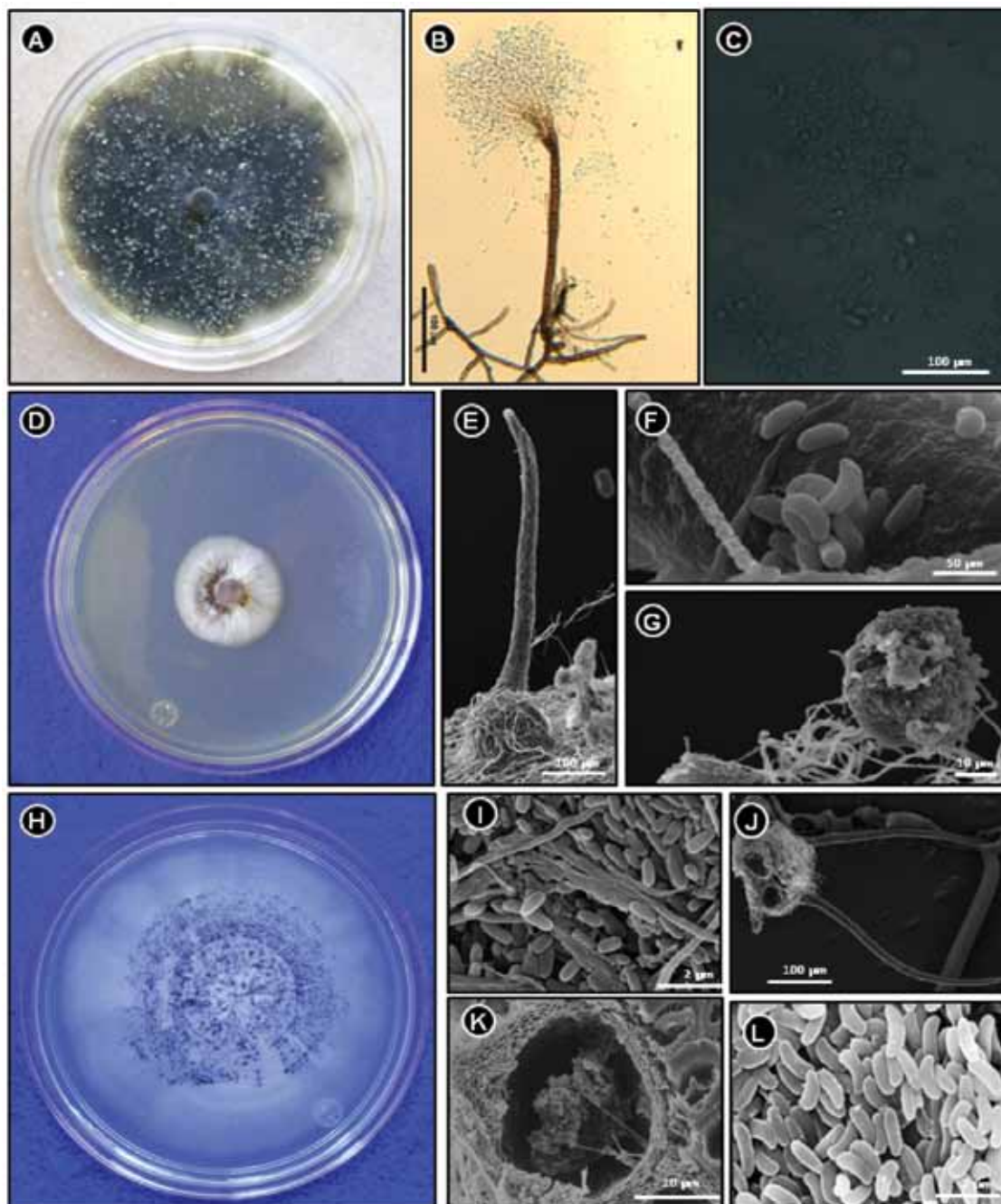


Figura 1. Características morfológicas de los hongos en cultivo y microscópicas de *Leptographium guttulatum*, *Ophiostoma angusticollis* y *O. nigrocarpum* en EMA al 2%. A) Colonia de *L. guttulatum* de color café claro a café oliváceo a los 12 días. B) Conidióforos solitarios. C) Conidias unicelulares. D) Colonia blanco cremoso de *O. angusticollis* a los 15 días. E) Peritecio. F) Ascosporas reniformes. G) Masas de ascosporas en una matriz gelatinosa. H) Colonia blanco cremoso con peritecios de *O. nigrocarpum*. I) Conidias elipsoides a cilíndricas. J y K) Peritecios y corte de la base. L) Ascosporas reniformes.

Figure 1. Morphologic and microscopic characteristics of the fungi cultures of *Leptographium guttulatum*, *Ophiostoma angusticollis* and *O. nigrocarpum* in MAE at 2%. A) *L. guttulatum* colony, from light brown to olive brown after 12 days. B) Lonely conidiophores. C) One-cell conidia. D) Creamy white colony of *O. angusticollis* after 15 days. E) Perithecium. F) Reniform ascospores. G) Ascospore masses in a gelly matrix. H) Creamy white colony with perithecia of *O. nigrocarpum*. I) Ellypsoid to cylindric conidia. J and K) Perithecia and cutting at the base. L) Reniform ascospores.



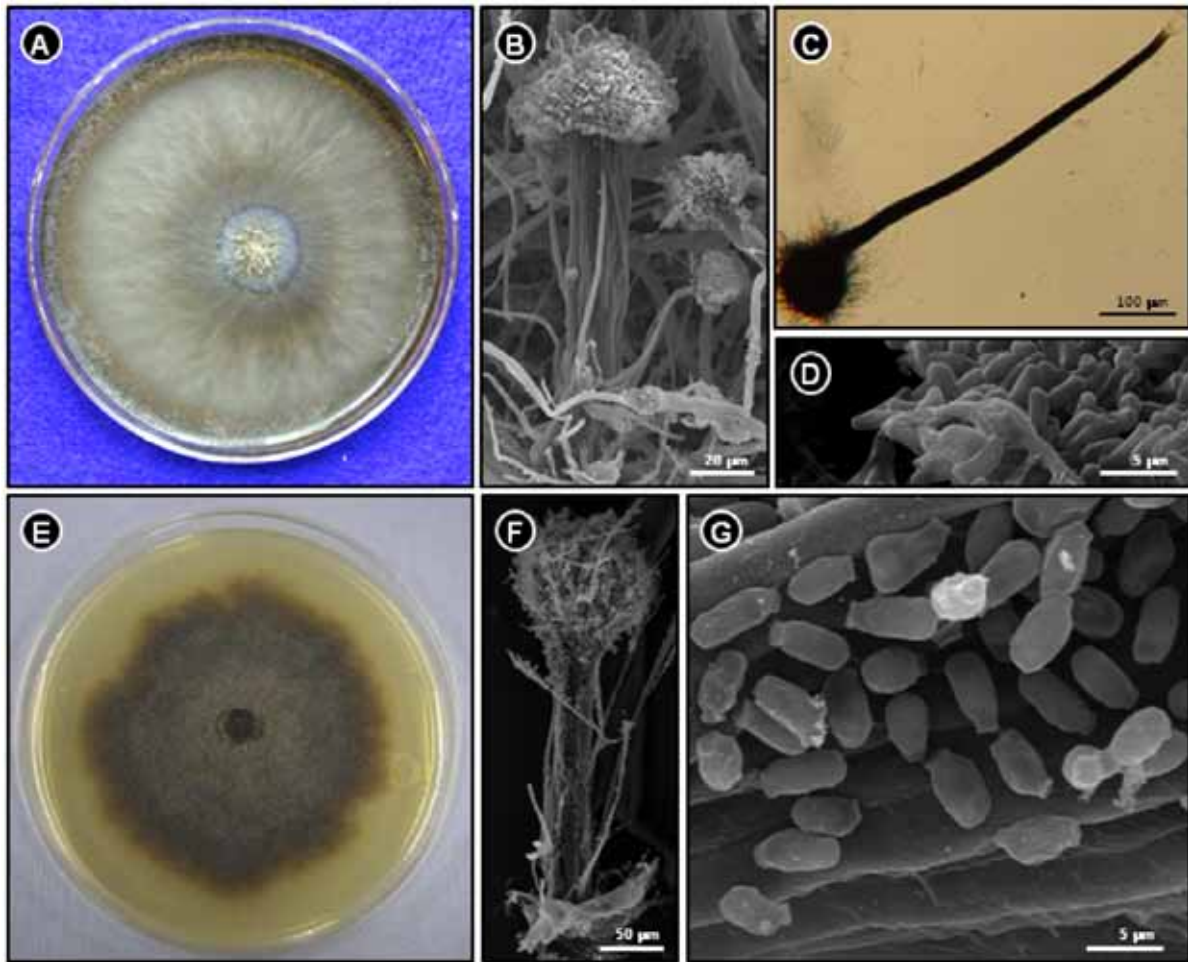


Figura 2. Características morfológicas de los hongos en cultivo y microscópicas de *Ophiostoma olivaceapini* y *Pesotum* sp. en EMA al 2%. A) Colonia café claro, café oscuro a grisáceo de *O. olivaceapini* a los 15 días. B) Sinema. C) Peritecios con hifas ostiolares. D) Ascosporas reniformes. E) Colonia café, café olivo a gris de *Pesotum* sp. a los 15 días. F) Sinema G) Conidias elipsoides a ovoides.

Figure 2. Morphologic and microscopic characteristics of fungi cultures of *Ophiostoma olivaceapini* and *Pesotum* sp. in MAE AT 2%. A) Light brown, dark brown to greyish *O. olivaceapini* colony after 15 days. B) Sinema. C) Perithecia with ostiolar hyphae. D) Reniform ascospores. E) Brown, olive-brown to greyish *Pesotum* sp. colony after 15 days. F) Sinema. G) Ellipsoid to ovoid conidia.

### Caracterización molecular

El producto de PCR de las regiones internas ITS1 e ITS2 de los genes ribosomales (rADN) fue de 700 pb (pares de bases). Las secuencias de ZOQ2 y ZOQ8 de *Leptographium guttulatum*; ZOQ5, ZOQ15, ZOQ17 de *Ophiostoma olivaceapini*; ZOQ9 y ZOQ16 de *O. angusticollis* se alinearon con las secuencias de estas mismas especies depositadas en el Banco de Genes del NCBI (Cuadro 1), con una homología de 98 a 100%. A excepción del género *Pesotum* (ZOQ6) que se alineó con *Ophiostoma* sp. (Número de acceso: AY649781), con una homología de 98%, considerado su teleomorfo (Harrington et al., 2001). *Ophiostoma nigrocarpum* (ZOQ12) mostró una homología de 99% con el género *Sporothrix* (número de acceso AY546722). Con base en sus

*Ophiostoma nigrocarpum* (ZOQ12) showed a 99% homology with the *Sporothrix* genus (Access number: AY546722). Starting from its morphologic characteristics, *O. nigrocarpum* is similar to the *O. stenoceras* (Robak) Nannf. complex; however, they can be divided by comparing DNA sequences (Aghayeva et al., 2004; Zhou et al., 2004). *O. abietinum* (Marm. & Butin) isolated from *Abies vejari* (Mart.) Liu and described by Marmolejo and Butin (1993) is considered an in-between form of *O. stenoceras* and *O. nigrocarpum*, from the morphology of the perithecia (De Beer et al., 2003). *O. angusticollis* (ZOQ13) aligned with *Sporothrix* (Access number: AY546722), with a 99% homology; this genus is quoted as the asexual state of *O. angusticollis* and *O. nigrocarpum* (Upadhyay, 1981).

características morfológicas *O. nigrocarpum* es similar al complejo de *O. stenoceras* (Robak) Nannf.; sin embargo, se pueden separar por comparación de secuencias de ADN (Aghayeva *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004). *O. abietinum* (Marm. & Butin) aislado de *Abies vejari* (Mart.) Liu y descrito por Marmolejo y Butin (1993) se considera una forma intermedia entre *O. stenoceras* y *O. nigrocarpum*, a partir de la morfología del peritecio (De Beer *et al.*, 2003). *O. angusticollis* (ZOQ13) se alineó con *Sporothrix* (Número de acceso: AY546722), con una homología de 99%; este género se cita como el estado asexual para *O. angusticollis* y *O. nigrocarpum* (Upadhyay, 1981).

The nucleotide sequences of the isolations were placed into the NCBI Gene Bank with the following access numbers: *L. guttulatum* (HM236498 y HM236499); *O. olivaceapini* (HM236500, EU109670 and EU109669), *Pesotum* sp. (HM236501), *O. angusticollis* (EU109668, EU109672 and EU109671) and *O. nigrocarpum* (EU109667).

Cuadro 1. Comparación de secuencias intergénicas (ITS<sup>1</sup>) de los genes rADN de los hongos ophiostomatoideos aislados de *Pinus hartwegii* con las del banco de genes.

Table 1. Intergenic sequence comparison (ITS<sup>1</sup>) of the rADN genes of the ophiostomatoid fungi isolated from *Pinus hartwegii* with those of the gene bank.

Aislamiento	Identificación morfológica	Número <sup>1</sup> (NCBI)	Número de nucleótidos (pb)	Especie alineada (NCBI)	IS <sup>1</sup>	Valor de alineamiento
ZOQ2	<i>Leptographium guttulatum</i>	HM236498	695	<i>L. guttulatum</i>	98	1094
ZOQ5	<i>Ophiostoma olivaceapini</i>	HM236500	637	<i>O. olivaceapini</i>	98	1140
ZOQ6	<i>Pesotum</i> sp.	HM236501	613	<i>Ophiostoma</i> sp.	98	1040
ZOQ8	<i>L. guttulatum</i>	HM236499	696	<i>L. guttulatum</i>	98	1099
ZOQ9	<i>Ophiostoma angusticollis</i>	EU109672	503	<i>O. angusticollis</i>	100	865
ZOQ12	<i>O. nigrocarpum</i>	EU109667	474	<i>Sporothrix</i> sp.	99	857
ZOQ13	<i>O. angusticollis</i>	EU109668	474	<i>Sporothrix</i> sp.	99	859
ZOQ15	<i>O. olivaceapini</i>	EU109670	526	<i>O. olivaceapini</i>	98	928
ZOQ16	<i>O. angusticollis</i>	EU109671	652	<i>O. angusticollis</i>	99	1042
ZOQ17	<i>O. olivaceapini</i>	EU109669	625	<i>O. olivaceapini</i>	98	1110

<sup>1</sup>Internal Transcribed Spacer (siglas en inglés); NCBI (National Center for Biotechnology Information); Índice de similaridad.

<sup>1</sup>Internal Transcribed Spacer<sup>1</sup> NCBI (National Center for Biotechnology Information); Similarity index.


Las secuencias de nucleótidos de los aislamientos se depositaron en el Banco de Genes del NCBI con los siguientes números de acceso *L. guttulatum* (HM236498 y HM236499); *O. olivaceapini* (HM236500, EU109670 y EU109669); *Pesotum* sp. (HM236501); *O. angusticollis* (EU109668, EU109672 y EU109671) y *O. nigrocarpum* (EU109667).

## CONCLUSIONES

En las galerías de *Dendroctonus adjunctus* en la corteza de *Pinus hartwegii* se aislaron e identificaron morfológicamente

## CONCLUSIONS

From the galleries of *Dendroctonus adjunctus* in the *Pinus hartwegii* bark were isolated and identified, morphologically and by molecular analysis, the following ophiostomatoid fungi: *Leptographium guttulatum*, *Ophiostoma angusticollis*, *O. olivaceapini*, *O. nigrocarpum* and *Pesotum* sp. The presence of the teleomorph and anamorph or of both was detected in the culture medium. However, *O. nigrocarpum* and *O. angusticollis* showed a 99% homology with the *Sporothrix* (anamorph) genus and 98% *Pesotum* with *Ophiostoma* (teleomorph).

y por análisis molecular los hongos ophiostomatoideos *Leptographium guttulatum*, *Ophiostoma angusticollis*, *O. olivacearinii*, *O. nigrocarpum* y *Pesotum* sp. Se registró la presencia del teleomorfo y anamorfo o ambos en el medio de cultivo. Sin embargo, *O. nigrocarpum* y *O. angusticollis* mostraron una homología con el género *Sporothrix* (anamorfo) en 99% y *Pesotum* en 98% con *Ophiostoma* (teleomorfo). 

## REFERENCIAS

- Aghayeva, D. N., Z. W. De Beer and T. Kirisitis. 2004. Two new *Ophiostoma* species with *Sporothrix* anamorphs from Austria and Azerbaijan. *Mycologia* 96 (4): 866-828.
- Ayres, M. P., R. T. Wilkens, J. J. Ruel, M. J. Lombardero, and E. Vallery. 2000. Nitrogen budgets of phloem-feeding bark beetles with and without symbiotic fungi (Coleoptera: Scolytidae). *Ecology* 81 (8): 2198-2210.
- Barnett, H. L. and B. B. Hunter. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Third edition. Burgess Publishing Company. Minnesota, MN. USA. 241 p.
- Barras, S. J. and T. Perry. 1971. Gland cells and fungi associated with prothoracic mycangium of *Dendroctonus adjunctus* (Coleoptera: Scolytidae). *Annals Entomological Society of America* 64 (1): 123-126.
- Cibrián T., D., D. A. Rosales and S. E. G. Díaz. 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, Edo. de México., México. 587 p.
- Croisé, L., F. Lieutier, H. Cochard and E. Dreyer. 2001. Effect of drought stress and high density stem inoculations with *Leptographium wingfieldii* on hydraulic properties of young Scots pine trees. *Tree Physiology* 21 (7): 427-436.
- De Beer, Z. W., T. C. Harrington, H. F. Visser, B. D. Wingfield and M. J. Wingfield. 2003. Phylogeny of the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schendkii* complex. *Mycologia* 95 (3): 434-441.
- Hanlin, R. T. 2001. Illustrated genera of ascomycetes. Volume II. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN. USA. 113 p.
- Harrington, T. C., D. McNew, J. Steimel, D. Hofstra and R. Farrel. 2001. Phylogeny and taxonomy of the *Ophiostoma piceae* complex and the Dutch elm disease fungi. *Mycologia* 93 (1): 111-136.
- Harrington, T. C. 1988. *Leptographium* species, their distributions, hosts and insect vectors. In: Harrington, T. C. and F. W. Cobb. (Eds.). *Leptographium* root diseases on conifers. The American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN. USA. pp: 1-39.
- Hausner, G., J. Reid and G. R. Klassen. 1993. On the subdivision of *Ceratocystis* s.l., based on partial ribosomal DNA sequences. *Canadian Journal of Botany* 71 (1): 52-63.
- Jacobs, K. and M. J. Wingfield. 2001. *Leptographium* species. Tree pathogens, insect associates, and agents of blue-stain. The American Phytopathological Society. St. Paul, MN. USA. 207 p.
- Jacobs, K., M. J. Wingfield, C. Coetsee, T. Kirisitis and B. D. Wingfield. 2001. *Leptographium guttulatum* sp. nov., a new species from spruce and pine in Europe. *Mycologia* 93 (2): 380-388.
- Kile, G. A. 1993. Plant diseases caused by species of *Ceratocystis sensu stricto* and *Chalara*. In: Wingfield, M. J., K. A. Seifert and J. F. Webber (Eds.). *Ceratocystis and Ophiostoma: Taxonomy, ecology and pathogenicity*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN. USA. pp: 173-184.
- Malloch, D. and M. Blackwell. 1993. Dispersal biology of the ophiostomatoid fungi. In: Wingfield, M. J., K. A. Seifert, J. F. Webber (Eds.). *Ceratocystis and Ophiostoma: Taxonomy, ecology and pathogenicity*. The American Phytopathological Society. St. Paul, MN. USA. pp: 173-184.
- Marmolejo J., G. 1991. El manchado azul de la Madera en Nuevo León. Reporte científico No. 27. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma de Nuevo León. Linares, N. L. México. 59 p.
- Marmolejo J., G. y H. Butin. 1993. Las especies de *Ophiostoma* y *Ceratocystopsis* (Ascomycetes, Microascales) conocidas de Nuevo León, México. Reporte científico especial No. 13. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma de Nuevo León. Linares, N. L. México. pp: 155-170.
- Mouton, M., M. J. Wingfield and P. S. Van-Wyk. 1993. Conidium development in the synnematous anamorphs of *Ophiostoma*. *Mycotaxon* 40 (6): 371-379.
- Olchoweki, A. and J. Reid. 1974. Taxonomy of the genus *Ceratocystis* in Manitoba. *Canadian Journal of Botany* 52 (7): 1675-1711.
- Paine, T. D., K. F. Raffa and T. C. Harrington. 1997. Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. *Annual Review of Entomology* 42: 179-206.
- Pérez V., O. A., D. Alvarado R., E. Cárdenas S., A. Equihua M., D. Gibrán, T., J. G. Álvarez M., D. Mejía S. y T. C. Harrington. 2009. *Ophiostoma ips* asociado al insecto descortezador (*Dendroctonus adjunctus*) del pino de las alturas (*Pinus hartwegii*). *Revista Mexicana de Micología* 30: 9-18.
- Popp, M. P., J. D. Johnson and M. S. Lesney. 1995. Characterization of the induced response of slash pine to inoculation with bark beetle vectored fungi. *Tree Physiology* 15 (9): 619-623.
- Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. Molecular cloning. A laboratory manual. Third edition. 1:1.32-1.34. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York, NY. USA. 2344 p.
- Seifert, K. A. 1993. Sapstain of commercial lumber by species of *Ophiostoma* and *Ceratocystis*. In: Wingfield, M. J., K. A. Seifert and J. F. Webber (Eds.). *Ceratocystis and Ophiostoma. Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity*. The American Phytopathological Society. St. Paul, MN. USA. pp: 141-151.
- Six, D. and T. D. Paine. 1996. *Leptographium pyrinum* is a mycangial fungus of *Dendroctonus adjunctus*. *Mycologia* 88 (5): 739-744.
- Upadhyay, H. P. 1981. A monograph of *Ceratocystis* and *Ceratocystopsis*. University of Georgia Press. Athens, GA. USA. 176 p.
- Upadhyay, H. P. 1993. Classification of the ophiostomatoid fungi. In: Wingfield, M. J., K. A. Seifert and J. F. Webber (Eds.). *Ceratocystis and Ophiostoma: Taxonomy, ecology and pathogenicity*. The American Phytopathological Society. St. Paul, MN. USA. pp: 7-13.
- Villarreal, M., V. Rubio, M. T. De Troya and F. Arenal. 2005. A new *Ophiostoma* species isolated from *Pinus pinaster* in the Iberian Peninsula. *Mycotaxon* 92: 259-268.
- Wingfield, B. D., W. S. Grant, J. F. Wolfaardt and M. J. Wingfield. 1994. Ribosomal RNA sequence phylogeny is not congruent with ascospore morphology among species in *Ceratocystis sensu stricto*. *Molecular Biology and Evolution* 11 (3): 376-383.
- Wingfield, M. J. 1987. Fungi associated with the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, and cerambycid beetles. *Mycologia* 79 (2): 325-328.
- Wingfield, M. J. 1993. *Leptographium* species as anamorphs of *Ophiostoma*: progress in establishing acceptable generic and species concepts. In: Wingfield, M. J., K. A. Seifert and J. F. Webber (Eds.). *Ceratocystis and Ophiostoma: Taxonomy, ecology and pathogenicity*. The American Phytopathological Society. St. Paul, MN. USA. pp: 43-51.
- Wingfield, M. J. and P. S. Knox-Davies. 1980. Root disease, associated with *Verticicladiella alacris*, of pines in South Africa. *Plant Disease* 64 (6): 569-571.
- Zhou, X. D., W. Z. De Beer, B. D. Wingfield and M. J. Wingfield. 2001. Ophiostomatoid fungi associated with three pine-infesting bark beetles in South Africa. *Sydowia* 53 (2): 290-300.
- Zhou, X. D., Z. W. De Beer, D. C. Tovar, B. D. Wingfield and M. J. Wingfield. 2004. Characterisation of *Ophiostoma* species associated with pine bark beetles from Mexico, including *O. pulvinisporum* sp. nov. *Mycological Research* 108 (6): 690-6



Wangari Muta Maathai. Dominio público.