

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Caracterización de algas y hongos asociados a la enfermedad  
del “alga verde” del pinabete (*Abies guatemalensis* Rehder)  
en Guatemala

Trabajo de graduación presentado  
por Andrés Villalobos Soberanis  
para optar al grado académico de Licenciado en Biología

Guatemala,

2020



Caracterización de algas y hongos asociados a la  
enfermedad del “alga verde” del pinabete  
(*Abies guatemalensis* Rehder) en Guatemala



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades




Caracterización de algas y hongos asociados a la enfermedad  
del “alga verde” del pinabete (*Abies guatemalensis* Rehder)  
en Guatemala


Trabajo de graduación presentado  
por Andrés Villalobos Soberanis  
para optar al grado académico de Licenciado en Biología

Guatemala,

2020



Vo. Bo: (f)   
Msc. Ana Lucía Dubón Morales

Tribunal Examinador: (f)   
MSc. Ana Lucía Dubón Morales

(f)   
Licda. Maria Reneé Álvarez

(f)   
MSc. Gabriela Alfaro

Fecha de aprobación: Guatemala, 3 de noviembre 2020



## PREFACIO

Desde que entré a la universidad, siempre quise formar parte de una investigación que aportara al conocimiento científico y al desarrollo sostenible de Guatemala. Terminé esta etapa con la satisfacción de haberlo logrado, y no lo hubiera hecho sin la ayuda de familiares, amigos, profesores a quienes quiero agradecer, aunque no hay espacio suficiente en estas páginas para expresar cuánto me han apoyado.

Primero, quiero agradecer a mis papás, a mi hermana y toda mi familia por darme apoyo incondicional y por haberme motivado a estudiar lo que quería, ellos me han hecho la persona que soy hoy. A mis amigos, por siempre estar ahí cuando lo necesito y por haber hecho mi vida universitaria mucho más fácil y memorable.

Agradezco al Instituto Nacional de Bosques, en especial a Sergio Osorio, por introducirme en esta problemática que está afectando a todo el país, sin su apoyo e interés este proyecto nunca se hubiera llevado a cabo. A Salvador Pira, José Billeb, Tono Pineda y todos los productores de pinabete que me han abierto las puertas de sus plantaciones durante estos años y me apoyaron en el trabajo de campo.

A mis asesoras Ana Lucía Dubón y María Renée Álvarez por confiar en mí, motivarme a dar lo mejor y por enseñarme cosas que han guiado mi carrera profesional. A Margarita Palmieri por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo este proyecto en un laboratorio profesional. A Patty, Mary, Leyda, Julio, Melvin y todo el personal del Laboratorio de Protección Vegetal, sin ellos este proyecto no hubiera sido posible.

A Luis Ríos, José Miguel Morales, Elena Dardón, Andrés Avalos y a todos mis catedráticos de la carrera que me dejaron valiosas enseñanzas y contribuyeron a mi formación. A Gabriela Alfaro por su apoyo y dirección a lo largo de la carrera, a Priscila Juárez, Ericka Santos y a todo el departamento de Biología.

Al Laboratorio de Protección Vegetal del Centro de Estudios Agrícolas y Alimentarios (CEAA) y al Herbario UVAL del Centro de Estudios Ambientales y de Biodiversidad (CEAB) por darme los recursos necesarios para llevar a cabo esta investigación. Y finalmente, a la Universidad del Valle de Guatemala por darme las herramientas para convertirme en un profesional con la visión de hacer algo por mejorar la sociedad.

# CONTENIDO

PREFACIO.....	i
LISTA DE CUADROS .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vi
RESUMEN .....	ix
ABSTRACT .....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES .....	3
A. Pinabete ( <i>Abies guatemalensis</i> Rehder).....	3
B. Plantaciones de pinabete .....	7
C. Plagas y enfermedades del pinabete .....	10
D. Algas terrestres.....	14
E. Hongos fitopatógenos .....	23
F. Biopelículas de microorganismos .....	28
III. JUSTIFICACIÓN .....	33
IV. OBJETIVOS.....	35
V. HIPÓTESIS .....	37
VI. METODOLOGÍA .....	39
A. Área de estudio.....	39
B. Colecta de muestras .....	40
C. Identificación de algas .....	41
D. Identificación de hongos .....	44
E. Comparación entre localidades.....	48
VII. RESULTADOS .....	51
A. Observaciones en campo .....	51
B. Observaciones de la biopelícula bajo microscopio.....	61
C. Identificación de algas .....	63
D. Identificación de hongos .....	68

E. Cultivo <i>in vitro</i> .....	79
F. Comparación entre localidades .....	80
VIII. DISCUSIÓN .....	83
A. Observaciones en campo .....	83
B. Observaciones de la biopelícula bajo microscopio.....	84
C. Identificación de algas .....	86
D. Identificación de hongos .....	88
E. Cultivo <i>in vitro</i> .....	90
F. Comparación entre localidades .....	92
G. Manejo de la enfermedad en las plantaciones .....	93
IX. CONCLUSIONES .....	95
X. RECOMENDACIONES .....	97
XI. BIBLIOGRAFÍA .....	99
XII. ANEXOS .....	109

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1.	Receta de preparación de medio de cultivo para algas.....	41
2.	Receta de preparación de solución desinfectante para algas.....	42
3.	Identificación de algas encontradas en las tres plantaciones de pinabete.....	63
4.	Especies de hongos encontrados en las tres plantaciones de pinabete.....	68
5.	Comparación de grupos de algas y hongos encontrados en las plantaciones.....	80

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Ramas y conos femeninos de <i>Abies guatemalensis</i> Rehder.....	3
2. Plantación de pinabete en San José Pinula, Guatemala.....	9
3. Filogenia de Chlorophyta y Streptophyta.....	17
4. Diagrama con los principales grupos de algas eucariotas terrestres y sus tipos de hábitat.....	18
5. Cobertura algal de <i>Klebsormidium crenulatum</i> sobre la corteza de un árbol en Inglaterra.....	20
6. Filogenia de los principales grupos de Eukarya.....	25
7. Diagrama de una biopelícula de algas sobre la corteza de un árbol.....	28
8. Biopelícula de algas epifíticas en hojas de <i>Picea abies</i> en Suecia.....	30
9. Mapa con sitios de muestreo de plantaciones de pinabete con incidencia de la enfermedad del alga verde.....	40
10. Disposición de las muestras en la cámara húmeda que contenía una rama con hojas, una rama sin hojas y tres hojas de pinabete.....	44
11. Disposición de las muestras en la caja Petri con agar que contenía las hojas de pinabete y el raspado de las hojas.....	45
12. Pinabetes infestados con la enfermedad del alga verde en la finca Billeben (Guatemala) .....	51
13. Vista bajo estereoscopio de ramas infestadas la enfermedad del alga verde colectadas en la finca Billeben (Guatemala).....	52
14. Vista bajo estereoscopio de hoja de angiosperma con biopelícula de algas y hongos, colectada en la finca Billeben.....	53
15. Pinabetes infestados con la enfermedad del alga verde en la finca Valle Alto (Chimaltenango).....	54
16. Ramas de pinabete infestadas con la enfermedad del alga verde con brotes de temporada.....	55
17. Vista bajo estereoscopio de ramas infestadas la enfermedad del alga verde colectadas	

	en la finca Valle Alto (Chimaltenango).....	56
18.	Pinabetes infestados con la enfermedad del alga verde en la finca Buena Vista (San Marcos).....	57
19.	Rama de pinabete con infestación leve de la biopelícula de algas.....	58
20.	Fascículos de pino ( <i>Pinus</i> sp.) cubiertos por biopelícula de algas y hongos, colectados en la finca Buena Vista.....	59
21.	Vista bajo estereoscopio de ramas infestadas la enfermedad del alga verde colectadas en la finca Buena Vista (San Marcos).....	60
22.	Montajes de microscopio del raspado de la biopelícula de hojas de pinabete colectadas en las tres localidades.....	61
23.	Alga filamentosa rodeada por hifas de un hongo del raspado de la biopelícula de hojas de pinabete colectadas en la finca Billeben.....	62
24.	Alga del género <i>Desmococcus</i> , hallada en la biopelícula de las hojas de pinabete de la finca Billeden, finca Valle Alto y la finca Buena Vista.....	64
25.	Alga de la clase Trebouxiophyceae, encontrada en hojas de pinabete en la finca Billeben.....	65
26.	Alga del género <i>Klebsormidium</i> , encontrada en hojas de pinabete en la finca Billeben.....	66
27.	Alga del género <i>Klebsormidium</i> , encontrada en hojas de la finca Valle Alto.....	67
28.	Hongo del género <i>Aspergillus</i> , aislado de hojas de pinabete de la finca Billeben.....	69
29.	Hongo del género <i>Trichoderma</i> , aislado de hojas de pinabete de la finca Billeben.....	70
30.	Hongo del género <i>Ulocladium</i> , aislado de hojas de pinabete de la finca Billeben.....	71
31.	<i>Fusarium equiseti</i> aislado de hojas de pinabete de la finca Valle Alto.....	72
32.	<i>Fusarium graminearum</i> aislado de hojas de la finca Valle Alto.....	73
33.	<i>Fusarium</i> sp. aislado de hojas de pinabete de la finca Valle Alto.....	74
34.	<i>Mucor</i> sp. aislado de hojas de pinabete de la finca Valle Alto.....	75
35.	<i>Mucor hiemalis</i> aislado de hojas de pinabete de la finca Buena Vista.....	76

36.	<i>Trichoderma koningiopsis</i> aislado de hojas de pinabete de la finca Buena Vista.....	77
37.	<i>Trichoderma viride</i> aislado de hojas de pinabete de la finca Buena Vista.....	78
38.	Hongos aislados a partir de algas contaminadas después del cultivo <i>in vitro</i> de muestras de la finca Valle Alto.....	79

## RESUMEN

En los últimos años se ha reportado la incidencia de una nueva plaga en las plantaciones de pinabete (*Abies guatemalensis* Rehder), conocida como la enfermedad del “alga verde”. Se caracteriza por una cobertura verde que crece sobre las hojas y bloquea la luz solar, causando la muerte de las ramas. De acuerdo con el Instituto Nacional de Bosques (INAB 2018), la enfermedad es causada por un alga cuya especie aún no ha sido determinada, por lo que es necesario identificar este y otros microorganismos que puedan estar relacionados a la enfermedad para poder controlar su dispersión.

En conjunto con personal del Instituto Nacional de Bosques, se visitaron tres plantaciones de pinabete a lo largo de un año: la Finca Billeben (Guatemala), Finca Valle Alto (Chimaltenango) y Finca Buena Vista (San Marcos). Se observó que las hojas más jóvenes no son infestadas por la cobertura de algas durante los primeros cinco meses, y que la infestación inicia en la parte inferior de las ramas. Se colectaron hojas que mostraran signos de la enfermedad y se identificaron las algas y hongos presentes en las muestras por medio de microscopía y cultivo *in vitro*. No fue posible establecer cultivos puros de las algas debido a la contaminación causada por hongos presentes en las hojas.

En las muestras de las tres localidades se encontraron cuatro algas: dos filamentosas del género *Klebsormidium*, una unicelular de la clase Trebouxiophyceae y una sarcinoide del género *Desmococcus*, esta última se encontró en las tres localidades. Se encontraron 10 hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* (3 especies), *Mucor* (2), *Trichoderma* (3) y *Ulocladium* sp. (1). Estos hongos son conocidos fitopatógenos, saprófitos y benéficos, y se almacenaron en un cepario que está disponible para futuras investigaciones.

Se concluyó que la cobertura de algas en las hojas del pinabete es una biopelícula conformada por varias algas y hongos que pueden variar de acuerdo a la localidad. Se emitieron recomendaciones para la prevención y el manejo de la enfermedad en las plantaciones, tales como el control de sombra, la desinfección de herramientas y la implementación de un método de monitoreo semicuantitativo. También se sugieren posibles tratamientos como la aplicación de pesticidas químicos y biológicos que deben ser evaluados por medio de ensayos de campo.

## ABSTRACT

In the past few years, a new disease has been reported affecting Guatemalan Fir (*Abies guatemalensis* Rehder) plantations, known as the “Green Algae” disease. It is characterized by a green cover that grows over leaves and blocks sunlight, leading to the death of the branch. According to the National Forestry Institute (INAB, 2018), the disease is caused by an alga that hasn’t been identified. It is necessary to identify this algae and other microorganisms that may be related to the disease in order to emit recommendations for disease management.

Along with personal from the National Forestry Institute, three fir plantations were visited throughout a year: Finca Billeben (Guatemala), Finca Valle Alto (Chimaltenango) y Finca Buena Vista (San Marcos). It was found that younger leaves do not show signs of infestation by the algae cover for the first five months, and that it starts in the underside of the branches. Leaves that showed signs of the disease were collected and the algae and fungi present in the samples were identified using microscopy and *in vitro* culture. It was not possible to establish pure algae cultures due to persistent contamination caused by fungi present in the leaves.

Four algae were found in the samples of the three locations: two filamentous of the *Klebsormidium* genus, one unicellular of the Trebouxiophyceae class and one sarcinoid of the *Desmococcus* genus, this last one was found in all three locations. Ten fungi were isolated that belong to five genera: *Aspergillus*, *Fusarium* (3 species), *Mucor* (2), *Trichoderma* (3) and *Ulocladium* sp. (1). These organisms are known plant pathogens, saprophytes and beneficial fungi, and were stored in a ceparium for future research projects.

It was concluded that the algae cover on Guatemalan Fir leaves is a biofilm comprised of several algae and fungi that can vary between locations. Recommendations were given in order to prevent and manage the disease in plantations, such as shadow control, tool disinfection and the implementing of a semi quantitative method for monitoring the disease. Possible treatments are also suggested, such as the application of chemical and biological pesticides that must be evaluated through field trials.

## I. INTRODUCCIÓN

El pinabete (*Abies guatemalensis* Rehder) es una especie de conífera endémica de los bosques fríos de alta montaña en México, Guatemala, El Salvador y Honduras. Debido a sus requerimientos climáticos e historia evolutiva, sus poblaciones se han visto fragmentadas y reducidas a las cimas de las montañas. La influencia humana constituye una presión adicional a la especie, el sobrepastoreo, avance de la frontera agrícola y la extracción de pinabete con fines ornamentales provocan la pérdida de hábitat y la falta de regeneración natural (Aguirre-Planter *et al.* 2000; Strandby *et al.* 2006).

En 1998 se estableció la Estrategia Nacional para la Conservación de Pinabete, con el objetivo de fomentar el comercio legal de la especie por medio del cultivo en plantaciones para satisfacer la demanda de árboles durante la época navideña (CONAP, 2010). En 2006 se reportaba que el cultivo de pinabete estaba reservado para grandes terratenientes con capacidad de realizar una alta inversión (Strandby *et al.* 2006). En la actualidad, tanto los grandes como los pequeños poseedores de tierra tienen acceso al establecimiento de plantaciones; incluso algunos productores agrícolas han reemplazado el cultivo de plantas anuales por el aprovechamiento forestal de pinabete (Castillo, 2016).

Sin embargo, el crecimiento lento del pinabete y el bajo porcentaje de germinación de la semilla puede dificultar su cultivo y desmotivar a los productores. Las semillas se producen cada dos años y tienen un porcentaje de germinación del 15%; además, se requiere de dos años para trasladar las plantas al exterior y de cinco a siete años adicionales para iniciar la venta de árboles (INAB, 2017; Strandby *et al.* 2008). Las plagas también afectan la productividad de las plantaciones y provocan pérdidas a los productores, ya que los árboles pierden su vigor y atractivo estético, reduciendo su valor en el mercado. El manejo fitosanitario de las plantaciones es una de las principales

deficiencias en las plantaciones del altiplano occidental, y es esencial fortalecerlo si se desea asegurar la calidad de los árboles y la sostenibilidad del cultivo de pinabete (Reynoso, 2008).

Recientemente, el Instituto Nacional de Bosques ha reportado la presencia de una plaga que está afectando considerablemente las plantaciones en varios departamentos del país: la enfermedad del alga verde del pinabete. Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de una cobertura verde que crece sobre las ramas y hojas del pinabete, formando una capa densa que bloquea la luz solar y reduce la productividad del árbol (INAB, 2018). Sin embargo, aún no se conoce la clasificación taxonómica del “alga verde”, lo que es necesario para conocer su ciclo de vida y determinar posibles métodos de control. Aunque no hay información detallada acerca de esta enfermedad, existen abundantes estudios describiendo fenómenos similares en bosques de Europa, Asia y Sudamérica, en los cuales también se mencionan hongos que viven en simbiosis con las algas (Lemes-Da Silva *et al.* 2010; Lin *et al.* 2012; Poggio, 2002).

Es por esto que el objetivo del presente estudio fue la identificación de las especies de algas y hongos presentes en hojas infestadas con la enfermedad del “alga verde” en plantaciones de pinabete.

## II. ANTECEDENTES

### A. Pinabete (*Abies guatemalensis* Rehder)

#### 1. Descripción

El pinabete, *Abies guatemalensis* Rehder, es una especie de conífera de la Familia Pinaceae. Es un árbol de hasta 45 m de alto y tronco de 1 m de diámetro, con copa piramidal ramas primarias oscuras de color café grisáceo dispuestas casi horizontalmente y ramas secundarias café rojizo. Con hojas lineares de 1-4.5 cm de largo y 0.1-0.2 cm de ancho, ápice emarginado, color verde claro u oscuro en el haz y grisáceo en el envés con nervadura elevada, margen recurvado y estomas conspicuos en el envés; con dos canales resiníferos subepidérmicos. Conos femeninos de 8.5-11.5 cm de largo y 4.5-5 cm de diámetro, de color púrpura y con forma cilíndrica, brácteas cuneadas-obovadas de la mitad o misma longitud que las escamas ovulíferas (Ver Figura 1). Semilla cuneadas-obovoide de 0.8-1 cm de longitud de color café con ala de 1-1.5 cm de largo y 0.1 cm de ancho (Parker 2008; Standley y Steyenmark 1958).



**FIGURA 1.** Ramas (izquierda) y conos femeninos (derecha) de *Abies guatemalensis* Rehder.

(INAB 2017)

## 2. Distribución

Durante las glaciaciones del Pleistoceno (2.5 millones de años – 10,000 a.C.), las poblaciones de coníferas que habitaban en latitudes altas se extendieron hacia los trópicos, formando poblaciones continuas a lo largo de las montañas de Mesoamérica. En los períodos interglaciares, cuando la temperatura global aumentó, estas poblaciones ascendieron en altitud formando poblaciones aisladas en las montañas. Estos períodos de expansión y contracción de las poblaciones han influido en la divergencia de las poblaciones de *A. hickelii*, *A. religiosa* y *A. guatemalensis*. El calentamiento del Holoceno ha aumentado la aridez en Latinoamérica durante los últimos 9,000 años, lo que ha provocado que los bosques montanos tengan que ascender en altitud, contribuyendo a la fragmentación de las poblaciones de pinabete (Aguirre-Planter *et al.* 2000; Jaramillo-Correa *et al.* 2008).

El pinabete se encuentra en el sur de México, Guatemala, El Salvador y Honduras, a una altitud entre 2,400 y 3,500 msnm. En Guatemala se encuentra en diez departamentos: Jalapa, Chiquimula, Zacapa, Chimaltenango, Sololá, Totonicapán, Quetzaltenango, San Marcos, Huehuetenango y Quiché. Se distribuye generalmente en bosques mixtos junto con otras coníferas como ciprés (*Cupressus lusitanica*), aliso (*Alnus acuminata*) y varias especies de pino (*Pinus ayacahuite*, *P. hartwegii*, *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*) (INAB 2017; Reynoso 2008).

## 3. Ecología

El pinabete es una especie indicadora de Bosque muy húmedo Montano Subtropical, de acuerdo a la clasificación de zonas de vida de Holdridge (De La Cruz, 1976). La fenología de la especie puede variar de acuerdo a la región geográfica, ya que se ve afectada por la altitud, humedad y disponibilidad de luz y nutrientes. La especie es perennifolia, por lo que posee hojas durante todo el año; en abril y mayo se producen nuevos brotes por la mayor disponibilidad de agua en la temporada lluviosa. La producción de conos ocurre cada dos años, esta inicia en octubre y termina entre diciembre y enero con la maduración de los mismos. Después, los conos caen y las

semillas permanecen en el suelo hasta el inicio de la temporada lluviosa del próximo año, cuando ocurre la germinación y crecimiento de las plántulas (Martínez-Arévalo 2016; Reynoso 2008).

Las plántulas dependen de otras especies de arbustos que actúan como plantas nodrizas para la protección contra heladas, que suele ser la principal causa de muerte de los árboles jóvenes; algunas de estas especies son el madrón (*Arbutus xalapensis*), la salvia (*Buddleja* sp.) y el arrayán (*Myrica serifera*) (Martínez-Arévalo 2016). El pinabete también puede formar relaciones simbióticas con micorrizas en bosques maduros, estas facilitan el crecimiento de los árboles ya que el hongo provee agua y nutrientes a cambio de los azúcares que se producen en la fotosíntesis (INAB 2017; Reynoso 2008).

#### **4. Amenazas del pinabete y estado de conservación**

##### **a. Pérdida de hábitat**

La pérdida de hábitat es una de las grandes amenazas del pinabete; en los últimos 70 años se ha perdido el 95% del bosque natural de pinabete, reduciéndose de 500 mil hectáreas a 27 mil (INAB 2017). Las principales causas son el cambio climático, los incendios forestales y el cambio de uso de suelo, principalmente para cultivo de maíz y hortalizas. Los efectos del cambio climático afectan a las poblaciones de pinabete debido a su distribución en los ecosistemas de alta montaña. El aumento de temperatura global ha forzado a la elevación en altitud de las especies, lo que puede aumentar la fragmentación, reducción en las poblaciones o incluso la extinción de las mismas. Las poblaciones de pinabete en el límite superior de la distribución (3,500 msnm) se encuentran más amenazadas por el cambio climático, mientras que las del límite inferior (2,400 msnm) por la expansión de la frontera agrícola y la fragmentación de bosque (INAB 2017; Kollman 2008; Strandby *et al.* 2008).

##### **b. Falta de regeneración**

El pinabete tiene un crecimiento lento y las semillas, que se producen cada dos años, tienen un porcentaje de germinación menor al 15% (Strandby *et al.* 2008). Además,

la especie requiere de la formación de microhábitats por parte de plantas nodrizas para la germinación de la semilla y el crecimiento de la planta. Esto provoca que la pérdida de bosque no pueda ser compensada por la regeneración natural, la cual también se ve afectada por actividades humanas como el sobrepastoreo, que reduce la acumulación de plántulas en el suelo del bosque (Strandby *et al.* 2008).

Para promover la regeneración natural de bosque de pinabete se han implementado programas de restauración ecológica, sin embargo, estos requieren del uso de semilla local para su implementación exitosa (Martínez-Arévalo 2016). De acuerdo con una prueba de procedencia realizada en Guatemala, la germinación de la semilla varía según el lugar de origen de la misma. Se determinó que las poblaciones en los límites de la distribución altitudinal (2,600 y 3,500 msnm) producen semillas con un menor porcentaje de germinación y plántulas con una menor altura. Además, dos poblaciones estudiadas de Quetzaltenango (El Edén Palestina y Sibilía La Laguna) mostraron un mayor porcentaje de germinación y un mayor crecimiento durante los primeros meses respecto al resto (Strandby *et al.* 2009).

### **c. Extracción de ramillas y árboles**

El pinabete se extrae tradicionalmente para la obtención de carbón, leña y madera, y como decoración en ceremonias y festividades. El olor es característico de la especie y es uno de los principales atractivos que tiene para su uso ornamental. Actualmente, el principal causante de la extracción de pinabete es la venta de árboles de navidad y adornos elaborados con ramillas. La extracción de ramillas provoca que no haya suficiente producción de conos y semillas; además, se debilita al árbol haciéndolo más susceptible a plagas y enfermedades (INAB 2017; Kollman 2008; Strandby *et al.* 2008). Se estima que cada año se extraen miles de ramillas de pinabete de los bosques en el altiplano occidental. En el año 2017, en una sola incautación en San Marcos, se decomisaron 390 mil ramillas de pinabete valuadas en más de dos millones de quetzales, siendo la incautación más grande hasta la fecha (Barrera 2017). En el 2019 se incautaron alrededor de 23 mil ramillas, con un valor de 122 mil quetzales, en los departamentos de Quetzaltenango y Totonicapán (Longo 2019).

#### **d. Estado de conservación**

Las amenazas del pinabete han provocado la fragmentación y reducción de sus poblaciones. De acuerdo con el INAB (2017), en los últimos 70 años se ha perdido el 95% de bosque de pinabete, y en la actualidad restan aproximadamente 25 mil hectáreas. La especie se encuentra en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN. También se encuentra en Categoría 1 en peligro de extinción del índice de CONAP, y en el Apéndice I de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres (CITES), por lo que se prohíbe el comercio internacional del pinabete desde 1979. La tala de árboles de pinabete en bosque natural está prohibida bajo cualquier propósito. El artículo 4-89 de la Ley de Áreas Protegidas establece condenas de prisión de 5 a 10 años y una multa de Q10 mil a Q20 mil por extracción y transporte ilegal de pinabete. El artículo 101-96 de la Ley Forestal, contempla multas de hasta Q50 mil con prisión de 1 a 5 años por delitos asociados (INAB y IARNA-URL 2012).

En 1998 se estableció la Estrategia Nacional para la Conservación de Pinabete, donde se autoriza el aprovechamiento de pinabete a través de plantaciones voluntarias. Desde entonces, el cultivo de pinabete es autorizado por el CONAP y el INAB, las entidades responsables de regular la venta de árboles por medio de la colocación de un marchamo que garantiza la procedencia legal de los mismos. En 2009 se aprobó la actualización que comprende los años 2008-2017 para la validación y diagnóstico de las líneas de acción de la estrategia. Algunas de líneas de acción que propone son la coordinación de las instituciones involucradas en la educación y promoción de la especie, y la generación de información para apoyar la conservación del pinabete. (CONAP 2010).

## **B. Plantaciones de pinabete**

### **1. Plantaciones en Guatemala**

El establecimiento de áreas protegidas no ha resultado como una alternativa efectiva para reducir la extracción ilegal de pinabete. En cambio, el aprovechamiento sostenible a través de plantaciones autorizadas promueve el comercio legal y plantea una solución para la extracción, ya que se satisface la demanda de árboles y ramillas durante

la época navideña y se reduce la presión sobre las poblaciones naturales. El pinabete es una de las cinco especies amenazadas del país que son aprovechadas a través de plantaciones autorizadas, y es priorizado por el INAB para el programa de incentivos forestales.

El cultivo de pinabete suele estar acompañado por cultivos anuales como al maíz, lo que les permite a los agricultores generar ganancias durante los primeros ocho a diez años de crecimiento donde no se aprovecha el pinabete. Aunque las primeras plantaciones se establecieron en los años 90, la mayoría de ellas han iniciado en los últimos diez años, por lo que aún están empezando a recibir ganancias por el cultivo de pinabete (CONAP 2010; Strandby *et al.* 2008).

En 1999 se reportaban 49 plantaciones abarcando 167 hectáreas en cuatro departamentos, en la actualidad existen 757 plantaciones de pinabete que cubren 323 hectáreas en diez departamentos: Jalapa, Guatemala, Sacatepéquez, Chimaltenango, Sololá, Totonicapán, Quetzaltenango, San Marcos, Huehuetenango y Quiché. Se han establecido plantaciones por medio de incentivos forestales en casi todos los departamentos donde se cultiva pinabete, la mayoría de las cuales se encuentran en Huehuetenango (67 ha), Chimaltenango (29 ha) y Quetzaltenango (18 ha) (INAB 2017). Se han establecido plantaciones en departamentos que están fuera de la distribución natural de pinabete, como Guatemala (Figura 2), Sacatepéquez y Chimaltenango; en este último se establecieron las primeras plantaciones de la especie (INAB 2017; INAB 2018; Strandby *et al.* 2008).



**FIGURA 2.** Plantación de pinabete en San José Pinula, Guatemala.  
Foto tomada por Andrés Villalobos

## **2. Rodales semilleros**

El cultivo de pinabete requiere de tiempo y una alta inversión debido al costo elevado de la semilla y el bajo porcentaje de germinación, además se requieren de 2 años para trasladar las plántulas al exterior y alrededor de 5 a 7 años para la cosecha de árboles (INAB 2017). Además, las semillas que se colectan de poblaciones lejanas al sitio de germinación muestran una menor viabilidad, lo que sugiere que el desarrollo de la semilla depende de las condiciones ambientales (Strandby *et al.* 2008). Esto implica que el desempeño de las plantaciones depende en gran manera del lugar de procedencia de la semilla, que por lo general se obtiene de rodales semilleros.

Los rodales semilleros son unidades de bosque natural o plantado que se establecen con el objetivo de obtener una fuente de producción de semilla confiable con base en características deseables de crecimiento, forma y sanidad. En el Registro Nacional Forestal se encuentran inscritos seis rodales semilleros que se encargan del abastecimiento de semillas para las plantaciones y viveros forestales, de los cuales cinco se encuentran en Quetzaltenango y uno en Huehuetenango. La recolección de semilla de

fuentes no autorizadas es bastante común; sin embargo, esta práctica no garantiza la obtención de germoplasma de calidad. (INAB 2017).

Otras especies de *Abies* también se aprovechan como árboles de navidad en Estados Unidos y Europa. Las fuentes semilleras de estas especies han sido ampliamente estudiadas; se ha evaluado la diversidad genética de las poblaciones, las condiciones óptimas para la germinación de la semilla y la resistencia a plagas. Incluso se ha demostrado que la diversidad genética y el origen de la semilla tienen un efecto sobre la susceptibilidad al hongo *Phytophthora* sp. y el pulgón *M. abietinus*, plagas que ya han sido reportadas para las plantaciones de Guatemala. (DeHayes 1980; Frampton *et al.* 2013; INAB 2018; Reynoso 2008).

## **C. Plagas y enfermedades del pinabete**

### **1. Plagas**

#### **a. Taltuzas**

En algunas plantaciones de pinabete se han reportado pérdidas a causa de taltuzas, una plaga que afecta una gran variedad de cultivos. Estos roedores habitan túneles paralelos a la superficie de la tierra, tienen cuerpo robusto y encorvado adaptado para desplazarse en ambientes subterráneos y pueden alcanzar un tamaño de hasta 10 pulgadas. Las taltuzas cavan túneles dentro de las plantaciones y se alimentan de las raíces del pinabete, provocando el debilitamiento y la muerte de los árboles, en especial en individuos jóvenes. Las principales formas de control incluyen la colocación de cebos a base de maíz o papa mezclados con productos tóxicos y el uso de trampas de metal en las entradas de los túneles (INAB 2018; Reynoso 2008).

#### **b. Gallina ciega**

Las larvas de la gallina ciega (*Phyllophaga* sp.) suelen alimentarse de las raíces de hierbas, sin embargo, cuando estas son escasas puede alimentarse de las raíces del pinabete. A principios de la temporada lluviosa, los ronrones de mayo adultos emergen

del suelo, se alimentan de plantas de hoja ancha en las cercanías de la plantación y regresan para colocar los huevos en el suelo.

Esta plaga suele ser un problema en plantaciones recién establecidas o con menos de tres años, y es más común encontrarla en terrenos que se utilizaban antes para actividades agrícolas. Se recomienda monitorear la presencia de la plaga previo a establecer la plantación, en caso que esta se encuentra se debe aplicar un tratamiento preventivo a las raíces, sumergiendo las plantas en un insecticida preventivo previo al traslado de las plantas al campo. Si la plaga se encuentra cuando ya está establecida la plantación, se recomienda aplicar al suelo un insecticida granulado, así como un fertilizante con alto contenido de potasio y fósforo y bajo contenido de nitrógeno para estimular el crecimiento de las raíces de las plantas afectadas (INAB 2018; Reynoso 2008).

#### **c. Pulgón de la raíz del pinabete**

Esta plaga es poco común de encontrar, sin embargo, puede ocasionar daños significativos en las plantaciones. El pulgón del género *Prociphilus* se alimenta de la savia que succiona de la raíz del pinabete, y puede infectar al árbol con patógenos contenidos en la saliva. Se observa como un cambio en la coloración de la copa de verde a amarillo-marrón de forma descendente, y puede causar la muerte en unas pocas semanas. Los pulgones viven en colonias adheridas a las raíces, y los adultos emergen del suelo para iniciar nuevas colonias en otros árboles. Se conoce poco acerca de esta plaga en Guatemala, aunque se ha estudiado en otros países donde se reporta como una plaga en plantaciones de abetos con fines navideños. Para el manejo del pulgón se recomienda la aplicación de insecticidas sistémicos en el suelo (INAB 2018).

#### **d. Pulgón del pinabete**

Existen dos especies de pulgones que afectan al pinabete: *Mindarus guatemalensis* y *M. abietinus*, siendo las principales plagas que afectan las plantaciones. Los pulgones se agrupan en colonias que se establecen en brotes y ramas tiernas, alimentándose de la

savia de las hojas y provocando enrollamiento y deformación de las mismas. Estos colocan huevos que eclosionan en abril y mayo, son de color negro y difíciles de ver a simple vista. Las ninfas son de color blanco amarillento cubiertas de lana blanquecina y cera, maduran rápidamente y se alimentan de hojas nuevas. Estas se convierten en pulgones alados aproximadamente desde finales de junio hasta mediados de julio, y colocan huevos en la base de las hojas nuevas para completar su ciclo de vida (INAB 2017; INAB 2018; Reynoso 2008).

Los pulgones tienen depredadores naturales como mariquitas (Coccinellidae) y crisopas (Chrysophidae), y se ha reportado que las lluvias intensas pueden reducir la población de la plaga. El manejo de esta plaga consiste principalmente en el monitoreo y el uso de pesticidas. Para realizar el monitoreo, poco antes del inicio de la época lluviosa, se seleccionan aleatoriamente de 10 a 15 árboles por hectárea y se golpean las ramas externas de la copa sobre un paño negro. Si se encuentran por lo menos 2 pulgones por árbol, se recomienda la aplicación de un insecticida sistémico. Cuando la plaga se encuentra en una alta incidencia no es recomendable la aplicación de insecticidas de contacto porque disminuyen las poblaciones de depredadores naturales; tampoco de fertilizantes altos en nitrógeno ya que favorecen el crecimiento de las colonias de pulgones (INAB 2017; INAB 2018; Reynoso 2008).

## **2. Enfermedades**

### **a. Fumagina**

Esta enfermedad inicia con la infestación de pulgones (*Mindarus abietinus* y *M. guatemalensis*), que se alimentan de la savia de la planta y excretan una sustancia con azúcares de la cual se alimenta el hongo *Capnodium* sp. Las esporas del hongo son transportadas por el viento y se depositan sobre las excreciones, formando una capa oscura con aspecto de costra. El crecimiento del hongo sobre las hojas impide el desarrollo normal de las funciones de respiración y fotosíntesis de las hojas, produciendo un debilitamiento general de la planta. La principal medida de manejo es la aplicación de insecticidas para combatir el ataque de los pulgones, así como la aplicación de fungicidas

a base de oxiclорuro de cobre; para reducir la infestación con fines estéticos, incluso se recomienda lavar el follaje con agua a presión (INAB 2017; INAB 2018).

### **b. Pudrición de la raíz**

La pudrición de la raíz es causada por un hongo del género *Phytophthora* que crece en las raíces del pinabete, aunque también puede encontrarse en tallos. El hongo ocasiona pudrición severa de las raíces del pinabete, y los síntomas incluyen la decoloración de las hojas de verde a amarillo marrón y muerte de las ramas en la base del árbol, lo que puede ocasionar retardo en el crecimiento e incluso la muerte de los árboles. Este hongo crece en terrenos inundables con mal drenaje o textura muy arcillosa, y puede originarse en vivero y trasladarse al campo cuando se trasplantan los árboles. Cuando ocurre un brote se recomienda arrancar las plantas y quemarlas fuera de la plantación, aplicar cal al suelo y sembrar en la siguiente temporada. Se debe tener cuidado de retirar todos los restos de plantas enfermas ya que las esporas del hongo pueden permanecer en el suelo por más de un año y reiniciar la infección en la temporada lluviosa (INAB 2017; INAB 2018).

### **c. Podredumbre blanca**

Esta enfermedad es causada por el hongo *Armillaria* sp., que afecta los tejidos conductivos del árbol (xilema y floema), cortando el suministro de agua y nutrientes al árbol y provocando la muerte. Se identifica por la presencia de hojas amarillentas (cloróticas) y la defoliación del árbol, al realizar un corte transversal en la base o las raíces del árbol se pueden encontrar masas blanquecinas dentro de los tejidos de conducción. El hongo puede aparecer en terrenos que no han sido preparados para el cultivo, donde se encuentran tocones viejos que constituyen los focos primarios de la infección. En árboles adultos puede ocasionar la muerte en algunos meses, mientras que en árboles jóvenes ocurre en menor tiempo. Las medidas de manejo incluyen remover los árboles infectados, realizar una zanja de 30 centímetros de profundidad alrededor del brote para cortar las raíces y aplicar cal al suelo (INAB 2018).

#### **d. Tizón interno de la hoja**

Esta enfermedad es ocasionada por un complejo de hongos de los géneros *Alternaria*, *Cladosporium* y *Pestalotia*, que causan la decoloración y defoliación de las ramas internas del pinabete. En casos extremos puede afectar también las ramas externas, provocando una defoliación severa que causa el debilitamiento general del árbol e incluso la muerte. La enfermedad suele afectar árboles a los que se les ha aplicado la poda de formación y tienen la copa cerrada con poca ventilación e iluminación, ya que las condiciones de humedad pueden favorecer el crecimiento de hongos. Las medidas de manejo de la enfermedad incluyen la desinfección de herramientas, el manejo de drenajes para evitar inundaciones y la aplicación de fungicidas sistémicos o de contacto como Captán o Clorotalonil de manera quincenal hasta que se reduzca la infección (INAB 2017; INAB 2018).

#### **e. Enfermedad del alga verde**

Esta enfermedad está causada por un alga verde que aún no ha sido identificada. La infección inicia en la parte interior de la copa y se extiende hacia fuera, lo que sugiere que la sombra y la humedad favorecen el desarrollo del alga. Cuando esta se extiende a las hojas, se reduce la actividad fotosintética y conforme el daño avanza, las hojas mueren y caen. Las recomendaciones para su prevención incluyen el manejo de la sombra y evitar plantar árboles donde haya estancamiento de agua. El único tratamiento recomendado hasta el momento que ha dado buenos resultados en campo es la aplicación de un fungicida a base de sulfato de cobre (INAB 2018).

### **D. Algas terrestres**

#### **1. Diversidad**

Las algas conforman un amplio grupo de organismos que llevan a cabo fotosíntesis oxigénica, compuesto por varios linajes evolutivos de distinto origen, tanto procariotas como eucariotas (Cavalier-Smith 2016). En este grupo suelen clasificarse a las cianobacterias (Cyanobacteria), algas verdes o clorofitas (Chlorophyta, Charophyta),

algas rojas (Rhodophyta), glaucofitas (Glaucophyta) algas verde-amarillas, pardas, doradas, crisofitas y diatomeas (Heterokontophyta); aunque los filos que se incluyen pueden variar de acuerdo a la clasificación que se utilice. El número de especies de algas descritas es alrededor de 40,000, aunque algunas estimaciones del número total de especies pueden ascender hasta 8 millones (Guiry 2012). La base de datos AlgaeBase contiene 157,000 registros de especies de algas, incluyendo especies de euglenas, dinoflagelados y coanoflagelados (AlgaeBase 2019).

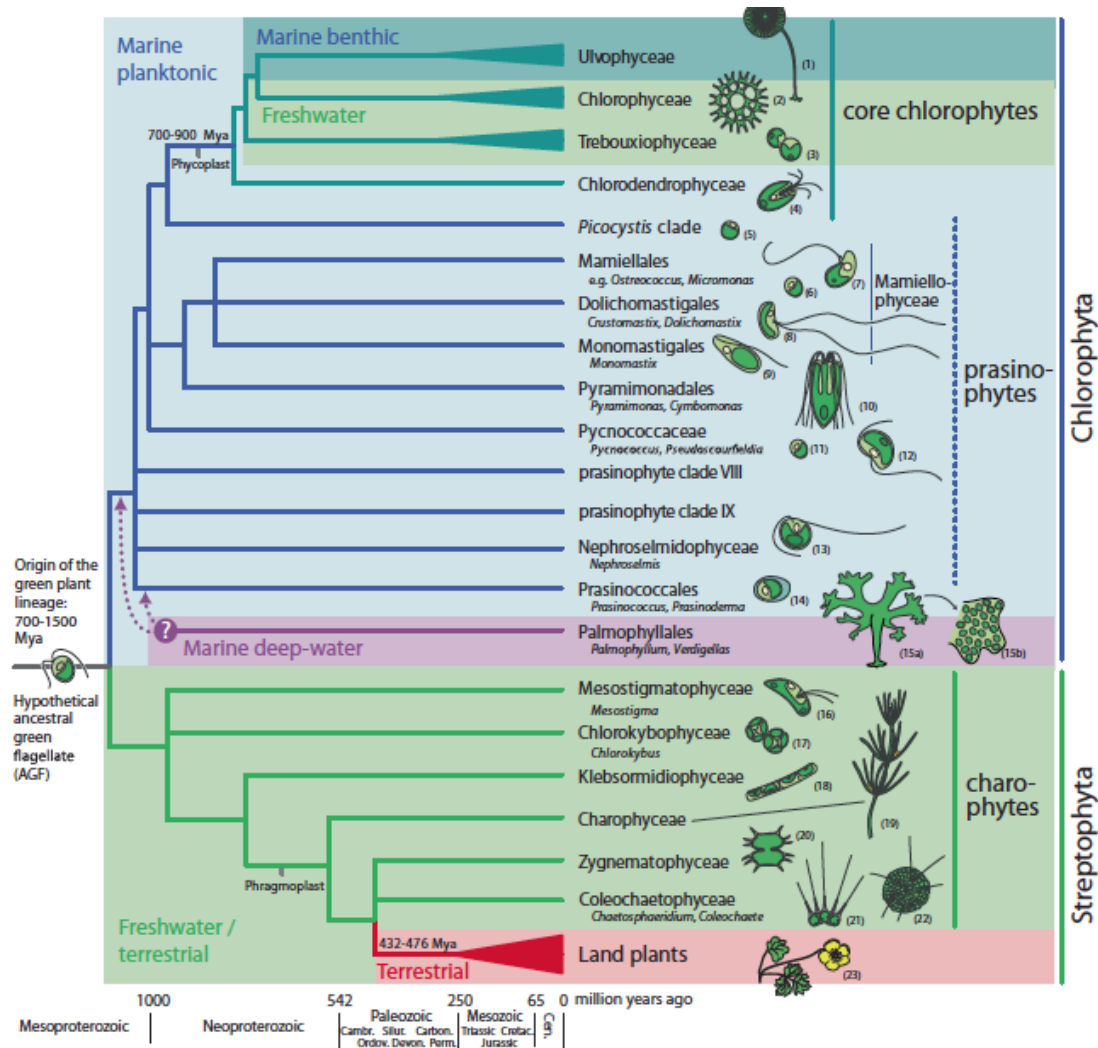
Los ecosistemas marinos y de agua dulce suelen ser el hábitat principal de las algas, que tienen tamaños variables que van desde unos pocos micrómetros en algas unicelulares hasta varios metros en algas marinas, aunque la mayoría son microscópicas (microalgas). Algunos linajes de algas desarrollaron mecanismos para tolerar la desecación, alta intensidad de luz ultravioleta y los cambios abruptos de temperatura, lo que les permitió crecer en la tierra. Se estima que alrededor de 800 especies de algas se encuentran en hábitats terrestres, la mayoría de las cuales son cianobacterias o algas clorofitas. Existe poca información disponible acerca de la diversidad de microalgas terrestres, en especial para los trópicos, ya que la mayor parte de estudios se han llevado a cabo en regiones templadas. Las condiciones climáticas más estables y la amplia diversidad biológica en los trópicos sugiere una diversidad de microalgas mucho mayor de la que ha sido inventariada en estas regiones (Freystein y Reisser 2010; López-Bautista *et al.* 2007).

## **2. Taxonomía y sistemática**

Existen cuatro grupos de algas que han podido colonizar ecosistemas terrestres: Cyanobacteria, Heterokontophyta, Chlorophyta y Streptophyta; de los cuales Cyanobacteria es procariota y el resto son eucariotas. En Cyanobacteria se agrupan una gran variedad de algas procariotas en una sola clase: Cyanophyceae. Estas pueden tener morfología unicelular o filamintosa, y los géneros más comunes son *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria* y *Spirulina* (Hodkinson *et al.* 2011; Leliaert *et al.* 2011).

En el filo Heterokontophyta se encuentran dos clases con hábitats terrestres: Bacillariophyceae (diatomeas) y Xanthophyceae (algas verde-amarillas). Los principales eucariotas fotosintéticos se agrupan en Chloroplastidia, que se divide en dos grandes grupos que divergieron hace aproximadamente mil millones de años: Chlorophyta y Streptophyta (ver Figura 3). A su vez, Chlorophyta se divide en tres clases principales: Trebouxiophyceae, Chlorophyceae y Ulvophyceae; dentro de este clado también se encuentra Prasinophytes, aunque este es un grupo polifilético y las relaciones filogenéticas dentro de este aún no han sido resueltas (Hodkinson *et al.* 2011; Leliaert *et al.* 2011).

La mayor cantidad de especies de algas terrestres del filo Chlorophyta se clasifican en Trebouxiophyceae, que incluye a varios géneros ampliamente distribuidos como *Chlorella*, *Myrmecia*, *Prasiola*, *Stichococcus* y *Trebouxia*, el género de algas más común presente en líquenes terrestres (Wehr y Sheath 2015). En Chlorophyceae se encuentran principalmente algas de agua dulce, aunque también otros géneros de algas terrestres como *Bracteacoccus* y *Chlorococcum*; y en Ulvophyceae se encuentran algas verdes marinas, con dos órdenes terrestres: Trentepohliales y Cladophorales (Hodkinson *et al.* 2011).



**FIGURA 3.** Filogenia de Chlorophyta y Streptophyta.

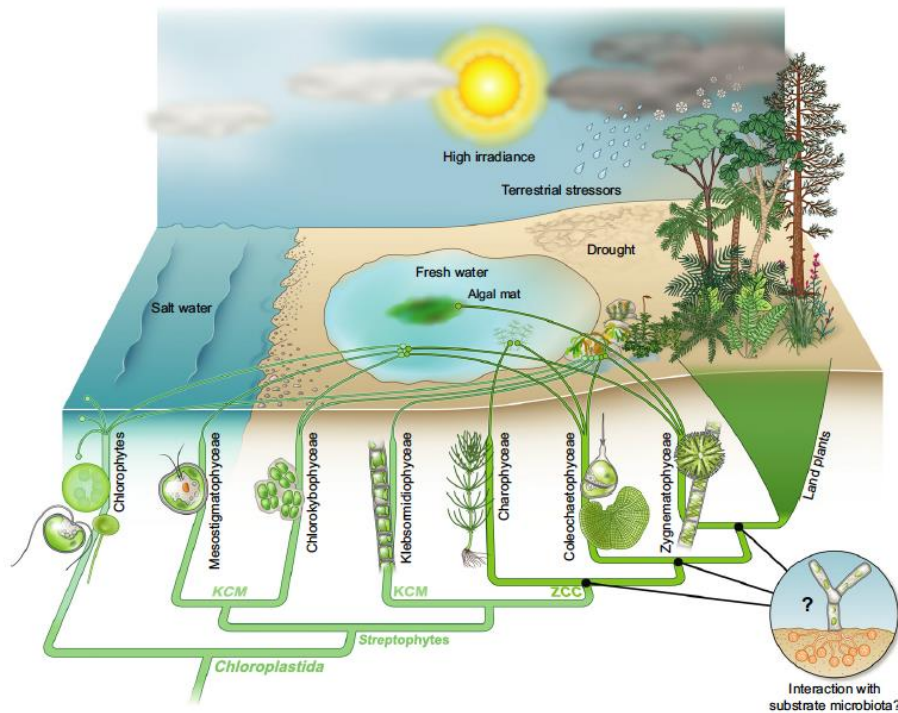
(Leliaert *et al.* 2011)

En Streptophyta se agrupan las plantas superiores (Embryophyta) y seis clases de algas: Charophyceae, Chlorokybophyceae, Coleochaetophyceae, Klebsormidiophyceae, Mesostigmatophyceae, Zygnematomyceae; de las cuales todas pueden encontrarse en hábitats terrestres, a excepción de Charophyceae (Hodkinson *et al.* 2011). *Chlorokybus atmophyticus* Geitler es la única especie de la clase Chlorokybophyceae, de igual manera que *Mesostigma viride* Lauterborn es el único miembro de Mesostigmatophyceae.

En Coleochaetophyceae se encuentran los géneros *Chaetosphaeridium* con seis especies y *Coleochaete* con 20; en Klebsormidiophyceae también se encuentran dos:

*Entransia* y *Klebsormidium*, siendo este último uno de los grupos más ampliamente distribuidos en hábitats terrestres (Archibald *et al.* 2017; Hodkinson *et al.* 2011).

Zygnematophyceae es la clase con la mayor cantidad de especies e incluye dos órdenes: Desmidiiales y Zygnematales; Zygnematales incluye las familias Zygnemataceae con más de 800 especies y Mesotaeniaceae con 100 especies, aunque se ha demostrado que estas familias no son monofiléticas. Desmidiiales incluye contiene más de 3,500 especies divididas en cuatro familias: Closteriaceae, Gonatozygaceae, Peniaceae y Desmidiaceae (Archibald *et al.* 2017). Aún no se conoce con seguridad cuál de estos grupos está más emparentado con las plantas superiores. Por un tiempo se consideró a Charophyceae como el grupo hermano de las plantas, aunque estudios recientes basados en secuencias de ADN sugieren que Zygnematophyceae podría ser el más relacionado (Ver Figura 4) (De Vries y Archibald 2018).



**FIGURA 4.** Diagrama con los principales grupos de algas eucariotas que cuentan con especies terrestres y sus tipos de hábitat.

(De Vries y Archibald 2018)

La clasificación taxonómica de algas se ha basado principalmente en características morfológicas, ya que no es posible aplicar la definición biológica de “especie”: un conjunto de organismos que pueden reproducirse entre sí y tener descendencia fértil. Esta definición ha ido cambiando producto de los avances en análisis genético. Se ha encontrado que algunas características son convergentes (homoplásicas) entre linajes diferentes de algas, lo que ha provocado rearrreglos a niveles taxonómicos altos, incluso a nivel de filo o clase. En algunos géneros como *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Neochloris* y *Trebouxia* se han incluido especies que pertenecen a diferentes clases, por lo que se les considera a estos géneros polifiléticos. En los últimos años, el análisis de secuencias de ADN ha permitido confirmar las relaciones entre los principales grupos de algas y clasificar nuevas especies (Guiry 2012).

### **3. Hábitat y ecología**

La mayoría de especies de algas terrestres viven en el suelo, aunque algunas pueden colonizar superficies por encima del suelo (subaéreas); estas obtienen agua y nutrientes de la lluvia y el aire, por lo que dependen de microhábitats específicos que se forman en una gran variedad de superficies. Las algas subaéreas pueden crecer sobre rocas (epilíticas), plantas (epífitas), hongos (epimicóticas) y animales (epizooicas); incluso sobre estructuras o edificaciones de metal, cemento, o madera, donde forman coberturas densas que provocan la degradación de las superficies a largo plazo (Das y Gupta 2015; Videv *et al.* 2017). Incluso se ha reportado el crecimiento de algas epífitas sobre insectos no voladores en bosques tropicales (Hoffman 1989).

Algunas algas también pueden ser parásitos de plantas, como es el caso del género *Cephaleuros*; mientras que otras sólo utilizan la planta como soporte, como el género *Klebsormidium* (Ver Figura 5). Las algas que crecen sobre la corteza se denominan epifloicas, mientras que las que crecen sobre las hojas se les llama epifílicas (Brooks *et al.* 2015).



**FIGURA 5.** Cobertura algal de *Klebsormidium crenulatum* sobre la corteza de un árbol en Inglaterra.

(Nichols 2014)

Algunos grupos de algas terrestres pueden formar simbiosis con otros organismos, proveyendo productos de la fotosíntesis a cambio de poder colonizar sitios donde no podrían vivir por sí solas. Las cianobacterias y clorofitas pueden vivir en mutualismo con hongos basidiomicetos o ascomicetos para formar líquenes, que suelen ser los primeros macroorganismos en una sucesión. Otras algas también pueden formar simbiosis con vertebrados de manera muy específica, como el alga *Oophila amblystomatis*, y la salamandra *Ambystoma maculatum*. Esta alga crece sobre la capa exterior de los huevos de la salamandra y después coloniza el interior de las células del embrión; también se encuentran en los oviductos de los adultos y se transmiten a los huevos durante la puesta (Kerney *et al.* 2011).

Algunos géneros pueden vivir bajo temperaturas extremas, como *Cylindrocystis* que forma coberturas sobre rocas en el desierto, *Chroococcus* que crece cerca de aguas termales, o *Chlamydomonas* que puede crecer sobre la nieve y el hielo, tolerando temperaturas por debajo del punto de congelación durante largos períodos. Las algas también pueden tolerar condiciones de extremas de acidez, encontrándose *Chaetophora*

en manantiales cársticos (resurgencias) o *Euglena* en ríos ácidos con valores de pH de 2 a 5 (Wehr y Sheath 2015).

#### **4. Morfología**

Existen tres tipos de morfología para las microalgas subaéreas: unicelular, sarcinoide y filamentosa. La morfología unicelular es la más común, y se encuentra presente en varios géneros: *Bracteacoccus*, *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Muriella*, *Myrmecia*, *Stichococcus*, *Tetracystis* y *Trebouxia*. La morfología sarcinoide o coccoide es menos común, presente en los géneros *Apatococcus*, *Chlorokybus*, *Chlorosarcina*, *Desmococcus* y *Prasiococcus*. Los filamentos uniseriados se encuentran principalmente en tres grupos: *Rosenvingiella*, *Prasiola* y *Klebsormidium* (López-Bautista *et al.* 2007).

#### **5. Métodos de identificación**

Debido a su reducido tamaño y tipo de hábitat, algunas algas pueden confundirse fácilmente con hongos, líquenes o incluso musgos, por lo que se requiere de la examinación microscópica de las algas para su identificación. La microscopía y el cultivo *in vitro* son los principales métodos que se han utilizado para la identificación de algas. A partir de muestras de campo se aíslan las algas en medio de cultivo y se observan los cultivos bajo microscopio (Brooks *et al.* 2015; Kuhl y Lorenzen 1964). Se ha descubierto que algunas características morfológicas son convergentes (homoplásicas) entre los diferentes grupos de algas, lo que puede resultar en la identificación errónea de algunas especies. Además, algunas características de un alga pueden variar de acuerdo a factores ambientales o condiciones de cultivo *in vitro*, y algunos géneros han sido descritos únicamente a partir de material cultivado en laboratorio. La homoplasia y plasticidad de las características morfológicas muestran que la morfología no es suficiente para determinar la especie de un alga; es por esto que, en la mayoría de casos, se requiere llevar a cabo un análisis genético para la identificación del alga hasta el nivel de especie de forma certera (Hodkinson *et al.* 2011).

Para realizar un análisis genético en la mayoría de casos es necesario el aislamiento y cultivo del alga previamente, y una vez obtenido un cultivo puro, se

procede a realizar un análisis genético utilizando marcadores de ADN. Por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), es posible aislar y secuenciar regiones marcadoras como ITS o 28S. Estas regiones se encuentran en el ADN nuclear; ITS (*Internal Transcribed Spacer*) corresponde a la región espaciadora entre los genes de ARN ribosomal de la subunidad grande (60S) y pequeña (40S) del ribosoma en eucariotas, mientras que la región 23S codifica para un componente de la subunidad pequeña (30S) del ribosoma en procariotas (López-Bautista *et al.* 2007; Hodac 2015).

Otros métodos más recientes trabajan directamente con muestras de campo, sin necesidad del cultivo de las algas, lo que hace posible la identificación de organismos que no son fáciles de aislar y cultivar en laboratorio. Esto puede realizarse por medio de la extracción de ADN de una muestra ambiental, y la amplificación y clonación de fragmentos generados por PCR (amplicones) e insertados en plásmidos. Estos plásmidos son insertados en bacterias para su multiplicación y luego extraídos y secuenciados, lo que permite el análisis de múltiples amplicones diferentes. Además de utilizar métodos de análisis genético, conocer el hábitat y la ecología de las algas es esencial para su identificación, ya que hay géneros o especies que suelen encontrarse únicamente en ciertos ecosistemas o ambientes (Hoffman 1989; Suutari *et al.* 2010).

## **6. Cultivo *in vitro***

Para la identificación de algas se requiere trabajar con un cultivo puro, el cual puede establecerse por medio del aislamiento de una sola especie de alga a partir de una muestra colectada en campo, que puede contener hasta cientos de microorganismos diferentes. Se debe trabajar en condiciones asépticas para prevenir la contaminación por hongos y bacterias, que suelen ser las principales fuentes de contaminación en el cultivo de algas.

El problema más importante en el cultivo de algas es asegurar un adecuado suplemento de carbono. Este se obtiene a partir del dióxido de carbono del aire o puede suplementarse en el medio en forma de glucosa, aunque esta puede facilitar el crecimiento de otros microorganismos. La contaminación en cultivos de algas puede observarse

añadiendo peptona al 0.1% y glucosa al 1%, lo que promueve más el crecimiento de bacterias que el de algas. Esto puede solucionarse aireando el cultivo con una mezcla de aire y dióxido de carbono, en una proporción de 95:5 o de hasta 99:1, en cuyo caso no se necesita suplementar glucosa (Hodac 2015; Kuhl y Lorenzen 1964).

Otros aspectos importantes para el cultivo de algas son la temperatura, iluminación y el suplemento de aire-CO<sub>2</sub> y nutrientes en el medio. Los cultivos deben mantenerse a temperatura ambiente y con iluminación artificial, puede utilizarse una lámpara fluorescente para la iluminación del cultivo y este no debe estar expuesto a la luz directa del sol. Se debe mantener el cultivo en constante agitación para evitar la sedimentación del alga utilizando un motor de bombeo de aire. Se debe transferir el alga en medio cada 6-8 semanas para suplementar los nutrientes necesarios, y se debe visualizar el cultivo bajo un microscopio antes de la inoculación en otros recipientes, para evaluar las características morfológicas del alga y asegurarse de transferir únicamente una especie. Es necesario mantener la morfología y fisiología de los cultivos, los cuales pueden ser afectados por la exposición a radiación ultravioleta (UV). Si se desea mantener un cultivo de algas durante tiempo prolongado, se deben inocular en tubos de cultivo con medio solidificado con agar al 1% (Kuhl y Lorenzen 1964).

## **E. Hongos fitopatógenos**

### **1. Diversidad**

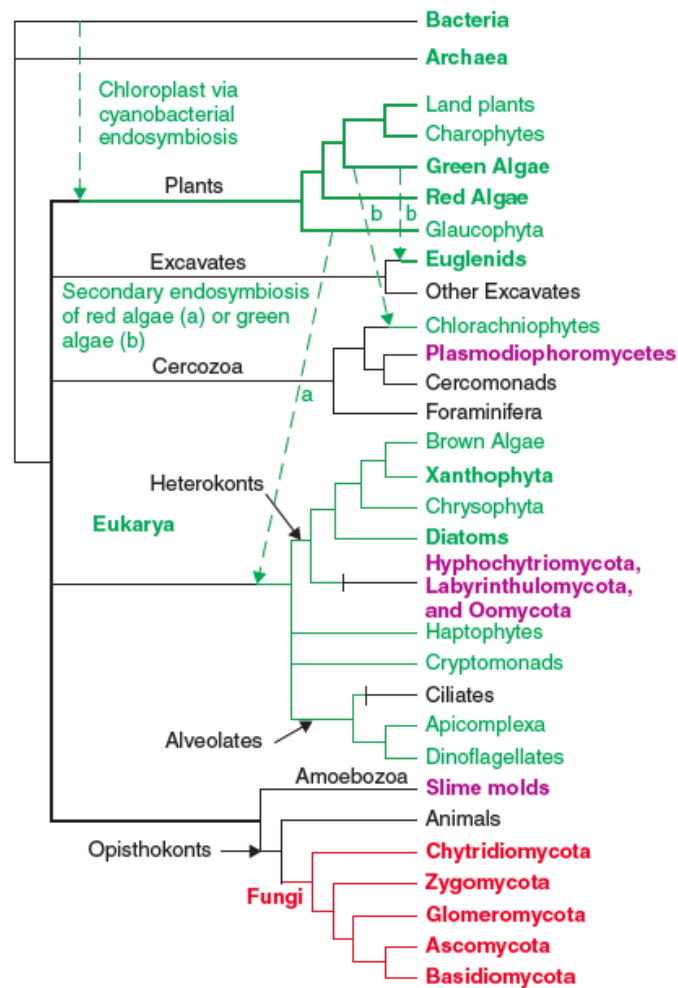
Se han descrito más de 144,000 especies de hongos, agrupadas en 886 familias taxonómicas. En los últimos diez años se han descrito 350 familias nuevas; cada año se describen alrededor de 2,000 especies y se estima que más del 90% de las especies de hongos aún no han sido estudiadas. Los hongos son un grupo altamente diverso en su anatomía, bioquímica, genética, tipos de hábitat y simbiosis; aunque los hongos verdaderos (Reino Fungi) comparten la característica de tener paredes celulares de quitina, también se han agrupado junto a otros eucariotas que se reproducen por esporas y carecen de clorofila. Se estima que los primeros hongos evolucionaron hace mil millones

de años, con la transición a la tierra ocurriendo hace 700 millones de años (Gaya *et al.* 2018; Thorn y Lynch 2007).

## **2. Taxonomía y sistemática**

La teoría de Cavalier-Smith se describió en la década de los 90, donde propuso la clasificación de los hongos basándose en características como el tipo de células móviles, la composición química de la pared celular, rutas biosintéticas de la lisina y secuencias de ADN del ARN ribosomal 5S. Posteriormente, utilizando secuencias de ARN ribosomal 18S se encontró que los verdaderos hongos forman un grupo monofilético, compuesto por: Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota y Basidiomycota (Ver Figura 6).

Los mohos mucilaginosos celulares (Acrasiomycota, Myxomycota) y los oomicetos (Oomycota) no se consideran verdaderos hongos debido a diferencias en su morfología y ciclo de vida, y se encuentran dentro del linaje de las algas pardas y diatomeas (Manoharachary *et al.* 2010; Thorn y Lynch 2007). De todos los filos antes mencionados, en cuatro se encuentran organismos fitopatógenos: Oomycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota.



**FIGURA 6.** Filogenia de los principales grupos de Eukarya. En color rojo se muestran los filos de hongos verdaderos (Fungi) y en morado se encuentran los pseudohongos. (Thorn y Lynch 2007).

### a. Oomycota

Los oomicetos no son verdaderos hongos. Estos se reproducen sexualmente por medio de oosporas, que se originan por la unión del oogonio y el anteridio. Su reproducción asexual se da por medio de esporas flageladas denominadas zoosporas; estas se producen en esporangios que se encuentran sobre esporangióforos. En este grupo

se encuentran los géneros *Phytophthora*, *Phytium*, *Bremia*, *Plasmopara* y *Peronospora* (Manoharachary *et al.* 2010).

#### **b. Zygomycota**

Los zigomicetos producen esporas asexuales no móviles contenidas en cuerpos fructíferos llamados esporangios, y se reproducen sexualmente por medio de meiosporas llamadas zigosporas. En este grupo se incluyen los géneros *Rhizopus*, *Pilobolus*, *Mucor* y *Rhizomucor* (Manoharachary *et al.* 2010).

#### **c. Ascomycota**

Los hongos superiores se agrupan en tres clases: Ascomycota, Basidiomycota y Deuteromycota. El filo Ascomycota es uno de los grupos más amplios de hongos, incluyendo algunos champiñones, trufas, levaduras unicelulares (*Saccharomyces*, *Pichia* y *Candida*). También se encuentran una gran variedad de hongos filamentosos saprófitos, parásitos y simbiontes mutualistas como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Botrytis*, *Alternaria*, *Pestalotia*, *Phomopsis*, *Taphrina*, *Sclerotinia* y *Monilinia*. Estos se caracterizan por tener micelio septado, y se reproducción sexuales se da a través de ascosporas que se producen dentro de sacos llamados ascas o ascocarpos.

Los ascocarpos pueden encontrarse en forma libre o contenidas en cuerpos fructíferos que, de acuerdo a su estructura, pueden ser apotecios, peritecios o cleistotecios. Su reproducción asexual es a través de conidios, que pueden estar solitarios o agrupados en conidiocarpos; muchas especies de ascomicetos se reproducen únicamente de forma asexual (especies anamórficas). Este es el filo más amplio de hongos con más de 90,000 especies descritas (Gaya *et al.* 2018; Manoharachary *et al.* 2010; Stewart y Globig 2011).

#### **d. Basidiomycota**

Los basidiomicetos se caracterizan por tener micelio septado, y se reproducen sexualmente mediante la producción de basidioporas, que son producidas en una

estructura llamada basidio. Se han descrito alrededor de 30,000 especies de basidiomicetos, incluyendo hongos patógenos de plantas y animales y descomponedores de hojas y madera. En este grupo se incluyen la géneros fitopatógenos como *Claviceps*, *Puccinia*, *Armillaria*, *Rhizoctonia*, *Moniliophthora*, *Ravenelia* y *Cynodon* (Gaya *et al.* 2018).

En este grupo también se encuentran hongos formadores de ectomicorrizas, que se asocian a las raíces de las plantas para el intercambio de nutrientes. Esta asociación suele encontrarse más seguido en ecosistemas templados, alpinos y boreales; ya que en ecosistemas tropicales hay una mayor presencia de micorrizas arbusculares (endomycorrizas), formadas por hongos del filo Glomeromycota. Los basidiomicetos son el segundo filo más grande de hongos, con más de 50,000 especies (Gaya *et al.* 2018; Manoharachary *et al.* 2010).

### **3. Identificación**

La identificación de hongos se ha apoyado principalmente en la observación microscópica de los hifas, esporas o estructuras reproductivas. Las características más utilizadas son el tamaño, forma, color, y estructura de las esporas; o la presencia de septos, ramificaciones y pigmentación de las hifas. Sin embargo, la morfología puede no ser suficiente la identificación debido a la convergencia en características morfológicas entre linajes diferentes. Por ejemplo, la trufa negra (*Tuber melanosporum*) del filo Ascomycota suele ser confundida con la falsa trufa (*Melanogaster tuberiformis*), del filo Basidiomycota, debido a la similitud en la morfología de sus estructuras reproductivas.

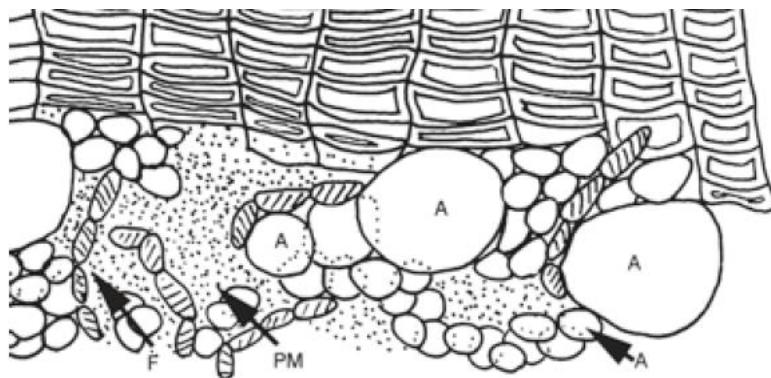
Esto ha provocado cambios en la taxonomía desde el nivel de especie hasta el nivel de filo, y la clasificación de una misma especie puede variar de acuerdo a los autores. Para la identificación correcta de hongos es necesaria la utilización de características morfológicas, información genética y tipo de hábitat (Gaya *et al.* 2018; Thorn y Lynch 2007).

Una de las técnicas más utilizadas para la identificación de hongos es el *barcoding*, que consiste en el análisis de secuencias de ADN que se comparten entre la mayoría de grupos del reino Fungi. La región ITS es la más utilizada para el *barcoding* en hongos, la cual contiene dos subregiones: ITS1 e ITS2. Estas se encuentran a ambos lados de la región conservada de ARN ribosomal 5.8S, y pueden analizarse de forma independiente o en conjunto. Por medio de secuenciación de nueva generación, es posible identificar varias especies de hongos a partir de una muestra ambiental. Esto ha contribuido a la ampliación de la taxonomía de hongos y la redefinición de las relaciones evolutivas entre los principales grupos (Badotti *et al.* 2017; Thorn y Lynch 2007).

## F. Biopelículas de microorganismos

### 1. Definición

Las biopelículas son asociaciones entre diferentes tipos de microorganismos autótrofos o heterótrofos, como algas, hongos, cianobacterias y bacterias, que se forman sobre una superficie sólida o líquida (Ver Figura 7) (Freystein y Reisser 2010). Estos microorganismos que conforman las biopelículas a menudo producen compuestos químicos que forman una matriz extracelular que les provee protección, y puede atraer la colonización de otros microorganismos similares.



**FIGURA 7.** Diagrama de una biopelícula de algas sobre la corteza de un árbol; A = algas, F = hongos, PM = partículas de suelo. (Freystein y Reisser 2010)

En ambientes bajo condiciones extremas, como desiertos o montañas nevadas, las biopelículas representan la mayor parte de biomasa en estos ecosistemas. Se ha encontrado que la estructura de estas depende principalmente de factores abióticos, tales como la disponibilidad de luz, la humedad ambiental y la presencia de nutrientes. También puede afectar el material, la textura y el pH de la superficie donde se forma la biopelícula (Stifterova y Neustupa 2015).

## **2. Biopelículas en bosques de coníferas**

En varios países de Europa se ha reportado la incidencia de una cobertura de algas que se forma sobre las hojas de *Picea abies* y algunas especies de *Abies* que también se aprovechan como árboles de navidad. Este fenómeno se ha descrito en Escandinavia, Alemania, Polonia, Suecia, Noruega, Dinamarca y el Reino Unido; y presenta un problema para las plantaciones de árboles con fines ornamentales. La cobertura está conformada por varias algas pertenecientes a los géneros *Protococcus*, *Apatococcus*, *Desmococcus*, *Coccomyxa* y un alga filamentosa que no fue identificada. Esta alga filamentosa es un colonizador tardío que se encontró en los árboles de algunas localidades. (Poggio 2002; Sochting 1997).

Algunas de las algas reportadas viven en simbiosis con hongos formando líquenes, y en la cobertura también pueden encontrarse otros hongos y bacterias. La colonización de las algas comienza en la parte inferior del tronco y continúa de forma vertical hacia la copa, luego avanza de forma horizontal desde las ramas viejas hacia las ramas más jóvenes, y forma pequeñas colonias en la superficie de las hojas (Ver Figura 8). El crecimiento de las algas sobre las hojas reduce la disponibilidad de luz para fotosíntesis, reduciendo la productividad del árbol. Incluso pueden crecer cerca o dentro de los estomas de la planta, afectando también el intercambio gaseoso (Poggio 2002; Sochting 1997; Sochting y Sutton 1997).

La colonización de las algas inicia al final del primer año de una hoja nueva, a finales de otoño, y continúa por los próximos cuatro años. Durante el siguiente año las algas se propagan y forman una cobertura gruesa en la superficie de las hojas de dos años

de edad. Las hojas de tres años pueden estar cubiertas en el envés, y en esta etapa un porcentaje de las algas en la cobertura han muerto. En 2002 se realizó un estudio detallado acerca de la biomasa de esta cobertura de algas en Suecia, concluyendo que un árbol de 20 años de edad con 16 kilogramos de hojas puede contener 200 gramos de algas. Según esta medida, se estimó que un rodal de 20 años puede contener hasta 375 kilogramos de cobertura de algas por hectárea (Sochting 1997; Poggio 2002).



**FIGURA 8.** Biopelícula de algas epifíticas en hojas de *Picea abies* en Suecia (Poggio 2002).

Se ha demostrado que la incidencia de estas algas en particular está relacionada a factores ambientales. A pesar de ser organismos fotosintéticos, las algas tienen un mayor crecimiento bajo sombra debido a que la luz directa ocasiona una mayor desecación. La humedad ambiental también es un factor importante ya que estas obtienen agua por medio de vapor de agua; y la deposición de nitrógeno y amonio atmosférico promueven el crecimiento de las algas. Sin embargo, no existe un solo factor ambiental que pueda predecir adecuadamente la distribución del alga, que también puede darse por causas antropogénicas como la contaminación del aire (Sochting 1997; Poggio 2002).

Las algas que forman la biopelícula pueden ser parasitadas por el hongo necrotrófico *Scolecotecha cornuta* Sochting & B. Sutton; la infestación del hongo es tan extensa como la del alga, este ha sido reportado en Dinamarca, Polonia, Suecia y el Reino Unido. El micelio infecta las células de las algas y causa necrosis, formando parches grises en la cobertura que le da un aspecto manchado a las ramas. Al realizar un muestreo de 2500 hojas se encontró que el 65% de estas estaban infectadas con el hongo, y se encontró la presencia de otro hongo *Capronia epiphylla* ined. y los líquenes *Fellhanera subtilis* (Vězda) Diederich & Sérus y *Scoliciosporum curvatum* Sérus (Sochting y Sutton 1997).

### 3. Biopelículas en bosques de angiospermas

Se han realizado varios estudios caracterizando las biopelículas de algas y hongos en bosques de hoja ancha en Europa, Asia, África y América. Lin y colaboradores (2012) evaluaron la diversidad de algas epifíticas en un bosque mixto de *Chamaecyparis obtusa* y *Eurya crenatifolia* en Taiwán; se identificaron las algas por medio del cultivo *in vitro* y la caracterización genética por PCR y secuenciación de la región 23S. En total se encontraron seis especies de clorofitas y una especie de cianobacteria; de las cuales *Klebsormidium flaccidum*, *Rosenvingiella radicans* y *Leptolyngbya* presentaban morfología filamentosa, y *Chloroidium saccharophilum*, *Ettlia pseudoalveolaris*, *Prasiococcus calcarius* y *Trebouxia* sp. presentaban morfología unicelular o sarcinoide.

En otro estudio realizado en Brasil se caracterizaron las algas epifíticas de un bosque semideciduo; se encontraron nueve especies de algas repartidas en tres clases: Trebouxiophyceae (1), Charophyceae (1) y Ulvophyceae (7). Las especies más comunes fueron *Desmococcus olivaceus*, *Printzina effusa*, *Klebsormidium flaccidum* y *Trentepohlia abietina*, siendo esta última la más abundante en el bosque (Lemes-Da Silva *et al.* 2010). Estas clases suelen encontrarse en hábitats terrestres alrededor de todo el mundo, sin estar restringidos a alguna región en específico. Un estudio extenso en Singapur encontró 57 especies de algas en un bosque; se aislaron las algas y se cultivaron *in vitro* para su examinación microscópica, y se utilizó un análisis de escalamiento no-métrico multi dimensional (NMDS) para comparar la composición de especies entre

localidades y tipo de hábitat. Se concluyó que las algas *Dictyochloropsis* sp., *Pseudomarvania aerophytica*, *Printzina effusa* y *Printzina lagenifera* eran las especies más comunes creciendo sobre corteza de árboles. Se encontraron 12 especies de cianobacterias, cinco especies del filo Heterokontophyta y 40 especies del filo Chlorophyta (Neustupa y Skaloud 2010).

### **III. JUSTIFICACIÓN**

Los bosques naturales de pinabete se han reducido en un 95% debido a la demanda de pinabete como árbol de navidad, la cual ha sido suplida las últimas décadas por plantaciones en varios departamentos del país. Las plantaciones de pinabete han demostrado ser esenciales para la conservación de la especie, ya que han reducido la presión sobre los bosques naturales y presentan una oportunidad para la generación de ingresos. En la actualidad existen 757 plantaciones de pinabete en diez departamentos, que cubren alrededor de 323 hectáreas (INAB, 2017); incluso los pequeños poseedores de tierra pueden hacer rentable el cultivo de pinabete por medio de la obtención de incentivos forestales.

Aun así, estas plantaciones deben afrontar desafíos para su sostenibilidad, uno de los principales es la alta incidencia de plagas y enfermedades. Las plagas pueden provocar decoloración y caída de las hojas, pudrición de las ramas o raíces y debilitamiento general de la planta, reduciendo la productividad y vigorosidad del pinabete. También afectan la calidad estética de los árboles y reduce su valor en el mercado, poniendo en riesgo la rentabilidad del cultivo de pinabete, la estabilidad económica de los productores y la conservación de la especie.

En los últimos años se ha reportado una nueva plaga que está afectando significativamente las plantaciones: la enfermedad del alga verde del pinabete. De acuerdo con el Instituto Nacional de Bosques (2018), la enfermedad está causada por un alga verde que aún no ha sido identificada. La infección inicia en la parte interior de la copa y se extiende hacia fuera, lo que sugiere que la sombra y la humedad favorecen el desarrollo del alga. Las recomendaciones para su tratamiento incluyen el manejo de la sombra y evitar el estancamiento de agua en la plantación. La aplicación de un fungicida

a base de cobre ha dado buenos resultados en campo, lo que sugiere que los hongos están relacionados con la enfermedad. Sin embargo, para determinar formas más efectivas de tratar la enfermedad, es necesario identificar los microorganismos asociados a esta para implementar métodos efectivos de control. Esto se realizará en conjunto con personal del INAB, que ha expresado su apoyo para investigar este fenómeno en conjunto con la Universidad del Valle de Guatemala para encontrar soluciones a corto y largo plazo.

En la literatura científica existen numerosos ejemplos de algas terrestres creciendo sobre árboles, incluso se reportan coberturas de algas y hongos sobre algunas especies de *Abies* nativas de Europa que también se aprovechan como árboles navideños. Hasta la fecha, ningún fenómeno similar ha sido reportado para las plantaciones o bosques naturales de *A. guatemalensis* en Guatemala. Este será el primer estudio abordando la identificación de especies de algas asociadas a la enfermedad del alga del pinabete, así como el posible rol de los hongos en el desarrollo de la enfermedad.

## **IV. OBJETIVOS**

### **A. General**

- Caracterización de microorganismos presentes en muestras de pinabete con signos de la enfermedad del alga verde provenientes de tres localidades en Guatemala.

### **B. Específicos**

- Aislamiento y cultivo de algas y hongos presentes en muestras de pinabete con signos de la enfermedad del alga verde.
- Identificación de algas y hongos aislados a partir de muestras de pinabete con signos de la enfermedad por medio de microscopía y análisis genético.
- Comparación de las especies de algas y hongos aislados entre las tres localidades.



## **V. HIPÓTESIS**

- Ha: La enfermedad del alga verde está compuesta por las mismas especies de algas en las tres localidades estudiadas.
- Ho: La enfermedad del alga verde está compuesta por diferentes especies de algas en las tres localidades estudiadas.



## **VI. METODOLOGÍA**

### **A. Área de estudio**

Se visitaron tres plantaciones de pinabete donde ya fue reportada la enfermedad del alga verde: la finca Billeben, finca Valle Alto y finca Buena Vista (Ver Figura 9).

#### **1. Finca Billeben**

Está ubicada en el municipio de San José Pinula, Guatemala; a una altitud de 2295 msnm. Esta se encuentra en la zona de vida Bosque Húmedo Montano Bajo Tropical (bh-MBT), de acuerdo a la clasificación de zonas de vida de Holdridge (De La Cruz, 1976) En la finca se cultiva pinabete y hortalizas.

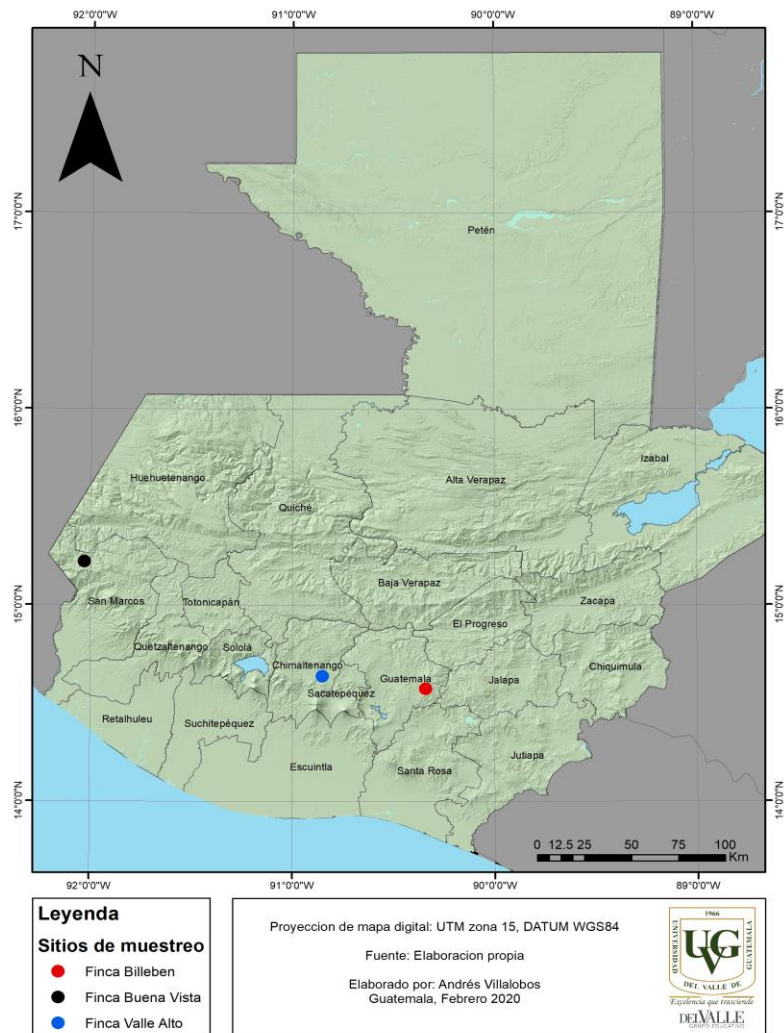
#### **2. La finca Valle Alto**

Se encuentra en San Andrés Iztapa, Chimaltenango, a una altitud de 2390 msnm; también se encuentra en la zona de vida Bosque Húmedo Montano Bajo Tropical (De La Cruz, 1976). En la finca se cultiva únicamente pinabete y tienen ganado, en los alrededores hay plantaciones de flores ornamentales.

#### **3. La finca Buena Vista**

Está ubicada en el Municipio de Tacaná a una altitud de 2850 msnm, en la zona de vida Bosque Muy Húmedo Montano Subtropical (De La Cruz, 1976). En la finca se cultiva pinabete, hortalizas y tienen crianza de aves.

En la Figura 9 se observa la ubicación de las tres plantaciones de pinabete muestreadas.



**FIGURA 9.** Mapa de la ubicación de sitios de muestreo de con incidencia de la enfermedad del alga verde

## B. Colecta de muestras

Las visitas se realizaron con acompañamiento de personal del INAB para confirmar la presencia de la enfermedad. Se documentaron las observaciones en campo por medio de fotografías de los árboles. Se seleccionaron tres árboles de pinabete con una altura de 1.5 a 2 metros de alto y que mostraran signos de la enfermedad, en cada árbol se seleccionaron tres ramas que se encontraran a la altura del pecho. Estas se cortaron con tijeras podadoras y se almacenaron en bolsas plásticas, se limpiaron las tijeras con desinfectante Virkon entre cada árbol para evitar la contaminación cruzada de

las muestras. El material colectado fue transportado en cadena de frío y luego almacenado en refrigeración a 4°C. Las muestras fueron procesadas en el Herbario UVAL del Centro de Estudios Ambientales y de Biodiversidad (CEAB) y el Laboratorio de Protección Vegetal del Centro de Estudios Agrícolas y Alimentarios (CEAA) de la Universidad del Valle de Guatemala.

## C. Identificación de algas

### 1. Aislamiento y cultivo *in vitro*

#### a. Preparación del medio de cultivo

Se cultivaron las algas tomando como base las metodologías de Videv y colaboradores (2017), y se utilizó un medio de cultivo desarrollado por Kuhl y Lorenzen (1964). La receta utilizada se presenta en el Cuadro 1.

**CUADRO 1.** Receta de preparación de medio de cultivo para microalgas

<b>Reactivo</b>	<b>Peso (mg)</b>	<b>Concentración (moles/Litro)</b>
KNO <sub>3</sub>	1011.10	1 * 10 <sup>-2</sup>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * 1 H <sub>2</sub> O	621	4.5 * 10 <sup>-3</sup>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	89	0.5 * 10 <sup>-3</sup>
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	246.5	1 * 10 <sup>-3</sup>
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	14.7	1 * 10 <sup>-4</sup>
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	6.95 (1 ml de solución de Hierro-EDTA)	2.5 * 10 <sup>-5</sup>
ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0.287	1 * 10 <sup>-6</sup>
MnSO <sub>4</sub> * 1 H <sub>2</sub> O	0.169	1 * 10 <sup>-6</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.061	1 * 10 <sup>-6</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	0.01235	1 * 10 <sup>-8</sup>
CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	0.00249	1 * 10 <sup>-8</sup>

Se preparó una solución de Hierro-EDTA (la fuente de hierro en el medio de cultivo) disolviendo 0.69 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  y 0.93 g de EDTA disódico en 80 ml de agua destilada hirviendo, se enfrió a temperatura ambiente y luego se aforó a 100 ml. Luego se preparó el medio de cultivo disolviendo los macro y micronutrientes en un litro de agua destilada estéril. En total se prepararon dos litros de medio que se almacenó en dos frascos de vidrio, uno para medio líquido y uno para medio sólido; a este último se le agregó 1% de agar (10 g.) y se dejó solidificar durante una hora.

### **b. Desinfección del alga**

Se prepararon 150 ml de una solución desinfectante para eliminar hongos y bacterias que se encontraron en la biopelícula. La receta utilizada se presenta en el Cuadro 2.

**CUADRO 2.** Receta de preparación de solución desinfectante para microalgas

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>	<b>Cantidad</b>
Gentamicina	50 mg/L	7.5 mg
Estreptomina	100 mg/L	15.1 mg
Carbendazim	64 $\mu\text{g}/\text{mL}$	9.6 mg

En el Cuadro 2 se muestra la composición de la solución utilizada para desinfectar las algas previo a su inoculación en el medio de cultivo. La solución está compuesta por dos antibióticos (Gentamicina, Estreptomina) y un antifúngico (Carbendazim).

Se seleccionaron tres hojas de una rama de pinabete que mostrara signos de la enfermedad y se raspó la cobertura de algas utilizando un bisturí estéril. Se colectó el polvo en un frasco de vidrio, se agregaron 30 ml de la solución desinfectante y se agitó constantemente durante 5 minutos. Después, se filtró la solución al vacío en un embudo Buchner a través de papel filtro 0.2 estéril, la biopelícula que quedó en el papel filtro se raspó con una espátula estéril y se inocularon en el medio de cultivo líquido y sólido (Lemes-Da Silva *et al.* 2010; Neustupa y Skaloud 2010; Smith y Stephenson 2007).

## **c. Siembra y mantenimiento**

### **1) Medio líquido**

Después de haber inoculado el alga, se preparó el sistema de aireación para cada recipiente. Este consiste en una manguera que bombea aire utilizando un motor para pecera, y otra manguera que bombea dióxido de carbono a razón de 45-60 burbujas por minuto. Se monitoreó el cambio de pH del medio utilizando un recipiente control al cual se agregó 1.5 mg rojo de fenol como indicador. Este permite que, en caso de un descenso del pH, el medio cambie de color naranja a amarillo (Andersen 2005; Kuhl y Lorenzen 1964).

### **2) Medio sólido**

Se inocularon las algas y cerraron los frascos de vidrio con papel Parafilm, se realizaron agujeros en la tapadera plástica para permitir el intercambio gaseoso y se cubrieron los agujeros con algodón estéril.

Todos los cultivos fueron sometidos a un fotoperíodo 12 horas luz, con lámparas fluorescentes; se revisaron diariamente para evaluar el crecimiento del alga y la presencia de contaminación (Andersen 2005; Kuhl y Lorenzen 1964).

## **2. Microscopía**

Las mismas ramas que se utilizaron para el cultivo *in vitro* se seleccionaron para realizar montajes de microscopio. Se raspó la cobertura de algas sobre un portaobjetos utilizando un bisturí estéril, se agregó una gota de agua destilada y se cubrió un con un portaobjetos para su observación en microscopio óptico Leica. Se observaron los montajes bajo aumentos de 100 a 400X, se midió el tamaño de las células y se tomaron fotografías de estructuras vegetativas y reproductivas. Las algas fueron identificadas a nivel de género con base en descripciones de literatura publicada (Archibald *et al.* 2017; Freystein y Reisser 2010; Graham y Wilcox 2000; John y Rindi 2014) y la clasificación

taxonómica actual de acuerdo con las bases de datos AlgaeBase e Index Nominum Algarum (AlgaeBase 2019).

## D. Identificación de hongos

### 1. Aislamiento y cultivo *in vitro*

#### a. Cámara húmeda

Se seleccionó una rama con signos de la enfermedad y se cortó un segmento con hojas de 3 a 5 cm de largo, un segmento sin hojas de 3 a 5 cm de largo y tres hojas de 3 a 5 cm. Estos se colocaron en una caja Petri con un disco de papel mojado con agua destilada estéril, como se muestra en la Figura 10. La caja se incubó durante una semana a temperatura ambiente y se realizaron montajes de los hongos que crecieron sobre la rama para su identificación por microscopía (Funnell-Harris *et al.* 2013; Krug 2004).



**FIGURA 10.** Disposición de las muestras en la cámara húmeda que contenía una rama con hojas, una rama sin hojas y tres hojas de pinabete

### **b. Directo en agar**

Se seleccionaron cuatro hojas de pinabete con signos de la enfermedad y se cortó un pedazo de 3 a 5 cm de largo, estos se colocaron en una caja Petri con medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA). En el otro extremo de la caja se realizó un raspado de la cobertura de las hojas con un bisturí estéril, así como se muestra en la Figura 11.

Los cultivos se incubaron a 28°C de 5 a 7 días; después se aislaron los hongos que hayan crecido sobre el material vegetal por medio de la resiembra en medio de cultivo PDA hasta obtener un cultivo puro, que se utilizó para la identificación por microscopía y análisis genético (Smith y Stephenson, 2007).



**FIGURA 11.** Disposición de las muestras en la caja Petri con agar que contenía las hojas de pinabete y el raspado de las hojas.

## **2. Microscopía**

Los hongos que crecieron en la cámara húmeda y en el medio PDA fueron identificados por medio de microscopía. Se realizaron montajes utilizando un asa micológica, se colocó una asada del hongo en un portaobjetos y se realizó una tinción con una gota de azul de lactofenol, que sirve para la observación de estructuras hialinas. Se observaron los montajes en microscopio Leica bajo aumentos de 100x, 250x y 400x, y se tomaron fotografías de los cultivos, el micelio, las esporas y/o estructuras reproductivas. Los hongos se identificaron a nivel de género con base en características morfológicas observadas, tomando como referencia descripciones y claves dicotómicas de literatura (Archibald *et al.* 2017; Phillips y Burdekin, 1992).

## **3. Análisis genético**

Cinco hongos aislados se identificaron hasta el nivel de especie con base en análisis genético de dos regiones de ADN nuclear de ADN: EF e ITS (Manoharachary *et al.* 2010)

### **a. Extracción de ADN**

Se realizó la extracción de ADN de un cultivo de hongo crecido durante una semana en medio PDA utilizando un protocolo con amortiguador CTAB (Murray y Thompson, 1980). Se rasparon los cultivos y se pesó de 100 a 300 mg de micelio en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, al cual se agregó 600 µl de buffer de extracción CTAB (2% CTAB, 1% polyvinylpyrrolidone [PVP], 100mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.4M NaCl, 20mM EDTA y 0.2% 2-mecaptoetanol) precalentado a 65°C. Luego se maceró el tejido durante 30 a 60 segundos con un palillo o un macerador automático, se incubó la muestra a 65°C durante 15-30 minutos y dejó enfriar a temperatura ambiente. Se agregaron 500 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló en un vórtex por 10 segundos, luego se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo.

Después se le agregó al sobrenadante 1 volumen (500 µl) de Isopropanol frío y 1/10 de volumen (50 µl) de acetato de amonio 7.5M, se mezcló por inversión y se incubó a -20°C por un mínimo de 20 minutos. Se centrifugó la muestra a 13,000 rpm por 10 min. y se descartó el sobrenadante, luego se lavó el precipitado con 150 µl de etanol 70% frío y se centrifugó a 13,000 rpm durante cinco minutos. Se descartó el sobrenadante y se secó el precipitado al aire por 45 min o en el horno a 30°C durante 10 a 20 min. Finalmente, se resuspendió el *pellet* en 50 µl de buffer TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) precalentado a 65°C, y se almacenó en refrigeración a 4°C por uno a cinco días.

### **b. Cuantificación de ADN**

El ADN extraído se cuantificó por medio de espectrofotometría UV/VIS. Se realizaron diluciones 1:100 de los extractos de ADN y se agregó en una celda de espectrofotómetro 5 µl de la dilución de ADN y 495 µl de buffer TE. Luego se midió la absorbancia a tres longitudes de onda (260, 280 y 320 nm) utilizando un espectrofotómetro y se determinó la concentración en ng/µl y la razón de absorbancia 260/280 y 260/230. Las muestras con una concentración de ADN igual o mayor a 200 ng/µl fueron utilizadas para el análisis con marcadores moleculares.

### **c. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Se amplificaron las regiones ITS y EF por medio Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La receta de la PCR y el programa del termociclador se encuentran en la sección de Anexos. Se comprobó la amplificación de los marcadores por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 50X (40mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 20mM ácido acético glacial) teñido con GelRed (0.1%).

El gel se corrió durante 40 minutos a 85 voltios y se visualizó en un transiluminador UVP GelDoc-It. El producto de PCR se envió en triplicado al laboratorio de Macrogen en Corea para determinar la secuencia de pares de bases por medio de secuenciación Sanger.

#### **d. Análisis de secuencias de ADN**

Se realizó el alineamiento de las secuencias obtenidas usando la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) de la base de datos de NCBI. Para cada secuencia se determinó el porcentaje de cobertura, que corresponde al número de pares de bases que se alinean con la secuencia de referencia, y el porcentaje de identidad, que corresponde a la similitud entre las pares de bases la secuencia alineada y la secuencia de referencia (Funnell-Harris *et al.* 2013; Madden, 2002).

#### **4. Cepario**

Los hongos aislados se almacenaron en un cepario en el Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala. Una vez los hongos fueron identificados a nivel de género o especie, se seleccionaron cultivos que tuvieran esporas al observarlos en los montajes bajo microscopio. Se cortaron dos segmentos de un mismo cultivo con un tamaño de un centímetro y se sembraron en un tubo de ensayo con medio de cultivo PDA inclinado (en *slant*).

Los cultivos se incubaron a 28°C de 5 a 7 días, posteriormente se realizaron montajes bajo microscopio de cada uno para confirmar la presencia de esporas. Después se agregaron 20 ml de una solución de glicerol al 15% estéril hasta llenar el tubo y se sellaron con papel Parafilm. Los cultivos se rotularon con el nombre científico y la fecha de aislamiento del hongo, y se almacenaron a temperatura ambiente.

### **E. Comparación entre localidades**

#### **1. Estudio descriptivo**

Se realizó un estudio de tipo descriptivo, que se caracteriza por medir la presencia, características o distribución de uno o varios fenómenos en una población en un determinado momento en el tiempo. Este tipo de estudios puede utilizarse para describir la presencia de una determinada enfermedad en una población sin necesidad de establecer

relaciones causales con otros factores (Veiga *et al.* 2008). En este caso se realizó una comparación de las especies de algas y hongos que se aislaron en función de la localidad. Esto se utilizó como base para determinar si los organismos asociados a la enfermedad del “alga verde” del pinabete varían de acuerdo al sitio de estudio. No se realizó un análisis estadístico debido a que no fue posible cuantificar de forma precisa la incidencia de las algas e hongos en cada localidad.

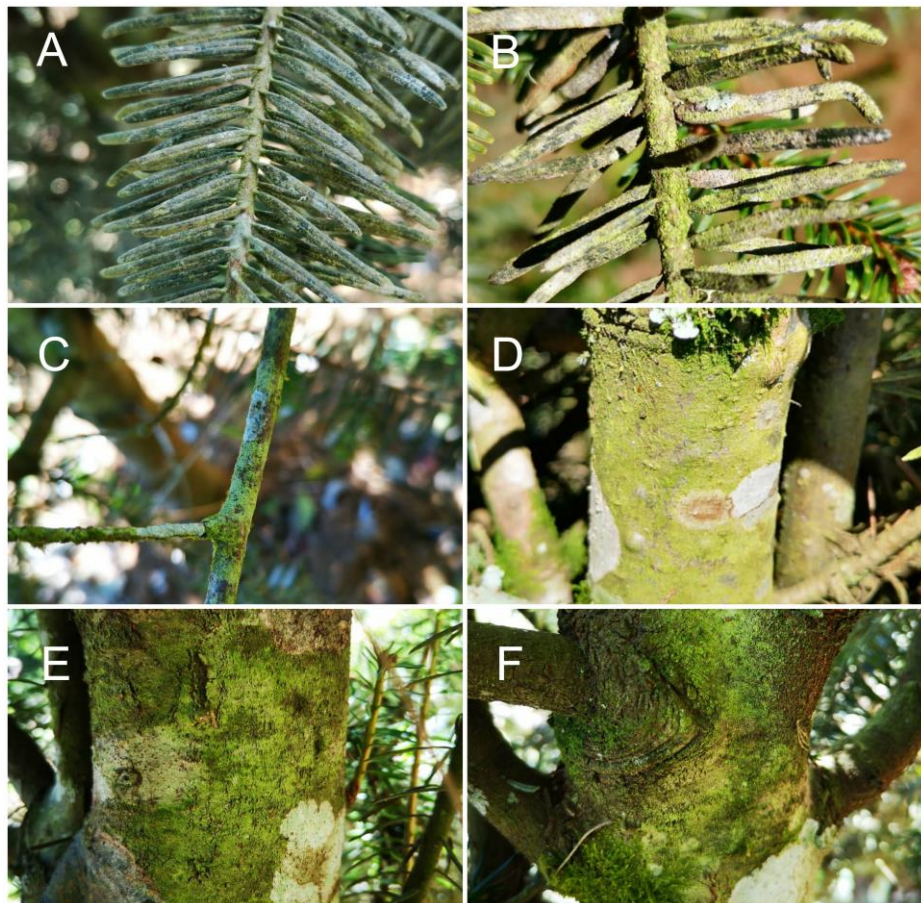


## VII. RESULTADOS

### A. Observaciones en campo

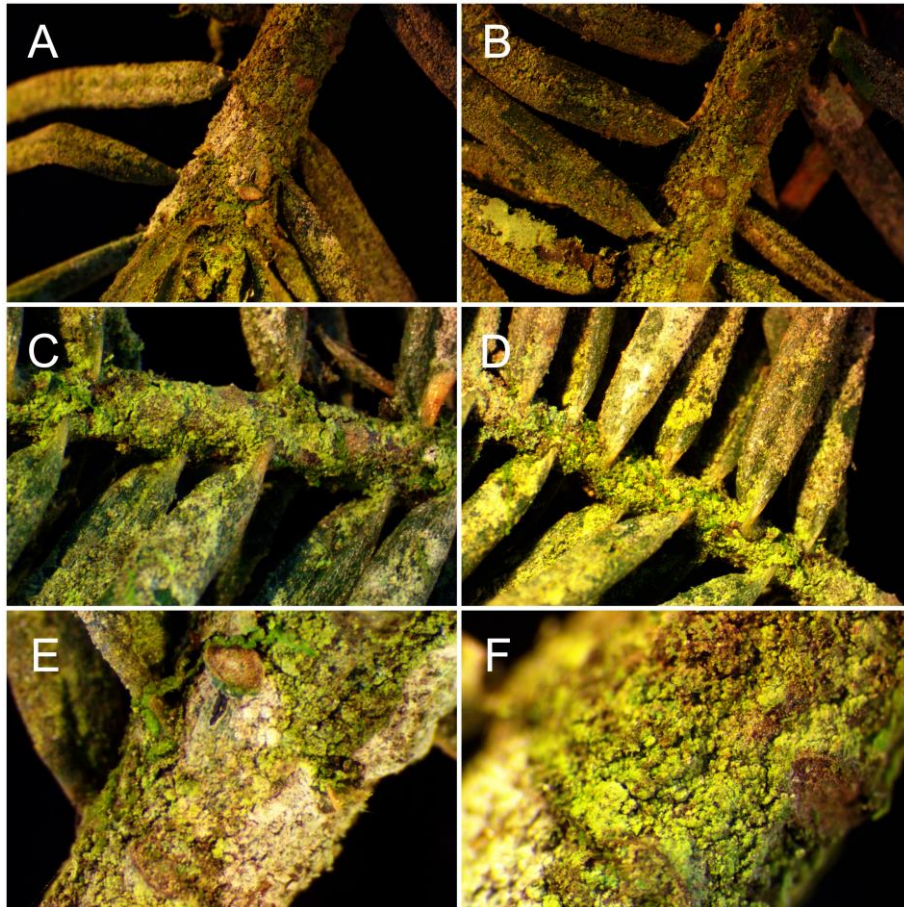
#### 1. Finca Billeben, Guatemala

En las figuras 12-14 se observa material colectado en la Finca Billeben.



**FIGURA 12.** Pinabetes infestados con la enfermedad del alga verde en la finca Billeben (Guatemala) **A)** Rama con infestación ligera **B)** Rama con infestación severa **C)** Rama con cobertura de algas **D)** **E)** **F)** Troncos de pinabete con biopelícula de algas.

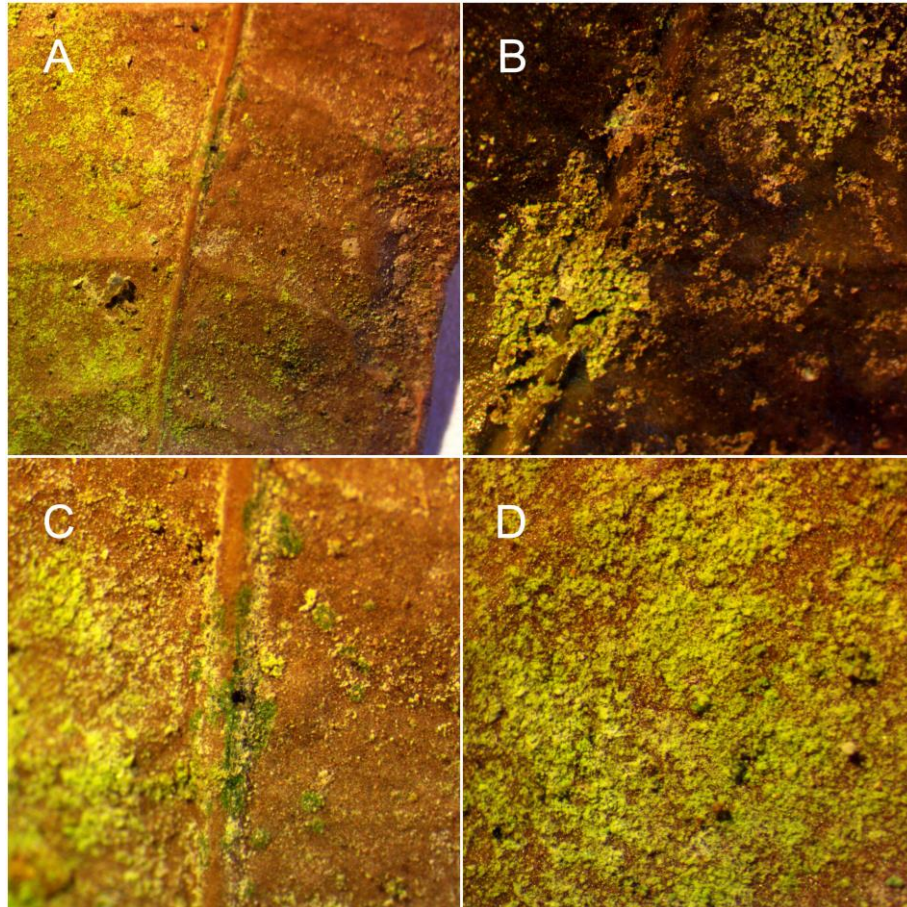
En la Figura 12 se muestran árboles de pinabete infestados con la enfermedad del alga erde en la Finca Billeben en Guatemala. En la Figura A) se muestra una rama con infestación ligera, con una cobertura polvosa que aún no cubre la mayoría de la superficie de las hojas. En la Figura B) se observa una rama con infestación severa, se observa una cobertura verde grisácea que cubre casi por completo la superficie de las hojas.



**FIGURA 13.** Vista bajo estereoscopio de ramas infestadas la enfermedad del alga verde colectadas en la finca Billeben (Guatemala). **A) B)** Aumento 6.3x **C) D)** Aumento 10x **E)** Aumento 20x **F)** Aumento 30x.

En la Figura 13 se muestran fotografías bajo estereoscopio de las ramas con infestación severa a diferentes aumentos, colectadas en la finca Billeben (Guatemala). En todas las figuras se observa una cobertura verde de algas con parches blancos que corresponden a hongos. En la Figura B) se observa un líquen folioso creciendo sobre las hojas del pinabete cubiertas por la biopelícula de algas. En la Figura E) se observa un

filamento de color verde oscuro que corresponde a musgo creciendo sobre una rama cubierta por la biopelícula.



**FIGURA 14.** Vista bajo estereoscopio de hoja de angiosperma con biopelícula de algas y hongos, colectada en la finca Billeben (Guatemala). **A)** Aumento 6.3x **B)** Aumento 10x **C)** Aumento 15x **D)** Aumento 30x.

En la figura anterior se muestran fotografías bajo estereoscopio de una hoja seca encontrada sobre la copa de un pinabete infestado con la enfermedad del alga verde. La hoja seca es de un árbol que se encontraba junto al pinabete. Se hallaron varias hojas iguales sobre otros tres pinabetes que también presentaban la biopelícula de algas, con parches color verde y gris en la superficie de la hoja. En la figura C) se observa un filamento de color verde oscuro que corresponde a musgo creciendo sobre la hoja como parte de la biopelícula, similar a como se encontró en la rama de pinabete.

## 2. Finca Valle Alto, Chimaltenango

En la Figura 15 se observan ramas de pinabetes infestados con la enfermedad del alga verde en la finca Valle Alto (Chimaltenango)



**FIGURA 15.** Pinabetes infestados con la enfermedad del alga verde en la finca Valle Alto (Chimaltenango) **A) B)** Rama con infestación ligera **C) D) E) F)** Ramas con infestación severa

En la Figura 15 se muestran ramas de pinabetes infestados con la enfermedad del alga verde, colectadas en la finca Valle Alto (Chimaltenango). En las figuras A) y B) se observan ramas con infestación ligera, donde la cobertura de algas no abarca la mayoría de la superficie de las hojas. En el resto de figuras se observan ramas con infestación severa, donde la biopelícula cubre por completo las hojas del pinabete.

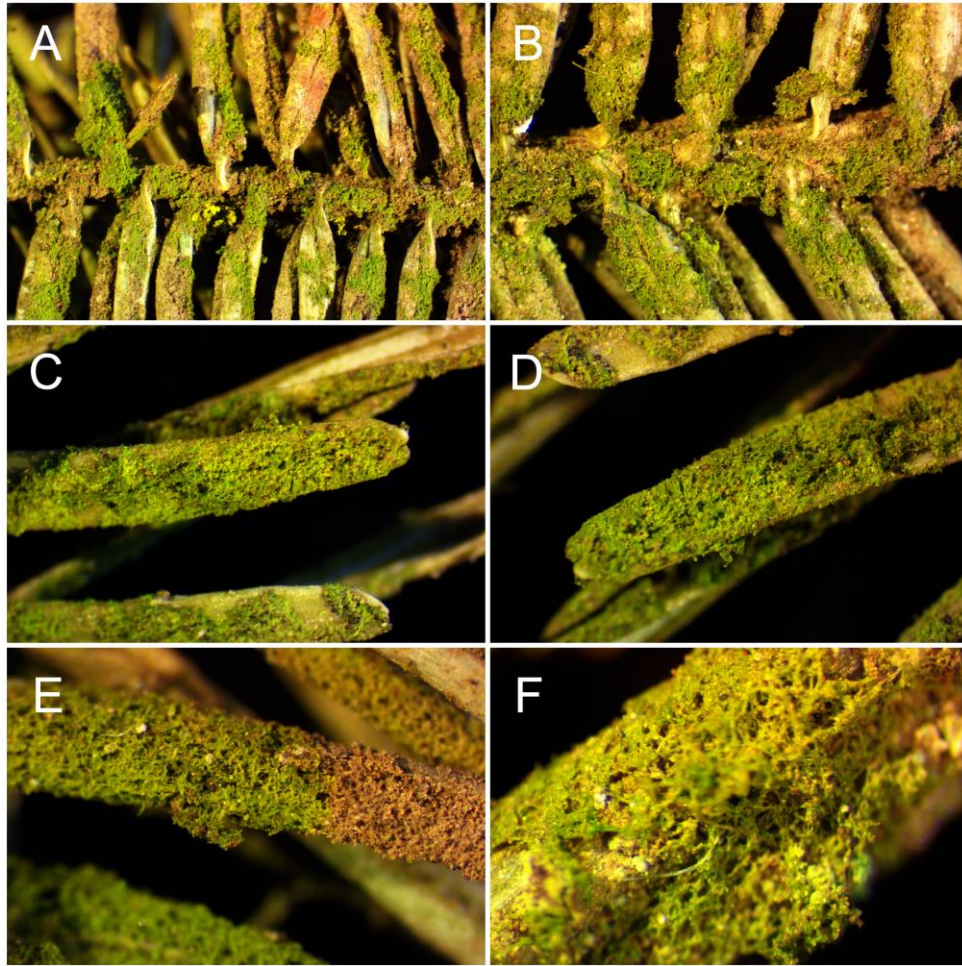
En la Figura 16 se observan ramas de pinabete con brotes de la temporada, colectadas en la finca Valle Alto (Chimaltenango).



**FIGURA 16.** Ramas de pinabete infestadas con la enfermedad del alga verde con brotes de temporada

En la Figura 16 se muestran ramas de pinabetes infestados con la enfermedad del alga verde, colectadas en la finca Valle Alto (Chimaltenango). Las ramas presentan brotes de temporada; las observaciones se realizaron en agosto del 2019, por lo que estos brotes se originaron a partir de mayo con el inicio de la temporada lluviosa. Como se observa en las figuras A) y B), los brotes aún no han sido colonizados por la biopelícula, a pesar de que las partes más viejas de la rama presentan una infestación severa con una cobertura casi completa de la superficie de las hojas.

En la Figura 17 se muestran vistas bajo estereoscopio de ramas y hojas de pinabete infestadas con la enfermedad del alga verde, colectadas en la finca Valle Alto (Chimaltenango).

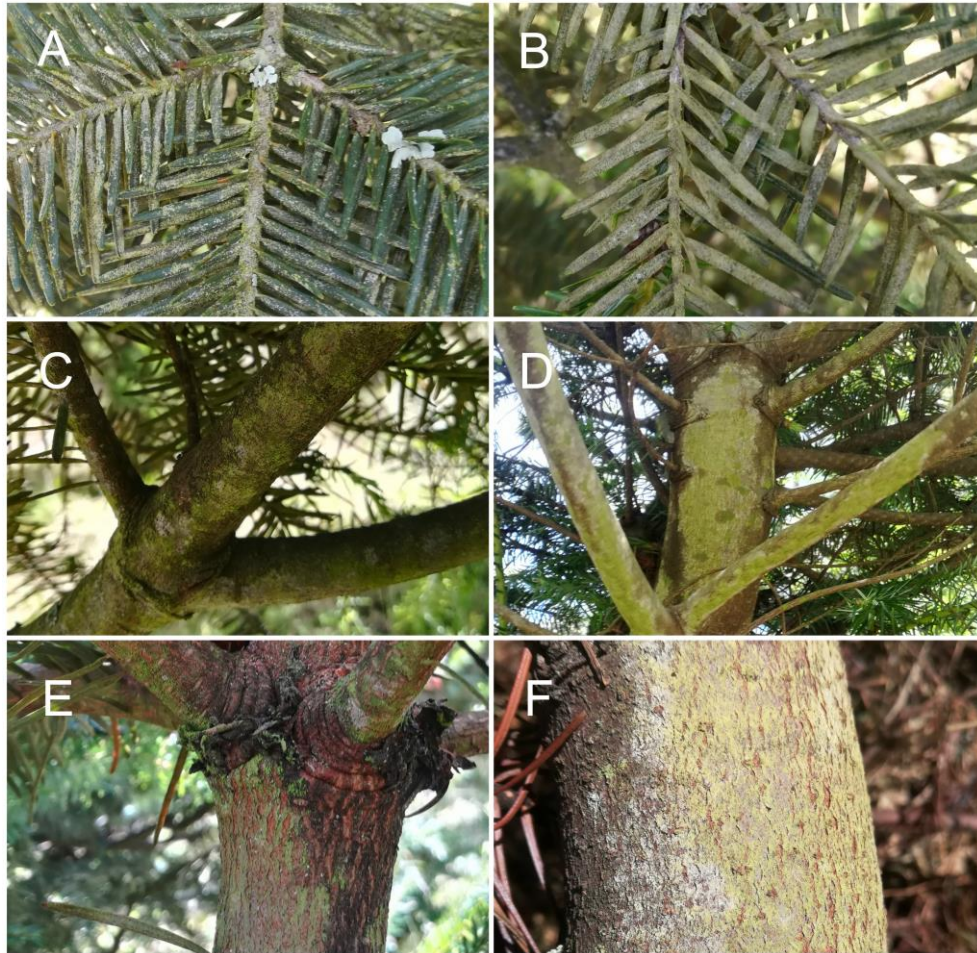


**FIGURA 17.** Vista bajo estereoscopio de ramas infestadas la enfermedad del alga verde colectadas en la finca Valle Alto (Chimaltenango). **A)** Aumento 6.3x **B) C)** Aumento 10x **D, E)** Aumento 20x **F)** Aumento 45x.

En la Figura 17 se muestran observaciones bajo estereoscopio de las ramas con infestación severa de la enfermedad del alga verde a diferentes aumentos. En la figura A) y B) se muestran ramas con la biopelícula de algas. En las figuras C) y D) se muestran hojas bajo aumentos de 10x y 20x. En la Figura E) se observa la biopelícula sobre una hoja, con una parte de color verde y una parte necrótica de color café.

### 3. Finca Buena Vista, San Marcos

En la Figura 18 se observan ramas de pinabetes infestados con la enfermedad del alga verde en la finca Buena Vista.



**FIGURA 18.** Pinabetes infestados con la enfermedad del alga verde en la finca Valle Alto (Chimaltenango) **A)** Rama con infestación ligera **B)** Rama con infestación severa **C)** **D)** Parte inferior de ramas de pinabete **E)** **F)** Tronco con biopelícula de algas y hongos

En la Figura 18 se observan ramas de pinabetes infestados con la enfermedad del alga verde, colectadas en la finca Buena Vista (San Marcos). En la figura A) se muestran ramas con infestación ligera de la biopelícula y un líquen folioso. En la figura B) se muestra una rama con infestación severa, donde la biopelícula de algas y hongos cubre por completo las hojas. En la figura C) y D) se observa la parte inferior de ramas de

pinabete cubiertas por la biopelícula. En la figura E se muestra la corteza de un pinabete con infestación ligera, y en la figura F) corteza con infestación severa.

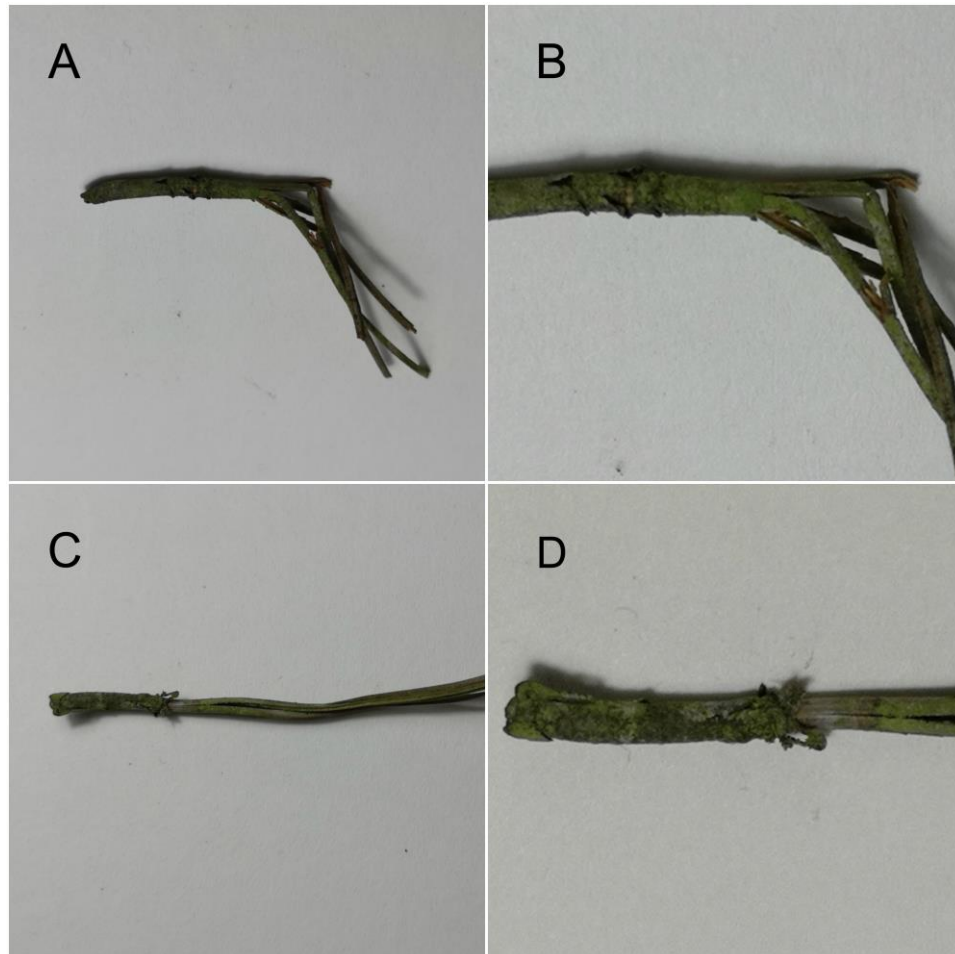
En la Figura 19 se observa la parte superior e inferior de una rama de pinabete con infestación leve de la enfermedad del alga verde, colectada en la finca Buena Vista (San Marcos).



**FIGURA 19.** Rama de pinabete con infestación leve de la biopelícula de algas. **A)** Parte superior de la rama. **B)** Parte inferior de la rama.

En la Figura 19 se muestra la parte superior e inferior de una rama de pinabete con infestación ligera de la enfermedad del alga verde. Como se muestra en la figura A), la parte superior de la rama no presenta la biopelícula, mientras que en la parte inferior (B) se observa una cobertura de color verde y gris que cubre toda la rama.

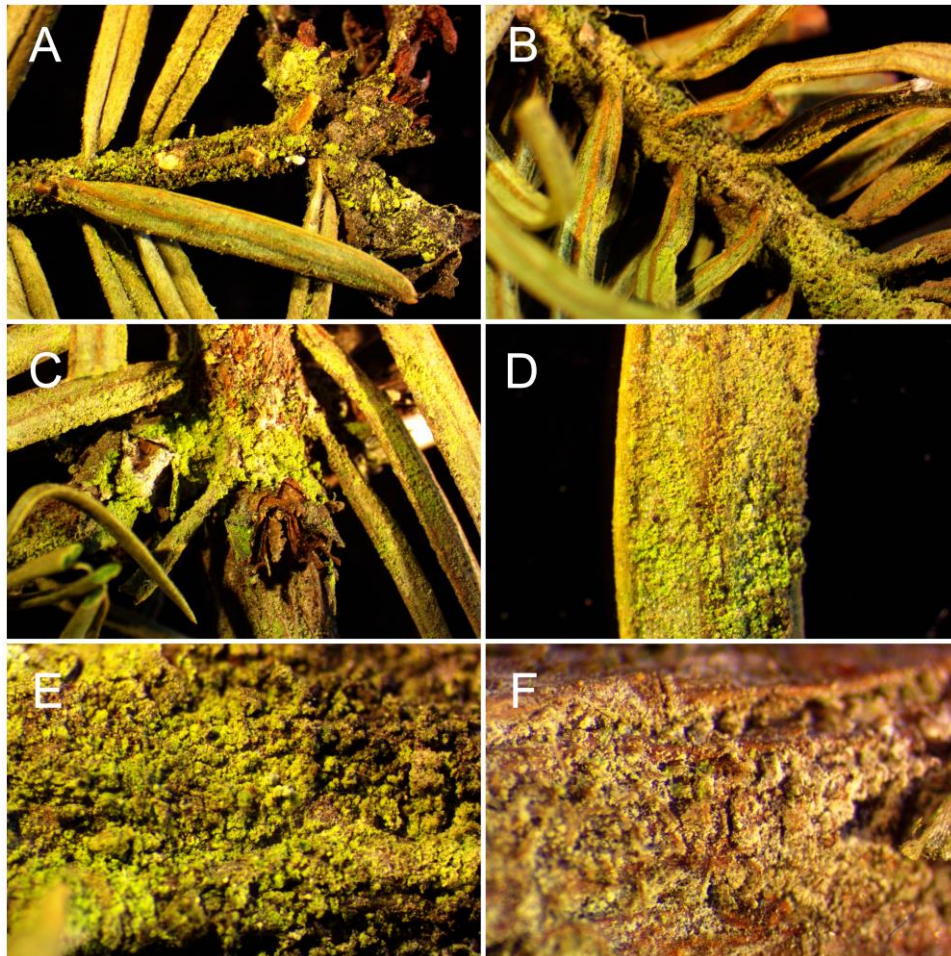
En la Figura 20 se muestran dos fascículos de pino (*Pinus* sp.) cubiertos por la biopelícula de algas, colectados en la finca Buena Vista (San Marcos).



**FIGURA 20.** Fascículos de pino (*Pinus* sp.) cubiertos por biopelícula de algas y hongos, colectada en la finca Buena Vista (San Marcos). **A)** Aumento 1x **B)** Aumento 6.3x **C)** Aumento 1x **D)** Aumento 6.3x.

En la Figura 20 se muestran dos fascículos de pino cubiertos por la biopelícula de algas y hongos, en aumento 1x (A-B) y en aumento 6.3x (C-D). Estas se encontraron sobre la copa de pinabetes infestados con la enfermedad del alga verde, similar al hallazgo de la finca Billeben en Guatemala. Las acículas de pino que se encontraban en el suelo alrededor de los pinabetes no mostraban infestación de la biopelícula.

En la Figura 21 se muestran vistas bajo estereoscopio de ramas de pinabete infestadas con la enfermedad del alga verde, colectadas en la finca Buena Vista.

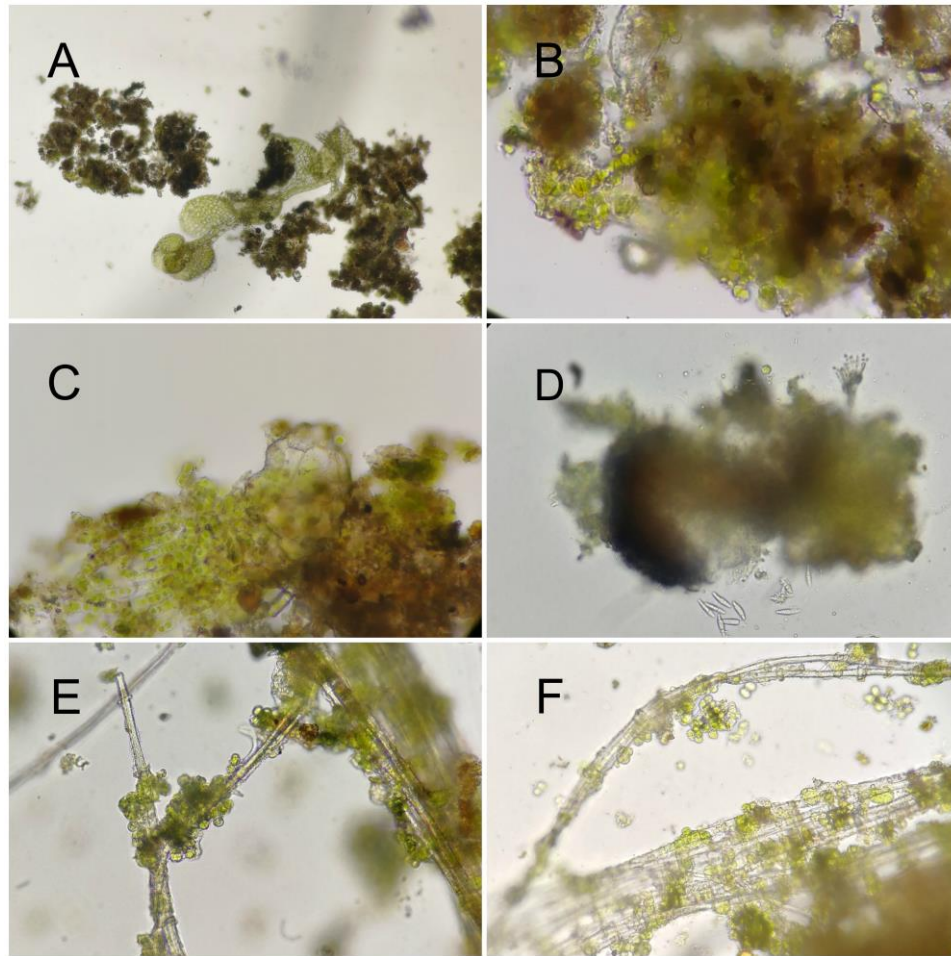


**FIGURA 21.** Vista bajo estereoscopio de ramas infestadas la enfermedad del alga verde colectadas en la finca Buena Vista (San Marcos). **A)** Aumento 6.3x **B) C)** Aumento 10x **D, E)** Aumento 20x **F)** Aumento 45x.

En la Figura 21 se muestran observaciones bajo estereoscopio de las ramas con infestación severa de la enfermedad del alga verde a diferentes aumentos. En las figura A) y B) se muestran ramas con la biopelícula de algas a aumentos de 6.3 y 10x, respectivamente. En las figuras C) y D) se muestran hojas bajo aumento 10x. En la Figura E) se observa la biopelícula de algas sobre una hoja que corresponde a algas, mientras que en la Figura F) se observó una cobertura necrótica de color gris que corresponde a hongos.

## B. Observaciones de la biopelícula bajo microscopio

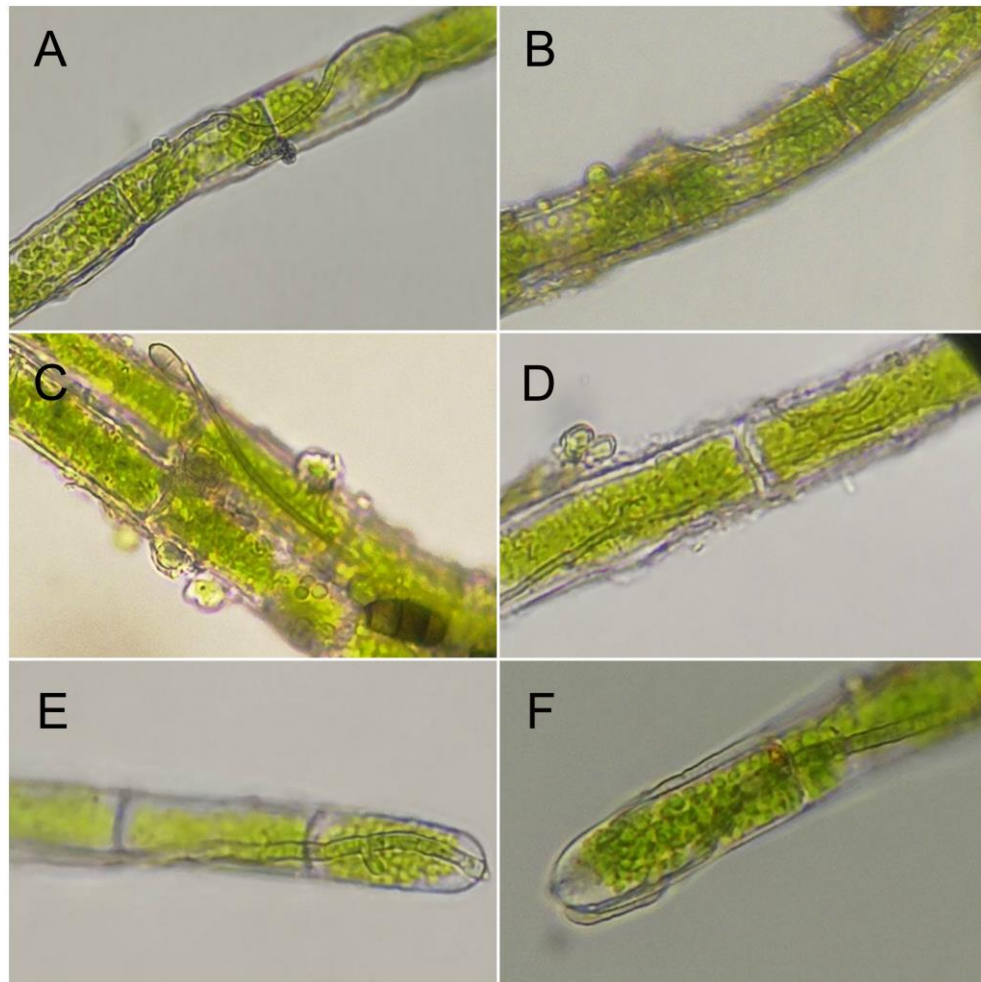
En la Figura 22 se observan montajes de microscopio de los raspados de la biopelícula de las hojas de pinabete colectadas en las tres localidades.



**FIGURA 22.** Montajes de microscopio del raspado de la biopelícula de hojas de pinabete colectadas en la finca Billeben (A, B), finca Valle Alto (C, D) y la finca Buena Vista (E, F). **A)** Filidios de una hepática y materia orgánica, Aumento 100x **B)** Algas, esporas y materia orgánica, Aumento 400x **C) D)** Algas, estructura de hongos y esporas y materia orgánica, Aumento 400x **E) F)** Micelio de un hongo junto a algas unicelulares, Aumento 400x.

En la Figura 22 se observan montajes de microscopio de los raspados de la biopelícula de hojas de pinabete colectadas en las tres localidades. En la figura A) se observan filidios de un musgo bajo aumento de 100x, y en la figura B) se muestran algas y materia orgánica bajo aumento de 400x, ambas colectadas en la finca Billeben (Guatemala). En las figuras C y D se muestran algas, estructuras de un hongo y esporas bajo un aumento de 400x, de hojas colectadas en la finca Valle Alto (Chimaltenango). En las figuras E) y F) se observa micelio de un hongo rodeado por algas unicelulares en hojas colectadas en la finca Buena Vista (San Marcos).

En la Figura 23 se observa un alga filamentosa rodeada por micelio de un hongo, hallado en los montajes de la biopelícula de hojas colectadas en la finca Billeben.



**FIGURA 23.** Alga filamentosa rodeada por hifas de un hongo del raspado de la biopelícula de hojas de pinabete colectadas en la finca Billeben, Aumento 400x.

En la Figura 23 se muestra una de las algas observadas en la biopelícula de las hojas de pinabete colectadas en la finca Billeben (Guatemala), bajo un aumento de 400x. En las Figuras A) - F) se observan los filamentos del alga que se encuentran rodeados por hifas de un hongo. En la figura C) se observan también esporas de dos hongos diferentes junto a los filamentos del alga. Esto indica que los hongos se desarrollan de forma cercana a las algas y también conforman la biopelícula que se encuentra en las hojas del pinabete.

### C. Identificación de algas

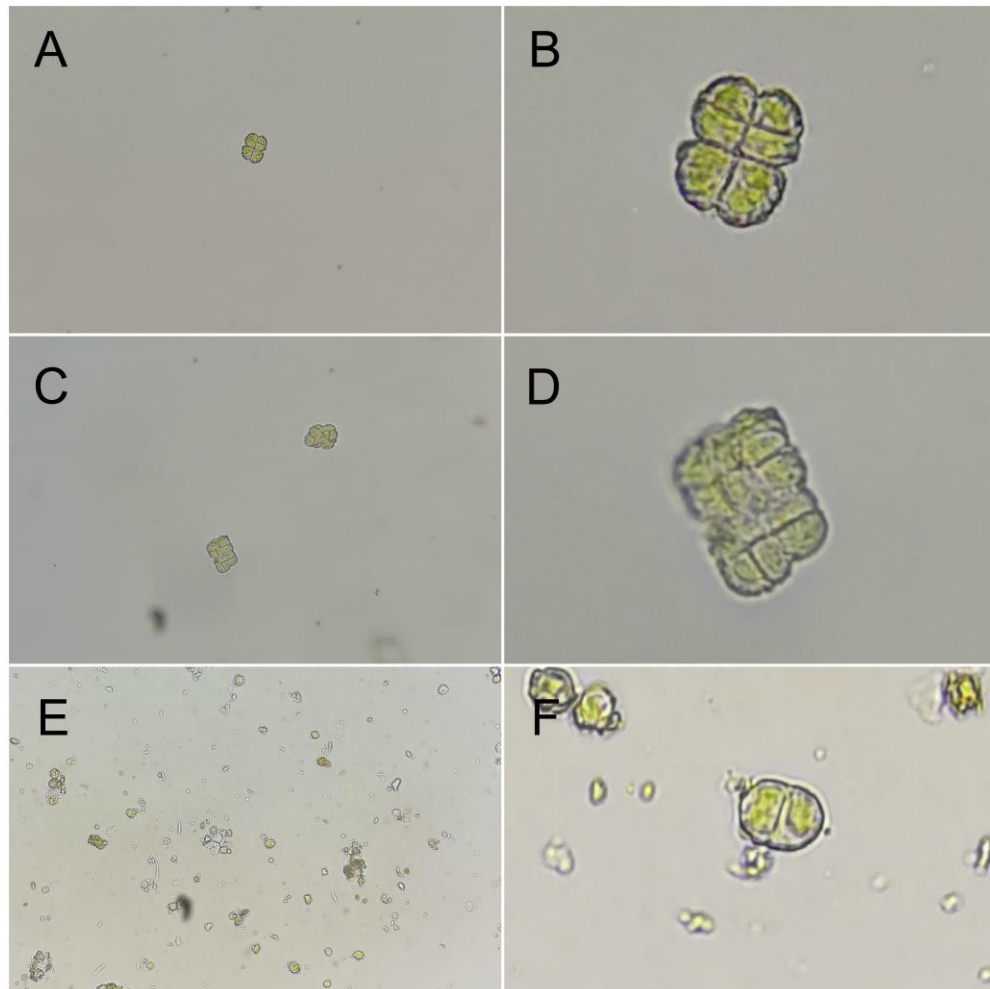
Se encontró un total de cuatro morfotipos de algas en las tres localidades: tres en la finca Billeben (Guatemala), dos en la finca Valle Alto (Chimaltenango) y uno en la finca Buena Vista (San Marcos), como se muestra en el Cuadro 3.

**CUADRO 3.** Identificación de algas encontradas en las tres plantaciones de pinabete

Morfotipo	Clase/Género	Localidades		
		Finca Billeben Guatemala	Finca Valle Alto Chimaltenango	Finca Buena Vista San Marcos
1	<i>Desmococcus</i> sp.	x	x	x
2	Trebouxiophyceae	x		
3	<i>Klebsormidium</i> sp1	x		
4	<i>Klebsormidium</i> sp2		x	

En el Cuadro 2 se observan los morfotipos de algas identificados con su clasificación taxonómica a nivel de clase o género, y las localidades en las que se encontró cada una. Uno de los morfotipos se encontró en común en las tres localidades, este se identificó hasta el género *Desmococcus*, (Clase Trebouxiophyceae) (Ver Figura 24). También se identificó un alga unicelular de la clase Trebouxiophyceae presente en hojas de pinabete de la finca Billeben únicamente (Ver Figura 25). Además, se encontraron dos especies diferentes de algas filamentosas del género *Klebsormidium* (Clase Klebsormidiophyceae), una en la finca Billeben y otra en la finca Valle Alto (Ver Figuras 26 y 27).

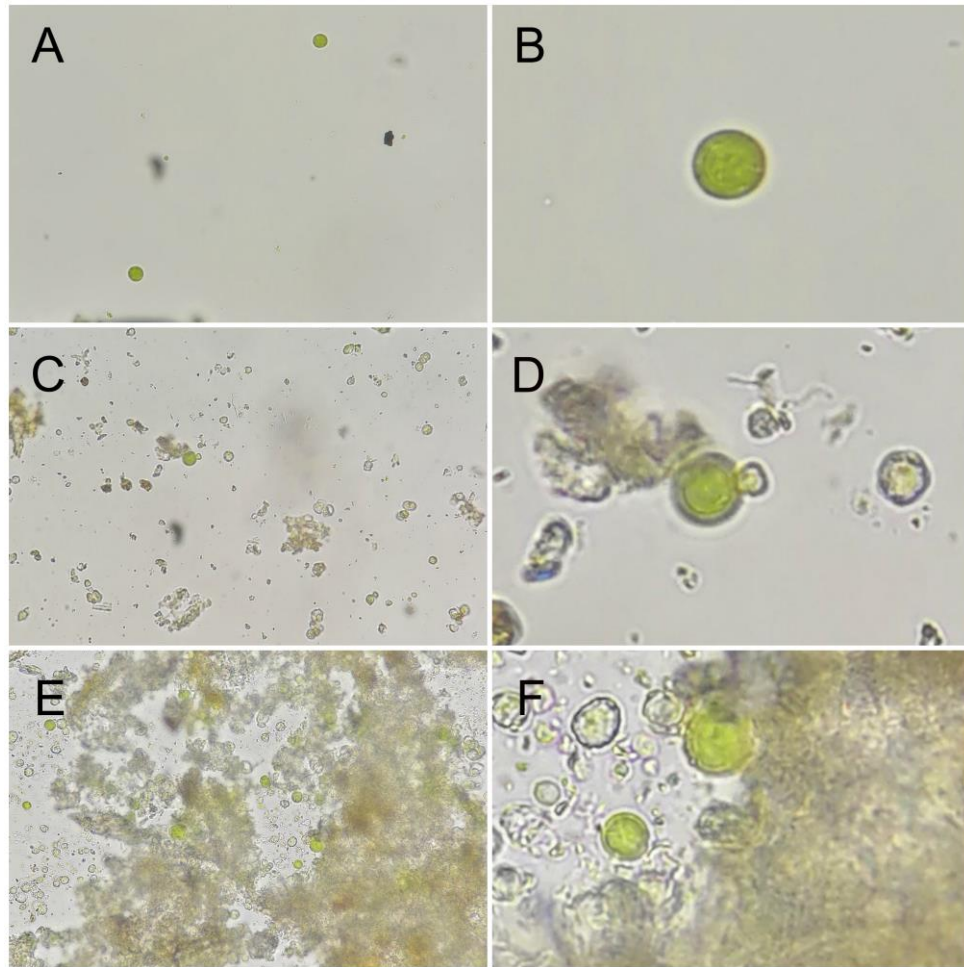
En la Figura 24 se observa el alga *Desmococcus* sp., que estaba presente en hojas de pinabete de las tres localidades de estudio.



**FIGURA 24.** Alga del género *Desmococcus*, hallada en la biopelícula de las hojas de pinabete de la finca Billeden (A, B), finca Valle Alto (C, D) y la finca Buena Vista (E, F)

En la Figura 24 se observa el alga *Desmococcus* sp., presente en las hojas de pinabete en la finca Billeben (A, B), la finca Valle Alto (C, D) y la finca Buena Vista (E, F). En las figuras A) C) y E) se muestran montajes de microscopio bajo un aumento de 400x. En las figuras B), D) y F) se muestra la imagen anterior ampliada. El alga presenta una morfología sarcinoide con arreglos de células en paquetes.

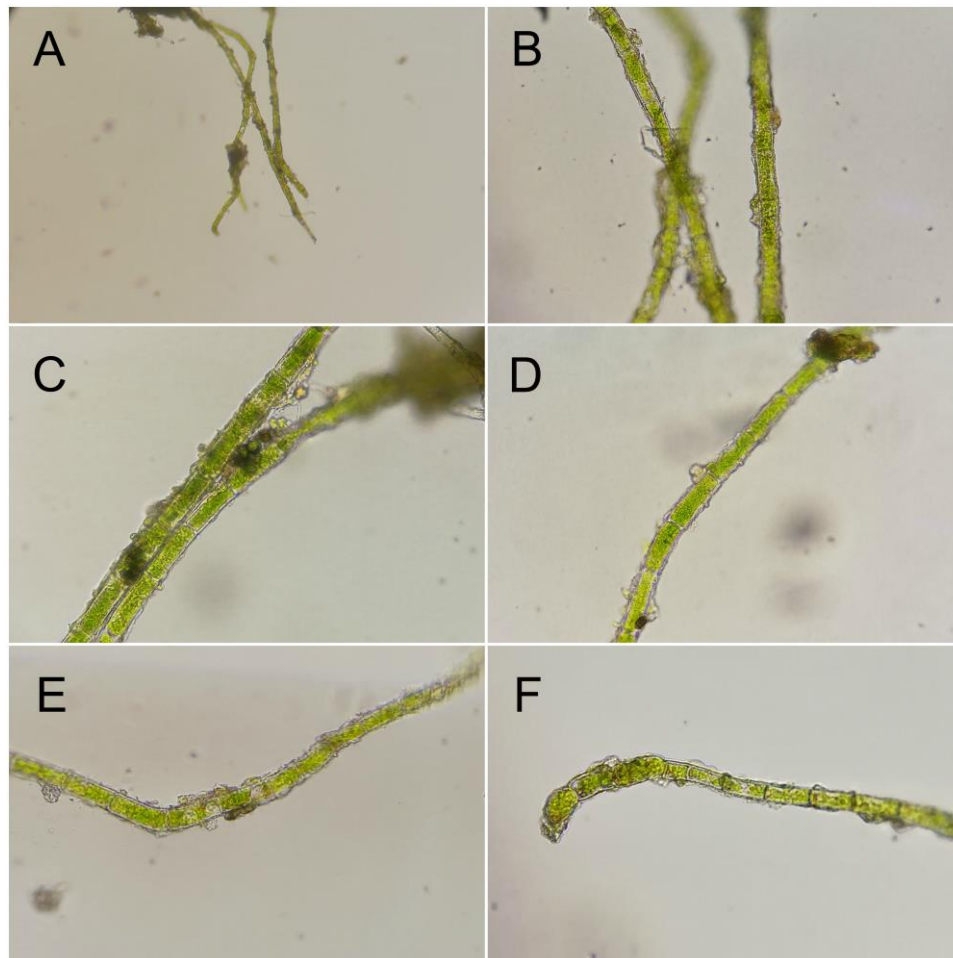
En la Figura 25 se observa un alga unicelular de la clase Trebouxiophyceae, presente en hojas de pinabete de la finca Billeben, Guatemala.



**FIGURA 25.** Alga de la clase Trebouxiophyceae, encontrada en hojas de pinabete en la finca Billeben, Guatemala.

En la Figura 25 se muestra un alga unicelular perteneciente a la clase Trebouxiophyceae, encontrada en la biopelícula sobre hojas de pinabete colectadas en la finca Billeben, Guatemala. En las figuras A) C) y E) se muestran montajes de microscopio bajo un aumento de 400x. En las figuras B), D) y F) se muestra la imagen anterior ampliada.

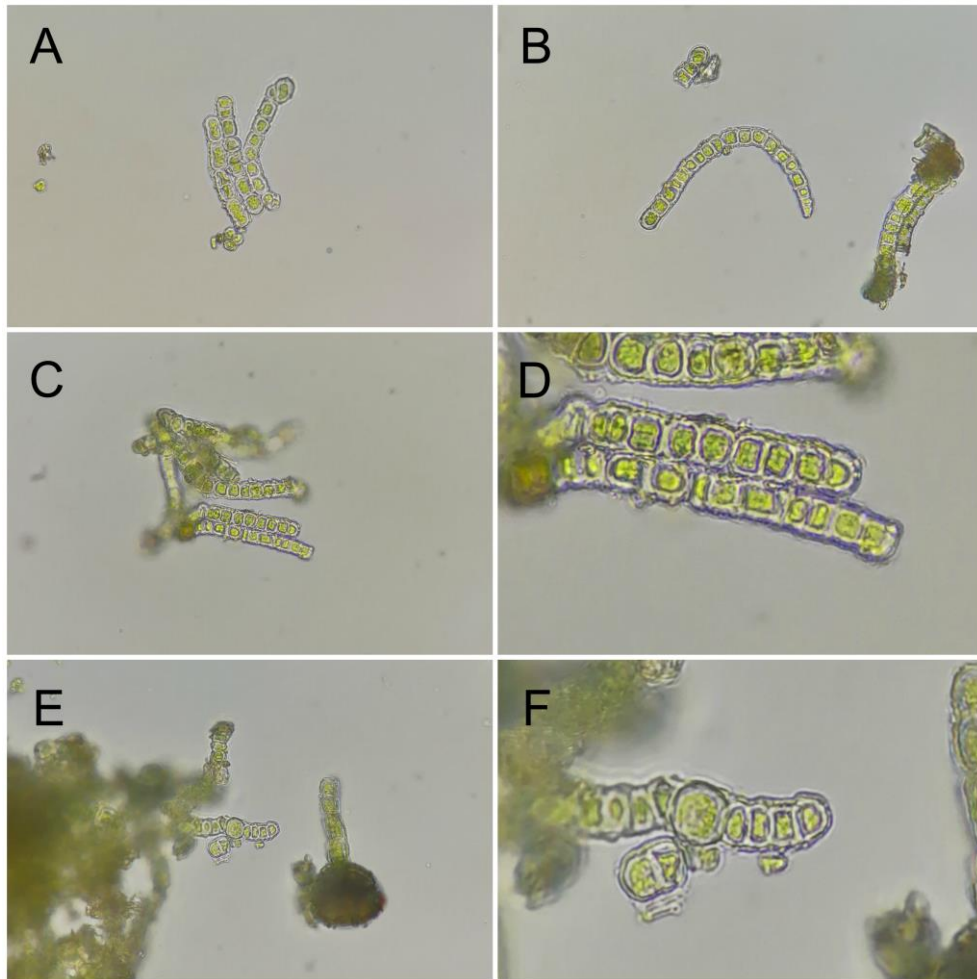
En la Figura 26 se observa un alga filamentosa del género *Klebsormidium*, presente en las hojas de pinabete en la finca Billeben, Guatemala.



**FIGURA 26.** Alga del género *Klebsormidium*, encontrada en hojas de pinabete en la finca Billeben, Guatemala. **A)** Aumento 100x **B – F)** Aumento 400x

En la Figura 26 se observa el alga filamentosa *Klebsormidium* sp., presente en la biopelícula sobre hojas de pinabete en la finca Billeben, Guatemala. En la Figura A se observa el alga a un aumento de 100x, mientras que en el resto de figuras B – F) se observan a un aumento de 400x. El alga presenta filamentos no ramificados y no presenta constricción entre las células.

En la Figura 27 se observa un alga filamentosa del género *Klebsormidium*, presente en las hojas de pinabete en la finca Valle Alto, Chimaltenango.



**FIGURA 27.** Alga del género *Klebsormidium*, encontrada en hojas de pinabete en la finca Valle Alto, Chimaltenango. **A)** Aumento 100x **B – F)** Aumento 400x

En la Figura 27 se observa el alga filamentosa *Klebsormidium* sp., presente en la biopelícula sobre hojas de pinabete en la Valle Alto, Chimaltenango. En las figuras A), B), C) y E) se muestran montajes de microscopio bajo un aumento de 400x. En las figuras D) y F) se muestra la imagen anterior ampliada. El alga presenta filamentos no ramificados, con un tamaño de células de 5-10  $\mu\text{m}$ .

## D. Identificación de hongos

Se aisló un total de 10 especies de hongos de las hojas de pinabete colectadas en las tres plantaciones. No se encontró ningún género que estuviera en común en las tres localidades; los géneros *Mucor* y *Trichoderma* se encontraron en dos de las tres localidades, como se muestra en el Cuadro 4.

**CUADRO 4.** Especies de hongos encontrados en las tres plantaciones de pinabete

Especie	Localidades		
	Finca Billeben Guatemala	Finca Valle Alto Chimaltenango	Finca Buena Vista San Marcos
<i>Aspergillus</i> sp.	x		
<i>Fusarium equiseti</i> *		x	
<i>Fusarium graminearum</i> *		x	
<i>Fusarium</i> sp.		x	
<i>Mucor</i> sp.		x	
<i>Mucor hiemalis</i> *			x
<i>Trichoderma koningiopsis</i> *			x
<i>Trichoderma viride</i> *			x
<i>Trichoderma</i> sp.	x		
<i>Ulocladium</i> sp.	x		

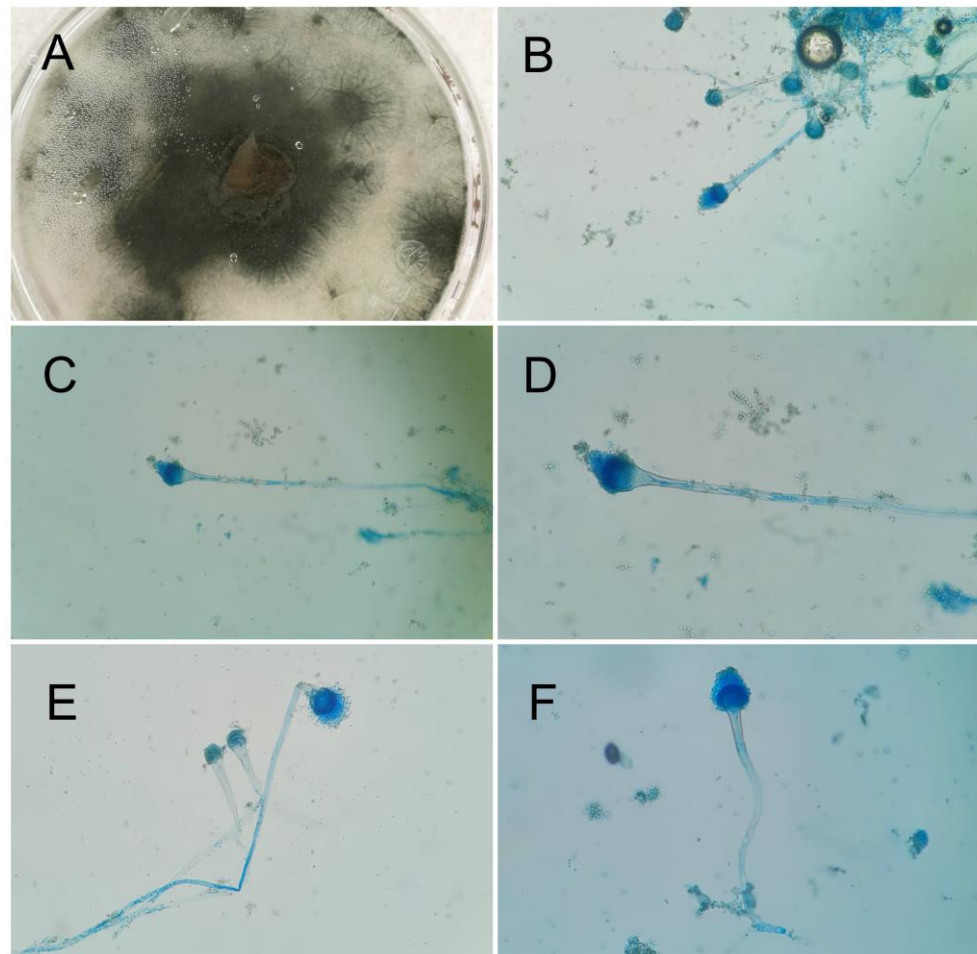
\* Especie identificada por medio de análisis genético

En el Cuadro 4 se representan las diez especies de hongos aisladas en cada una de las tres localidades. En la finca Billeben se encontraron tres especies de géneros diferentes, *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp. y *Ulocladium* sp. En la finca Valle Alto se aislaron cuatro especies de *Fusarium* (*F. equiseti*, *F. graminearum* y *Fusarium* sp.) y una especie del género *Mucor*. En la finca Buena Vista se aislaron tres especies, *Mucor hiemalis*, *Trichoderma koningiopsis* y *T. viride*.

Cinco de los hongos aislados se identificaron a nivel de especie por medio de PCR y secuenciación. Para cada secuencia se determinó el porcentaje de cobertura y de identificación, los cuales se muestran en la sección de Anexos. El porcentaje de cobertura de las secuencias obtenidas varió de 86.88% a 99.57%, a excepción de la secuencia ITS de *T. koningiopsis* con un 19.23%. El porcentaje de identidad fue alto en todos los casos,

de 93.55% a 100%. Los resultados fueron consistentes entre la región EF y la región ITS, ya que se obtuvo la misma identificación con ambos marcadores para cada uno de los hongos. Esto confirma la especie de los hongos y sustenta el uso de ambos marcadores para la identificación por análisis genético.

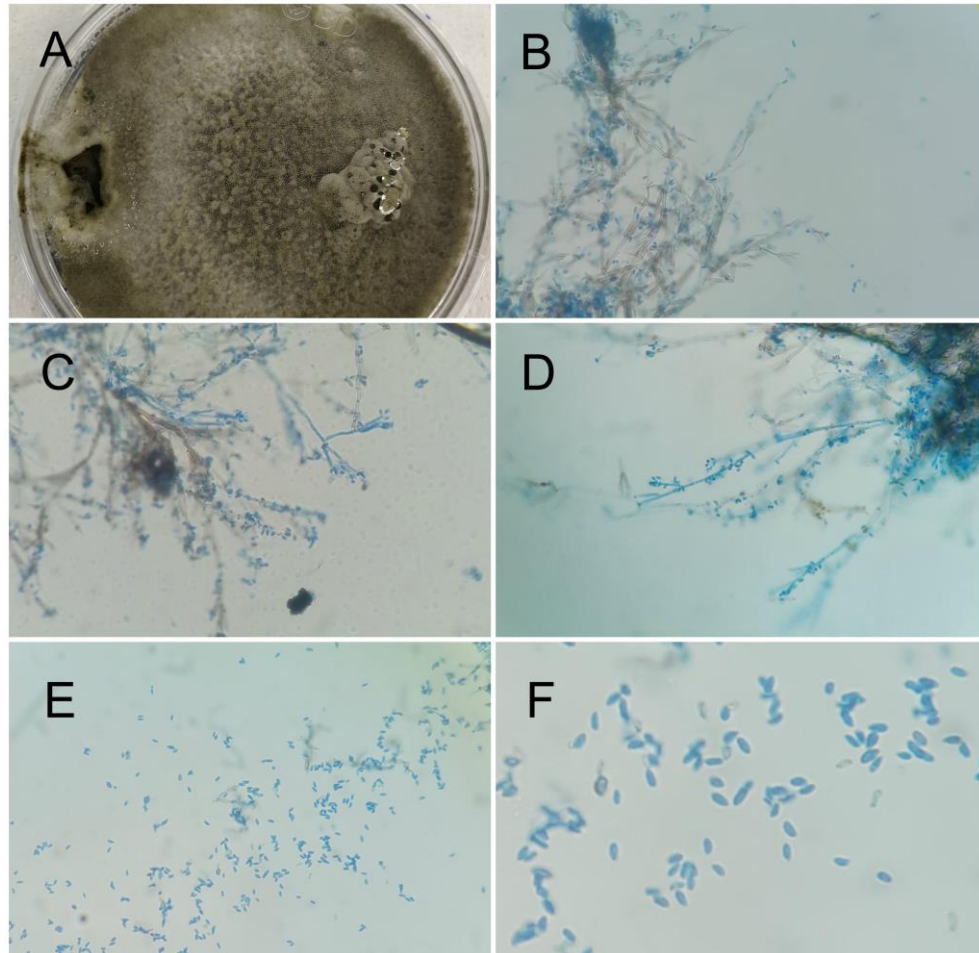
En las figuras 28-30 se muestran los hongos aislados a partir de hojas de pinabete de la finca Billeben, Guatemala.



**FIGURA 28.** Hongo del género *Aspergillus*, aislado de hojas de pinabete de la finca Billeben, Guatemala. **A)** Cultivo **B) C)** Conidióforos, Aumento 250x. **D-F)** Conidióforos, Aumento 400x.

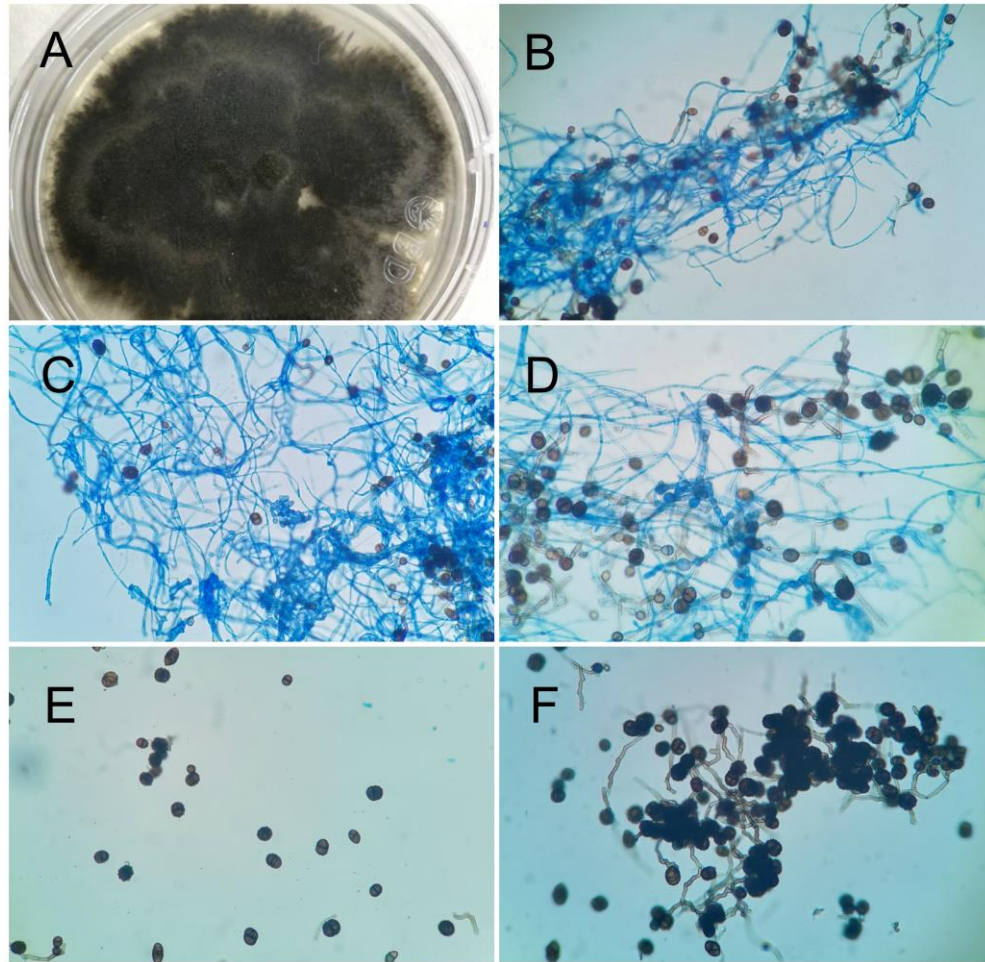
En la Figura 28 se observa el hongo *Aspergillus* sp., aislado a partir de hojas de pinabete colectadas en la finca Billeben, Guatemala. En la figura A) se observa el cultivo

del hongo con colonias de aspecto polvoso de color verde oscuro. En las figuras B-F) se muestran conidióforos hialinos con la doble pared característica del género.



**FIGURA 29.** Hongo del género *Trichoderma*, aislado de hojas de pinabete de la finca Billeben, Guatemala. **A)** Cultivo **B-D)** Micelio y conidióforos, Aumento 250x **E)** Esporas, Aumento 250 **F)** Esporas, Aumento 400x.

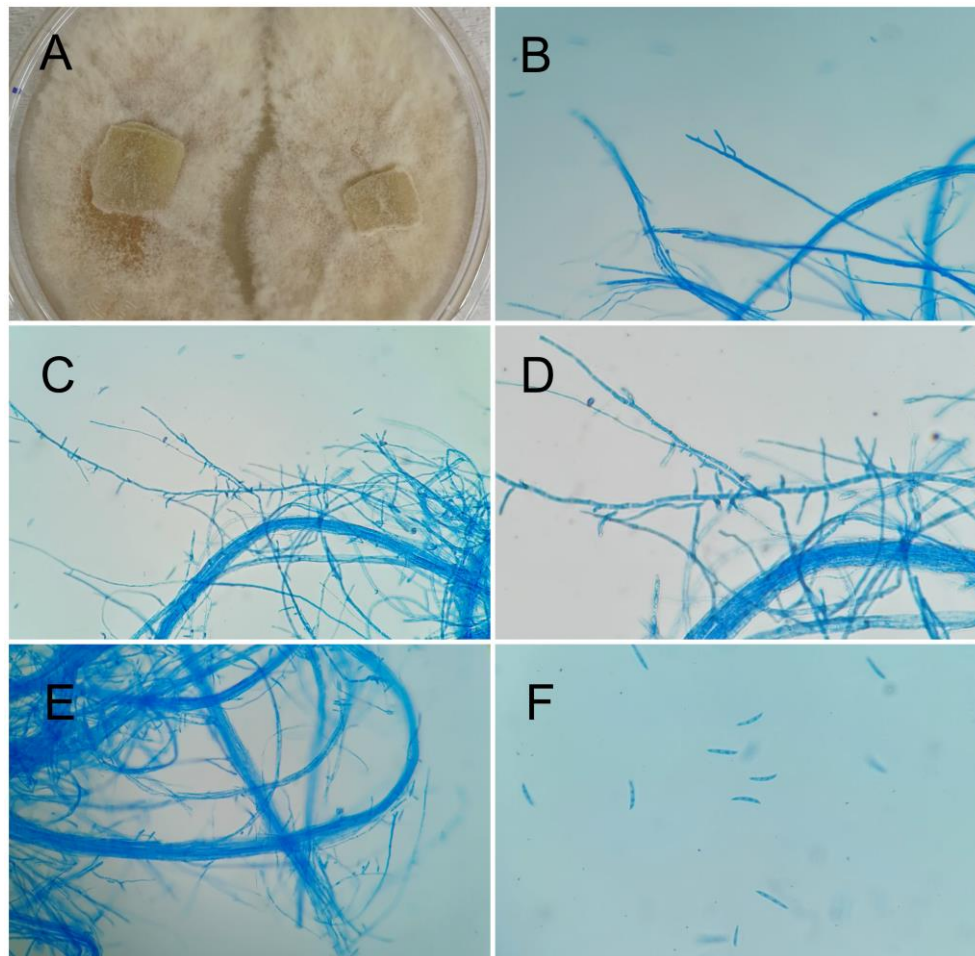
En la Figura 29 se observa un hongo del género *Trichoderma*, aislado a partir de hojas de pinabete colectadas en la finca Billeben, Guatemala. En la figura A) se observa el cultivo del hongo, el micelio vegetativo es blanco y maduro presenta coloración gris. En las figuras B - D) se muestra un micelio septado y conidióforos ramificados bajo aumento de 250x. En la figuras E-F) se observan conidios hialinos, elipsoidales con borde liso.



**FIGURA 30.** Hongo del género *Ulocladium*, aislado de hojas de pinabete de la finca Billeben, Guatemala. **A)** Cultivo **B-C)** Micelio y esporas, Aumento 250x **D)** Micelio y esporas, Aumento 400x **E-F)** Esporas, Aumento 400x.

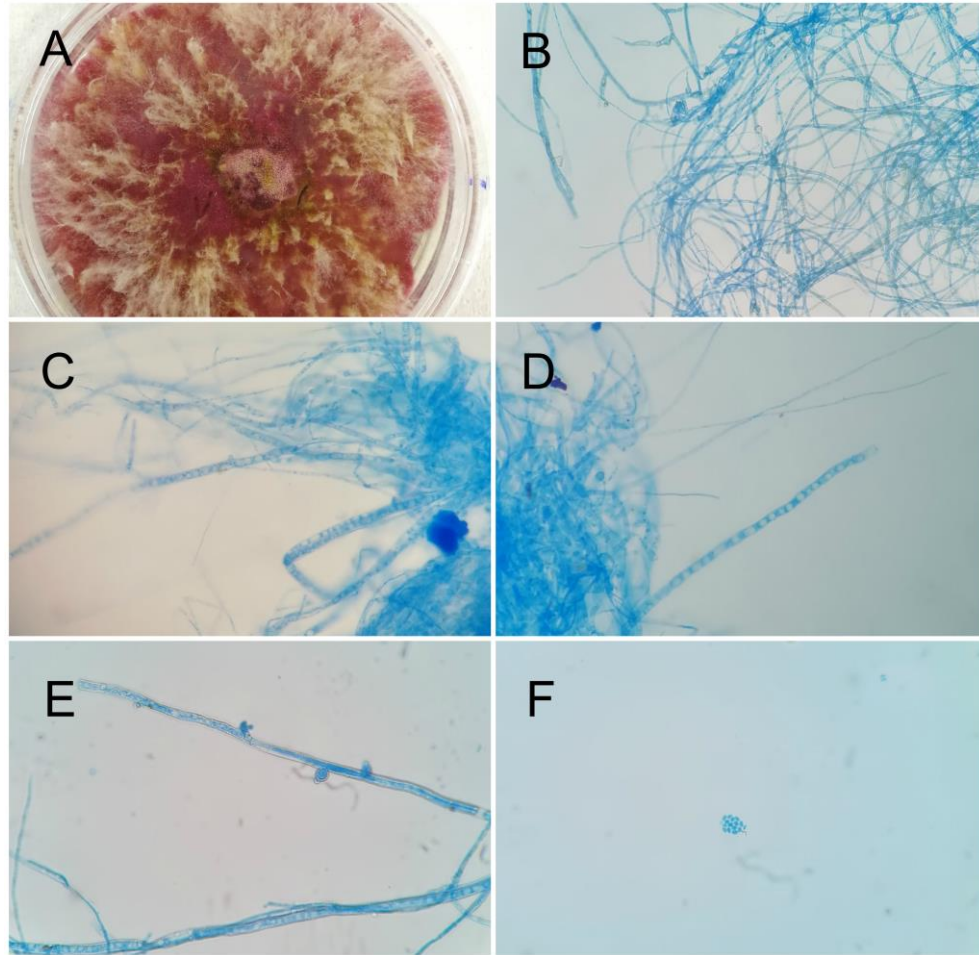
En la Figura 30 se observa un hongo del género *Ulocladium*, aislado a partir de hojas de pinabete colectadas en la finca Billeben, Guatemala. En la figura A) se observa el cultivo del hongo, con colonias de aspecto costroso de color negro. En las figuras B-D) se muestra un micelio hialino y septado. En las figuras E-F) se observa el detalle de las esporas multicelulares pigmentadas (dictioconidios).

En las figuras 31-34 se muestran los hongos aislados a partir de hojas de pinabete de la finca Valle Alto, Chimaltenango.



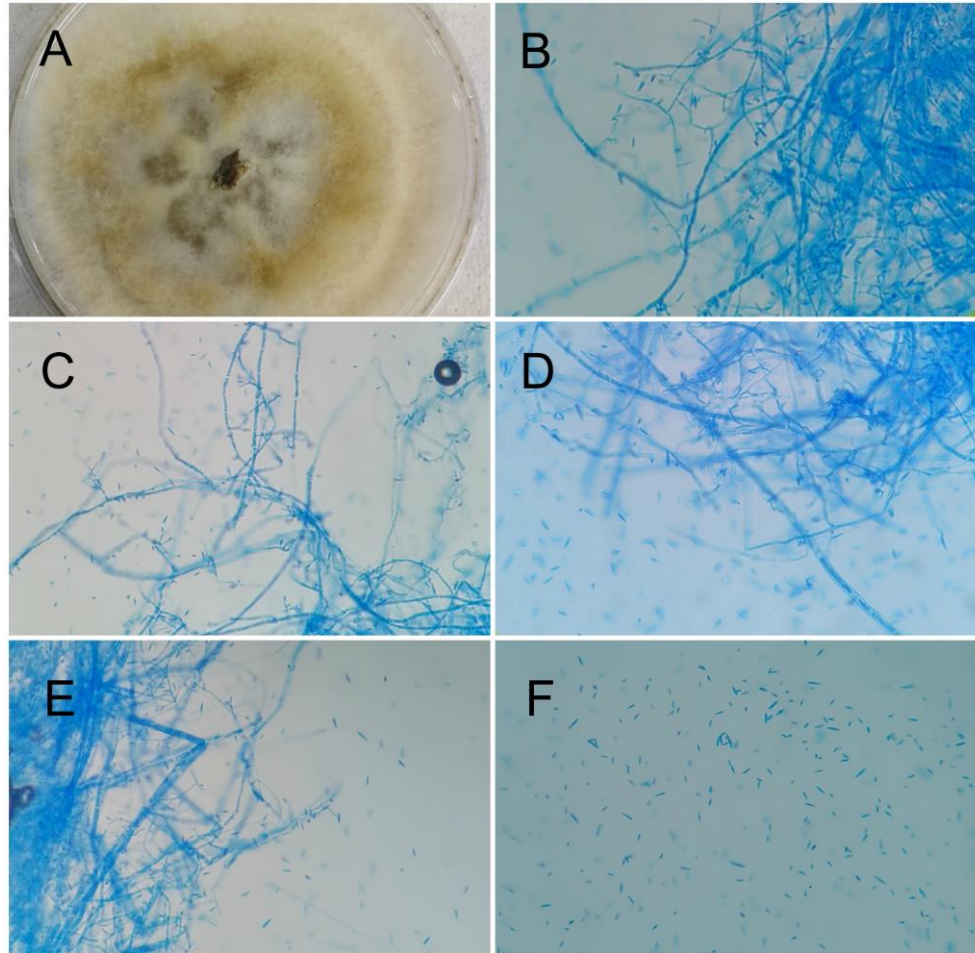
**FIGURA 31.** *Fusarium equiseti* aislado de hojas de pinabete de la finca Valle Alto, Chimaltenango. **A)** Cultivo **B-C)** Micelio, Aumento 250x **D-E)** Micelio, Aumento 400x **F)** Esporas, Aumento 400x.

En la Figura 31 se observa el hongo *Fusarium equiseti*, aislado a partir de hojas de pinabete colectadas en la finca Valle Alto, Chimaltenango. En la figura A) se observa el cultivo del hongo, con colonias de color rosado con aspecto filamentosas. En las figuras B-E) muestra un micelio septado a diferentes magnificaciones y en la figura F) se muestran macroconidios, que son esporas asexuales con forma de canoa, hialinas y septadas.



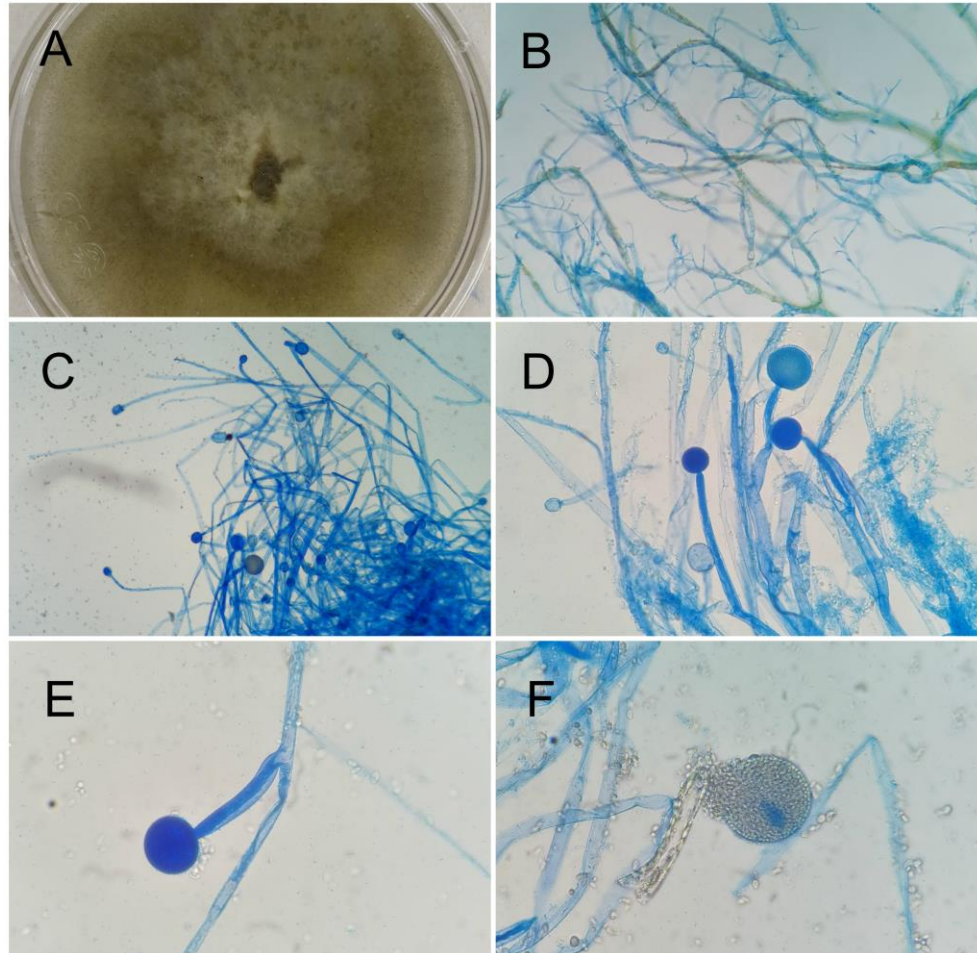
**FIGURA 32.** *Fusarium graminearum* aislado de hojas de pinabete de la finca Valle Alto, Chimaltenango. **A)** Cultivo **B-C)** Micelio, Aumento 250x **D-E)** Micelio, Aumento 400x **F)** Conidios, Aumento 400x.

En la Figura 32 se observan estructuras de *Fusarium graminearum*, aislado a partir de hojas de pinabete colectadas en la finca Valle Alto, Chimaltenango. En la figura A) se observa el cultivo del hongo, con micelio filamentoso de color amarillo y producción de pigmento rojo difusible al medio. En las figuras B-E) se muestra micelio a diferentes magnificaciones, y en la F) se muestra una monofiálide con microconidias en masa, hialinas y ovoides.



**FIGURA 33.** *Fusarium* sp. aislado de hojas de pinabete de la finca Valle Alto, Chimaltenango. **A)** Cultivo **B-C)** Micelio, Aumento 250x **D-E)** Micelio, Aumento 400x **F)** Conidios, Aumento 400x.

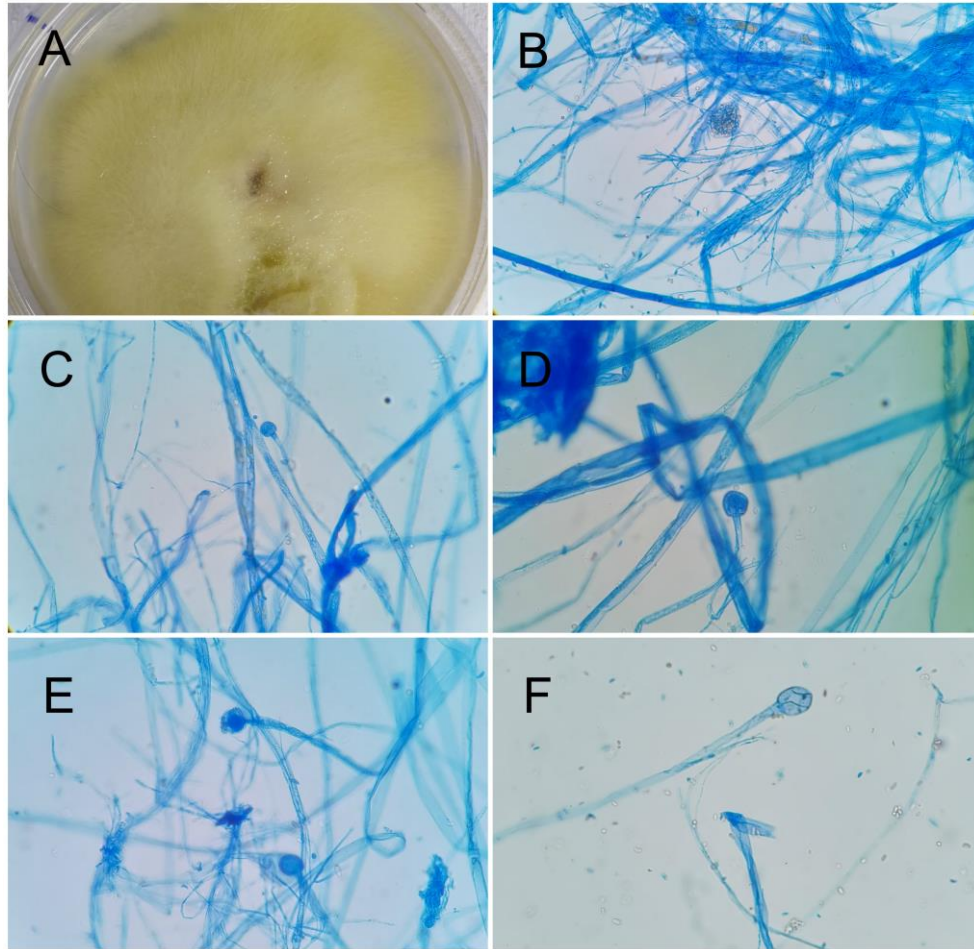
En la Figura 33 se observa un hongo del género *Fusarium*, aislado a partir de hojas de pinabete colectadas en la finca Valle Alto, Chimaltenango. En la figura A) se observa el cultivo del hongo con micelio de color amarillo crema. En las figuras B-E) se observa un micelio hialino y septado a diferentes magnificaciones, y en la figura F) se observan dos tipos de conidios: macroconidios hialinos septados y microconidios ovoides, ambos corresponden a las esporas asexuales del hongo.



**FIGURA 34.** *Mucor* sp. aislado de hojas de pinabete de la finca Valle Alto, Chimaltenango. **A)** Cultivo **B-C)** Micelio y esporangi6foros, Aumento 100x **D)** Micelio y esporangi6foros, Aumento 250x **E)** Esporangio6foro, Aumento 400x. **F)** Esporangio y esporas, Aumento 400x

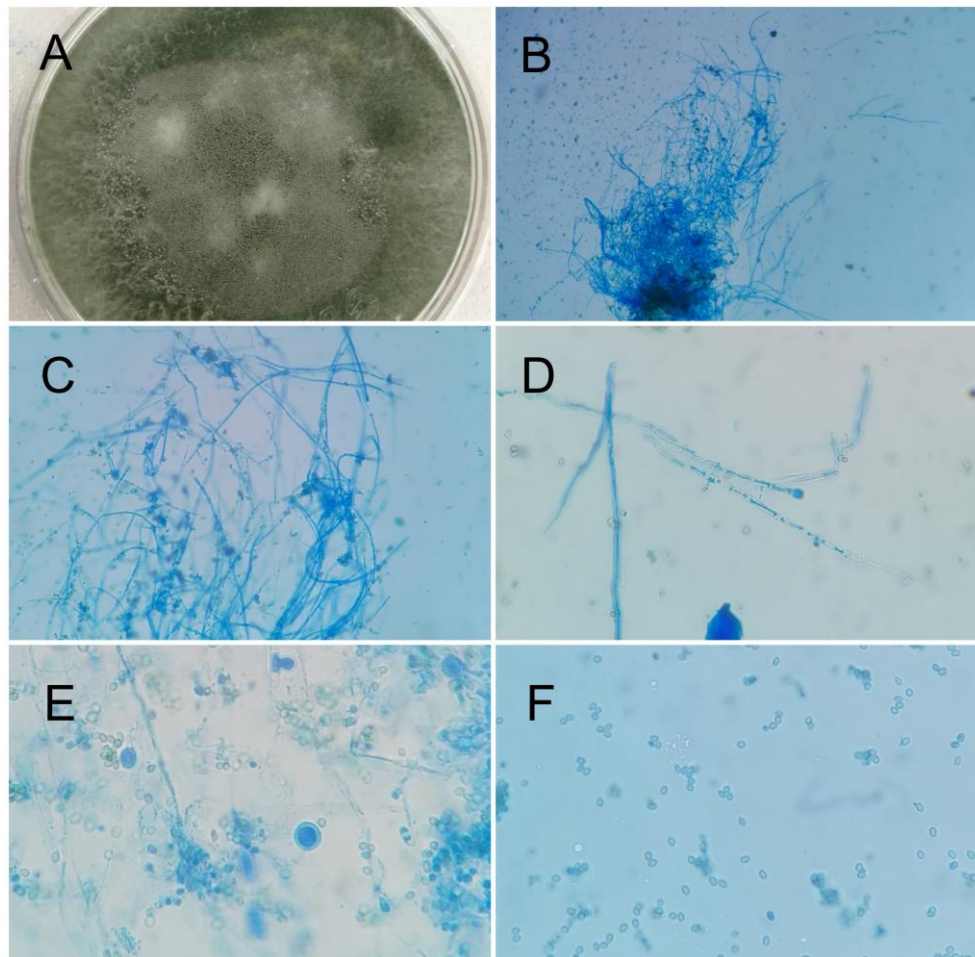
En la Figura 34 se observa un hongo del g6nero *Mucor*, aislado a partir de hojas de pinabete colectadas en la finca Valle Alto, Chimaltenango. En la figura A) se observa el cultivo del hongo, con colonias de aspecto filamentoso de color amarillo gris6ceo. En las figuras B-D) se muestra micelio con hifas hialinas, sin septos y esporangi6foros hialinos, sosteniendo esporangios globosos. En la figura E) se observa un esporangio con el detalle de la pared y en la F) un esporangio y esporangiosporas bajo aumento de 400x. No se muestran rizoides en la ramificaci6n del esporangio, lo que es caracter6stico del g6nero.

En las Figura 35-37 se muestran los hongos aislados a partir de hojas de pinabete de la finca Buena Vista, San Marcos.



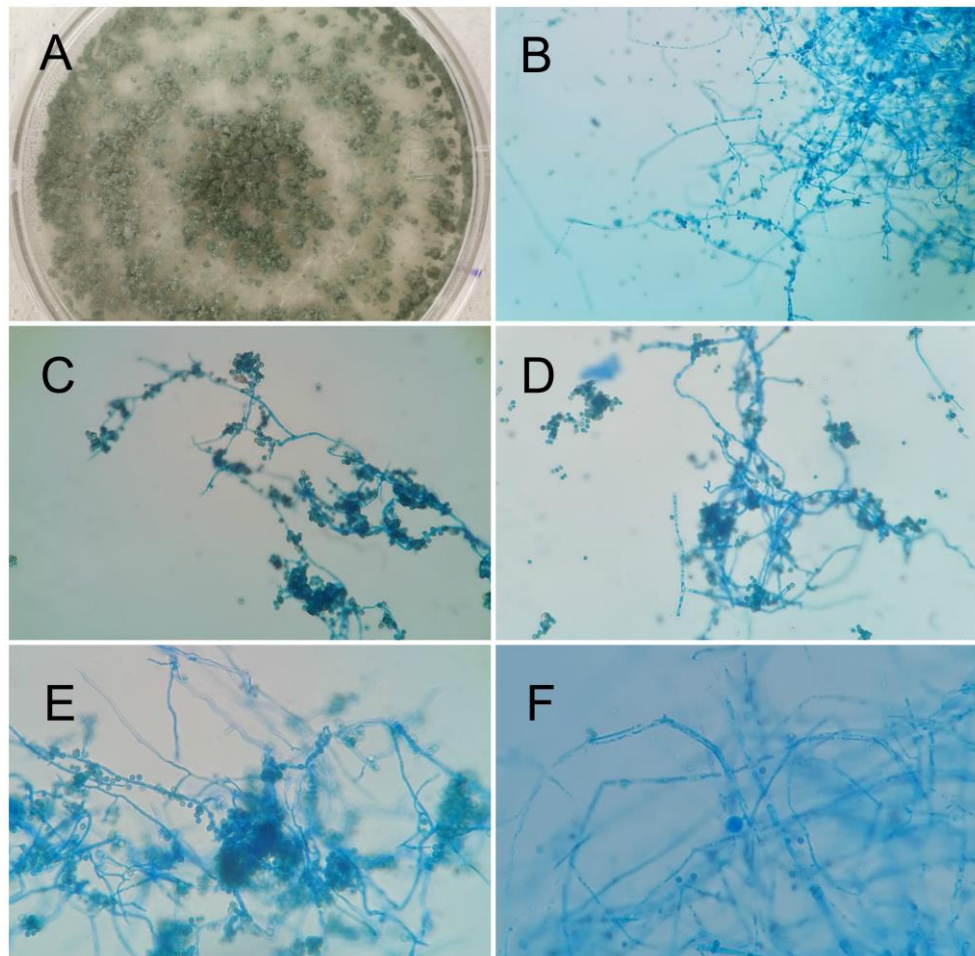
**FIGURA 35.** *Mucor hiemalis* aislado de hojas de pinabete de la finca Buena Vista, San Marcos. **A)** Cultivo **B-C)** Micelio y esporangios, Aumento 250x **D-F)** Micelio y esporangi6foros, Aumento 400x.

En la Figura 35 se observan estructuras de *Mucor hiemalis*, aislado a partir de hojas de pinabete colectadas en la finca Buena Vista, San Marcos. En la figura A) se observa el cultivo del hongo de color amarillo con aspecto vellosa algodonoso. En las figuras B-C) se muestra micelio bajo aumento de 250x. En las figuras D-F) se observa micelio cenoc6tico (aseptado) con hifas hialinas y esporangios globosos. No se observan rizoides en la ramificaci6n del esporangio, lo que es caracter6stico del g6nero.



**FIGURA 36.** *Trichoderma koningiopsis* aislado de hojas de pinabete de la finca Buena Vista, San Marcos. **A)** Cultivo **B)** Micelio, Aumento 100x **C)** Micelio, Aumento 250x **D)** **E)** Micelio y conidióforos, Aumento 400x **F)** Conidios, Aumento 400x.

En la Figura 36 se observan estructuras de *Trichoderma koningiopsis*, aislado a partir de hojas de pinabete colectadas en la finca Buena Vista, San Marcos. En la figura A) se observa el cultivo del hongo de color verde con filamentos blancos. En las figuras B-E) se muestra micelio septado con conidióforos hialinos a diferentes magnificaciones. En la Figura F) se observan conidios (esporas asexuales) hialinos y ovoides.

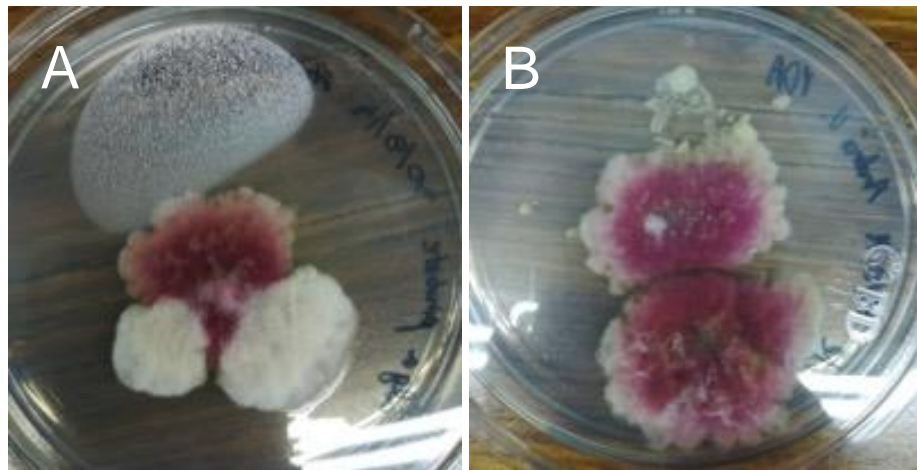


**FIGURA 37.** *Trichoderma viride* aislado de hojas de pinabete de la finca Buena Vista, San Marcos. **A)** Cultivo **B)** Micelio, Aumento 100x **C-D)** Micelio y conidios, Aumento 250x **E-F)** Micelio y conidios, Aumento 400x.

En la Figura 37 se observa el hongo *Trichoderma viride*, aislado a partir de hojas de pinabete colectadas en la finca Buena Vista, San Marcos. En la figura A) se observa el cultivo del hongo, el micelio vegetativo es blanco y maduro se torna de color verde oscuro, que es en donde se encuentran esporas. El crecimiento se observa en forma de círculos concéntricos. En las figuras B-F) se muestra micelio hialino septado con conidióforos hialinos, ramificados y masas de conidios unicelulares ovoides a oblongos con coloración verde o hialinas.

## E. Cultivo *in vitro*

Se utilizaron hojas de pinabete de dos localidades para el aislamiento y cultivo de algas: la finca Billeben y la finca Valle Alto. No fue posible cultivar las algas *in vitro* debido a la presencia de contaminación causada por hongos, tanto en los cultivos sólidos como en los líquidos. No se observó crecimiento de las colonias de algas a lo largo de una semana, posteriormente se observaron hongos que crecieron alrededor de las colonias inoculadas en el medio de cultivo. Al resembrar estos hongos en medio de cultivo PDA, se observó que crecieron las mismas especies de hongos aislados a partir de las hojas de pinabete. En el caso de los cultivos de algas de la finca Billeben crecieron los hongos *Trichoderma* sp. y *Ulocladium* sp., mientras que en los cultivos de algas de la finca Valle Alto crecieron *Fusarium graminearum* y *F. equiseti* (Figura 38).



**FIGURA 38.** Hongos aislados a partir de algas contaminadas después del cultivo *in vitro* de muestras de la finca Valle Alto, Chimaltenango.

En la Figura 38 se muestran hongos que crecieron en medio de cultivo PDA una semana después de haber inoculado las algas que mostraron contaminación en los cultivos *in vitro*. En ambas muestras se encontró *F. graminearum* y en una se encontró también *F. equiseti*.

Al mantener los cultivos por una semana hubo una reducción del pH del medio de cultivo debido a la adición de dióxido de carbono, lo que se observó como un cambio de color en el medio de naranja a amarillo en el envase control. Además, se observó que no había un bombeo constante de dióxido de carbono, ya que la presión varió de forma considerable conforme se vació el tanque de plástico. Las algas se sedimentaron en el fondo del recipiente debido a que no había una adecuada circulación en el medio de cultivo líquido, a pesar de que si había bombeo de aire y dióxido de carbono.

## F. Comparación entre localidades

En el Cuadro 5 se muestran todas las algas y hongos aislados a partir de hojas de pinabete en las tres localidades.

**CUADRO 5.** Comparación de grupos de algas y hongos encontrados en las plantaciones de pinabete

Clasificación	Localidades		
	Finca Billeben Guatemala	Finca Valle Alto Chimaltenango	Finca Buena Vista San Marcos
<b>Algas</b>			
<i>Desmococcus</i> spp.	X	X	X
<i>Klebsormidium</i> spp.	X	X	
Trebouxiophyceae	X		
<b>Hongos</b>			
<i>Aspergillus</i> sp.	X		
<i>Fusarium equiseti</i>		X	
<i>Fusarium graminearum</i>		X	
<i>Fusarium</i> sp.		X	
<i>Mucor hiemalis</i>			X
<i>Mucor</i> sp.		X	
<i>Trichoderma koningiopsis</i>			X
<i>Trichoderma viride</i>			X
<i>Trichoderma</i> sp.	X		
<i>Ulocladium</i> sp.	X		

En el Cuadro 5 se observan los géneros de algas y hongos encontrados en hojas de pinabete de las tres plantaciones. En este caso se muestra la clasificación a nivel de género para realizar la comparación entre localidades, junto con el número de especies que se encontraron para cada género.

Se encontró que el alga del género *Desmococcus* está presente en hojas de pinabete de las tres localidades. El género *Klebsormidium* está presente en dos localidades, en la finca Billeben y en la finca Valle Alto, aunque en cada una se encuentran diferentes especies. El morfotipo de la clase Trebouxiophyceae se encontró únicamente en la finca Billeben.

En el caso de los hongos, no se encontró un género que estuviera presente en muestras de las tres localidades. El género *Mucor* se encontró en la finca Valle Alto y la finca Buena Vista, mientras que el género *Trichoderma* se encontró en la finca Billeben y la finca Buena Vista. Los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, y *Ulocladium* se encontraron únicamente en una localidad. Esto indica que los hongos que se encuentran en la biopelícula también pueden variar de acuerdo a la localidad.



## VIII. DISCUSIÓN

### A. Observaciones en campo

Tanto en la finca Billeben (Guatemala) como en la finca Buena Vista (San Marcos), se encontraron sobre los pinabetes hojas caídas de árboles cercanos de otras especies que presentaban la biopelícula de algas, como se muestra en las figuras 14 y 20. La presencia de la biopelícula de algas en hojas de otras especies de plantas demuestra que ésta no se forma únicamente sobre los árboles de pinabete. Sin embargo, ya que las algas no se encontraron en otros árboles cercanos se concluye que estas hojas fueron colonizadas debido a su proximidad con las ramas de pinabete infestadas, no porque otras especies estén siendo afectadas por la enfermedad del “alga verde”. De acuerdo con Hoffman (1989), el crecimiento de algas epífitas está más controlado por factores físicos (temperatura, iluminación, humedad) que por la planta hospedera. Aun así, otros factores como el pH de la corteza y la especie del árbol influyen en la colonización de algas (Alwi *et al.* 2015; Stifterova y Neustupa 2015), por lo que los árboles de pinabete podrían presentar características que facilitan el crecimiento de estas.

Se observó que los nuevos brotes de hojas tardan un tiempo en ser colonizados (Ver Figura 16). Debido a esto, es necesario realizar un monitoreo de los nuevos brotes para determinar el tiempo de colonización de la biopelícula, lo que permitiría conocer los meses óptimos para la aplicación de pesticidas. En un estudio con *Picea abies* realizado por Poggio (2002), se encontró que las nuevas hojas empiezan a ser colonizadas seis meses después de haber brotado, y que las ramas más viejas tienen una biopelícula más densa. Esto apoya las observaciones del INAB (2018), ya que la enfermedad avanza de la parte interna de la copa (con ramas viejas) a la parte externa (con ramas nuevas). También

se ha observado una mayor abundancia de hongos conforme aumenta la edad de las ramas de coníferas (Carroll 1977; Terhonen *et al.* 2011).

Se observó también que los árboles que se encontraban bajo sombra presentaban una mayor infestación de la enfermedad del alga verde. El INAB (2018) menciona que la sombra y la humedad favorecen el crecimiento de algas, lo cual es apoyado por numerosas referencias (Hoffmann 1989; Hodkinson 2011; Holzinger y Karsten 2013; Sochting 1997) Las algas terrestres dependen de la humedad ambiental para obtener agua, y son propensas a desecación si se exponen directamente a la luz solar. Tomando esto en consideración, la falta de podas y raleo en las plantaciones de pinabete podrían favorecer el desarrollo de la enfermedad, ya que disminuyen la iluminación en la copa del árbol (INAB, 2018).

Además, se encontró que la biopelícula crece primero en la parte inferior de las ramas y luego se extiende a la parte superior, como se muestra en la Figura 19. De manera similar, Bernstein y Carroll (1977) reportaron una mayor infestación de microorganismos en la parte inferior de las hojas de *Pseudotsuga menziesii*. Esto puede deberse a que la parte inferior está menos expuesta a la luz solar, lo que favorece el crecimiento de algas y hongos (Schnurr y Allen 2015; Vides y Archibald 2017). Esto deberá ser tomado en cuenta para diseñar un monitoreo de la enfermedad, ya que es necesario revisar también la parte inferior de las ramas para confirmar la presencia de la enfermedad.

## **B. Observaciones de la biopelícula bajo microscopio**

Al observar bajo microscopio los raspados de las hojas de pinabete se encontraron algas, hongos, briofitas y líquenes (Ver Figura 22), los cuales son componentes comunes de las biopelículas de microorganismos que crecen sobre la corteza y hojas de árboles (Belnap y Lange 2001; Budel 2002; Hoffman 1989). Las briofitas y líquenes no se identificaron debido a que no se encontraron frecuentemente en la biopelícula sobre las hojas de pinabete, por lo que deberán ser abordados en futuras investigaciones. Adicionalmente, se encontraron ácaros, diatomeas y restos de insectos en menor cantidad.

Las observaciones indican que las algas y los hongos se encuentran estrechamente relacionados en la biopelícula (Ver Figura 23), y que estos también tienen un rol en el desarrollo de la enfermedad del alga verde del pinabete. En los raspados de muestras de la finca Billeben se observaron esporas e hifas de un hongo alrededor de un fragmento del alga filamentosa *Klebsormidium* sp., lo que demuestra que existe una relación entre ambos organismos (Ver Figura 23). Este y otros géneros de algas filamentosas producen polisacáridos que componen una matriz extracelular a la que se pueden adherir otras algas, cianobacterias y hongos (Warren *et al.* 2019). Además, las hifas de los hongos se adhieren a otros componentes de la biopelícula como partículas de suelo para agregarlos y compactarlos (Belnap y Lange 2001).

Es necesario llevar a cabo más estudios abordando la relación simbiótica que existe entre las algas y los hongos de la biopelícula. Se ha demostrado que puede haber intercambio de nutrientes entre microorganismos autótrofos y heterótrofos de una biopelícula (Schnurr y Allen 2015). Los productos de la fotosíntesis de algas se han encontrado en los cuerpos fructíferos de algunos basidiomicetos, comprobando que estos pueden formar relaciones mutualistas similares a líquenes con varios grupos de algas como *Desmococcus* y *Klebsormidium* (Mukhin *et al.* 2016; Mukhin *et al.* 2018). Smith y Stephenson (2007) encontraron varios géneros de cianobacterias (*Chroococcus* y *Apathonece*) y algas (*Chlorococcum*) en una biopelícula de musgos y mohos mucilaginosos formada sobre troncos de *Picea rubens*. Los autores mencionan que los mohos y musgos estaban estrechamente asociados a las algas y que podrían estar recibiendo nutrientes de estas, como nitrógeno.

De forma contraria, existen casos de hongos que parasitan las algas, infectando el interior de las células y causando necrosis (Raghukumar 1987; Sochting 1997). El hongo *Scolecotecha cornuta* parasita las algas *Apatococcus lobatus* y *Desmococcus viridis* de la biopelícula que se forma sobre las ramas de *Picea abies*, y le da un aspecto grisáceo y manchado a las ramas del árbol. Hoppert y colaboradores (2010) encontraron que un hongo del género *Fusarium* parasita la biopelícula del alga filamentosa *Zygonium*

*ericetorum*. Realizaron tinciones con rojo de rutenio y observaron que las hifas del hongo se adhieren a las paredes celulares de las algas, se introduce en los espacios intercelulares y después invaden el interior de las células. Dadas las observaciones de parches grises en la biopelícula sobre las ramas de pinabete (Ver Figuras 13 y 17), es posible que algunos hongos estén parasitando las algas, aunque esto deberá ser confirmado en futuras investigaciones por medio de cortes histológicos y tinción de células.

### **C. Identificación de algas**

Se identificaron 4 morfotipos de algas (Ver Cuadro 3), aunque es posible que se esté subestimando este número debido a que la identificación se realizó directamente de raspados de la biopelícula sin aislar y cultivar las algas, y es posible que se hayan pasado por alto otras especies de menor tamaño y abundancia (Glaser *et al.* 2018).

El alga del género *Desmococcus* se encontró en las tres localidades, esta se caracteriza por tener una morfología sarcinoide con las células agregadas en paquetes (López-Bautista *et al.* 2007). Las especies del género presentan una distribución cosmopolita, y han sido aislada a partir de hábitats terrestres como paredes, estructuras metálicas y corteza de árboles (Das y Gupta 2015; Rindi y Guiry 2004; Stifterova y Neustupa 2015). Estas producen una matriz extracelular de polisacáridos y forman una biopelícula que ayuda a la retención de humedad y protege a las células de radiación excesiva (Gustavs *et al.* 2015). Este género también se encontró en la cobertura de algas sobre hojas de *Picea abies*, que afectó plantaciones de árboles ornamentales en Europa (Sochting 1997)

Dos de las algas encontradas son filamentosas no ramificadas; de acuerdo con López-Bautista y colaboradores (2007), los filamentos uniseriados se encuentran principalmente en tres géneros de algas subaéreas: *Klebsormidium*, *Rosenvingiella* y *Prasiola*. Estos dos últimos géneros se encuentran principalmente en costas marinas donde crecen en rocas al quedar expuestas cuando baja la marea, aunque también han sido encontrados en ciudades creciendo sobre paredes (Holzinger y Karsten 2013; Rindi y Guiry 2004). Existen otros géneros de algas que presentan una morfología y hábitat

similar, como *Zygonium*, *Zygnema*, *Ulothrix* y *Oedogonium*, aunque este último encuentra en cuerpos de agua dulce y no ha sido reportado en hábitats terrestres (Reddy 2001).

Las algas filamentosas se identificaron con el género *Klebsormidium*, aunque en las dos localidades (Finca Billeben y Finca Valle Alto) se encontraron diferentes especies. Este género tiene una distribución cosmopolita y es uno de los grupos más comunes de algas filamentosas terrestres. Este ha reportado en zonas templadas como Europa y Norteamérica, y en zonas tropicales como África y Sudamérica (Samolov *et al.* 2018; Stifterova y Neustupa 2015). Esta alga prolifera más en un pH bajo y en condiciones ambientales favorables produce una biopelícula a la que pueden adherirse otros organismos (Glaser *et al.* 2018; Warren *et al.* 2019). No han habido reportes de esta alga como parásito o causante de enfermedades en plantas.

Una de las algas se identificó de la clase Trebouxiophyceae, la cual se encontró únicamente en una localidad, la finca Billeben. En esta clase se agrupan la mayoría de especies de algas unicelulares y sarcinoides que conforman las biopelículas que se forman sobre los árboles (Novakova y Neustupa 2015). En un estudio realizado en el sudeste asiático se encontró que en bosques con dosel abierto y mayor intensidad de luz había una mayor abundancia de algas del orden Trentepohliales y cianobacterias, mientras que en bosques de dosel cerrado con más sombra se encontraron más algas de la clase Trebouxiophyceae (Neustupa y Skaloud 2008). La identificación del alga se realizó hasta el nivel de clase debido a la falta de características diagnósticas observables. Esta alga podría pertenecer al género *Chlorella*, aunque en este grupo se encuentran especies con una amplia variación morfológica (Guiry 2012), por lo que la identificación deberá ser confirmada en futuras investigaciones.

En general, las algas identificadas en este estudio pertenecen a géneros que se han descrito como organismos formadores de biopelículas fotosintéticas en superficies naturales y artificiales como suelos, plantas, rocas y construcciones (Grbic *et al.* 2010; Rindi y Guiry 2004; Stifterova y Neustupa 2015). Esto indica que las algas no son

organismos parásitos del pinabete, sino que lo utilizan como soporte de manera similar a líquenes o musgos, favoreciéndose su crecimiento por la sombra y humedad que provee la copa del árbol (Neustupa y Albrechtova 2003). Sin embargo, la formación de una densa biopelícula de algas reduce la incidencia de luz sobre las hojas y puede promover la proliferación de otros microorganismos que sí son patógenos, en este caso hongos (Reuther *et al.* 1978; Sochting 1997).

#### **D. Identificación de hongos**

Se aislaron diez hongos a partir de las hojas de pinabete infestadas con la enfermedad (Ver Cuadro 4), pertenecientes a cinco géneros (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Trichoderma* y *Ulocladium*), los cuales ya se han encontrado previamente en biopelículas de microorganismos y en hojas de árboles. En un estudio realizado por Grbic y colaboradores (2010), se aislaron 23 especies de hongos de una biopelícula de algas formada sobre un monumento histórico de piedra. Entre ellas, se encontraron dos especies del género *Mucor*, dos especies de *Aspergillus* y una de *Fusarium*.

En la finca Valle Alto se encontraron hongos de los géneros *Aspergillus*, *Ulocladium* y *Trichoderma*. El género *Aspergillus* se encuentra comúnmente en hojarasca y materia en descomposición, y ha sido reportado en bosques de *Abies alba* y otras coníferas (Aoki *et al.* 1992; Zamora *et al.* 2008). El género *Trichoderma* se caracteriza por actuar como antagonista de hongos fitopatógenos como *Fusarium* y *Phytium*, mientras que *Ulocladium* es un hongo saprófito y patógeno que puede causar necrosis en hojas encinos, y varias familias de hierbas, pero no ha sido reportado para coníferas (Esfahani 2008; Vannini y Vettraino 2000).

En las muestras colectadas en la finca Valle Alto (Chimaltenango) se encontraron tres especies de *Fusarium* (*F. equiseti*, *F. graminearum* y *Fusarium* sp). *Fusarium equiseti* puede causar mal de talluelo (“damping-off”) en coníferas de Norteamérica y África (Gordon *et al.* 2015). Esta enfermedad también ha sido reportada para el pinabete, afecta las plántulas en vivero y es causada por hongos de los géneros *Phytophthora*,

*Pythium*, *Rhizoctonia* y *Fusarium* (Sánchez 2013). No se observaron síntomas de pudrición o marchitamiento por *Fusarium* en las hojas del pinabete infestadas con la enfermedad del alga verde, por lo que la presencia de esta especie puede deberse a la acumulación de esporas en la biopelícula.

Por otra parte, *Fusarium graminearum* es un hongo parásito que causa la fusariosis de la espiga en maíz y trigo. Sin embargo, esto no sugiere que esta especie esté afectando al pinabete, ya que se encuentra reportada únicamente para gramíneas (Miller *et al.* 2007). En un estudio realizado por Malaissi (2016), se aislaron ésta y otras seis especies de *Fusarium* (incluyendo *F. equiseti*) a partir de hojas de 14 familias de angiospermas, y se hallaron diez especies de plantas no gramíneas como hospedantes alternativos de *F. graminearum*. Se encontró que estas plantas actúan como una fuente de inóculo del hongo, ya que las esporas se acumulan en las hojas y flores donde pueden permanecer incluso por varios años. Tomando esto en consideración, el hongo probablemente provenga de plantaciones de maíz aledañas, un cultivo ampliamente distribuido en Guatemala que suele mezclarse con pinabete en sistemas agroforestales (INAB 2018). Se recomienda realizar estudios posteriores para monitorear la incidencia de *Fusarium* en esta localidad, ya que puede ocasionar enfermedades en el pinabete y en otras especies cultivadas en el área.

En la finca Buena Vista se aislaron las especies *Mucor hiemalis*, *Trichoderma viride* y *Trichoderma koningiopsis*, las cuales ha sido ampliamente reportadas en hojas de coníferas. Hayes (1965) investigó la descomposición de hojarasca de *Abies grandis*, y encontró que en hojas recién caídas se encontraban las especies *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium frequentans*, mientras que en hojas más viejas había una mayor abundancia de *Mucor hiemalis* y *Trichoderma viride*. Los estudios de Aoki y colaboradores (1992) y Brandsberg (1969) obtuvieron resultados similares, aislando *M. hiemalis* y *T. viride* a partir de hojas en descomposición de *Abies alba* y *A. grandis*, respectivamente. En otros estudios más recientes también se han aislado *M. hiemalis* y *T. viride* a partir de hojas en descomposición de otras especies de coníferas (Hanackova *et al.* 2015; Vandegrift *et al.* 2007; Zamora *et al.* 2008). La presencia de hongos saprófitos en las hojas de pinabete

puede explicarse también por la acumulación de hojas secas y materia en descomposición en la copa de los árboles. Esto resulta en una mayor deposición de esporas en las hojas, lo que contribuye a una mayor infestación de hongos en la biopelícula (Carroll *et al.* 1977; Dix y Webster, 1995).

En general, se encontraron hongos patógenos, saprófitos y benéficos en la biopelícula formada sobre las hojas de pinabete. Los hongos patógenos como *Fusarium* y *Mucor* pueden adherirse a la biopelícula e infectar los tejidos de la planta. Es posible que estos hongos infecten las algas de la biopelícula y sean la causa de la formación de parches necróticos (Hoppert *et al.* 2010), aunque esto deberá ser confirmado en futuras investigaciones. Los hongos saprófitos como *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Ulocladium* se encuentran generalmente en el suelo y en hojarasca (Farr *et al.* 1989), y se encontraron en las hojas del pinabete probablemente debido a la presencia de partículas de suelo y materia orgánica en descomposición en la biopelícula.

## **E. Cultivo *in vitro***

No fue posible obtener cultivos puros de las algas que conforman la biopelícula. Los hongos, bacterias y diatomeas suelen ser contaminantes comunes en cultivos de algas, en especial si se establecen a partir de muestras colectadas en campo (Andersen 2005). En este caso, no se le añadió glucosa al medio de cultivo para reducir la contaminación por hongos y bacterias (Kuhl y Lorenzen 1964). Aun así, todos los cultivos presentaron contaminación por hongos, por lo que es necesario optimizar el método de cultivo de las algas asociadas a la enfermedad del alga verde del pinabete.

Los hongos crecieron alrededor de las colonias de algas, lo que sugiere que la contaminación se dio a causa de microorganismos presentes en el material sembrado en el medio y no por contaminación ambiental del laboratorio. Además, las observaciones bajo microscopio indican que los hongos crecen junto a las algas en la biopelícula, por lo que al realizar los raspados para inocular las algas en el medio de cultivo también se añadieron hifas y esporas de estos mismos hongos. Esto indica que la metodología de

desinfección de las algas no fue efectiva para eliminar los hongos presentes en la biopelícula.

Existen varios métodos para aislar algas y establecer cultivos puros, uno de ellos consiste en realizar un proceso de desinfección previo a inocularlas algas en el medio de cultivo, así como se realizó en este caso. Se le agregó un fungicida de amplio espectro (Carbendazim) a la solución desinfectante; este ha sido indicado para la inhibición de *Fusarium*, por lo que es probable que se requiera de una mayor concentración o más tiempo de exposición a los hongos. En este caso solo se utilizó un tratamiento, por lo que se recomienda evaluar varias concentraciones y combinaciones de antibióticos y antifúngicos, así como diferentes tiempos de desinfección que puedan eliminar hongos y bacterias sin afectar el crecimiento las algas.

En caso no sea posible desinfectar las algas por completo, también se recomienda agregar antibióticos y antifúngicos al medio de cultivo para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos. Los antibióticos más comunes en el cultivo de algas son penicilina, estreptomicina sulfato y gentamicina, siendo este último el más utilizado. Sin embargo, las cianobacterias y algunas algas eucariotas son sensibles a los antibióticos, por lo que la exposición por varios días puede reducir o incluso inhibir su crecimiento (Andersen 2005; Holm-Hansen 1964).

Otro método efectivo para el aislamiento de algas consiste en realizar una dilución seriada, partiendo de una solución a una determinada concentración de células y diluyéndola varias veces previo al estriado en agar. Esto permite reducir la posibilidad de contaminación debido a la menor cantidad de microorganismos que se inoculan en el medio de cultivo (Holm-Hansen 1964). También es posible separar las algas de otros microorganismos utilizando filtros de membrana, con un tamaño de poro que permita el paso de bacterias y esporas de hongos, manteniendo las algas de mayor tamaño (Andersen 2005).

Se recomienda utilizar un medio de cultivo Bold Basal (BBM) o BG-11, ya que promueven especialmente el crecimiento de algas y han sido los más utilizados (Ilavarasi *et al.* 2011). El desarrollo de un protocolo de cultivo *in vitro* permitirá establecer cultivos puros de las algas y facilitará la identificación de un número mayor de especies que conforman la biopelícula.

## **F. Comparación entre localidades**

Se encontró que la composición de especies de algas y hongos en la biopelícula de las hojas del pinabete pueden variar de acuerdo a la localidad. Esta variación puede deberse a la madurez y la edad de la cobertura sobre las hojas. Se ha demostrado que existe una sucesión en las biopelículas de microorganismos similar a la que sucede en los bosques, ya que la abundancia y riqueza de especies de algas varía de acuerdo al tiempo. Las algas unicelulares y sarcinoides suelen ser los primeros organismos en formar y adherirse a la biopelícula; posteriormente se adhieren algas filamentosas, que suelen ser colonizadores tardíos (Schnurr y Allen 2015).

El alga del género *Desmococcus* se encontró en las tres localidades, lo que sugiere que esta especie es un colonizador temprano de la biopelícula, así como sugieren varios autores (Schnurr y Allen 2015; Sochting 1997). Se recomienda evaluar más plantaciones para confirmar si esta especie se encuentra en todas las localidades con incidencia del alga. En dos de las localidades se encontraron algas filamentosas (la finca Billeben y finca Valle Alto), lo que implicaría que estas tienen pinabetes que presentan una biopelícula más desarrollada. La edad de los árboles era similar en las tres localidades (8-10 años), por lo que esta variación puede deberse a factores ambientales que varían entre las localidades.

El pH, la humedad, la iluminación o la concentración de nutrientes también pueden afectar la riqueza de especies de algas en una biopelícula. Se ha demostrado que a mayor pH de la corteza y a mayor humedad la riqueza de especies de algas aumenta (Stifterova y Neustupa 2015), aunque sería necesario medir estas variables para asegurar que están afectando la riqueza de especies entre localidades. La intensidad de manejo de

un bosque también puede afectar las especies de una biopelícula, con una mayor riqueza en regiones con poca cobertura de dosel y alta intensidad de luz (Glaser *et al.* 2018).

## **G. Manejo de la enfermedad en las plantaciones**

Es necesario tomar en cuenta varias medidas fitosanitarias para realizar un buen manejo de la enfermedad en las plantaciones de pinabete. Las algas terrestres se dispersan por medio de fragmentos o células que se transportan a través del viento, agua y animales, llegando a recorrer largas distancias (Belnap y Lange 2001; Stifterova y Neustupa 2015). En este caso, los fragmentos de algas pueden transportarse fácilmente entre árboles, que suelen estar a una distancia de dos metros entre sí en las plantaciones (INAB 2018). Además, la falta de desinfección de herramientas utilizadas para la poda representa una forma de dispersión directa de la enfermedad entre individuos, transportando fragmentos de algas y esporas de hongos entre árboles. Tal como lo ha resaltado el INAB (2018), también es importante realizar un adecuado manejo de la sombra en la plantación, ya que la falta de podas y raleos puede incrementar la infestación de algas y hongos.

La concentración de nitrógeno se ha estudiado ampliamente como factor limitante en el crecimiento de algas (Novakova y Neustupa 2015; Poggio 2002). Ismail (2012) demostró que la aspersión de nitrógeno a diferentes niveles de oxidación, en forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), aumenta la proliferación de algas epífitas e incrementa la riqueza de especies en la biopelícula. Estos compuestos están presentes en los principales fertilizantes nitrogenados (Ruiz 1999), lo que sugiere que la aplicación de fertilizantes foliares podría representar una fuente de nutrientes para las algas. Esto deberá ser tomado en cuenta para el manejo fitosanitario de las plantaciones, y podría ser evaluado como factor que afecte la infestación de algas en los árboles.

Es necesario diagnosticar el nivel de infestación de la enfermedad en las plantaciones, por lo que se debe cuantificar el crecimiento de la biopelícula con el objetivo de determinar cuáles son los árboles más afectados. Es por esto que se recomienda establecer una escala semicuantitativa de infestación de 0 a 3, con categorías diferenciables en campo que permitan diagnosticar el estado de la enfermedad los árboles.

Esta misma metodología ha sido utilizada por otros autores para medir la biopelícula de algas en varias coníferas de Europa (Sochting 1997, Neustupa y Albrechtova 2003; Novakova y Neustupa 2015). Si se forma una cobertura densa de algas también es posible medir la biomasa pesando hojas individuales antes y después de remover la biopelícula. En el estudio de Sochting (1997) en *Picea abies* se muestrearon 100 hojas de 2 años de edad por árbol y se determinó que la cobertura de algas representaba en promedio el 11.6% del peso de cada hoja.

Una vez se haya establecido una metodología para el monitoreo en las plantaciones, se recomienda realizar ensayos de campo con pesticidas para evaluar su efectividad en el control de las algas y hongos. El Instituto Nacional de Bosques (2008) reporta que el sulfato de cobre ha dado buenos resultados, este es un componente del caldo Bordelés, un fungicida y alguicida ampliamente utilizado en la agricultura orgánica (Reuther *et al.* 1978). El sulfato de cobre reduce la producción e inhibe la germinación de esporas y compromete la integridad de la membrana celular de los hongos. Además, los iones de cobre catalizan la producción de radicales libres que causan estrés oxidativo en las células (Oziengbe y Osazee 2012).

El polisulfuro de calcio (“lime sulfur”) también es efectivo para el control de líquenes y algas, está compuesto por hidróxido de calcio y azufre acuoso y su pH es altamente alcalino (alrededor de 11). Este no debe aplicarse directo al follaje por lo que no es recomendado para árboles perennifolios como el pinabete. El uso de fungicidas de amplio espectro también puede reducir la infestación de hongos en la biopelícula, aunque estos podrían no afectar a las algas (Beckerman 2008; Reuther *et al.* 1978).

## IX. CONCLUSIONES

- La enfermedad del alga verde del pinabete es causada por una biopelícula de algas y hongos que se forma sobre el tronco, ramas y hojas, se encontraron en total cuatro especies de algas y diez especies de hongos en las fincas Billeben, Valle Alto y Buena Vista.
- Se identificaron cuatro especies de algas: dos filamentosas del género *Klebsormidium*, una sarcinoide del género *Desmococcus* y una unicelular perteneciente a la clase Trebouxiophyceae.
- Se identificaron diez especies de hongos: *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *F. graminearum*, *F. equiseti*, *Mucor* sp., *M. hiemalis*, *Trichoderma* sp., *T. viride*, *T. koningiopsis*, *Ulocladium* sp., aislados a partir de hojas infestadas con la biopelícula.
- En la finca Billeben (Guatemala) se encontraron tres especies de algas (*Desmococcus* sp., *Klebsormidium* sp. y Trebouxiophyceae) y tres especies de hongos (*Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp. y *Ulocladium* sp.)
- En la finca Valle Alto (Chimaltenango) se encontraron dos especies de algas (*Desmococcus* sp., *Klebsormidium* sp.) y cuatro especies de hongos (*Fusarium graminearum*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium* sp. y *Mucor* sp.)
- En la finca Buena Vista (San Marcos) se encontró una especie de algas (*Desmococcus* sp.) y tres especies de hongos (*Mucor hiemalis*, *Trichoderma koningiopsis* y *Trichoderma viride*)
- El alga *Desmococcus* sp. fue la única especie que se encontró en común en las tres localidades, por lo que podría ser un colonizador temprano de la biopelícula
- No se encontró ningún género de hongos que estuviera presente en todas las localidades, los géneros *Mucor* y *Trichoderma* se encontraron en dos de las tres plantaciones.

- No fue posible realizar cultivos *in vitro* de las algas debido a la contaminación por hongos presentes en la biopelícula de las hojas del pinabete.
- La infestación de las ramas inicia en la parte inferior de la rama y luego se extiende a la parte superior, probablemente debido a que la sombra favorece el crecimiento de algas y hongos.
- Las hojas recién brotadas no presentan crecimiento de la biopelícula, por lo que se asume que la infestación inicia, por lo menos, a partir de los cinco meses.

## X. RECOMENDACIONES

### *Metodología*

- Evaluar más localidades para determinar si comparten las especies de algas y hongos identificados en este estudio.
- Registrar la secuencia del cambio de coloración de la biopelícula de verde a gris, y asociarla con el cambio en la riqueza de algas y hongos para establecer una sucesión de especies.
- Elaborar un protocolo de cultivo *in vitro* de las algas asociadas a la enfermedad del alga verde del pinabete, optimizando el método de purificación de las algas por medio de la adición de antifúngicos de amplio espectro en el medio de cultivo, dilución seriada o filtración a través de membranas.
- Una vez se hayan realizado cultivos *in vitro* de las algas, realizar un análisis genético por medio de marcadores moleculares para confirmar la identificación a nivel de especie.
- Comparar la riqueza de especies de algas en función de la edad de las hojas, para establecer si las hojas más viejas tienen una diferente composición de microorganismos.
- Evaluar factores ambientales que puedan estar afectando la riqueza de especies de algas de la biopelícula, estableciendo una correlación con variables como la sombra, humedad, pH de la corteza y la deposición de nitrógeno.
- Determinar si existe una relación simbiótica de mutualismo o parasitismo entre las algas y los hongos identificados por medio de tinciones y técnicas de cultivo *in vitro*.

### *Manejo de la enfermedad en las plantaciones*

- Según las especies de hongos identificados, realizar ensayos *in vitro* para evaluar el potencial de inhibición de ciertos pesticidas, previo a realizar ensayos en campo.
- Desarrollar una escala de infestación de la enfermedad de 0 a 3 con el objetivo de diagnosticar los árboles y facilitar el monitoreo de la enfermedad en las plantaciones.
- Complementar el monitoreo de infestación de la enfermedad midiendo la biomasa de la biopelícula, pesando las hojas de pinabete antes y después de remover la cobertura de algas.
- Monitorear la incidencia de enfermedades en cultivos aledaños ya que los hongos patógenos pueden acumularse en la biopelícula de algas sobre las hojas del pinabete.
- Una vez establecido un método de monitoreo de la enfermedad, realizar ensayos en campo con diferentes pesticidas (sulfato de cobre, Mancozeb) para evaluar su efectividad en el control de las algas y hongos identificados.
- Registrar la estacionalidad de la enfermedad por medio del monitoreo de brotes nuevos para identificar los meses de colonización de la biopelícula, lo que permitirá conocer el período óptimo para la aplicación de pesticidas.
- Resaltar la importancia de las podas y el raleo en las plantaciones de pinabete, ya que la falta de estas disminuye la iluminación y aireación en la copa del árbol, favoreciendo el desarrollo de la enfermedad.
- Elaborar un manual con la información básica de la enfermedad del alga verde y recomendaciones para su manejo, con el objetivo de apoyar a los productores de pinabete en la identificación, monitoreo y tratamiento de la enfermedad en las plantaciones.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-Planter, Eduardo; G.R. Furnier y L.E. Eguiarte. 2000. «Low levels of genetic variation within and high levels of genetic differentiation among populations of species of *Abies* from Southern Mexico and Guatemala». *American Journal of Botany*. (87): 362–371.
- AlgaeBase. (2019). Recuperado el 27 de marzo de 2020, de World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway: <https://www.algaebase.org/content/?tc=accept&undefined>
- Alwi, Ihsan, *et al.* 2015. «Bark pH as a factor affecting the density of epiphytic terrestrial algae in Taman Wetland Putrajaya, Malaysia». *Journal of Applied and Physical Sciences*. 1(1): 13-18.
- Andersen, Robert. 2005. *Algal Culturing Techniques*. Estados Unidos: Elsevier Academic Press. 589 págs.
- Aoki, Tokumasu y F. Oberwinkler. 1992. «Fungal Succession on fir needles in Germany». *Trans. Mycol. Soc. Japan*. (33): 359-374.
- Archibald, John; A.G. Simpson y C.H. Slamovits. 2017. *Handbook of the Protists*. 2ª edición. Londres: Springer International Publishing. 1645 págs.
- Badotti, Fernanda, *et al.* 2017. «Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi)». *BMC Microbiology*. (42): 114-120.
- Barrera, Whitmer. 2017. «Decomisan 390 mil ramillas de pinabete en San Pedro Sacatepéquez». *Prensa Libre* [Guatemala]. 3 de diciembre de 2017, pág 10.
- Beckerman, Janna. 2008. *Using Organic Fungicides. Disease Management Strategies for Horticultural Crops*. Indiana: Purdue University. 4 págs.

- Belnap, Jayne y O.L. Lange. 2001. *Biological Soil Crusts: Structure, Function and Management*. Berlín: Springer. 479 págs.
- Brandsberg, John. 1969. «Fungi Isolated from Decomposing Conifer Litter». *Mycologia*. 61(2): 373-381.
- Brooks, Fred, *et al.* 2015. «The Trentepohliales (Ulvophyceae, Chlorophyta): an unusual plant order and its novel plant pathogen, Cephaleuros». *Plant Disease*. 99(6): 740-753.
- Budel, Burkhard. 2002. «Diversity and ecology of Biological Crusts». *Progress in Botany*. (63): 386-404.
- Carroll, Ferdinand; E. Muller y B.C. Sutton. 1977. «Preliminary Studies on the Incidence of Needle Endophytes in some European Conifers». *Sydowia*. (29): 87-103.
- Castillo, Mike. (2016). «Dejan las hortalizas por cultivo de pinabete en Huehuetenango». *Prensa Libre* [Guatemala]. 20 de noviembre de 2016, pág 14.
- Cavalier-Smith, Thomas. 2016. «Higher classification and phylogeny of Euglenozoa». *European Journal of Protistology*. (56): 250-276.
- Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP). 2010. *Estrategia Nacional para la Conservación de Pinabete para el período 2008-2017*. Departamento de Manejo Forestal. Guatemala. 206 págs.
- Das, Sudipta y R.K. Gupta. 2015. «Colonization of micro-algae on the painted iron surfaces». *Phykos*. 45(2): 9-12
- DeHayes, Donald. 1980. «Genetic variation in susceptibility of *Abies balsamea* to *Mindarus abietinus*». *Canadian Journal of Forest Research*. (11): 30-35.
- De La Cruz, R. 1976. *Clasificación de zonas de vida de Guatemala basada en el sistema Holdridge*. Centro Universitario de Oriente. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- De Vries, Jan y J.M. Archibald. 2018. «Plant evolution: landmarks on the path to terrestrial life». *New Phytologist*. (217): 1428–1434.
- Dix, Neville y J. Webster. 1995. *Fungal Ecology*. Washington: Chapman & Hall. 549 págs.

- Esfahani, Mehdi. 2018. «Identification of *Ulocladium atrum* causing potato leaf blight in Iran». *Phytopathologia Mediterranea*. 57(1): 112-114.
- Farr, David, *et al.* 1989. *Fungi in plants and plant products in the United States*. Minnesota: American Phytopathological Society. 1252 págs.
- Frampton, John; F. Isik y D.M. Benson. 2013. «Genetic variation in resistance to *Phytophthora cinnamomi* in seedlings of two Turkish *Abies* species». *Tree Genetics & Genomes*. (9): 53-63.
- Freystein, Katharina y W. Reisser. 2010. *Green Biofilms on Tree Bark: more than just algae. Symbioses and Stress: Joint Ventures in Biology*. Nueva York: Springer Science & Business Media. 573 págs.
- Funnell-Harris, Deanna, *et al.* 2013. «Isolation and characterization of the grain mold fungi *Cochliobolus* and *Alternaria* spp. from sorghum using semiselective media and DNA sequence analyses». *Canadian Journal of Microbiology*. 59(2): 87-96.
- Gaya, Ester, *et al.* 2018. *State of the World's Fungi 2018*. Londres: Royal Botanic Gardens Kew. 92 págs.
- Glaser, Karin. 2018. «Algal richness in BSCs in forests under different management intensity with some implications for P cycling». *Biogeosciences* (15): 4181–4192.
- Graham, Linda y L.W. Wilcox. 2000. *Algae*. Washington: Prentice Hall. 1416 págs.
- Gordon, Thomas; C. L. Swett y M. J. Wingfield. 2015. «Management of *Fusarium* diseases in conifers». *Crop Protection* (15): 1-12.
- Grbic, Ljaljevic, *et al.* 2010. «Biofilm forming cyanobacteria, algae and fungi in two historic monuments in Belgrade, Russia». *Arch. Biol. Sci.* 62(3): 625-631.
- Guiry, Michael. 2012. «How many species of algae are there? ». *Journal of Phycology*. 48(5): 1057-1063.
- Gustavs, Lydia, *et al.* 2015. «Mixotrophy in the terrestrial green algae *Apatococcus lobatus* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta)». *Journal of Phycology* 52(2): 311-314.

- Hanackova, Zuzana, *et al.* 2015. «Fungal succession in the needle litter of a montane *Picea abies* forest investigated through strain isolation and molecular fingerprinting». *Fungal Ecology* (13): 157-166.
- Hayes, Albert. 1965. «Studies on the decomposition of coniferous leaf litter, II. Changes in external features and succession of microfungi». *Journal of Soil Science* 16(2): 242-258.
- Hodac, Ladislav. 2015. *Green algae in soil: assessing their biodiversity and biogeography with molecular-phylogenetic methods based on cultures*. Tesis de Doctorado. Alemania: Georg-August-Universität Göttingen. 570 págs.
- Hodkinson, Trevor. 2011. *Climate change, Ecology and Systematics. Terrestrial green algae: systematics, biogeography and expected responses to climate change*. Reino Unido: Cambridge University Press. 227 págs.
- Hoffmann, Lucien. 1989. «Algae of terrestrial habitats». *Botanical Reviews*. (55): 77–105.
- Holm-Hansen, Osmund. 1964. «Isolation and Culture of Terrestrial and Fresh-water Algae of Antarctica». *Phycologia* 4(1): 43-52.
- Holzinger, Andreas y U. Karsten. 2013. «Desiccation stress and tolerance in green algae: consequences for ultrastructure, physiological, and molecular mechanisms». *Frontiers in Plant Science* 4(327): 1-18.
- Hoppert, Michael. *et al.* 2010. «Structure and Reactivity of a Biological Soil Crust from a xeric sandy Soil in Central Europe». *Geomicrobiology*. (21): 183-191.
- Ilavarasi, Asokaraja, *et al.* 2011. «Optimization of various growth media to freshwater microalgae for biomass production». *Biotechnology* 10(6): 540-545.
- Instituto Nacional De Bosques (INAB). 2017. *Pinabete (Abies guatemalensis Rehder). Paquete Tecnológico Forestal*. Departamento de Investigación. Guatemala. 40 págs.
- Instituto Nacional de Bosques (INAB). 2018. *Manual de campo para el manejo sanitario de plantaciones de árboles navideños de pinabete*. Cooperativa Integral Agrícola Joya Hermosa de las Tres Cruces R.L. Guatemala. 16 págs.
- Instituto Nacional de Bosques e Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente de la Universidad Rafael Landívar (INAB y IARNA-URL). 2012. *Primer Informe*

- Nacional sobre el Estado de los Recursos Genéticos Forestales en Guatemala.* Guatemala. 186 págs.
- Ismail, Asmida. 2012. *Effects of atmospheric pollutants on epiphytic terrestrial algae.* Tesis de Doctorado. Reino Unido: Imperial College London. 197 págs.
- Jaramillo-Correa, Juan Pablo, *et al.* 2008. «Ancestry and divergence of subtropical montane forest isolates: molecular biogeography of the genus *Abies* (Pinaceae) in southern México and Guatemala». *Molecular Ecology*. (17): 2476–2490
- John, David y F. Rindi. 2014. *Freshwater algae of North America: Ecology and Classification. Chapter 8, Filamentous (Nonconjugating) and Plantlike Green Algae.* 2ª. edición. Washington: Academic Press. 427 págs.
- Kerney, Ryan, *et al.* 2011. «Intracellular invasion of green algae in a salamander host». *Proceedings of the Natural Academy of Sciences*. 108(16): 6497–6502.
- Kollmann, John. 2008. «Factor limiting the regeneration of an endangered conifer in the highlands of Guatemala». *Journal for Nature Conservation*. (16): 146-156.
- Krug, John. 2004. *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods. Chapter 1: Moist chambers for the development of fungi.* Nueva York: Elsevier Science & Technology. 777 págs.
- Kuhl, Adolf y H. Lorenzen. 1964. «Handling and Culturing of *Chlorella*». *Methods in Cell Biology*. (1): 159-187.
- Leliaert, Frederik, *et al.* 2011. «Into the deep: New discoveries at the base of the green plant phylogeny». *Bioessays*. 33(9): 683-692.
- Lemes-Da Silva, Nadia, *et al.* 2010. «Corticolous green algae from tropical forest remnants in the northwest region of São Paulo State, Brazil». *Brazilian Journal of Botany*. 33(2): 215 – 226.
- Lin, Ching, *et al.* 2015. «Biodiversity of the epiphyllous algae in a *Chamaecyparis* forest of northern Taiwan». *Botanical Studies*. (53): 489 – 499.
- Longo, María José. 2019. «Qué pasará con las 23 mil ramillas de pinabete incautadas en el 2019?». *Prensa Libre* [Guatemala]. 31 de diciembre de 2019, pág 8.

- Lopez-Bautista, Juan, *et al.* 2007. *The Systematics of Subaerial Algae. Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*. Nueva York: Springer Science & Business Media. 617 págs.
- Madden, Thomas. 2002. *The NCBI Handbook. Chapter 16: The BLAST Sequence Analysis Tool*. 2ª edición. Boston: National Center for Biotechnology Information. 189 págs.
- Malaissi, Tomás. 2016. *Fusariosis de la espiga de trigo: las malezas como fuente de inóculo*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires: Repositorio Institucional de la UNLP. 49 págs.
- Manoharachary, Chakravarthula, *et al.* 2010. *Nature at work: Ongoing saga of evolution. Chapter 10. Biodiversity, phylogeny and evolution of fungi*. India: The National Academy of Sciences. 159 págs.
- Martínez-Arévalo, J.V. 2016. «Los bosques de *Abies guatemalensis* Rehder de San Marcos, Guatemala: una oportunidad para su restauración ecológica». *Ciencia, Tecnología y Salud*. 3(1): 27-46.
- Miller, Shea, *et al.* 2007. «Colonization of maize silks by *Fusarium graminearum*, the causative organism of gibberella ear rot». *Canadian Journal of Botany*. 85(4): 369-376.
- Mukhin, Victor, *et al.* 2016. «Mycetobiont Symbiotic Algae of Wood-Decomposing Fungi». *Russian Journal of Ecology* 47(2): 133–137.
- Mukhin, Victor, *et al.* 2018. «Lichen-like Symbiotic Associations of Wood-decaying Fungi and Algae. I. Biodiversity and Ecology of Photobionts». *Ecology and Geography of Plants and Plant Communities*. (20): 134-142.
- Murray, Michael y W. Thompson. 1980. «Rapid isolation of high molecular weight plant DNA». *Nucleic Acids Research*. 8(19): 4321-4325.
- Neustupa, Jiri y J. Albrechtova. 2003. «Aerial algae on spruce needles in the Krusne Hory Mts., Czech Republic». *Czech Phycology Olomouc* (3): 161-167.
- Neustupa, Jiri y P. Skaloud. 2008. «Diversity of subaerial algae and cyanobacteria on tree bark in tropical mountain habitats». *Biologia*. 63(6): 806-812.

- Neustupa, Jiri y P. Skaloud. 2010. «Diversity of subaerial algae and cyanobacteria growing on bark and wood in the lowland tropical forests of Singapore». *Plant Ecology and Evolution*. 143(1): 51 –62.
- Nichols, D. (2014). Recuperado el 14 de marzo de 2020, de *Klebosrmidium crenulatum*, *NatureSpot*:  
<https://www.naturespot.org.uk/species/klebsormidium-crenulatum>
- Novakova, Radka y J. Neustupa. 2015. «Microalgal biofilms on common yewneedles in relation to anthropogenic air pollution in urban Prague, Czech Republic». *Science of the Total Environment* (508): 7-12.
- Oziengbe, Oredo y J.O. Osazee. 2012. «Antifungal activity of copper sulphate against *Colletotrichum gloeosporioides*». *Journal of Asian Scientific Research* 2(12): 835-839.
- Parker, Tracey. 2008. *Trees of Guatemala*. Texas: The Tree Press. 1033 págs.
- Phillips, Donald. y D.A. Burdekin. 1992. *Diseases of Forest and Ornamental Trees*. Londres: The MacMillan Press. 581 págs.
- Poggio, Laura. 2002. *Epiphytic algae on Norway spruce needles in Sweden - geographical distribution, time-trends and influence of site factors*. Tesis Swedish University of Agricultural Sciences. Suecia: Department of Forest Soils. 32 págs.
- Raghukumar, Chandralata. 1987. «Fungal parasites of the green alga *Chaetomorpha media*». *Diseases of aquatic organisms*. (3): 147-150.
- Reddy, Solipuram. 2001. *University Botany I: (Algae, Fungi, Bryophyta And Pteridophyta)*. Volumen 1. Estados Unidos: New Age International. 432 págs.
- Reuther, Walter. 1978. *The Citrus Industry*. Volumen IV. California: UCANR Publications. 362 págs.
- Reynoso, Jonathan. 2008. «Bosque natural, producción comercial y control del pulgón *Mindarus guatemalensis* en *Abies guatemalensis* Rehder en el altiplano occidental de Guatemala». Tesis Universidad San Carlos de Guatemala. 178 págs.
- Rindi, Fabio y M. R. Guiry. 2004. «Composition and spatial variability of terrestrial algal assemblages occurring at the bases of urban walls in Europe». *Phycologia* 43(3): 225-235.

- Ruiz, Rafael. 1999. «Características de algunos fertilizantes nitrogenados para uso en goteo». *Serie La Platina* (82): 1-4.
- Samolov, Elena, *et al.* 2018. «Usual alga from unusual habitats: biodiversity of Klebsormidium (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) from the phylogenetic superclade G isolated from biological soil crusts». *Molecular Phylogenetics and Evolution*. (133): 236-255.
- Sánchez, Luis. 2013. «Evaluación de cinco productos orgánicos para la prevención del “damping-off” (mal del talluelo) en semilleros de pinabete (*Abies guatemalensis* Rehder) en el vivero municipal Palestina de Los Altos, Quetzaltenango». Tesis Universidad San Carlos de Guatemala. 50 págs.
- Schnurr, Peter y D.G. Allen. 2015. «Factors affecting algae biofilm growth and lipid production: A review». *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (52): 418–429.
- Smith, Thomas y S. Stephenson. 2007. «Algae associated with Myxomycetes and leafy liverworts on decaying spruce logs». *CASTANEA* 72(1): 50-57.
- Sochting, Ulreich. y B.C. Sutton. 1997. «*Scolecotheca cornuta* gen. et sp. nov. on needles of *Picea abies* from Denmark». *Mycological Research*. 101(11): 1366-1370.
- Sochting, Ulreich. 1997. «Epiphyllic cover on spruce needles in Denmark». *Ann. Bot. Fennici*. (34): 157–164.
- Standley, Paul, y J.A. Steyermark. 1958. *Flora of Guatemala*. Estados Unidos: Fieldana. Botany. 1140 págs.
- Stewart, Phillip y S. Globig. 2011. *Phytopathology in Plants*. Canadá: Apple Academic Press. 331 págs.
- Stifterova, Anna y J. Neustupa. 2015. «Community structure of corticolous microalgae within a single forest stand: evaluating the effects of bark surface pH and tree species». *Fottea Olomouc* 15(2): 113-122.
- Strandby, Andersen, *et al.* 2006. «Conservation and utilization of *Abies guatemalensis* Rehder – an endemic conifer in Central America». *Biodiversity and conservation*. (15): 3131–3151.

- Strandby, Andersen, *et al.* 2008. «Provenance variation in germination and seedling growth of *Abies guatemalensis* Rehder». *Forest Ecology and Management*. (255): 1831–1840.
- Strandby, Andersen, *et al.* 2009. «A morphometric study of the *Abies religiosa* – *hickelii* – *guatemalensis* complex (Pinaceae) in Guatemala and Mexico». *Plant Systematics and Evolution*. (280): 59–76.
- Suutari, Milla. *et al.* 2010. «Molecular evidence for a diverse green algal community growing in the hair of sloths and a specific association with *Trichophilus welckeri* (Chlorophyta, Ulvophyceae)». *BMC Evolutionary Biology*. 10(86): 1-12.
- Terhonen, Eeva, *et al.* 2011. «The effect of latitude, season and needle-age on the mycota of Scots pine (*Pinus sylvestris*) in Finland». *Silva Fennica* 45(3): 301–317.
- Thorn, Greg y M.D. Lynch. 2007. *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry. Chapter 6: Fungi and Eukaryotic Algae*. Nueva York: Elsevier. 552 págs.
- Vandegrift, Elly, *et al.* 2007. «Fungal Genetic Diversity within Decomposing Woody Conifer Roots in Oregon, U.S.A.». *Northwest Science* 81(2): 125-138.
- Vannini, Andrea y A.M. Vettraino. 2000. «*Ulocladium chartarum* as the causal agent of a leaf necrosis on *Quercus pubescens*». *Forest Pathology*. (30): 297-303.
- Veiga, Jorge. 2008. «Modelos de estudios en investigación aplicada: conceptos y criterios para el diseño». *Med. Secur. Trab.* 54(210): 81-88.
- Videv, Pavel, *et al.* 2017. «Epimycotic Algae on the Medicinal Fungus *Trametes versicolor* (L.) Lloyd.». *International Journal of Advanced Research in Botany (IJARB)*. 3(2): 18-26.
- Warren, Steven, *et al.* 2019. «Reproduction and Dispersal of Biological Soil Crust Organisms». *Frontiers in Ecology and Evolution*. 7(344): 1-18.
- Wehr, John y R.G. Sheath. 2015. *Freshwater algae of North America. Chapter 2. Habitats of Freshwater Algae*. Reino Unido: Elsevier. 87 págs.
- Zamora, Paula, *et al.* 2008. «Fungi in needles and twigs of pine plantations from northern Spain». *Fungal Diversity*. (30): 171-184.



## XII. ANEXOS

### Anexo 1. Información de los marcadores utilizados para la identificación de hongos

Marcador	Secuencia de los cebadores (dirección 5' - 3')	Tamaño esperado (pb)
EF	F: CACGGTTGCAAGCTTTGTCC	1070
	R: TTGAATGACGATCGCGGGTGC	
ITS	F: ATGGCCGAGGTCGCTCACAA	1250
	R: ATACTCGCCTGCTTGAACGCG	

### Anexo 2. Receta de PCR para la amplificación de marcador EF

Reactivo	Cantidad ( $\mu$ L) 1 reacción	Cantidad ( $\mu$ L) 12 reacciones
H <sub>2</sub> O	17.7	212.4
Buffer 10x, MgCl <sub>2</sub> 25mM	2.5	30
dNTP's 25mM	1	12
Primer (forward) 10mM	1.3	15.6
Primer (reverse) 10mM	1.3	15.6
Taq polimerasan 5U/ $\mu$ L	0.2	2.4

### Anexo 3. Receta de PCR para la amplificación de marcador ITS

Reactivo	Cantidad (μL) 1 reacción	Cantidad (μL) 12 reacciones
H2O	17.7	212.4
Buffer 10x, MgCl <sub>2</sub> 25mM	2.5	30
dNTP's 25mM	1	12
Primer (forward) 10mM	1.3	15.6
Primer (reverse) 10mM	1.3	15.6
Taq polimerasan 5U/μL	0.2	2.4

### Anexo 4. Programa de termociclador para la amplificación de marcador EF

Repeticiones	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
	Desnaturalización inicial	95	15 minutos
35 ciclos	Desnaturalización	94	30 segundos
	Anillamiento	52	90 segundos
	Extensión	72	1 minuto
	Extensión final	60	30 minutos

### Anexo 5. Programa de termociclador para la amplificación de marcador ITS

Repeticiones	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
	Desnaturalización inicial	95	15 minutos
35 ciclos	Desnaturalización	94	30 segundos
	Anillamiento	56	90 segundos
	Extensión	72	1 minuto
	Extensión final	60	30 minutos

**Anexo 6.** Identificación de hongos aislados de hojas de pinabete con base en las secuencias de regiones amplificadas EF e ITS

<b>Muestra</b>	<b>Marcador</b>	<b>Identificación</b>	<b>Porcentaje de cobertura</b>	<b>Porcentaje de identidad</b>
1	EF	<i>Fusarium graminearum</i> FVRRES	93.00%	96.00%
	ITS	<i>Fusarium graminearum</i> isolate PAK-14	99.00%	100.00%
2	EF	<i>Fusarium equiseti</i> strain Salicorn 8	92.97 %	96.04 %
	ITS	<i>Fusarium equiseti</i> isolate Anna6	99.57 %	100.00 %
3	EF	<i>Trichoderma viride</i> strain GJS89-127	94.54 %	97.95 %
	ITS	<i>Trichoderma viride</i> strain CTCCSJ-A-SD33116	90.78 %	94.23 %
4	EF	<i>Mucor hiemalis</i> f. <i>hiemalis</i>	87.23 %	93.55 %
	ITS	<i>Mucor hiemalis</i> isolate SL71_64a_Y2	99.31 %	99.65%
5	EF	<i>Trichoderma koningiopsis</i> isolate XXTF7	86.88 %	96.14 %
	ITS	<i>Trichoderma koningiopsis</i> strain NECC30678	19.23 %	100.00%