



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO**  
POSTGRADO EN FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA

**ASOCIACIÓN DE LA MUERTE  
DESCENDENTE DE MANGO (*Mangifera  
indica* L.) CON LA PUDRICIÓN DEL  
PEDÚNCULO EN LA COSTA DEL PACÍFICO  
DE MÉXICO**

**MARICARMEN SANDOVAL SÁNCHEZ**

**TESIS**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2012

La presente tesis, titulada: "**Asociación de la muerte descendente de mango (*Mangifera indica* L.) con la pudrición del pedúnculo en la Costa del Pacífico de México**", realizada por la alumna: **MARICARMEN SANDOVAL SÁNCHEZ**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

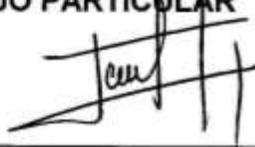
**MAESTRA EN CIENCIAS**

**FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO: \_\_\_\_\_



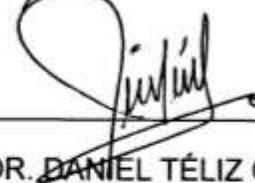
DR. DANIEL NIETO ÁNGEL

ASESOR: \_\_\_\_\_



DR. JOSÉ SÉRGIO SANDOVAL ISLAS

ASESOR: \_\_\_\_\_



DR. DANIEL TÉLIZ ORTIZ

ASESOR: \_\_\_\_\_



DR. MARIO OROZCO SANTOS

Montecillo, Texcoco, Estado de México. Mayo de 2012

ASOCIACIÓN DE LA MUERTE DESCENDENTE DE MANGO (*Mangifera indica* L.)  
CON LA PUDRICIÓN DEL PEDÚNCULO EN LA COSTA DEL PACÍFICO DE  
MÉXICO

Maricarmen Sandoval Sánchez, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2012

Las pudriciones del pedúnculo de frutos y muerte descendente de ramas de mango (*Mangifera indica* L.) son asociadas con hongos de la familia Botryosphaeriaceae. Los objetivos de este estudio fueron identificar morfológica y filogenéticamente diferentes especies de hongos aislados de frutos con pudrición del pedúnculo y ramas con muerte descendente de los cultivares 'Ataulfo', 'Kent' y 'Tommy Atkins', provenientes de cinco Estados productores de México, y determinar la asociación entre ambas enfermedades. Las muestras se recolectaron entre marzo de 2010 y junio de 2011. Los hongos asociados con la pudrición del pedúnculo correspondieron a *Lasiodiplodia theobromae* y *Neofusicoccum parvum*, y se detectó también a *Neofusicoccum* sp.; los hongos asociados con la muerte descendente de ramas correspondieron a *Lasiodiplodia pseudotheobromae* y *N. parvum*. Se reporta una posible asociación de pudrición del pedúnculo con muerte descendente, ya que los hongos asociados con muerte descendente, fueron patogénicos al inocularlos en pedúnculos de frutos de 'Ataulfo', 'Kent' y 'Tommy Atkins'. Este parece ser el primer reporte de *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae* y *N. parvum* causando pudrición del pedúnculo o muerte descendente de ramas de mango en México.

**Palabras clave:** *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum* sp., *Mangifera indica*.

ASSOCIATION OF DIEBACK OF MANGO (*Mangifera indica* L.) WITH STEM-END  
ROT IN THE PACIFIC COAST OF MEXICO

Maricarmen Sandoval Sánchez, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2012

Stem-end rots of fruits and dieback of branches of mango (*Mangifera indica* L.) are associated with fungi of the family Botryosphaeriaceae. The objectives of this study were to identify different species of fungi morphologically and phylogenetically, isolated from fruits with stem-end rot and branches showing dieback in the cultivars 'Ataulfo', 'Kent' and 'Tommy Atkins', coming from five states of Mexico, and to determine the association between both diseases. Samples were collected between March 2010 and June 2011. The fungi associated with stem-end rot corresponded to *Lasiodiplodia theobromae* and *Neofusicoccum parvum*; *Neofusicoccum* sp. was also detected. Fungi associated with dieback of branches corresponded to *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *N. parvum*. A possible association of stem-end rot and dieback is reported, as the fungi associated with dieback were pathogenic when inoculated on peduncles of fruits of 'Ataulfo', 'Kent' and 'Tommy Atkins'. This seems to be the first report of *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae* and *N. parvum* causing stem-end rot of fruits or dieback of branches of mango in Mexico.

**Key words:** *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum* sp., *Mangifera indica*.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento de mis estudios de postgrado y por apoyar el desarrollo de la ciencia en México.

Al Colegio de Postgraduados, por el financiamiento parcial del presente trabajo de investigación, a través del Fideicomiso revocable de administración e inversión no. 167304 para el establecimiento y operación de los fondos para la investigación científica y desarrollo tecnológico.

A todos los profesores del Colegio de Postgraduados, que han contribuido positivamente en mi formación académica.

Al Dr. Daniel Nieto Ángel, por su amistad, planeación y dirección de este trabajo de investigación, con aprecio.

Al Dr. José Sergio Sandoval Islas y M. C. Ma. del Carmen Sánchez Gálvez, por su invaluable apoyo, orientación y comprensión a lo largo de mi vida.

Al Dr. Daniel Téliz Ortiz, Dr. Mario Orozco Santos y Dra. Hilda Victoria Silva Rojas, con mucho respeto y admiración, por sus valiosos conocimientos, aportaciones, sugerencias y correcciones en la realización de mi tesis.

Al M. I. José Manuel Vargas Sállago, M. C. Juan Manuel Tovar Pedraza, M. C. Luis Alfonso Aguilar, Ing. Jesús Orozco Santos, Miguel Ángel Aussenac Pérez e Ing. Ilobana Alanis Martínez, por su apoyo en la fase de campo y de laboratorio.

Para María Fernanda,  
mis papás y  
José Manuel,  
con amor.

## CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	ix
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	x
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	3
2.1. Objetivos generales .....	3
2.2. Objetivos particulares .....	3
<b>3. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	4
3.1. Importancia del cultivo .....	4
3.2. Enfermedades del mango .....	4
3.3. Pudriciones del pedúnculo de frutos de mango .....	5
3.3.1. Agentes causales .....	5
3.3.2. Síntomas .....	6
3.3.3. Características morfológicas de los agentes causales .....	7
3.3.4. Distribución geográfica .....	8
3.3.5. Epidemiología .....	9
3.3.6. Manejo de la enfermedad .....	10
3.4. Desórdenes de declinación .....	11
3.4.3. Manejo de la enfermedad .....	13
3.5. La familia Botryosphaeriaceae: su relación con pudriciones de pedúnculo y muerte descendente .....	14
3.5.1. Taxonomía y estudios filogenéticos .....	14
3.5.2. Especies importantes .....	16
3.5.3. Características morfológicas de Botryosphaeriaceae .....	17
3.5.4. Endofitismo de Botryosphaeriaceae .....	17
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	19
4.1. Colecta de frutos y ramas .....	19
4.2. Aislamientos .....	20
4.3. Pruebas de asociación entre hongos aislados de frutos y ramas .....	20
4.4. Análisis estadístico de la velocidad de crecimiento de la infección .....	22
4.5. Caracterización morfológica .....	22
4.5.1. Características culturales .....	22
4.5.2. Morfología de estructuras reproductivas .....	23
4.6. Identificación molecular .....	23

4.6.1. Extracción de DNA.....	23
4.6.2. Amplificación mediante PCR de los genes ribosomales .....	24
4.6.3. Análisis filogenético de la región ITS .....	24
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>26</b>
5.1. Descripción de síntomas de frutos y ramas colectados .....	26
5.2. Frecuencias de aislamientos .....	28
5.2.1. Frecuencia de aislamientos de frutos .....	28
5.2.2. Frecuencia de aislamientos de ramas .....	29
5.3. Pruebas de asociación entre hongos aislados de frutos y ramas.....	30
5.4. Análisis estadístico de la velocidad de crecimiento de la infección .....	33
5.5. Caracterización morfológica .....	36
5.6. Identificación molecular .....	41
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>50</b>
<b>7. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>51</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Historia de la clasificación taxonómica del género <i>Botryosphaeria</i> .....	15
<b>Cuadro 2.</b> Localidad, cultivar y número de frutos con pudrición del pedúnculo colectados para establecer la etiología y su relación con muerte descendente.....	19
<b>Cuadro 3.</b> Localidad, cultivar y número de ramas con muerte descendente colectadas para establecer su relación con pudrición de pedúnculo.....	20
<b>Cuadro 4.</b> Porcentaje de incidencia de hongos aislados de frutos de mango con síntomas de pudrición de pedúnculo provenientes de diferentes Estados y cultivares. ....	29
<b>Cuadro 5.</b> Porcentaje de incidencia de hongos aislados de ramas de mango con síntomas de muerte descendente provenientes de diferentes Estados y cultivares. ....	30
<b>Cuadro 6.</b> Aislamientos nombrados de acuerdo con el hospedante, especie del hongo y lugar de procedencia. ....	31
<b>Cuadro 7.</b> Significancias de las fuentes de variación para efectos de tres cultivares de mango y tratamientos con herida y sin herida sobre la velocidad de crecimiento de aislamientos de <i>Lasiodiplodia</i> spp., <i>Neofusicoccum parvum</i> , <i>Pestalotiopsis theae</i> y <i>Phomopsis</i> sp. ....	35
<b>Cuadro 8.</b> Comparación de medias con la prueba Tukey ( $P \leq 0.05$ ) de la velocidad de crecimiento de la infección generada por los aislamientos de <i>Lasiodiplodia</i> spp., <i>Neofusicoccum parvum</i> , <i>Pestalotiopsis theae</i> y <i>Phomopsis</i> sp. sobre frutos de tres cultivares. ....	36
<b>Cuadro 9.</b> Área bajo la curva del diámetro de la lesión generada por diferentes aislamientos de <i>Lasiodiplodia</i> spp., <i>Neofusicoccum parvum</i> , <i>Pestalotiopsis theae</i> y <i>Phomopsis</i> sp. en tres cultivares de mango. ....	36
<b>Cuadro 10.</b> Identificación filogenética de aislamientos obtenidos de frutos de mango con síntomas de pudrición del pedúnculo y ramas con muerte descendente en México durante 2010 y 2011.....	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Síntomas de pudrición del pedúnculo en frutos de mango (*Mangifera indica* L.) colectados en los Estados de Colima, Guerrero, Jalisco y Nayarit. .... 26
- Figura 2.** Síntomas de muerte descendente de ramas de mango. .... 27
- Figura 3.** Síntomas de pudrición del pedúnculo en frutos de mango del Cv. Ataulfo, causados por aislamientos de *Lasiodiplodia* spp., *Neofusicoccum parvum*, *Pestalotiopsis theae* y *Phomopsis* sp. .... 32
- Figura 4.** Síntomas de pudrición del pedúnculo en frutos de mango de los Cv. Kent y Tommy Atkins, causados por aislamientos de *Lasiodiplodia* spp., *Neofusicoccum parvum*, *Pestalotiopsis theae* y *Phomopsis* sp. .... 34
- Figura 5.** Cultivo en medio PDA de *Lasiodiplodia theobromae* aislado de frutos de mango con pudrición del pedúnculo. .... 38
- Figura 6.** Cultivo en medio PDA de *Neofusicoccum parvum* aislado de ramas de mango con muerte descendente. .... 39
- Figura 7.** Estructuras de reproducción asexual de *Lasiodiplodia theobromae*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae* y *Neofusicoccum parvum* producidas en medio PDA. .... 41
- Figura 8.** Árbol consenso construido con las secuencias obtenidas de la región del ITS ribosomal de los aislamientos procedentes de Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán y Nayarit con el método de máxima parsimonia mediante análisis bootstrap con 1000 repeticiones. .... 43

## 1. INTRODUCCIÓN

La familia Anacardiaceae incluye especies de alto valor comercial, entre las cuales destaca el mango (*Mangifera indica* L.). Este fruto es originario de India, Bangladesh y Myanmar (Ploetz, 2003). Los principales países productores son India, China, México, Indonesia, Tailandia, Pakistán, Brasil, Filipinas, Bangladesh y Nigeria (FAO, 2010).

En México, las regiones productoras más importantes de mango son: Región Sureste, Centro-Occidente y Noroeste, destacando los estados de Baja California Sur, Colima, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa y Veracruz; en los cuales, se producen los cultivares Ataulfo, Haden, Manila y Tommy Atkins. En 2010, se cultivaron 183'108.37 hectáreas con una producción de 1'632'649.4 toneladas (SIAP, SAGARPA, 2010).

Las enfermedades más importantes que limitan la producción de esta especie vegetal son: mancha foliar (*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.), desórdenes de declinación (*Botryosphaeria* spp.), muerte repentina (*Ceratocystis fimbriata* (Ellis & Halst.), roña (*Elsinoe mangiferae* Bitanc. & Jenkins), malformaciones (*Fusarium* spp.), tizón foliar (*Macrophoma mangiferae* Hing. & Sharma), cenicilla (*Oidium mangiferae* Berthe), necrosis apical (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall) y mancha negra bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* Robbs, Ribeiro & Kimura) (Ploetz y Freeman, 2009).

Otros problemas de mucha importancia son las enfermedades de postcosecha, entre las cuales se encuentran la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz & Sacc.) y las pudriciones del pedúnculo ocasionadas por un complejo de hongos asociados con la familia *Botryosphaeriaceae*, entre los que se han reportado a: *Dothiorella dominicana* Petr. & Cif., *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. (sin. *Botryodiplodia theobromae* Pat.), *Neofusicoccum mangiferae* (Syd. & P. Syd.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips (sin.

*Dothiorella mangiferae* Syd. & P. Syd.) y *Neofusicoccum parvum* Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips (sin. *Fusicoccum parvum* Pennycook & Samuels) (Johnson, 1994; Mirzaee *et al.*, 2002; de Oliveira *et al.*, 2010;). Además, se considera que *Phomopsis mangiferae* (Sacc.) Bubák (Ko *et al.*, 2009) y *Pestalotiopsis mangiferae* (Henn.) Steyaert. (Johnson, 1994) también son agentes causales de estas pudriciones de pedúnculo.

Por otra parte, se ha reportado que los desórdenes de declinación, los cuales comprenden síntomas como tizón, cancrisis, gomosis, muerte regresiva o descendente y sangrado del tallo, comparten etiologías similares con las pudriciones del pedúnculo (Prusky *et al.*, 2009).

En México no existe información que precise a los agentes causales de la pudrición del pedúnculo, ni su asociación con la muerte descendente de ramas que puedan dar información para el manejo de la enfermedad desde precosecha, por lo que este trabajo tuvo los siguientes objetivos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos generales**

1. Identificar los hongos asociados con la pudrición del pedúnculo del mango.
2. Determinar la relación de los hongos causantes de la muerte descendente del mango con la pudrición del pedúnculo.
3. Determinar la variación patogénica de los hongos causantes de pudrición del pedúnculo.

### **2.2. Objetivos particulares**

- a) Identificar morfológica y molecularmente hongos de frutos con pudrición del pedúnculo y de ramas con muerte descendente provenientes de las regiones productoras de la Costa del Pacífico.
- b) Realizar pruebas de asociación de hongos aislados de frutos en frutos.
- c) Realizar pruebas de asociación de hongos aislados de ramas en frutos.

### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1. Importancia del cultivo

La familia Anacardiaceae incluye especies de alto valor comercial, entre las cuales destaca el mango (*Mangifera indica* L.). Este fruto es originario de India, Bangladesh y Myanmar (Ploetz, 2003). Los principales países productores son India, China, México, Indonesia, Tailandia, Pakistán, Brasil, Filipinas, Bangladesh y Nigeria (FAO, 2010).

En México, las regiones productoras más importantes son: Región Sureste, Centro-Occidente y Noroeste, destacando los Estados de Baja California Sur, Colima, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa y Veracruz; en los cuales, se producen los cultivares Ataulfo, Haden, Manila y Tommy Atkins. En 2010, se cultivaron 183'108.37 hectáreas con una producción de 1'632'649.4 toneladas (SIAP, SAGARPA, 2010).

#### 3.2. Enfermedades del mango

Las enfermedades más importantes que limitan su producción son: mancha foliar (*A. alternata*), desórdenes de declinación (*Botryosphaeria* spp.), seca o muerte repentina (*C. fimbriata*), roña (*E. mangiferae*), malformaciones (*Fusarium* spp.), tizón foliar (*M. mangiferae*), cenicilla (*O. mangiferae*), necrosis apical (*P. s. pv. syringae*) y mancha negra bacteriana (*X. a. pv. mangiferaeindicae*) (Ploetz y Freeman, 2009).

Por su parte, los problemas en postcosecha tienen un impacto significativo en la vida de anaquel del fruto, lo cual se refleja en pérdidas económicas sustantivas en el mercado interno y de exportación. Las más importantes son la antracnosis causada por el hongo *C. gloeosporioides*, y las pudriciones del pedúnculo ocasionadas por un complejo de hongos asociados con la familia *Botryosphaeriaceae*, entre los que se han reportado a: *D. dominicana* (Darvas,

1991; Johnson *et al.*, 1991a), *L. theobromae* (Srivastava, 1972; Johnson *et al.*, 1991a, 1991b, 1992 y 1993; Meah *et al.*, 1991; Sangchote, 1988; Mascarenhas *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 1999; Mirzaee *et al.*, 2002;); *N. mangiferae* y *N. parvum* (de Oliveira *et al.*, 2010; Ni *et al.*, 2010) Además, se considera que *P. mangiferae* (Ko *et al.*, 2009) y *P. mangiferae* (Johnson, 1994) también son agentes causales de estas pudriciones.

### **3.3. Pudriciones del pedúnculo de frutos de mango**

A escala mundial, las pudriciones del pedúnculo de frutos de mango representan uno de los problemas de postcosecha más serios que afectan esta industria. Éstos se vuelven más importantes conforme los huertos envejecen. Las pérdidas se incrementan cuando los frutos son almacenados por periodos prolongados a bajas temperaturas o cuando los frutos maduran a temperaturas mayores de 28°C. Estas enfermedades causan pérdidas significativas en mangos durante el almacenamiento (Prusky *et al.*, 2009).

#### **3.3.1. Agentes causales**

Son causadas por un complejo de hongos, principalmente de la familia Botryosphaeriaceae, entre los que se han reportado a: *D. dominicana* (Darvas, 1991; Johnson *et al.*, 1991a, 1991b), *L. theobromae* (Srivastava, 1972; Johnson *et al.*, 1991a, 1991b; 1992 y 1993; Meah *et al.*, 1991; Sangchote, 1988; Johnson, 1994; Rodríguez *et al.*, 1999; Mirzaee *et al.*, 2002, de Oliveira *et al.*, 2010), *N. parvum* (de Oliveira *et al.*, 2010), *N. mangiferae* (Johnson *et al.*, 1991a; Ni *et al.*, 2010), además de *P. mangiferae* (Johnson *et al.*, 1991a; Johnson, 1994; Ko *et al.*, 2009) y *P. mangiferae* (Johnson, 1994).

Otros hospedantes de importancia económica en los que se han reportado especies de *Botryosphaeriaceae* causando pudriciones de frutos y/o del pedúnculo son: aguacate (*Persea americana* Mill.) (Darvas y Kotzé, 1987; Hartill *et al.*, 2002;

Alama *et al.*, 2006; Zea *et al.*, 2007), cítricos (*Citrus* spp.) (Adisa y Obinyereokwu, 1988; Brown *et al.*, 2000; Zhang y Swingle, 2005; Zhang y Timmer, 2007; Luo *et al.*, 2011), mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E Moore y Stearn) (Bautista-Baños *et al.*, 2002; Gómez-Jaimes *et al.*, 2009), plátano (*Musa* spp.) (Slabaugh, 1994) y papaya (*Carica papaya* L.) (Wang *et al.*, 2007). Así mismo, otras especies de *Phomopsis* y *Pestalotiopsis* se han reportado originando la misma enfermedad en: durazno (*Prunus persica* L.) (Michailides *et al.*, 2006), fresa (*Fragaria* × *ananassa* 'Allstar' L.) (Ellis *et al.*, 2000), guayaba (*Psidium guajava* L.) (Cardoso *et al.*, 2002), manzana (*Malus domestica* Borkh.) (Karaoglanidis y Bardas, 2006) y melón (*Cucumis melo* L.) (Garibaldi *et al.*, 2011).

### 3.3.2. Síntomas

El desarrollo de síntomas sobre el pedúnculo y frutos de mango maduros cosechados depende del hongo involucrado. En infecciones causadas por *L. theobromae*, *D. dominicana* y *N. mangiferae*, se observan lesiones iniciales difusas, acuosas-hundidas irradiando del pedúnculo en forma de proyecciones de huellas dactilares, las cuales oscurecen y coalescen rápidamente alrededor de la base del pedúnculo formando márgenes ondulados. La necrosis generalmente permanece por debajo de la cutícula, invadiendo el fruto entero en una semana si prevalecen las condiciones ambientales favorables (alta temperatura y humedad relativa). Puede aparecer micelio superficial alrededor del pedúnculo, a través de heridas en la epidermis o directamente por ésta, así como un exudado acuoso de color café saliente de las mismas. La producción de picnidios sobre la superficie del fruto comienza alrededor del pedúnculo (Srivastava, 1972; Darvas, 1991; Johnson *et al.*, 1991a).

De acuerdo con Johnson *et al.* (1991a) *P. mangiferae* produce lesiones oscuras y circulares alrededor del pedúnculo que se extienden lentamente, observándose comparativamente que sólo un tercio del fruto se ve afectado, en el tiempo que *L. theobromae* y *D. dominicana* tardan en pudrir un fruto completo. Por su

parte, *Pe. mangiferae* también ocasiona lesiones oscuras de lento avance, con producción de acérvulos en lesiones avanzadas.

### 3.3.3. Características morfológicas de los agentes causales

*L. theobromae* produce micelio vellosos aéreo de color gris a negro en medio avena-agar (AA) y papa-dextrosa-agar (PDA). Conidiomata simple o dentro de cuerpos estromáticos agregados. Conidios inicialmente hialinos, aseptados, granulares, ovoides a elipsoides y de pared gruesa; cuando maduros, uniseptados, midiendo 17-33 x 10-15  $\mu\text{m}$ , de pared café con numerosas estriaciones longitudinales. Paráfisis comúnmente presentes (Johnson, 1994; Ploetz y Freeman, 2009).

*N. mangiferae*, en medio PDA, produce micelio gris de aspecto vellosos con conidiomata discreto, gregario y parcialmente inmerso, con patrones de picnidios iniciales en forma de “manchas de pimienta”; en medio AA, micelio de color gris oscuro. En frutos, el hongo produce conidiomata unilocular en pseudoestroma subcuticular. Los conidios de esta especie difieren de los producidos por otras especies de *Neofusicoccum* spp. debido a su longitud promedio más corta (13-14  $\mu\text{m}$ ). Por lo general son unicelulares, hialinos, elipsoidales a ovoides, midiendo 13.6 x 5.4  $\mu\text{m}$ , pero a menudo se tornan uni o biseptados a muriformes, de color marrón claro y globosos a piriformes, constituyendo el sinanamorfo *Dichomera* (Johnson, 1994; Slippers *et al.*, 2005; Crous *et al.*, 2006; Slippers y Wingfield, 2007; Ploetz y Freeman, 2009).

*N. parvum* produce micelio gris algodonoso y picnidios discretos o cuerpos fructíferos estromáticos multiloculares en PDA o avena-agar, respectivamente (Johnson *et al.*, 1991). Los conidios son fusiformes a naviculares, hialinos y unicelulares, de 14.7–25.5 (19) x 4.5–7 (5.2)  $\mu\text{m}$ , aunque a veces se observan de color café y biseptados (Slippers *et al.*, 2005).

*D. dominicana* produce micelio gris algodonoso y picnidios discretos o cuerpos fructíferos estromáticos multiloculares en PDA o avena-agar, respectivamente. Los conidios son fusiformes a escafoides, de 12-25 × 4-6 µm, hialinos y unicelulares, algunas veces se observan conidios de color café, biseptados, así como microconidios de 2.5 x 4.5 µm (Johnson 1994; Prusky *et al.*, 2009).

*P. mangiferae* forma picnidios inmersos, casi globosos, oscuros, ostiolados y errumpentes; los conidios son unicelulares, hialinos y de dos tipos: α-conidios (5-10 × 2.3-4 µm), ovoides a fusiformes; y β-conidios (15-37.5 × 1.3-2.5 µm), filiformes con características curvas (Johnson *et al.*, 1992; Ko *et al.*, 2009).

*Pe. mangiferae* forma acérvulos abundantes, evidentes como puntos negros elevados sobre manchas grises, los cuales, cuando están maduros, emanan columnas negras de esporas a través de poros de la epidermis. Los conidios miden 20 × 5 µm, son fusiformes, rectos a ligeramente curvados, con tres células medias de pared gruesa y cafés, así como células basales de pared delgada y hialinas. La célula apical porta tres apéndices apicales (Lim, 1994).

#### **3.3.4. Distribución geográfica**

En cuanto a su distribución, *L. theobromae* prevalece en regiones tropicales mientras que *D. dominicana* prevalece en zonas de cultivo elevadas o subtropicales. *Pe. mangiferae* puede ser particularmente importante en zonas más secas. De acuerdo con Prusky *et al.* (2009), la incidencia de la pudrición del pedúnculo es mayor conforme los huertos envejecen y las pérdidas aumentan cuando los frutos son almacenados por periodos prolongados a bajas temperaturas o cuando son cosechados a temperaturas mayores de 28° C.

### 3.3.5. Epidemiología

Los patógenos que causan pudriciones del pedúnculo inician la infección conforme los árboles envejecen, en huertos con mal manejo, atacando árboles debilitados predispuestos por altas y bajas temperaturas, sequía, alta humedad relativa, suelos pesados, quemaduras de Sol, entre otros factores (Johnson *et al.*, 1991a; Ploetz *et al.*, 1996; Prusky *et al.*, 2009).

Johnson *et al.* (1993) sugirieron que las esporas pueden germinar y penetrar en el tejido del hospedante a través de heridas, permaneciendo como endófitos en las ramas de árboles de mango. Otros autores mencionan que la infección también puede ocurrir mediante semillas, estomas o lenticelas (Brown y Hendrix, 1981; Smith *et al.*, 1996). Posteriormente, las hifas colonizan las partes florales, desarrollándose endofíticamente en tejido sano de tallos, ramas, raíces y hojas, sin la expresión de síntomas hacia el exterior, y en última instancia alcanzan el pedúnculo varias semanas después de la floración, en donde permanecen quiescentes hasta que el fruto madura, etapa en la que infecta a través del pedúnculo y se desarrolla en los haces vasculares del fruto maduro.

Esta fase latente puede ser irrupida por algún tipo de estrés en el hospedante, tal como el estrés hídrico, causando que la fase patogénica del ciclo de vida sea disparada.

La infección del pedúnculo también sucede si los frutos son colocados en el suelo durante la cosecha. Una diseminación posterior puede ocurrir entre frutos por contacto directo después de la cosecha o vía exudados que drenan de los frutos en descomposición (Johnson *et al.*, 1992; Freire y Bezerra, 2001; Morales y Rodríguez, 2006).

Asimismo, es posible que la infección resulte por el transporte de esporas mediante insectos vectores, ya que los frutos podridos producen volátiles, los cuales podrían servir como atrayentes (Nago y Matsumoto, 1994).

### **3.3.6. Manejo de la enfermedad**

#### **3.3.6.1. Control cultural**

A través de la implementación de programas de podas en huertos de mango, como medida de control precosecha, se ha logrado reducir significativamente los niveles de organismos endófitos como *Botryosphaeria* spp., de tal manera que disminuye el inóculo en el tejido del tallo del cual emergen nuevas inflorescencias (Johnson *et al.*, 1992). También es importante la prevención del estrés hídrico durante el desarrollo y maduración del fruto, así como evitar la colocación de frutos en el suelo para suprimir el desarrollo de la enfermedad. Asimismo, se recomienda que los frutos sean enfriados a 13°C inmediatamente después de la cosecha y del tratamiento químico, y almacenarse en un lugar bien ventilado.

#### **3.3.6.2. Control en campo y postcosecha**

Diversas prácticas postcosecha se pueden utilizar para retrasar el desarrollo de las pudriciones de pedúnculo, tales como almacenamiento a baja temperatura y atmósferas controladas o modificadas; sin embargo, el manejo de la enfermedad está lejos de ser perfeccionado (Prusky *et al.*, 2009).

#### **3.3.6.3. Control químico**

Para el control postcosecha de especies de hongos del género *Botryosphaeria* se recomienda la inmersión, pulverización o aplicación a ultra bajo volumen del fungicida benomil (cuando sea posible). El prochloraz o el hipoclorito de sodio también suprimen efectivamente la pudrición del pedúnculo de mango (Plan *et*

*al.*, 2002). La combinación de agua caliente y benomil, y la aplicación de prochloraz y un tratamiento de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) diluido en cera redujeron la incidencia de la pudrición del pedúnculo después de 4 semanas de almacenamiento a 14° C y 7 días de vida útil a 20° C, de 86 a 10% en 'Tommy Atkins' y de 63 a 12% en 'Keitt' (Kobiler *et al.*, 2001).

#### **3.3.6.4. Control biológico**

El uso de *Bacillus licheniformis*, de manera individual o alternado con oxiclورو de cobre, ha sido evaluado como un tratamiento precosecha para controlar enfermedades de frutos de mango. Aplicaciones de *B. licheniformis* en intervalos de 3 semanas desde floración hasta la cosecha, controlaron niveles moderados de antracnosis y de podredumbre suave causada por *Botryosphaeria*, lo que sugiere un posible tratamiento para aplicaciones comerciales precosecha (Silimela y Korsten, 2006; Sharma *et al.*, 2009).

### **3.4. Desórdenes de declinación**

Las enfermedades de mango llamadas tizón, cancro, declinación, gomosis, tizón de la yema, muerte regresiva de la punta y sangramiento del tallo, comprenden síntomas y etiologías similares (Ploetz y Freeman, 2009).

#### **3.4.1. Síntomas**

Estos problemas fitosanitarios ampliamente dispersos no están bien entendidos. Los síntomas incluyen: quemadura marginal de la lámina foliar; síntomas foliares de deficiencias nutricionales, particularmente de hierro y manganeso; decoloración vascular; muerte regresiva de ramas pequeñas que puede o no progresar hacia la defoliación; gomosis, un exudado claro u opaco de yemas terminales o de ramas y degeneración de raíces (Ploetz *et al.*, 1996; Ploetz y Freeman, 2009).

### 3.4.2. Agentes causales

Diversos factores bióticos y abióticos pueden ser causas primarias de síntomas de declinación o bien, agentes de predisposición (Ploetz y Freeman, 2009). Los hongos son los agentes más comunes, endófitos que también causan pudriciones del pedúnculo en frutos de mango, y que normalmente son patógenos secundarios que causan enfermedad en hospedantes debilitados o predispuestos (Johnson *et al.*, 1992; Slippers *et al.*, 2005; Slippers y Wingfield, 2007; Ploetz y Freeman, 2009). Varias especies causaron todos o algunos de los síntomas señalados anteriormente cuando fueron inoculados individualmente en plantas (Ploetz *et al.*, 1996). Su asociación frecuente en tejidos infectados indica que esos síntomas por lo general se desarrollan más severamente después de infecciones múltiples.

Muchos de estos patógenos se encuentran dentro de la familia Botryosphaeriaceae. *L. theobromae*, *Diplodia natalensis* Pole-Evans y *D. theobromae* (Pat.) W. Nowell son las causas de declinación en mango más comunes y extendidas y afectan muchos otros hospedantes en los trópicos (Punithalingam, 1976; Ploetz y Freeman, 2009).

*L. theobromae* ataca árboles debilitados predispuestos por altas y bajas temperaturas, sequía, alta humedad relativa e insolación (Alvarez-García y Ploetz *et al.*, 1996). Frecuentemente es endófito, infecta plantas heridas y se encuentra en el suelo, en yemas muertas, frutos momificados y restos orgánicos debajo de los árboles (Johnson *et al.*, 1992).

Otro de los patógenos más importantes en mango que causan pudrición del pedúnculo, muerte regresiva y tizón de las flores es *N. parvum* y *N. mangiferum* (Javier-Alva *et al.*, 2009; Ni *et al.*, 2010).

Así mismo, *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz.) Crous y Slippers (sin. *Scytalidium dimidiatum* (Penz.) B. Sutton y Dyko; *Fusicoccum dimidiatum* (Penz.)

D.F. Farr; *Hendersonula toruloidea* Natrass causa una marchitez súbita de las yemas a las ramas grandes, quemadura de las hojas y canchales en el tronco, de los cuales se origina un exudado claro (Sakalidis *et al.*, 2011).

En lugares con suelos calcáreos, los síntomas de declinación incluyen clorosis intervenal y necrosis marginal de las hojas, muerte regresiva de las yemas que avanza hacia las ramas grandes, reducción del crecimiento de raíces secundarias, gomosis y decoloración vascular (Ploetz *et al.*, 1996).

Por otra parte, McSorley *et al.* (1980) detectaron el nematodo *Hemicriconemoides mangiferae* Siddiqi en niveles bajos, pero consistentes sobre árboles de mango declinantes. Sugirieron que podría ser responsable del crecimiento reducido de raíces en árboles afectados, y podría jugar un papel en el desarrollo de la enfermedad.

Otras especies de hongos examinadas por Ploetz *et al.* (1996), tales como *A. alternata*, *C. gloeosporioides*, *N. parvum* (*D. dominicana*), *L. theobromae* y dos especies de *Phomopsis* fueron aisladas de árboles con diversos síntomas de declinación; *C. gloeosporioides*, *N. parvum* y *L. theobromae* fueron los más perjudiciales y causaron necrosis importante en yemas, muerte descendente de puntas, gomosis y decoloración vascular.

### **3.4.3. Manejo de la enfermedad**

El control de los desórdenes de declinación en mango resulta complicado. Se necesitan técnicas para detectar estos patógenos en materiales de propagación. La ubicación interna y la diversidad de hongos que están involucrados, disminuyen las oportunidades para controlar estos desórdenes con fungicidas, y debido a que la transmisión de estos patógenos ocurre a través del viento y salpicaduras de lluvia, las aplicaciones estratégicas de fungicidas protectantes de amplio espectro pueden ser efectivas en ciertas épocas del año (Peterson *et al.*, 1991). La poda de partes

afectadas y el tratamiento de áreas con heridas, así como el manejo de los factores de predisposición controlables como el estrés por sequía, pueden ser benéficos. Sin embargo, una mejor comprensión de la epidemiología de estas enfermedades podría ayudar en estos esfuerzos.

### **3.5. La familia Botryosphaeriaceae: su relación con pudriciones de pedúnculo y muerte descendente (Adaptado de Denman *et al.*, 2000)**

#### **3.5.1. Taxonomía y estudios filogenéticos**

La familia *Botryosphaeriaceae* (única en el orden *Botryosphaeriales*, clase *Dothideomycetes* (Schoch *et al.*, 2006, Kirk *et al.*, 2008) incluye más de 1500 táxones, considerando teleomorfos y anamorfos (Species fungorum; <http://www.speciesfungorum.org>). Sin embargo, la taxonomía de géneros y especies en esta familia ha sido inconsistente y ha generado confusión durante mucho tiempo, lo cual ha frustrado la interpretación de literatura más antigua sobre su naturaleza endofítica, patogenicidad y asociación de hospedantes (Slippers y Wingfield, 2007).

Los miembros de la familia *Botryosphaeriaceae* fueron descritos por primera vez en 1820 como especies de *Sphaeria* (Fries) (Crous *et al.*, 2006; Schoch *et al.*, 2006), posteriormente en 1863, fue introducido el género *Botryosphaeria* Ces. & De Not. (Cesati y De Notaris, 1863), rectificado por Saccardo (1877), y está basado en la especie tipo *Botryosphaeria dothidea* (Moug.: Fr) Ces. De Not. (Barr 1972, Slippers *et al.*, 2004).

Es una familia rica en especies con una distribución cosmopolita, encontrándose en un amplio rango de monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas, específicamente sobre ramas leñosas, hojas herbáceas, tallos de gramíneas, yemas y en los talos de líquenes, comportándose como saprófitos, parásitos y endofíticos, además de que pueden causar enfermedades como pudrición del pedúnculo de frutos, tizón, cancrisis, gomosis y muerte regresiva o

descendente (Smith *et al.*, 1996; Khanzada *et al.*, 2004; Mohali *et al.*, 2005; Denman *et al.*, 2000).

A través del tiempo, la taxonomía superior del género *Botryosphaeria* ha sufrido diferentes modificaciones (Cuadro 1). En un inicio, el género fue asignado a la familia *Melogrammataceae*, dentro del orden *Sphaeriales* (Lindau, 1897); posteriormente, fue situado en la familia *Pseudosphaeriaceae* que agrupaba taxones con un solo lóculo y ascostromata multiascal, dentro del orden *Dothideales* (Von Höhnel, 1909). Theissen y Sydow (1915) crearon la subfamilia *Botryosphaerieae* y fue colocado en ésta, pero dentro de ningún orden. Un año más tarde, Theissen (1916) lo cambió al orden *Myriangiales*; sin embargo, Theissen y Sydow (1918) crearon la subclase *Dothideineae* dentro del nuevo orden *Pseudosphaeriales* y la nueva familia *Botryosphaeriaceae*. Por su parte, Petrak (1923) lo reclasificó estableciendo la subfamilia *Pseudosphaerieae*, dentro de *Pleosporaceae* (*Sphaeriales*).

**Cuadro 1.** Historia de la clasificación taxonómica del género *Botryosphaeria*

AÑO	AUTOR	CLASE	ORDEN	FAMILIA	SUBFAMILIA
1897	Lindau	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Sphaeriales</i>	<i>Melogrammataceae</i>	-
1909	Von Höhnel	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Dothideales</i>	<i>Pseudosphaeriaceae</i>	-
1915	Theissen y Sydow	<i>Dothideomycetes</i>	-	<i>Pseudosphaeriaceae</i>	<i>Botryosphaerieae</i>
1916	Theissen	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Myriangiales</i>	<i>Pseudosphaeriaceae</i>	-
1918	Theissen y Sydow	<i>Dothideomycetes</i> *	<i>Pseudosphaeriales</i>	<i>Botryosphaeriaceae</i>	-
1923	Petrak	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Sphaeriales</i>	<i>Pleosporaceae</i>	<i>Pseudosphaerieae</i>
1928	Miller	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Dothideales</i>	<i>Pseudosphaeriaceae</i>	-
1938	Miller	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Pseudosphaeriales</i>	<i>Pseudosphaeriaceae</i>	-
1955	Luttrell		<i>Pleosporales</i>	?	-
1975	Von Arx y Müller	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Dothideales</i>	?	-
1987	Barr	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Pleosporales</i>	?	-
2006	Schoch <i>et al.</i>	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Botryosphaeriales</i>	<i>Botryosphaeriaceae</i>	-

\*Theissen y Sydow (1918) crearon la subclase *Dothideineae*

Una de las razones principales de esta reorganización en la clasificación de *Botryosphaeria* fue la confusión respecto a la ontogenia y morfología de verdaderos

peritecios, ascostromata y tejido intersticial (Denman *et al.*, 2000). Con la demostración de Miller (1928) acerca de las diferencias entre los tejidos que forman estas estructuras, nuevamente se posicionó a *Botryosphaeria* dentro del orden *Dothideales*, para ser reclasificado por el mismo autor 10 años después dentro del orden *Pseudosphaeriales*, mismo que Luttrell (1955) reemplazó por *Pleosporales*, clasificación apoyada por Barr (1987). Así, hasta hace unos años, dos sistemas principales de clasificación se mantenían en uso común, el de Barr (1987) en el que *Botryosphaeria* fue puesto en los *Pleosporales*, y el de Von Arx y Müller (1975) quien posicionó al género en los *Dothideales*.

En los últimos años, debido principalmente a la disponibilidad de herramientas moleculares basadas en el DNA recombinante, ha surgido una taxonomía más sólida para este grupo de hongos. Hasta hace una década, la posición del género en la clasificación más alta de los ascomicetes no había sido resuelta (Denman *et al.*, 2000), pero de acuerdo con los estudios filogenéticos de Schoch *et al.* (2006), quien señaló que la posición de la familia Botryosphaeriaceae en la clase Dothideomycetes ha sido enigmática, la situó en ésta dentro de *Botryosphaeriales*, un orden nuevo e independiente de los órdenes *Pleosporales* y *Dothideales*.

De esta manera, en la clasificación actual se reconoce al género *Botryosphaeria* como miembro de la familia *Botryosphaeriaceae*, acomodada en el orden *Botryosphaeriales* (Kirk *et al.*, 2008).

### **3.5.2. Especies importantes**

Hasta el año 2000, el género *Botryosphaeria* agrupaba 143 especies (Denman *et al.*, 2000). Sin embargo, Crous *et al.* (2006) demostraron que dicho género comprende varios linajes filogenéticos diferentes, correlacionados con las características morfológicas de sus anamorfos, por lo que actualmente *Botryosphaeria* es considerado un género relativamente pequeño consistiendo sólo

de dos especies: *B. dothidea* y *B. corticis* (Demaree & M.S. Wilcox) Arx & E. Müll., esta última confinada a *Vaccinium* spp. (Phillips *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2008).

Más de 20 anamorfos han sido relacionados con *Botryosphaeria*; entre los más comunes se encuentran: *Diplodia*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia*, *Macrophomina*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium*, *Pseudofusicoccum* y *Sphaeropsis* (Denman *et al.*, 2000; Crous *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2008).

Conforme a los estudios de Denman *et al.* (2000) estos anamorfos se dividieron en dos grupos: conidios hialinos con paredes delgadas, (tipo-*Fusicoccum*), y conidios pigmentados con paredes gruesas (tipo-*Diplodia*).

### **3.5.3. Características morfológicas de Botryosphaeriaceae**

Las características de esta familia comprenden: Ascomata uni-a multilocular con paredes de color marrón oscuro de varias capas, aislados o en grupos, frecuentemente incrustados en tejido estromático. Ascas bitunicadas, con paredes gruesas, pediceladas o sésiles, clavadas, con cámara apical bien desarrollada, entremezclados con pseudoparáfisis hialinos, septados, ramificados o no. Ascosporas hialinas o pigmentadas, septadas o no, elipsoides a ovoides, con o sin apéndices mucoides o funda.

Los anamorfos presentan conidiomata picnidial uni-a multilocular, con frecuencia incrustado en el tejido estromático; células conidiogénicas hialinas y fialídicas, y conidios hialinos o pigmentados, de paredes delgadas o gruesas, septados o aseptados, con o sin fundas o apéndices mucoides.

### **3.5.4. Endofitismo de Botryosphaeriaceae**

El uso del término 'endófito' puede ser controversial cuando se hace referencia al papel ecológico del organismo, particularmente cuando se describen

mutualistas vs. patógenos latentes. Algunos miembros de esta familia son claramente conocidos como patógenos, y por lo tanto pueden ser descritos como patógenos latentes; sin embargo, sería un error referirse al grupo como patógenos latentes. Incluso para muchos de los patógenos bien estudiados, la patogenicidad puede variar en gran medida en diferentes entornos y se sabe poco sobre su ecología en ecosistemas nativos. Para la mayoría de las especies nada se sabe sobre su ecología, lo cual complica el uso de términos específicos referentes a ésta (Slippers y Wingfield, 2007).

En este sentido, se hace referencia a los miembros de la familia Botryosphaeriaceae como 'endófitos' en un sentido general, y en lo que respecta a su presencia en tejido sano de la planta, sin que implique necesariamente un papel ecológico específico (Slippers y Wingfield, 2007).

Dichos miembros, fueron reconocidos por primera vez como endófitos cuando el hongo *Diplodia pinea* (sin. *Sphaeropsis sapinea*) de amplia importancia forestal, fue aislado de los tallos y xilema de *Pinus* sp. Poco después, una serie de hongos de los géneros *Fusicoccum*, *Neofusicoccum*, *Pseudofusicoccum* (todos los conocidos anteriormente como *Dothiorella* spp.) y *Lasiodiplodia theobromae* fueron aislados de partes sanas de plantas de mango (Johnson *et al.*, 1992). Desde entonces, otras especies han sido aisladas como endófitas. Con base en la amplia distribución taxonómica y alta frecuencia de infección endofítica en varios hospedantes para aquellas especies examinadas, se cree que la mayoría, si no todos los miembros de Botryosphaeriaceae, podrían tener una fase endofítica.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Colecta de frutos y ramas

La colecta de frutos y ramas se realizó entre los meses de marzo de 2010 y junio de 2011 en huertos ubicados en los Estados de Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán y Nayarit. En total se colectaron 110 frutos de mango de los cultivares 'Ataulfo', 'Kent' y 'Tommy Atkins' con síntomas de pudrición del pedúnculo, de los cuales se realizaron aislamientos de sólo los mejores 58 frutos que presentaban un síntoma característico de pudrición de pedúnculo. De los mismos lugares, se recolectaron ramas con muerte descendente, de las cuales se obtuvieron 60 aislamientos. El criterio de colecta fue la localización de huertos con bajo nivel tecnológico de producción y observación de pudrición del pedúnculo y muerte regresiva. (Cuadro 2 y 3).

**Cuadro 2.** Localidad, cultivar y número de frutos con pudrición del pedúnculo colectados para establecer la etiología y su relación con muerte descendente.

LOCALIDAD	CULTIVAR	NO. DE FRUTOS
<b>Colima</b>		
Coquimatlán y Tecomán	'Tommy Atkins'	16
	'Ataulfo'	14
<b>Guerrero</b>		
Acapulco de Juárez	'Ataulfo'	13
	'Tommy Atkins'	7
<b>Jalisco</b>		
Tomatlán	'Tommy Atkins'	10
<b>Nayarit</b>		
Jalcocotán	'Kent'	8

**Cuadro 3.** Localidad, cultivar y número de ramas con muerte descendente colectadas para establecer su relación con pudrición de pedúnculo.

<b>LOCALIDAD</b>	<b>CULTIVAR</b>	<b>NO. DE MUESTRAS</b>
<b>Guerrero</b>		
Zacualpan	'Ataulfo'	<b>10</b>
San Jerónimo de Juárez	'Tommy Atkins'	<b>10</b>
Tecpan de Galeana	'Ataulfo'	<b>10</b>
Atoyac de Álvarez	'Tommy Atkins'	<b>10</b>
San Luis de la Loma	'Ataulfo'	<b>10</b>
<b>Michoacán</b>		
Nueva Italia	'Ataulfo'	<b>10</b>

#### **4.2. Aislamientos**

Se cortaron trozos de aproximadamente 125 mm<sup>3</sup> de la zona de avance de la pudrición en frutos y de la necrosis en ramas. Se desinfectaron por inmersión en hipoclorito de sodio al 2% durante 3 minutos en el caso de frutos y al 3% durante 4 minutos en el caso de ramas. Posteriormente, los trozos se lavaron dos veces con agua destilada esterilizada, se secaron con papel filtro esterilizado y bajo condiciones asépticas, se colocaron 4 trozos por caja Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). Las cajas se incubaron bajo luz negra continua con una lámpara de 40 W a una temperatura de 25±1 °C durante el día con la finalidad de inducir esporulación (Tovar, 2010). Los aislamientos se purificaron mediante cultivos monospóricos en medio agua-agar (AA) y se incrementaron en medio PDA para realizar su identificación y las pruebas de asociación.

#### **4.3. Pruebas de asociación entre hongos aislados de frutos y ramas**

Debido a que las pruebas de patogenicidad en este tipo de patosistemas representan un fenómeno complicado, una alternativa que se consideró viable para establecer una relación entre la pudrición de pedúnculo y la muerte descendente fue la inoculación de frutos de diferentes cultivares con los hongos aislados de frutos y

los hongos aislados de ramas de diferentes cultivares y regiones. De esta manera, se puede proporcionar una evidencia fuerte de la etiología de la pudrición del pedúnculo, al caracterizar las diferentes pudriciones y establecer su posible relación con la muerte descendente, además, conocer si existe una interacción entre cultivares y regiones muestreadas. Los resultados tienen como objetivo final el establecer experimentos mejor diseñados para entender a profundidad este fenómeno y que conduzca a proveer elementos consistentes y determinantes para estructurar programas de manejo de la enfermedad en precosecha y postcosecha.

Para lo anterior, se realizó una selección de nueve aislamientos, cuatro aislados de frutos y cinco aislados de ramas, de acuerdo con su prevalencia, localidad, cultivar y procedencia. El experimento se realizó en el Laboratorio de Resistencia Genética del Colegio de Postgraduados. El diseño utilizado fue completamente al azar con cinco repeticiones.

Se utilizaron frutos de mango sanos, de tamaño uniforme, sin daños físicos y en madurez fisiológica de los cultivares 'Ataulfo', 'Kent' y 'Tommy Atkins'. Los frutos se lavaron con agua y jabón y se desinfectaron por inmersión en hipoclorito de sodio al 2% durante 3 min; posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada. Los frutos se obtuvieron de la Central de Abastos de la Ciudad de México, desconociendo su origen y características de producción.

Un total de cinco frutos por cultivar se inocularon con cada uno de los nueve aislamientos. El testigo consistió de un fruto sin inocular. Se establecieron dos tratamientos: 1) Bajo condiciones asépticas, sobre el pedúnculo de cada fruto, se realizó una herida por punción de aproximadamente 5 mm de profundidad usando un palillo de madera esterilizado. Sobre cada herida se colocó un disco de PDA de 5 mm de diámetro con crecimiento micelial de 6 días de edad y se sostuvo con una cinta de Parafilm® de aproximadamente 6 mm de ancho. Sobre los frutos testigos sólo se colocaron discos de PDA sin inóculo. 2) Se realizó lo mismo sólo que sin herida. Los frutos se colocaron en charolas de unicel con toallas de papel esterilizado

humedecidas con agua destilada esterilizada. Las charolas se cubrieron con bolsas de plástico y se mantuvieron a una temperatura de  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Los frutos se observaron diariamente, registrando las mediciones del diámetro polar y ecuatorial de las lesiones que se desarrollaron alrededor del sitio de inoculación, con las cuales se obtuvo un promedio y se calculó el área bajo la curva del crecimiento de la lesión mediante el método de los trapecios (Liengme, 2002), con la finalidad de conocer la velocidad de crecimiento y determinar la patogenicidad y agresividad de los aislamientos.

#### **4.4. Análisis estadístico de la velocidad de crecimiento de la infección**

Los datos del área bajo la curva del crecimiento de la lesión inducido por los nueve aislamientos se compararon mediante un análisis de varianza (ANAVA) utilizando un diseño multifactorial de tres factores (efecto del tratamiento con herida y sin herida, efecto de cultivar y efecto de aislamiento) sobre la velocidad de crecimiento de la infección; así como la prueba Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Los análisis se hicieron con el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, version 9.1.3 SAS Institute Inc. 2009).

#### **4.5. Caracterización morfológica**

##### **4.5.1. Características culturales**

Se registró el crecimiento micelial, pigmentación y formación de estructuras de reproducción, de las colonias de los hongos sembrados en 10 cajas Petri, por aislamiento, e incubadas bajo luz negra continua a una temperatura de  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante el día.

#### **4.5.2. Morfología de estructuras reproductivas**

Los aislamientos se identificaron morfológicamente con base en el color, forma de la colonia, crecimiento del micelio, esporulación, forma de conidios y dimensiones, usando las claves y descripciones morfológicas de Punithalingam (1976), Sutton (1980), Barnett y Hunter (1998) y Burgess *et al.* (2006) para *Lasiodiplodia theobromae*; Pennycook y Samuels (1985) y Crous *et al.* (2006) para *Neofusicoccum parvum*; y Alves *et al.* (2008) para *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. Las cepas identificadas se conservaron dentro de tubos de ensayo con aceite mineral esterilizado para estudios posteriores.

#### **4.6. Identificación molecular**

##### **4.6.1. Extracción de DNA**

Cultivos monospóricos de nueve aislamientos provenientes de los huertos muestreados de los Estados de la Costa del Pacífico de México con seis días de edad, se utilizaron para realizar la extracción de DNA mediante la metodología descrita por Ahrens y Seemüller (1992). Se pesaron 0.2 g de cada aislamiento y se maceró en un mortero al que se le adicionó 300 µL del buffer de extracción CTAB (Tris-HCl 100 mM pH 8.0; Na<sub>2</sub>EDTA 2H<sub>2</sub>O 20 mM, pH 8, CTAB 3%; NaCl 1.4 M; β-mercaptoetanol 0.2%) previamente calentado a 60 °C, se mezcló vigorosamente y se transfirió a tubos Eppendorf estériles de 2 mL, se adicionaron 600 µL más de la solución de CTAB y se incubó a 60°C por 1 h, agitándolo ocasionalmente. Posteriormente se adicionaron 600 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1, v/v) y se mezcló. Se centrifugó a 14 000 rpm por 8 min, la fase acuosa se colocó en un tubo nuevo estéril de 1.5 mL, se adicionaron 600 µL de isopropanol frío, se mezcló suavemente por inversión y se incubó a -20 °C por 1 h para precipitar el DNA. Posteriormente, se centrifugó a 14 000 rpm por 8 min, se eliminó el sobrenadante. La pastilla obtenida se secó a temperatura ambiente, posteriormente se disolvió en 100 µL de agua destilada estéril. La calidad del DNA extraído se verificó mediante

electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% (Ultrapure, Gibco, USA) usando el amortiguador TBE (Tris-Borato-EDTA pH 8.0). El gel se tiñó con bromuro de etidio y los productos se visualizaron en un transiluminador (Gel Doc 2000, BIO RAD®, USA). La concentración de DNA se cuantificó en un espectrofotómetro Perkin Elmer® (Lambda BIO 10®).

#### **4.6.2. Amplificación mediante PCR de los genes ribosomales**

Para amplificar la región ITS se usaron los iniciadores ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) que reconocen las regiones que codifican para los genes nucleares ribosomales 18S, 5.8S y 28S que son altamente conservados y que se encuentran unidos internamente por las regiones ITS1 e ITS2. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: Buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, dNTP's 0.2 mM, *Taq* DNA polimerasa 1U (Invitrogen®) y 20 pmol de cada iniciador, 2 µl del DNA obtenido se emplearon en la PCR. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer (CT 2400 ICA, USA) con una desnaturalización inicial a 95° C por 2 min; seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95° C por 1 min, el alineamiento a 50° C por 30 s y la extensión a 72° C por 2 min; con una extensión final de un ciclo a 72° C por 10 min. El producto final de PCR se purificó usando el kit QIAquick (Qiagen, USA) de acuerdo con las instrucciones dadas por el fabricante. El fragmento amplificado se verificó en un gel de agarosa al 2% y el gel se tiñó como anteriormente se mencionó. El producto amplificado se purificó con el kit Wizard (Promega®, USA) y se secuenció en ambas direcciones con el Genetic Analyzer modelo 3730XL® (Applied Biosystem®, USA). Las secuencias nuevas encontradas en este estudio fueron depositadas en el GenBank del NCBI.

#### **4.6.3. Análisis filogenético de la región ITS**

Las secuencias correspondientes a la región ITS fueron ensambladas y editadas con la opción CAP (Contig Assembly Program) del Software BioEdit

v7.0.9.1 (Hall, 1999), creando las secuencias consenso de cada aislamiento. Debido a que el Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Centre for Biotechnology Information (NCBI) encuentra regiones de similitud local entre secuencias con alineamientos significantes, las secuencias consenso de cada aislamiento obtenido para la región ITS completa fueron comparadas con la opción BLASTN 2.2.19 y depositadas en el GenBank del NCBI.

Para los análisis evolutivos, todas las secuencias consenso fueron compiladas dentro de un archivo con formato FASTA y alineadas usando el ClustalW 1.8.1 (Thompson *et al.*, 1994) incluido en el Software MEGA 4.0.2 (Tamura *et al.*, 2007). Las reconstrucciones filogenéticas fueron realizadas para los conjuntos de datos de la región ITS usando el método de máxima parsimonia. Este análisis se efectuó mediante el Close Neighbour Interchange (CNI), opción de búsqueda (nivel = 1) con el árbol inicial por adición al azar (10 repeticiones), y los espacios o datos faltantes fueron considerados delecciones completas.

Para determinar los valores de confianza para los clados dentro del árbol resultante, se realizó un análisis bootstrap con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985). Los números de acceso de *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae*, *N. parvum*, *N. sp* y *P. theae* depositados en la base de datos del NCBI GenBank fueron seleccionados para incluirlos como especies de referencia junto con las secuencias obtenidas en este estudio. *Phaeomoniella capensis* (número de acceso FJ372391) se designó como la especie fuera de grupo para la construcción del árbol evolutivo.

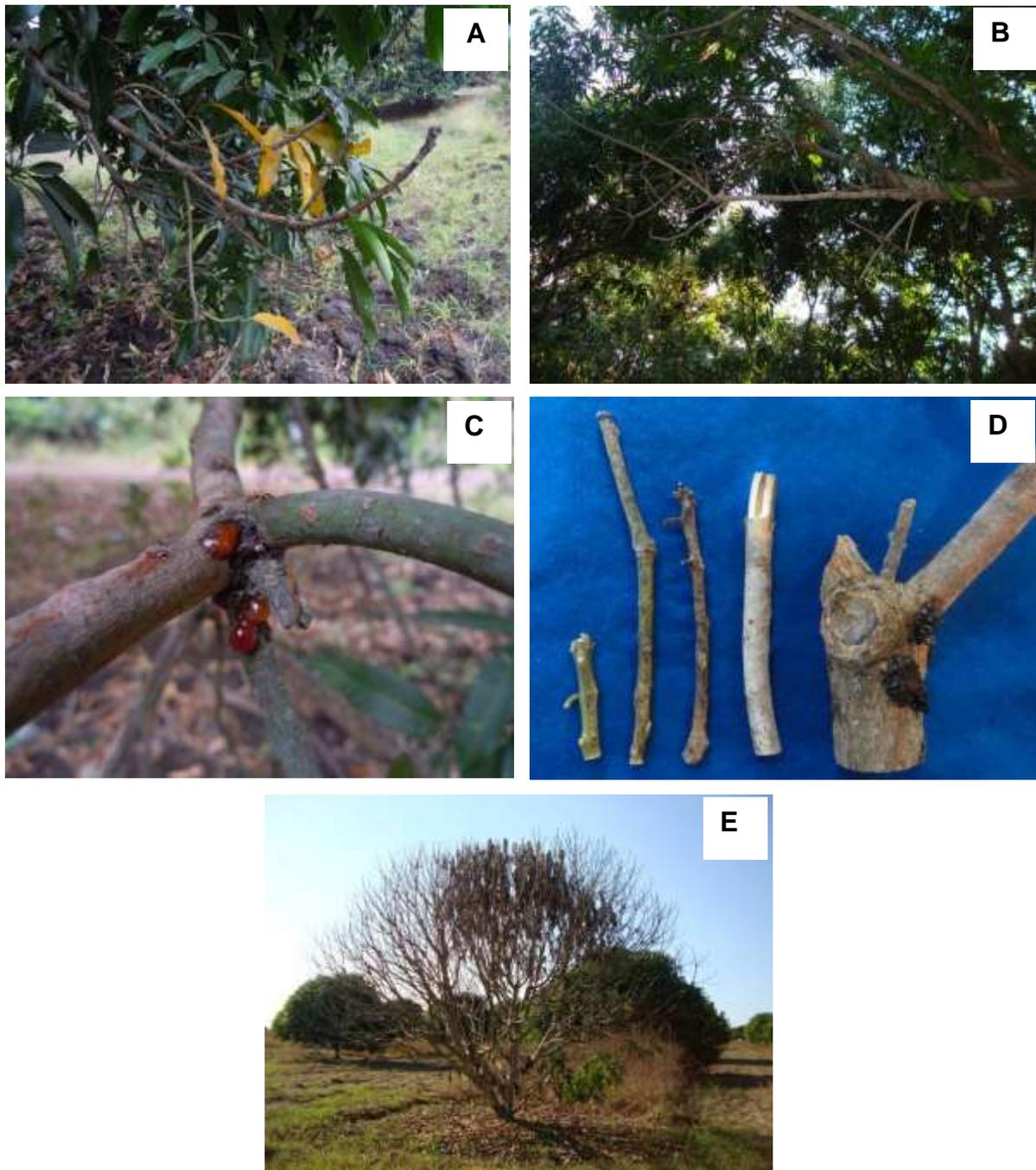
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Descripción de síntomas de frutos y ramas colectados

**Síntomas en frutos.** Se observó una pudrición de color claro a café oscuro originándose alrededor del pedúnculo de los frutos y extendiéndose a lo largo de éstos, formando márgenes ondulados. En las muestras del Cv. Ataulfo la pudrición se extendía a lo largo de la curvatura cóncava y/o convexa del fruto, seguida por las caras laterales (Figura 1A-C).



**Figura 1.** Síntomas de pudrición del pedúnculo en frutos de mango (*Mangifera indica* L.) colectados en los Estados de Colima, Guerrero, Jalisco y Nayarit. **A)** Cv. Ataulfo con pudrición extendida a lo largo de la curvatura de los frutos, seguida por las caras laterales. **B)** Cv. Kent y **C)** Cv. Tommy Atkins con pudrición oscura originada en el pedúnculo y márgenes ondulados.



**Figura 2. Síntomas de muerte descendente de ramas de mango. A) y B) Ramas con muerte descendente, iniciando en el ápice y avanzando hacia la base de la rama. C) Exudados gomosos rojizos en zona de avance de muerte descendente. D) Haces vasculares necrosados. E) Árbol exhibiendo secamiento con defoliación parcial, ramas con hojas muertas y verdes.**

**Síntomas en ramas.** En los árboles muestreados, entre ramas de aspecto normal, se observaron ramas con secamiento, el cual iniciaba en el ápice y avanzaba hacia la base de la rama, observándose así, muerte descendente (Figura 2A y 2B). Estas ramas mostraban haces vasculares necrosados y exudados gomosos rojizos (Figura 2C y 2D). En un estado avanzado de muerte descendente, los árboles exhibían secamiento con defoliación parcial, ramas con hojas muertas y verdes (Figura 2E).

## 5.2. Frecuencias de aislamientos

### 5.2.1. Frecuencia de aislamientos de frutos

A partir de los frutos de mango de diferentes cultivares colectados con síntoma de pudrición del pedúnculo, se aisló a *Lasiodiplodia theobromae* (62.5 %), *Neofusicoccum parvum* (29.74 %), *Neofusicoccum* sp. (1.30 %) *Colletotrichum* sp. (4.74 %) y *Pestalotiopsis* sp. (1.72 %) del número total de colonias aisladas (464) (Cuadro 4).

De los frutos colectados en Colima, se aisló de 'Ataulfo' a *L. theobromae* (100 %) (32 colonias), y de 'Tommy Atkins' a *L. theobromae* (96 %) y *Colletotrichum* sp. (4 %) (128 colonias).

Por otra parte, de los frutos colectados en Guerrero, se aisló de 'Ataulfo' a *L. theobromae* (84 %), *Colletotrichum* sp. (11 %) y *Pestalotiopsis* sp. (5 %) (104 colonias). En lo que respecta a 'Tommy Atkins', se aisló a *L. theobromae* (86 %), *Colletotrichum* sp. (9 %) y *Pestalotiopsis* sp. (5 %) (56 colonias). En relación con los frutos colectados en Jalisco, se aisló a *Neofusicoccum parvum* (100%), y en Nayarit se aisló a *N. parvum* (91%) y *Neofusicoccum* sp. (9%), respectivamente (144 colonias).

**Cuadro 4.** Porcentaje de incidencia de hongos aislados de frutos de mango con síntomas de pudrición de pedúnculo provenientes de diferentes Estados y cultivares.

ESTADO	CULTIVAR	HONGO	NO. DE COLONIAS	% DE INCIDENCIA
Colima <sup>a</sup>	‘Aaulfo’	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	32	100
Colima <sup>a</sup>	‘Tommy Atkins’	<i>L. theobromae</i>	123	96
		<i>Colletotrichum</i> sp.	5	4
Guerrero <sup>b</sup>	‘Aaulfo’	<i>L. theobromae</i>	87	84
		<i>Colletotrichum</i> sp.	12	11
		<i>Pestalotiopsis</i> sp.	5	5
Guerrero <sup>b</sup>	‘Tommy Atkins’	<i>L. theobromae</i>	48	86
		<i>Colletotrichum</i> sp.	5	9
		<i>Pestalotiopsis</i> sp.	3	5
Jalisco <sup>c</sup>	‘Tommy Atkins’	<i>Neofusicoccum parvum</i>	80	100
Nayarit <sup>d</sup>	Kent’	<i>N. parvum</i>	58	91
		<i>Neofusicoccum</i> sp	6	9

a: Coquimatlán y Tecomán, Col.; b: Acapulco de Juárez, Gro.; c: Tomatlán, Jal.; d: Jalcocotán, Nay.

### 5.2.2. Frecuencia de aislamientos de ramas

A partir de las ramas de mango de diferentes cultivares colectadas con síntoma de muerte descendente, se aisló a *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (67.71 %), *Phomopsis* sp. (16.67%), *N. parvum* (10.41 %), *Pestalotiopsis theae* (3.54 %) y *Pestalotiopsis* sp. (1.67 %) (480 colonias) (Cuadro 5). Por cada una de las 6 localidades, se obtuvieron 80 colonias.

De las ramas colectadas en Nueva Italia, Michoacán, se aisló a *N. parvum* (62 %), *P. theae* (21 %) y *L. pseudotheobromae* (17 %).

En relación con las ramas de los cultivares ‘Aaulfo’ y ‘Tommy Atkins’ colectadas en Guerrero, se aisló de: Zacualpan, *L. pseudotheobromae* (79 %) y *Phomopsis* sp. (21 %); San Jerónimo de Juárez, *L. pseudotheobromae* (70 %) y *Phomopsis* sp. (30 %); Tecpan de Galeana, *L. pseudotheobromae* (71 %), *Phomopsis* sp. (19 %) y *Pestalotiopsis* sp. (10 %); Atoyac de Álvarez, *L. pseudotheobromae* (77 %) y *Phomopsis* sp. (23 %); San Luis de la Loma, *L. pseudotheobromae* (92 %) y *Phomopsis* sp. (8 %).

**Cuadro 5.** Porcentaje de incidencia de hongos aislados de ramas de mango con síntomas de muerte descendente provenientes de diferentes Estados y cultivares.

LOCALIDAD	CULTIVAR	HONGO	NO. DE COLONIAS	% DE INCIDENCIA
<b>Michoacán</b>				
Nueva Italia	'Tommy Atkins'	<i>N. parvum</i>	50	62
		<i>Pestalotiopsis theae</i>	17	21
		<i>L. pseudotheobromae</i>	13	17
<b>Guerrero</b>				
Zacualpan	'Ataulfo'	<i>L. pseudotheobromae</i>	63	79
San Jerónimo de Juárez	'Tommy Atkins'	<i>Phomopsis</i> sp.	17	21
		<i>L. pseudotheobromae</i>	56	70
Tecpan de Galeana	'Ataulfo'	<i>Phomopsis</i> sp.	24	30
		<i>L. pseudotheobromae</i>	57	71
		<i>Phomopsis</i> sp.	15	19
Atoyac de Álvarez	'Tommy Atkins'	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	8	10
		<i>L. pseudotheobromae</i>	62	77
		<i>Phomopsis</i> sp.	18	23
San Luis de la Loma	'Ataulfo'	<i>L. pseudotheobromae</i>	74	92
		<i>Phomopsis</i> sp.	6	8

Los aislamientos utilizados en las pruebas de asociación se nombraron de acuerdo con el hospedante (cultivar), especie del hongo y lugar de procedencia, de la siguiente manera: FLaCo, FLaGr, FNeJa, FNeNa, RLaGr, RLaMi, RNeMi, RPhGr y RPeMi (Cuadro 6).

### 5.3. Pruebas de asociación entre hongos aislados de frutos y ramas

**5.3.1. Cultivar 'Ataulfo'.** En el tratamiento con herida, 7 días después de la inoculación (ddi), se observaron síntomas iniciales de pudrición del pedúnculo en todos los frutos.

Los aislamientos de *Lasiodiplodia* y *Neofusicoccum* produjeron síntomas iguales, consistentes de manchas negras limitadas alrededor de la base del pedúnculo con crecimiento de micelio sobre éstas (Figura 3A). A los 10 ddi, se observaron lesiones difusas, hundidas y húmedas, originándose en el pedúnculo en forma de proyecciones radiales, las cuales rápidamente oscurecieron y coalescieron, produciendo márgenes negros ondulados (Figura 3C).

**Cuadro 6.** Aislamientos nombrados de acuerdo con el hospedante, especie del hongo y lugar de procedencia.

<b>AISLAMIENTO</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>HOSPEDANTE</b>	<b>LUGAR DE PROCEDENCIA</b>
FLaCo	<i>L. theobromae</i>	Fruto Cv. 'Ataulfo'	Colima
FLaGr	<i>L. theobromae</i>	Fruto Cv. 'Ataulfo'	Guerrero
FNeJa	<i>N. parvum</i>	Fruto Cv. 'Tommy Atkins'	Jalisco
FNeNa	<i>N. parvum</i>	Fruto Cv. 'Kent'	Nayarit
RLaGr	<i>L. pseudotheobromae</i>	Rama Cv. 'Tommy Atkins'	Guerrero
RLaMi	<i>L. pseudotheobromae</i>	Rama Cv. 'Ataulfo'	Michoacán
RNeMi	<i>N. parvum</i>	Rama Cv. 'Ataulfo'	Michoacán
RPhGr	<i>Phomopsis</i> sp.	Rama Cv. 'Tommy Atkins'	Guerrero
RPeMi	<i>P. theae</i>	Rama Cv. 'Ataulfo'	Michoacán

FLaCo = Fruto, *Lasiodiplodia* Colima; FLaGr = Fruto *Lasiodiplodia* Guerrero; FNeJa = Fruto, *Neofusicoccum* Jalisco; FNeNa = Fruto, *Neofusicoccum* Nayarit; RLaGr = Rama *Lasiodiplodia* Guerrero; RLaMi = Rama *Lasiodiplodia* Michoacán; RNeMi = Rama, *Neofusicoccum* Michoacán; RPhGr = Rama *Phomopsis* Guerrero; RPeMi = Rama *Pestalotiopsis* Michoacán.

A los 14 ddi, se notó que las manchas oscuras se habían extendido a lo largo de la curvatura cóncava o convexa del fruto, seguida por las caras laterales (Figura 3B); también se observó micelio sobre la epidermis o emergente a través de rupturas de ésta, así como un exudado acuoso café saliente de las mismas o del pedúnculo. La pudrición total de los frutos ocurrió 20 ddi (Figura 3D). Estos síntomas coinciden con los reportados por Johnson (1994).

El aislamiento de RPhGr produjo lesiones de lento avance alrededor del pedúnculo; semicirculares con márgenes definidos y negras. Se percibió que en ambos casos, sólo un tercio del fruto se vio afectado, al mismo tiempo que *Lasiodiplodia* y *Neofusicoccum* podrían un fruto completo (Figura 3E).

Respecto a los frutos inoculados con RPeMi, 20 ddi, sólo se notó una mancha negra limitada alrededor del pedúnculo y micelio sobre éste (Figura 3F). Todos los síntomas descritos anteriormente coinciden con los reportados por Johnson (1994). En relación con el tratamiento sin herida, se registraron los mismos síntomas, sólo que éstos comenzaron 9 ddi, dos días después de que los frutos con el tratamiento con herida comenzaron a tener síntomas iniciales.



**Figura 3. Síntomas de pudrición del pedúnculo en frutos de mango del Cv. Ataulfo, causados por aislamientos de *Lasiodiplodia* spp., *Neofusicoccum parvum*, *Pestalotiopsis theae* y *Phomopsis* sp. A-D) Aislamiento FNeNa. A) Mancha negra inicial alrededor de la base del pedúnculo y crecimiento micelial, 7 ddi. B) Lesiones difusas, hundidas y húmedas, en forma de proyecciones radiales con márgenes negros ondulados, 10 ddi. C) Manchas oscuras extendidas a lo largo de la curvatura cóncava del fruto, seguida por las caras laterales, 14 ddi. D) Pudrición total de los frutos, 20 ddi. E) Aislamiento RPhGr causando lesiones de lento avance alrededor del pedúnculo, circulares, negras con márgenes definidos, 20 ddi. F) Aislamiento RPeMi originando manchas negras limitadas alrededor del pedúnculo con micelio, 20 ddi.**

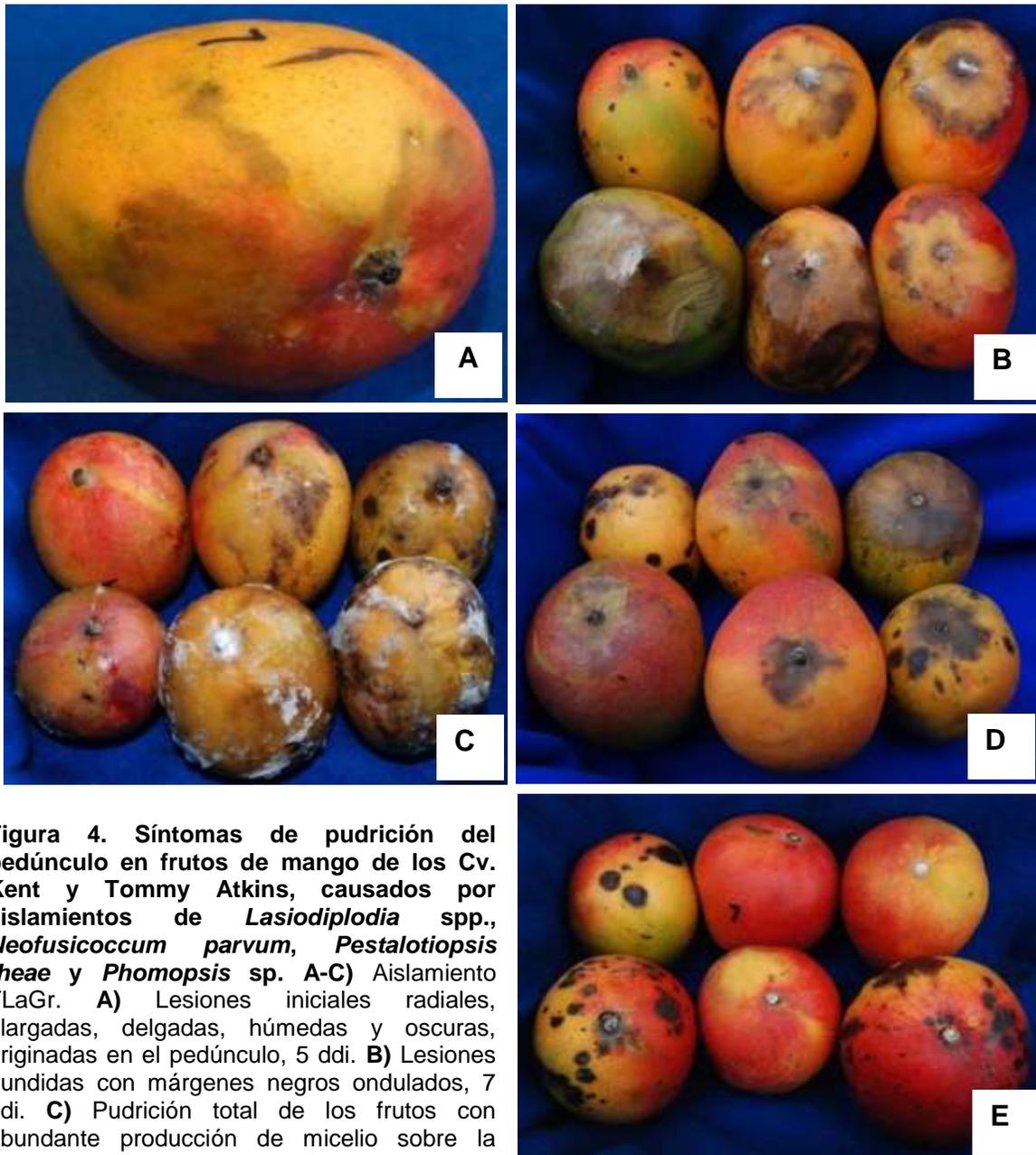
**5.3.2. Cultivar 'Kent' y 'Tommy Atkins'.** En ambos cultivares y tratamientos, con los aislamientos de *Lasiodiplodia* y *Neofusicoccum*, 5 ddi se apreciaron manchas radiales, alargadas, delgadas y oscuras, originándose en el pedúnculo (Figura 4A), las cuales rápidamente coalescieron 7 ddi, tornándose hundidas y húmedas y formando márgenes negros ondulados; también se observó en el tratamiento con herida, producción de abundante micelio sobre la epidermis o emergente a través de rupturas de ésta, así como el exudado acuoso café saliente de las mismas o del pedúnculo (Figura 4B). La pudrición total de los frutos ocurrió 10 ddi (Figura 4C).

El aislamiento RPhGr produjo lesiones de lento avance; circulares alrededor del pedúnculo y negras (Figura 4D). De manera similar con el Cv. 'Ataulfo', menos de un tercio del fruto se vio afectado, al mismo tiempo que *Lasiodiplodia* y *Neofusicoccum* podrían un fruto completo. Respecto a los frutos inoculados con RPeMi, no se observaron síntomas. (Figura 4E).

Se reaislaron los hongos en cultivos puros a partir de los frutos inoculados en cada uno de los dos tratamientos y sus colonias y estructuras reproductivas se compararon con las de los aislamientos inoculados originalmente. Los frutos testigo no presentaron síntomas y no se aisló ningún hongo tras haberse realizado las pruebas de asociación.

#### **5.4. Análisis estadístico de la velocidad de crecimiento de la infección**

Los resultados obtenidos indican que las interacciones entre cultivares, tratamientos y aislamientos fueron altamente significativas ( $P = <.0001$ ) (Cuadro 7). La velocidad de crecimiento de la infección que produjo cada aislamiento inoculado varió dependiendo del cultivar y del tratamiento con herida o sin ésta.



**Figura 4. Síntomas de pudrición del pedúnculo en frutos de mango de los Cv. Kent y Tommy Atkins, causados por aislamientos de *Lasiodiplodia* spp., *Neofusicoccum parvum*, *Pestalotiopsis theae* y *Phomopsis* sp. A-C) Aislamiento FLaGr. A) Lesiones iniciales radiales, alargadas, delgadas, húmedas y oscuras, originadas en el pedúnculo, 5 ddi. B) Lesiones hundidas con márgenes negros ondulados, 7 ddi. C) Pudrición total de los frutos con abundante producción de micelio sobre la epidermis o emergente a través de rupturas de ésta, 10 ddi. D) Aislamiento RPhGr causando lesiones de lento avance alrededor del pedúnculo, casi circulares con márgenes definidos y negras, 10 ddi. E) Aislamiento RPeMi con producción de micelio en el sitio de inoculación, 10 ddi.**

**Cuadro 7.** Significancias de las fuentes de variación para efectos de tres cultivares de mango y tratamientos con herida y sin herida sobre la velocidad de crecimiento de aislamientos de *Lasiodiplodia* spp., *Neofusicoccum parvum*, *Pestalotiopsis theae* y *Phomopsis* sp.

Fuente	GL*	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Cultivar (C)	2	13436.23336	6718.11668	2029.70	<.0001
Tratamiento (T)		15112.29333	15112.29333	4565.77	<.0001
Aslamiento (A)	8	11470.43499	1433.80437	433.18	<.0001
C*T	2	2767.74139	1383.87070	418.10	<.0001
C*A	16	2902.26142	181.39134	54.80	<.0001
T*A	8	2845.87437	355.73430	107.48	<.0001
C*T*A	16	518.77452	32.42341	9.80	<.0001
Modelo	53	49053.61339	925.53988	279.63	<.0001
Error	21	714.94116	3.30991		
Total	269	49768.55			

\*GL= Grados de libertad

El análisis de varianza y la prueba de medias indicaron que existen diferencias estadísticamente significativas entre cultivares, siendo Ataulfo el que presentó menos infección. Por su parte, el tratamiento con herida fue la mejor condición para el crecimiento de los hongos. Al realizar la comparación de medias de los tres cultivares con la prueba Tukey ( $P \leq 0.05$ ), no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los aislamientos de *Lasiodiplodia* y *Neofusicoccum*, lo que indica que no existe variabilidad patogénica entre estas especies aisladas (Cuadro 8).

Por otra parte, al comparar los tres cultivares, se observó que el tratamiento con herida resultó la mejor condición para el crecimiento de los aislamientos de *Lasiodiplodia* y *Neofusicoccum* en las interacciones Tommy Atkins + FLaGr, FNeNa, RLaGr, RLaMi y RNeMi al compartir áreas bajo la curva estadísticamente iguales junto con las interacciones de Kent + FLaCo y FNeJa (Cuadro 9).

**Cuadro 8.** Comparación de medias con la prueba Tukey ( $P \leq 0.05$ ) de la velocidad de crecimiento de la infección generada por los aislamientos de *Lasiodiplodia* spp., *Neofusicoccum parvum*, *Pestalotiopsis theae* y *Phomopsis* sp. sobre frutos de tres cultivares.

AGRUPAMIENTO TUKEY	MEDIA DE TRES CULTIVARES	NÚMERO DE MEDICIONES	AISLAMIENTOS
A	18.4383	30	FLaCo
A	18.2647	30	FLaGr
A	18.228	30	FNeJa
A	18.0983	30	FNeNa
A	17.84	30	RLaGr
A	17.1617	30	RLaMi
A	17.1567	30	RNeMi
B	4.9983	30	RPhGr
C	0.0000	30	RPeMi

Medias con letras iguales entre columnas son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05)

**Cuadro 9.** Área bajo la curva del diámetro de la lesión generada por diferentes aislamientos de *Lasiodiplodia* spp., *Neofusicoccum parvum*, *Pestalotiopsis theae* y *Phomopsis* sp. en tres cultivares de mango.

	FLaCo	FLaGr	FNeJa	FNeNa	RLaGr	RLaMi	RNeMi	RPhGr	RPeMi
<b>Ataulfo<sup>H</sup></b>	8.38 d	8.87 d	9.93 d	10.44 d	8.94 d	8.86 d	10.04 d	2.05 e	0 e
<b>Kent<sup>H</sup></b>	37.35 a	35.45 ab	37.20 a	33.90 abc	35.15 ab	32.15 bc	30.30 c	11.2 d	0 e
<b>T. Atkins<sup>H</sup></b>	36.30 ab	38.05 a	36.45 ab	37.55 a	34.50 a	37.50 a	37.80 a	11.20 d	0 e
<b>Ataulfo<sup>SH</sup></b>	1.56 e	1.90 e	2.05 e	1.85 e	1.90 e	1.26 e	1.65 e	1.59 e	0 e
<b>Kent<sup>SH</sup></b>	13.05 d	12.25 d	12.10 d	12.35 d	11.45 d	11.50 d	11.30 d	2.05 e	0 e
<b>T. Atkins<sup>SH</sup></b>	12.95 d	12.85 d	12.90 d	12.50 d	12.10 d	11.70 d	11.85 d	1.95 e	0 e

<sup>H</sup> Herida; <sup>SH</sup> Sin herida

Medias con letras iguales entre columnas son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05)

## 5.5. Caracterización morfológica

### 5.5.1. Características culturales

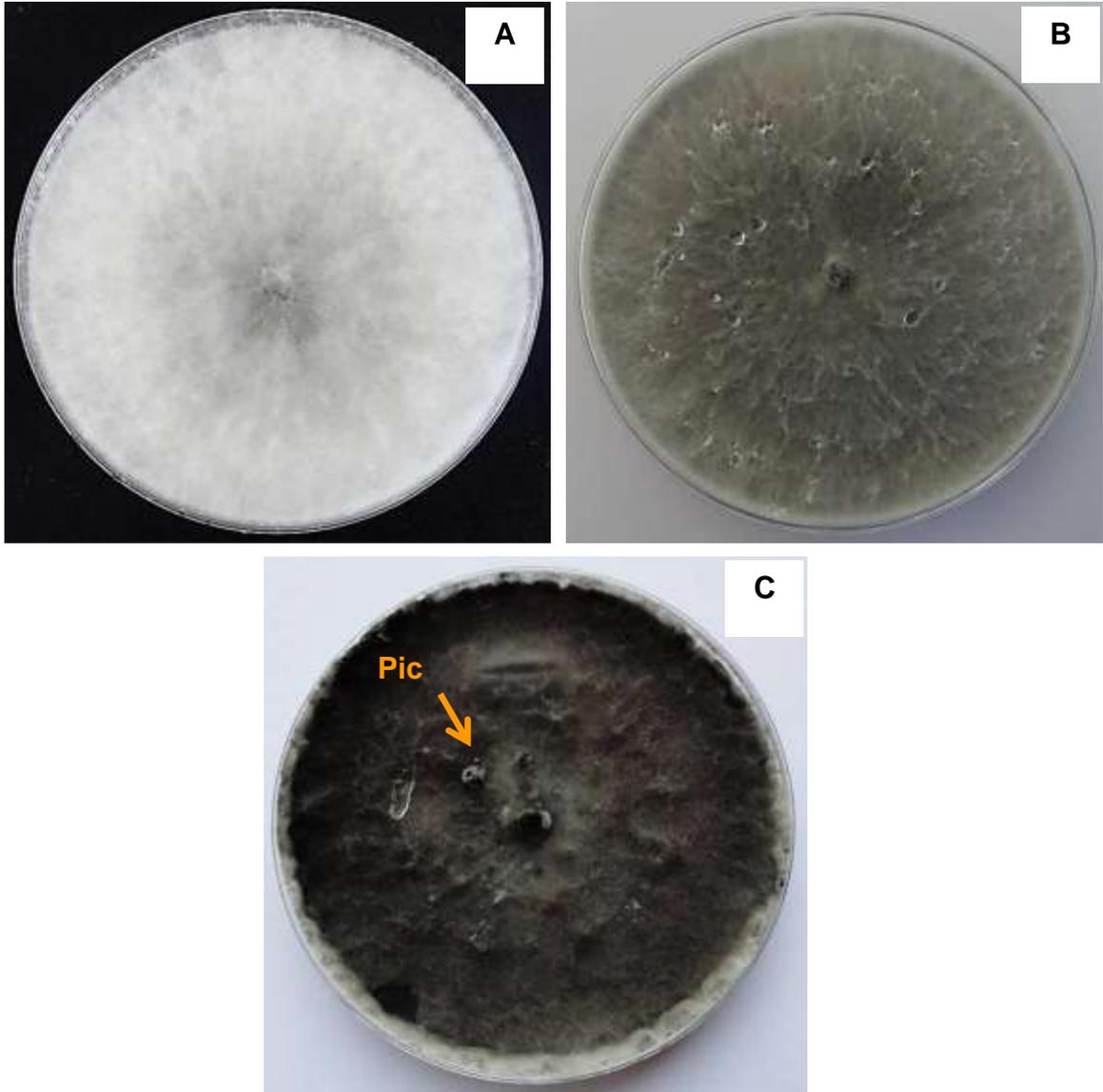
**5.5.1.1. Características culturales de *L. theobromae*.** Del primer al tercer día, las colonias desarrollaron abundante micelio algodonoso de color blanco-

grisáceo, aéreo y de crecimiento rápido (Figura 5A), que posteriormente se tornó gris oliváceo; en el centro de la caja de Petri, se observó denso y de color gris oscuro (Figura 5B); al reverso de la caja, se observó grisáceo en un inicio (1-3 días) y luego se tornó de color negro con jaspeado radial grisáceo. A partir de 15 días, se apreciaron conidiomas picnidiales (Figura 5C).

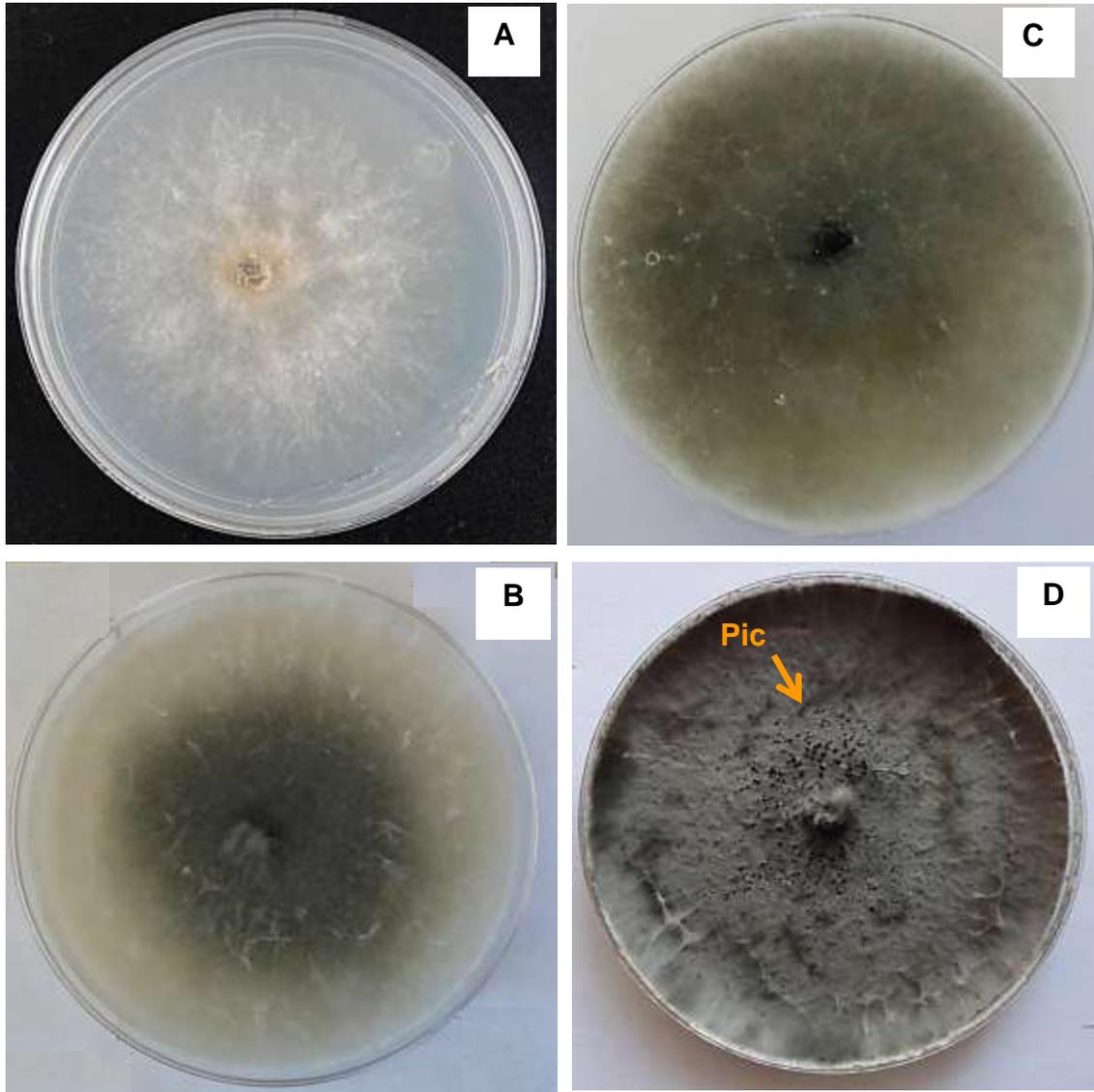
**5.5.1.2. Características culturales de *N. parvum*.** Las colonias desarrollaron inicialmente (1-3 días) micelio algodonoso, blanco-grisáceo y abundante, de crecimiento más lento que *L. theobromae* (Figura 6A); posteriormente se tornó gris, más denso en el centro (Figura 6B); progresivamente, se observó gris oscuro (Figura 6C); al reverso de la caja, se observó grisáceo en un inicio (1-3 días) y luego se tornó de color negro con jaspeado grisáceo. La formación de conidiomas picnidiales se observó a partir de los 13 días (Figura 6D).

## **5.5.2. Morfología de estructuras reproductivas**

**5.5.2.1. Morfología de estructuras reproductivas in vitro de *L. theobromae*.** Conidiomas picnidiales producidos en estroma, semi-inmersos, dispersos, simples o compuestos y en agregados (Figura 7A, 7B); picnidios negros, piriformes y ostiolados. Conidióforos hialinos, cilíndricos, simples, septados o aseptados, surgiendo de la pared interior de células que recubren la cavidad picnidial. Paráfisis hialinos, cilíndricos y aseptados. Después de 20 días, se observaron conidios inmaduros (amerosporas) hialinos, subovoides a elipsoidales, con pared gruesa y citoplasma granulado (Figura 7C), midiendo 20 - 31.02 x 11.36 - 16.36  $\mu\text{m}$  (25.53 x 13.16  $\mu\text{m}$ , promedio de 100 conidios). Los conidios maduros (didimosporas) se observaron alrededor de 25 días de edad; de color café oscuro, elipsoidales a ovoides, con estriaciones longitudinales irregulares (Figura 7D), midiendo 19.44 - 28.86 x 11.25 - 15.91  $\mu\text{m}$  (24.32 x 12.27  $\mu\text{m}$ , promedio de 100 conidios).



**Figura 5. Cultivo en medio PDA de *Lasiodiplodia theobromae* aislado de frutos de mango con pudrición del pedúnculo. A) Crecimiento de 3 días, B) 7 días y C) 20 días con presencia de picnidios (Pic).**

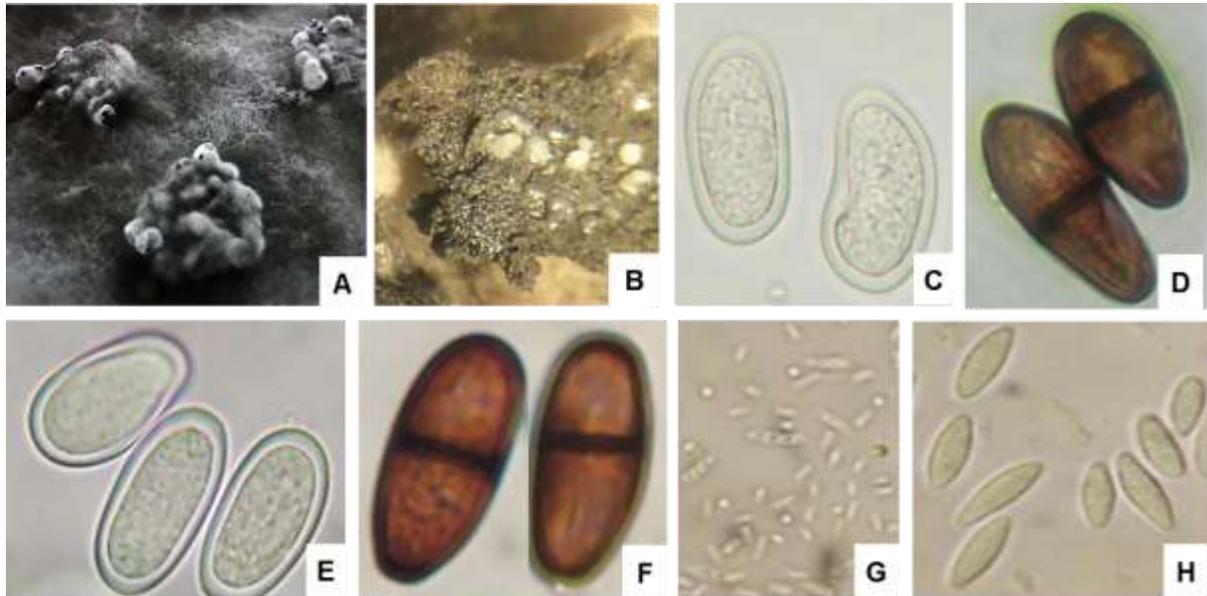


**Figura 6. Cultivo en medio PDA de *Neofusicoccum parvum* aislado de ramas de mango con muerte descendente. A) Crecimiento de 3 días, B) 5 días, C) 10 días y D) 15 días con presencia de picnidios (Pic).**

**5.5.2.2. Morfología de estructuras reproductivas in vitro de *L. pseudotheobromae*.** A diferencia de *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae* produce conidios más grandes y elipsoidales (Figura 7E), con el ápice y base redondeados, más estrechos en el centro, midiendo los conidios maduros (Figura 7F) 23.82 - 31.57 x 13.89 - 17.44  $\mu\text{m}$  (26.17 x 16.23  $\mu\text{m}$ , promedio de 100 conidios). Se ha reportado que produce un pigmento rosa oscuro en medio PDA incubado a 35 °C y es capaz de crecer a 10 °C, pero ambas características no fueron observadas en este estudio.

**5.5.2.3. Morfología de estructuras reproductivas in vitro de *N. parvum*.** Conidiomas picnidiales uni o multiloculares, individuales o constituidos en estroma; picnidios globosos, piriformes con una papila corta y aguda, y ostiolados. Conidióforos reducidos a células conidiogénicas, las cuales son hialinas, holoblásticas, formando conidios en sus puntas y surgiendo de la pared interior del lóculo y recubriéndolo. A partir de los 16 días se apreciaron conidios fusiformes a elipsoidales con ápice subobtusado y base truncada, lisos o gutulados, de paredes delgadas, hialinos y unicelulares (Figura 7G), midiendo 21.77 - 26.99 x 5.18 - 8.55  $\mu\text{m}$  (24.92 x 7.09  $\mu\text{m}$ , promedio de 150 conidios), así como microconidios hialinos, lisos, en forma de barra y truncados en los extremos (Figura 7H).

Las características culturales y estructuras de reproducción asexual en PDA y microscopía de luz coincidieron con las reportadas por Punithalingam (1976), Sutton (1980) y Burgess *et al.* (2006) para *L. theobromae*. En el caso de *L. pseudotheobromae*, concuerdan con las descripciones de Alves *et al.* (2008), y respecto a *N. parvum*, coinciden con aquellas de Pennycook y Samuels (1985) y Crous *et al.* (2006).



**Figura 7. Estructuras de reproducción asexual de *Lasiodiplodia theobromae*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae* y *Neofusicoccum parvum* producidas en medio PDA. A-D) Estructuras de *L. theobromae* A) Conidiomas picnidiales producidos en estroma y agregados. B) Conidioma segmentado con extrusión de conidios. C) Conidios inmaduros (amersporas). D) Conidios maduros (didimosporas). E) Amersporas y F) Didimosporas de *L. pseudotheobromae*. G) Conidios unicelulares hialinos y H) Microconidios de *N. parvum*.**

## 5.6. Identificación molecular

### 5.6.1. Análisis filogenético de los genes ribosomales

Con las amplificaciones llevadas a cabo mediante los primers ITS5 e ITS4, se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 500, 540 y 570 pb. Los resultados del BLASTN confirmaron que los aislamientos FNeJa, FNeNa y RNeMi se identificaron como *N. parvum*, y el aislamiento FLaGr como *L. theobromae* (números de acceso GenBank JQ619648, JQ619649, JQ619650, JQ619651) y los genes de la región ITS revelaron identidades de nucleótidos de las secuencias del 100% para estas especies. Asimismo, los aislamientos RLaGr y RLaMi se asemejan el 100% con *L. pseudotheobromae*, y en 99% el aislamiento RPeMi a *Pestalotiopsis theae* (números de acceso JQ619644, JQ619645, JQ619652). Las secuencias de los otros dos aislamientos que no fueron evaluados en las pruebas de patogenicidad, presentan

un 99% de identidad de sus nucleótidos con *Neofusicoccum* sp. (JQ619646, JQ619647) (Cuadro 10).

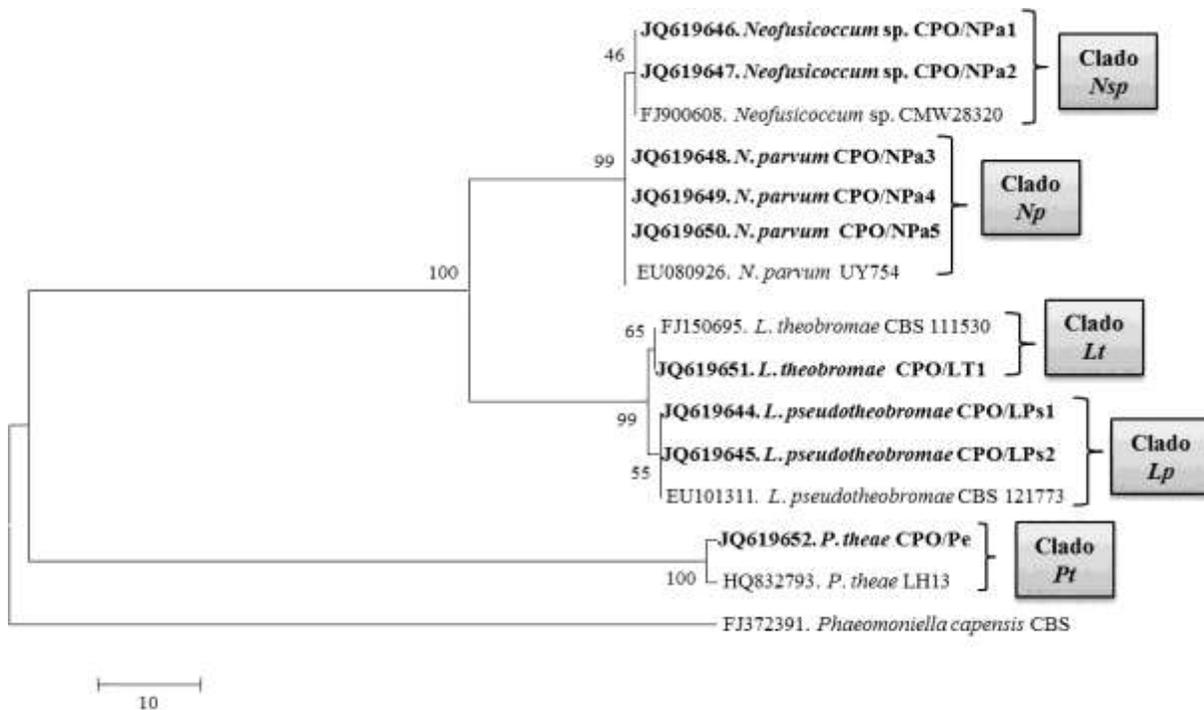
**Cuadro 10.** Identificación filogenética de aislamientos obtenidos de frutos de mango con síntomas de pudrición del pedúnculo y ramas con muerte descendente en México durante 2010 y 2011.

Nomenclatura <sup>a</sup>	Aislamiento	Identidad	Fuente	Hospedante	Localidad	Accesión GenBank ITS
CPO/LT1	FLaGr	<i>L. theobromae</i>	Fruto	Cv. 'Ataulfo'	Guerrero	JQ619651
CPO/LPs1	RLaGr	<i>L. pseudotheobromae</i>	Rama	Cv. 'Tommy Atkins'	Guerrero	JQ619644
CPO/LPs2	RLaMi	<i>L. pseudotheobromae</i>	Rama	Cv. 'Ataulfo'	Michoacán	JQ619645
CPO/NPa1	-	<i>Neofusicoccum</i> sp.	Fruto	Cv. 'Kent'	Nayarit	JQ619646
CPO/NPa2	-	<i>Neofusicoccum</i> sp.	Fruto	Cv. 'Kent'	Nayarit	JQ619647
CPO/NPa3	FNeJa	<i>N. parvum</i>	Fruto	Cv. 'Tommy Atkins'	Jalisco	JQ619648
CPO/NPa4	FNeNa	<i>N. parvum</i>	Fruto	Cv. 'Kent'	Nayarit	JQ619649
CPO/NPa5	RNeMi	<i>N. parvum</i>	Rama	Cv. 'Ataulfo'	Michoacán	JQ619650
CPO/Pe	RPeMi	<i>Pestalotiopsis theae</i>	Rama	Cv. 'Ataulfo'	Michoacán	JQ619652

<sup>a</sup> Nomenclatura de las secuencias enviadas al GenBank

FLaGr = Fruto *Lasiodiplodia* Guerrero; RLaGr = Rama *Lasiodiplodia* Guerrero; RLaMi = Rama *Lasiodiplodia* Michoacán; FNeJa = Fruto, *Neofusicoccum* Jalisco; FNeNa = Fruto, *Neofusicoccum* Nayarit; RNeMi = Rama, *Neofusicoccum* Michoacán; RPeMi = Rama *Pestalotiopsis* Michoacán.

Los aislamientos evaluados se separaron en cuatro clados utilizando el método de máxima parsimonia. Estos clados fueron designados *Lp* para *L. pseudotheobromae*, *Lt* para *L. theobromae*, *Np* para *N. parvum*, *Nsp* para *Neofusicoccum* sp. y *Pt* para *P. theae* (Figura 8).



**Figura 8.** Árbol consenso construido con las secuencias obtenidas de la región del ITS ribosomal de los aislamientos procedentes de Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán y Nayarit con el método de máxima parsimonia mediante análisis bootstrap con 1000 repeticiones. Se obtuvieron cinco clados (*Lp*: *L. pseudotheobromae*; *Lt*: *L. theobromae*; *Np*: *N. parvum*; *Nsp*: *Neofusicoccum* sp.; *Pt*: *P. theae*).

En los últimos años, la pudrición del pedúnculo se ha reportado como una enfermedad importante de frutos en postcosecha en las regiones productoras de mango alrededor del mundo. Se ha reconocido que la etiología de esta enfermedad ha sido imprecisa (Slippers *et al.*, 2005), pero con el uso actual de técnicas moleculares en combinación con los estudios morfológicos adecuados, es posible identificar aislamientos pertenecientes a diferentes taxones de manera precisa (Silva y Ávila, 2011).

En esta investigación, las poblaciones de patógenos de los estados de Colima, Guerrero, Jalisco y Nayarit, pertenecientes a la Costa del Pacífico de México, fueron identificadas con el fin de determinar la etiología de los agentes causales involucrados en los síntomas de pudrición del pedúnculo en frutos de mango y establecer una posible asociación de la muerte descendente con la

podrición del pedúnculo, así como determinar la existencia de variación patogénica. Este estudio representa la primera exploración de especies de la familia Botryosphaeriaceae donde la pudrición del pedúnculo es asociada con la muerte descendente de mango en México.

Las especies *L. theobromae*, *N. mangiferum* y *N. parvum* de la familia Botryosphaeriaceae son las que comúnmente se asocian causando enfermedades en las regiones productoras de mango alrededor del mundo, principalmente desórdenes de declinación y pudriciones del pedúnculo (Punithalingam, 1980; Johnson, 1994; Ploetz *et al.*, 1996; Slippers *et al.*, 2005; de Oliveira *et al.*, 2010; Sakalidis *et al.*, 2011). De la región productora de mango de la Costa del Pacífico, se aisló a *L. theobromae* y *N. parvum*; además de *L. pseudotheobromae*, de frutos con pudrición del pedúnculo y ramas con muerte descendente a partir de los cultivares Ataulfo, Kent y Tommy Atkins.

Aunque dichas especies muestran algunas variaciones en cuanto a características morfológicas, la amplificación usando primers universales para genes ribosomales, revelaron un buen nivel de concordancia entre los reportes previos para estas especies (Punithalingam, 1976; Sutton, 1980; Pennycook y Samuels, 1985; Burgess *et al.*, 2006; Crous *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2008;) y las estructuras morfológicas de los aislamientos obtenidos en este estudio. No se observó diversidad genética en los aislamientos, como se muestra por los marcadores moleculares en este estudio con las secuencias de Camerún, China y Uruguay (Begoude *et al.*, 2010, no publicado, 2009; Perez *et al.*, 2010; Liu *et al.*, no publicado, 2010) utilizadas para su comparación.

En el caso de *L. pseudotheobromae*, corresponde a una especie que alguna vez se clasificó como *L. theobromae*, pero a través de características moleculares y morfológicas, fue revelada por Alves *et al.* (2008) como una especie críptica de *L. theobromae* y considerada como una nueva especie. Desde entonces, este nuevo patógeno se ha encontrado en diferentes hospedantes incluyendo *Acacia* spp. (Alves

*et al.*, 2008; Perez *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010) en China, Costa Rica y Uruguay; *Albizia falcataria* (Zhao *et al.*, 2010) en China; *Citrus* spp. (Alves *et al.*, 2008; Phillips *et al.*, 2008, 2009; Abdollahzadeh *et al.*, 2010; Begoude *et al.*, 2010; Wright *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010) en Irán y Surinam; *Coffea* sp. (Alves *et al.*, 2008; Abdollahzadeh *et al.*, 2009, 2010) en República del Congo; *Eucalyptus* spp. (Perez *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010) en China y Uruguay; *Gmelina* spp. (Liu *et al.*, 2010) en Costa Rica; *Mangifera* spp. (Zhao *et al.*, 2010; Sakalidis *et al.*, 2011) en China y Sudáfrica; *Myrcianthes pungens* (Perez *et al.*, 2010) en Uruguay; *Paulownia fortunei* (Zhao *et al.*, 2010) en China; *Rosa* sp. (Zhao *et al.*, 2010) en Países Bajos; y *Terminalia catappa* (Begoude *et al.*, 2010) en Madagascar y Sudáfrica. Hasta ahora, no ha habido reportes sugiriendo que afecta cultivos en México.

Los dos aislamientos obtenidos de frutos del cultivar Kent en Nayarit e identificados como *Neofusicoccum* sp., revelan que este género de hongos presenta un evento de especiación, ya que al no definirse la especie, indica que posiblemente *N. parvum* u otra especie del mismo género está cambiando, por lo que tiene potencial como nueva especie. Al comparar estos aislamientos en la base de datos del BLASTN, la secuencia *Neofusicoccum* sp. CMW28320 de Camerún, resulta la más cercana. Asimismo, al alinear las secuencias de los aislamientos de *N. parvum* y *Neofusicoccum* sp. (procedentes de Nayarit) obtenidas en esta investigación con las de aguacate (Molina *et al.*, 2011) y arándano (Rebollar, A., 2012, comunicación personal<sup>1</sup>), ambas de Michoacán, las del presente estudio, presentan más cercanía con aquellas de aguacate, por lo que es probable que la ruta de esporas haya partido de Michoacán hacia Nayarit o viceversa, estableciéndose un proceso de adaptación regional. La variación genética puede deberse a mutaciones y procesos selectivos de adaptación en un hospedante determinado. *Neofusicoccum* sp., ha sido reportada recientemente causando daños en *Blepharocalyx salicifolius*, *Eucalyptus* spp., *Eugenia* spp., *Myrcianthes cisplatensis*, *Myrciaria tenella*, *Myrrhinium atropurpureum* var. *octandrum* y *Psidium pubifolium* en Uruguay (Perez *et al.*, 2010), *Persea americana* en California (McDonald y Eskalen, 2011), *Protea cynaroides* en

<sup>1</sup>Rebollar, A. A Centro Regional Morelia, Universidad Autónoma Chapingo. Comunicación personal

Zimbabwe (Marincowitz *et al.*, 2008), *Vaccinium corymbosum* en Chile (Espinoza *et al.*, 2009) y *Vitis vinifera* en California (Urbez-Torres *et al.*, 2010).

El espectro de taxones de Botryosphaeriaceae colonizando los árboles y frutos de mango puede reflejar lo que fue introducido con el germoplasma y lo que está presente en el ambiente local. Las especies de hongos introducidas pueden estar menos adaptadas al clima o menos dispersas en el suelo en forma de inóculo. Los mangos que han sido introducidos en hábitats exóticos pueden no tener el conjunto completo de microflora fúngica que se produce dentro de su ambiente natural. Los endófitos introducidos con el mango pudieron haber interrumpido la microecología equilibrada del hospedante, lo cual incurre en una reducción del sistema de defensa de la planta, lo que resulta en un aumento de la colonización de los endófitos localmente adaptados y un incremento del potencial patogénico para los patógenos latentes, ambos ocurriendo de manera natural dentro del hospedante (Regina *et al.*, 2001; Sakalidis *et al.*, 2011). También es importante considerar las técnicas de control de enfermedades, ya que por ejemplo, desde que se implementó un programa de control para *C. gloeosporioides* en mangos australianos, la pudrición del pedúnculo se convirtió en la principal enfermedad postcosecha (Johnson *et al.*, 1991b).

Al igual que Johnson (1992), Ploetz *et al.* (1996), Ramos *et al.* (1997) y de Oliveira *et al.* (2010) se aislaron otras especies de hongos en menor frecuencia, entre ellas *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp. y *Phomopsis* sp. En este estudio, se observó que mientras *Lasiodiplodia* spp. y *N. parvum* pudren un fruto completo, en los frutos inoculados con *Phomopsis* sp. sólo se observaba pudrición en un tercio de éstos; por su parte, *P. theae* no indujo pudrición en ningún cultivar, lo cual indica que esa especie no es patogénica en mango o no existieron las condiciones para inducir síntomas.

La especificidad regional dentro de los miembros de Botryosphaeriaceae ha sido observada. de Oliveira *et al.* (2010), encontraron que en el Valle de San Francisco, *Fusicoccum aesculi* y *N. parvum* fueron más prevalentes que *L.*

*theobromae*, mientras que *L. theobromae* fue la especie predominante en el Valle de Assú. Ambos lugares se encuentran en el noreste semiárido de Brasil, presentando condiciones climáticas similares. Así mismo, *N. parvum* fue aislado de los cultivares Tommy Atkins, Van Dyke, Haden, Kent y Keitt; mientras que *L. theobromae* sólo fue aislado de Tommy Atkins. Esos resultados coinciden con los presentes, ya que en este estudio, *N. parvum* también fue aislado de los cultivares Tommy Atkins y Kent, pero *L. theobromae* sólo fue aislado de Ataulfo y Tommy Atkins.

Las diferencias en cuanto a las poblaciones de hongos en mango, pueden deberse a varias razones como condiciones climáticas extremas de altas temperaturas, tormentas violentas, inundaciones o sequías; la eficacia de las medidas cuarentenarias en la prevención del movimiento de los patógenos comunes dentro de la región o la proximidad a los endófitos que dominan la vegetación nativa y que están mejor adaptados al ambiente (Sakalidis *et al.*, 2011).

El éxito relativo de colonización también es influenciado por la temperatura. Especies del complejo de *L. theobromae* son consistentemente encontradas bajo ambientes cálidos-tropicales o subtropicales, mientras que *N. parvum* generalmente es encontrado en condiciones templadas (Burgess *et al.* 2006; Pavlic *et al.* 2007; Sakalidis *et al.* 2011).

Las infecciones cruzadas realizadas por Johnson (1993) mostraron que cuando los frutos fueron coinfectados con *L. theobromae* y *N. parvum*, incubados a varias temperaturas, *L. theobromae* produjo lesiones grandes a 30 °C, mientras que *N. parvum* dominó a 13 °C, y hubo una expresión mixta en un intervalo de 18-25 °C. Estos resultados concuerdan con aquellos obtenidos por Sakalidis *et al.* (2011), en donde observaron que *Lasiodiplodia* sp. 1 y *L. pseudotheobromae*, produjeron las lesiones más grandes sobre frutos, seguidas por *Neoscytalidium dimidiatum* y *Ne. novaehollandiae*, a 28-33 °C. En el presente estudio, no se utilizó la temperatura como variable, sin embargo, los resultados difieren con los descritos anteriormente,

pues tanto *L. theobromae*, como *L. pseudotheobromae* y *N. parvum* fueron patogénicos a 25°C.

Se demostró la patogenicidad de los hongos aislados de frutos al reproducir los síntomas en frutos inoculados de manera artificial, y reaislarlos. Las especies de *Pestalotiopsis* sp. y *Phomopsis* sp. fueron inoculadas con el fin de comparar los síntomas reportados en la literatura (Jhonson, 1994; Ko, 2009) los cuales coinciden con los obtenidos en este estudio. Por otra parte, al realizar en frutos la infección cruzada de los aislamientos de *L. pseudotheobromae* y *N. parvum* obtenidos de ramas con muerte descendente, se estableció una posible asociación con pudrición del pedúnculo, ya que todos los aislamientos fueron patogénicos en los tres cultivares, produciendo los mismos síntomas que aquellos de los aislamientos de frutos. Son necesarios más estudios de patogenicidad en ramas para complementar la asociación obtenida en este estudio y de esta manera, resolver la etiología en cuanto a si *N. parvum* también es responsable de causar muerte regresiva de árboles de mango, ya que comúnmente se atribuye esta enfermedad a *Lasiodiplodia theobromae*.

Las técnicas moleculares, específicamente los datos de las secuencias de DNA permiten discriminar numerosas nuevas especies. Sin estas herramientas eficaces, especies crípticas o estrechamente relacionadas, así como complejos de especies permanecerían sin ser reconocidas. Sin embargo, las características morfológicas y otras fenotípicas, tales como la patogenicidad, no deben ser subestimadas porque diferencias en estas características pueden indicar la presencia de especies crípticas y presentar datos valiosos en su delimitación (Pavlic *et al.*, 2009).

Es importante establecer y comprender la vía de infección de hongos patógenos para conducir prácticas de manejo que puedan reducir el inóculo e infección en los hospedantes. Las especies de la familia Botryosphaeriaceae pueden infectar a las plantas a través de colonización endofítica, por heridas, por semillas,

injertos, así como por la infección del suelo de frutos y semillas caídos (Brown y Hendrix 1981; Smith *et al.* 1996a, b; Slippers y Wingfield, 2007; Tovar, 2010; Sakalidis *et al.* 2011). Para los patógenos postcosecha, la información precisa acerca de fuentes de inóculo, modo y tiempo de infección y la respuesta de los patógenos a las temperaturas de almacenamiento, contribuirán con la eficacia en el control de enfermedades.

## 6. CONCLUSIONES

La frecuencia de aislamientos, identificación morfológica, molecular, análisis filogenético y pruebas de patogenicidad confirmaron que los hongos asociados con la pudrición del pedúnculo en los Estados de la Costa del Pacífico de México, corresponden a *Lasiodiplodia theobromae* y *Neofusicoccum parvum*.

La frecuencia de aislamientos, identificación morfológica, molecular y análisis filogenético confirmaron que los hongos asociados con la muerte descendente de ramas en Guerrero y Michoacán, corresponden a *Lasiodiplodia pseudotheobromae* y *N. parvum*.

Las pruebas de asociación de los aislamientos de *L. pseudotheobromae* y *N. parvum* obtenidos de ramas con muerte descendente, establecieron una posible asociación con pudrición del pedúnculo, ya que todos los aislamientos fueron patogénicos en los tres cultivares, produciendo los mismos síntomas que aquellos de los aislamientos de frutos.

Los dos aislamientos obtenidos de frutos del cultivar Kent en Nayarit e identificados como *Neofusicoccum* sp., revelan que este género de hongos presenta un evento de especiación, indicando que posiblemente *N. parvum* u otra especie del mismo género está cambiando, por lo que tiene potencial como nueva especie.

## 7. LITERATURA CITADA

- Abdollahzadeh, J., E. M. Goltapeh, A. Javadi, M. Shams-Bakhsh, R. Zare, and A. J. L. Phillips. 2009. *Barriopsis iraniana* and *Phaeobotryon cupressi*: two new species of the Botryosphaeriaceae from trees in Iran. *Persoonia* 23: 1-8.
- Abdollahzadeh, J., A. Javadi, E. M. Goltapeh, R. Zare, and A. J. L. Phillips. 2010. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia* 25: 1-10.
- Adisa, V. A. and O. A. Obinyereokwu. 1988. Studies on the latent infection of *Botryodiplodia theobromae* Pat. on *Citrus sinensis* (Li.) Osbeck fruit. *Mycopathologia* 102(3): 165-167.
- Ahrens, U. and E. Seemüller. 1992. Detection de DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.
- Alama, I., E. Maldonado, y G. E. Rodríguez. 2006. *Lasiodiplodia theobromae* afectando el cultivo del Palto (*Persea americana*) en las condiciones de Piura-Perú. *Universalía* 11: 4-13.
- Alvarez-García, L. A. and J. López-Gracia. 1971. Gummosis, dieback, and fruit rot disease of mango (*Mangifera indica* L.) caused by *Physalospora rhodina* (B. and C.) Cke. in Puerto Rico. *Journal of Agriculture University of Puerto Rico* 55: 435-450.
- Alves, A., P. W. Crous, A. Correia, and A. J. L. Phillips. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic species in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* 28: 1-13.
- Barnett, L. H. and B. B. Hunter. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Fourth Edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA.
- Bautista-Baños, S., J. C. Díaz-Pérez, and L. L. Barrera-Necha. 2002. Postharvest fungal rots of sapote mamey *Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn. *Postharvest Biology and Technology* 24: 197-200.
- Begoude, A. D., B. Slippers, M. J. Wingfeld, and J. Roux, 2010. Botryosphaeriaceae associated with *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar. *Mycological Progress* 9: 101-123.

- Brown E. A. and Hendrix F. F. 1981. Pathogenicity and histopathology of *Botryosphaeria dothidea* on apple stems. *Phytopathology* 71: 375-379.
- Brown, G. E. and J. W. Eckert. 2000. Diplodia stem-end rot. *In: Compendium of Citrus Diseases*, 2nd ed. L. W. Timmer, S. M. Gernsey, and J. H. Graham (eds). American Phytopathological Society. pp: 43-44.
- Burgess, T. I., P. A. Barber, S. Mohali, G. Pegg, W. de Beer, M. J. Wingfield. 2006. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia* 98: 423-435.
- Cardoso, J. E., C. M. Maia, and M. N. G. Pessoa. 2002. Occurrence of *Pestalotiopsis psidii* and *Lasiodiplodia theobromae* causing stem rot of guava plants in the State of Ceará, Brazil. *Fitopatologia brasileira* 27(3): 320.
- Crous, P. W., B. Slippers, M. J. Wingfield, J. Rheeder, W. F. O. Marasas, A. J. L. Phillips, A. Alves, T. Burgess, P. Barber, and J. Z. Groenewald. 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology* 55: 235-253.
- Darvas, J. M., and J. M. Kotzé. 1987. Fungi associated with pre-and postharvest diseases of avocado fruit at Westfalia Estate, South Africa. *Phytophylactica* 19: 83-85.
- Darvas, J. M. 1991. *Dothiorella dominicana*, a new mango pathogen in South Africa. *Phytophylactica* 23: 295–298.
- Denman, S., P. W. Crous, J. E. Taylor, J. C. Kang, I. Pascoe, M. J. Wingfield 2000. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria* and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology* 45: 129-140.
- de Oliveira, V. S. C., S. J. Michereff, R. M. Brainer, C. A. G. Tuão, E. S. M. Gomide, and M. P. C. Saraiva. 2010. Species of Botryosphaeriaceae associated on mango in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 127: 509-519.
- Ellis, M. A., M. Nita, and L. V. Madden. 2000. First report of Phomopsis fruit rot of strawberry in Ohio. *Plant disease* 84(2): 199.

- Espinoza, J. G., E. X. Briceño, E. R. Chavez, J. R. Urbez-Torres, and B. A. Latorre, 2009. *Neofusicoccum* spp. associated with stem canker and dieback of blueberry in Chile. *Plant Disease* 93(11): 1187-1194.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2010. Disponible en: <http://www.fao.org>. Consultado el 20 de octubre de 2011.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Freire, F. C. O. and J. L. Bezerra, 2001. Foliar endophytic fungi of Ceará State (Brazil): a preliminary study. *Summa Phytopathologica* 27: 304-308.
- Garibaldi, A., D. Bertetti, A. Poli, and M. L. Gullino. 2011. First report of black rot caused by *Phomopsis cucurbitae* on cantaloupe (*Cucumis melo*) in the Piedmont Region of Northern Italy. *Plant disease* 95(10): 1317.
- Gómez-Jaimes, R., D. Nieto-Ángel, D. Téliz-Ortiz, A. Mora-Aguilera, M. T. Martínez-Damián, M. Vargas-Hernández. 2009. Evaluation of refrigerated sapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn) quality and incidence of fungi. *Agrociencia* 43: 37-48.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hartill, W. F. T. and K. R. Everett. 2002. Inoculum sources and infection pathways of pathogens causing stem-end rots of 'Hass' avocado (*Persea americana*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 30(4): 249-260.
- Javier-Alva, J., D. Gramaje, L. A. Alvarez, and J. Armengol. 2009. First report of *Neofusicoccum parvum* associated with dieback of mango trees in Peru. *Plant Disease* 93: 426.
- Johnson, G. I., A. W. Cooke, A. J. Mead, and I. A. Wells. 1991a. Stem end rot of mango in Australia: causes and control. *Acta Horticulturae* 291: 288-295.
- Johnson, G. I., A. J. Mead, A. W. Cooke, and J. R. Dean. 1991b. Mango stem end rot pathogens- Infection levels between flowering and harvest. *Annals of Applied Biology* 119: 465-473.

- Johnson, G. I., A. J. Mead, A. W. Cooke, and J. R. Dean. 1992. Mango stem end rot pathogens- Fruit infection by endophytic colonisation of the inflorescence and pedicel. *Annals of Applied Biology*. 120: 225-234.
- Johnson, G. I., A. W. Cooke, and A. J. Mead. 1993. Infection and quiescence of mango stem end rot pathogens. *Acta Horticulturae* 341: 329-336.
- Johnson, G. I. 1994. Stem-end rot. *In: Compendium of tropical fruit diseases*. Ploetz, R. C., G. A Zentmyer, W. T. Nishijima, K. G. Rohrbach, and H. D. Ohr (eds.) Ed. APS Press. pp: 39-41.
- Karaoglanidis, G. S. and G. Bardas. 2006. First report of *Phomopsis* fruit decay on apple caused by *Phomopsis mali* in Greece. *Plant disease* 90(3): 375.
- Khanzada, M. A., A. M. Lodhi, and S. Saleem. 2004. Pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Fusarium solani* on mango. *Pakistan Journal of Botany* 36: 181-189.
- Kirk, P. M., P. F. Cannon, D. W. Minter, and J. A. Stalpers. 2008. *Dictionary of the Fungi*. 10th ed. CABI Publishing, Wallingford, U.K. 722 p.
- Ko, Y., C. W. Liu, C. Y. Chen, S. Maruthasalam, and C. H. Lin. 2009. First report of stem end rot of mango caused by *Phomopsis mangiferae* in Taiwan. *Plant Disease* 93(7): 764.
- Kobiler, I., Y. Shalom, I. Roth, M. Akerman, Y. Vinokour, Y. Fuchs, and D. Prusky. 2001. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the incidence of side and stem end rots in mango fruits. *Postharvest Biology and Technology* 23: 23–32.
- Korsten, L., G. M. Sanders, and E. Grosse-Weischede. 1994. Isolation and pathogenicity of avocado post-harvest pathogens from Westfalia and other avocado producing areas. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 17: 46-48.
- Liengme, B. V. 2002. *A Guide to Microsoft Excel for scientists and engineers*. 2<sup>nd</sup> ed. Butterworth-Heinemann. 271 p.
- Lim, T. K. 1994. Gray leaf spot. *In: Compendium of tropical fruit diseases*. Ploetz, R. C., G. A Zentmyer, W. T. Nishijima, K. G. Rohrbach, and H. D. Ohr (eds.) Ed. APS Press. pp: 36.

- Liu, J. K., P. Chomnunti, L. Cai, R. Phookamsak, E. Chukeatirote, E. B. G. Jones, M. Moslem, and K. D. Hyde. 2010. Phylogeny and morphology of *Neodeightonia palmicola* sp. nov. from palms. *Sydowia* 62: 261-276.
- Luo, M., Z. Y. Dong, S. Y. Bin, and J. T. Lin. 2011. First report of fruit rot disease on pomelo caused by *Lasiodiplodia theobromae* in China. *Plant Disease* 95(9): 1190.
- Marincowitz, S., J. Z. Groenewald, M. J. Wingfield, and P. W. Crous, 2008. Species of Botryosphaeriaceae occurring on Proteaceae. *Persoonia* 21: 111-118.
- Mascarenhas, P., A. Behere, A. Sharma, and S. R. Padwal-Desai. 1996. Post-harvest spoilage of mango (*Mangifera indica*) by *Botryodiplodia theobromae*. *Mycological Research* 100: 27-30.
- McDonald, V. and A. Eskalen, 2011. Botryosphaeriaceae species associated with avocado branch cankers in California. *Plant Disease* 95(11): 1465-1473.
- McSorley, R., J. L. Parrado, and S. Goldweber. 1981. Plant-parasitic nematodes associated with mango and relationship to tree condition. *Nematropica* 11: 1-9.
- Meah, M. B., R. A. Plumbley, and M. J. Jeger. 1991. Growth and infectivity of *Botryodiplodia theobromae* causing stem-end rot of mango. *Mycological Research* 95(4): 405-408.
- Michailides, T. J. and T. Thomidis. 2006. First report of *Phomopsis amygdali* causing fruit rot on peaches in Greece. *Plant disease* 90(12): 1551.
- Mirzaee, M. R., M. Azadvar, and D. Ershad. 2002. The incidence of *Lasiodiplodia theobromae* the cause of fruit and stem-end rot of mango in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 38: 62-65.
- Mohali, S., T. I. Burgess, and M. J. Wingfield. 2005. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *Forest Pathology* 35: 385-396.
- Molina-Gayosso, E., H. V. Silva-Rojas, and S. García-Morales. 2012. First report of black spots on avocado fruit caused by *Neofusicoccum parvum* in Mexico. *Plant disease* 96(2): 287.

- Morales-Rondón, V. and M. Rodríguez-González. 2006. Endophytes fungi in mango 'Haden' orchards of Maracaibo plain, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia* 23: 273-284.
- Nago, H. and M. Matsumoto. 1994. An ecological role of volatiles produced by *Lasiodiplodia theobromae*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 58: 1267-1272.
- Ni, H. F., R. F. Liou, T. H. Hung, R. S. Chen, and H. R. Yang. 2010. First report of fruit rot disease of mango caused by *Botryosphaeria dothidea* and *Neofusicoccum mangiferae* in Taiwan. *Plant Disease* 94(1): 128.
- Pavlic, D., B. Slippers, T. A. Coutinho, and M. J. Wingfield. 2007. Botryosphaeriaceae occurring on native *Syzygium cordatum* in South Africa and their potential threat to *Eucalyptus*. *Plant Pathology* 56(4): 624-636.
- Pennycook, S. R. and G. J. Samuels. 1985. *Botryosphaeria* and *Fusicoccum* species associated with ripe fruit rot of *Actinidia deliciosa* (Kiwifruit) in New Zealand. *Mycotaxon* 24: 445-458.
- Perez, C. A., M. J. Wingfield, B. Slippers, N. A. Altier, and R. A. Blanchette, 2010. Endophytic and canker-associated Botryosphaeriaceae occurring on non-native *Eucalyptus* and native Myrtaceae trees in Uruguay. *Fungal Diversity* 41: 53-69.
- Peterson, R. A., G. I. Johnson, L. G. Schipke, and A. W. Cook. 1991. Chemical control of stem end rot. *Acta Horticulturae* 291: 304-307.
- Phillips, A. J. L., P. V. Oudemans, A. Correia, and A. Alves. 2006. Characterisation and epitypification of *Botryosphaeria corticis*, the cause of blueberry cane canker. *Fungal Diversity* 21: 141-155.
- Phillips, A. J. L., A. Alves, S. R. Pennycook, P. R. Johnston, A. Ramaley, A. Akulov, and P. W. Crous, 2008. Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. *Persoonia* 21: 29-55.
- Phillips, A. J. L. and A. Alves, 2009. Taxonomy, phylogeny, and epitypification of *Melanops tulasnei*, the type species of *Melanops*. *Fungal Diversity* 38: 155-166.

- Plan, M. R. R., D. C. Joyce, H. J. Ogle, and G. I. Johnson, 2002. Mango stem-end rot (*Botryosphaeria dothidea*) disease control by partial-pressure infiltration of fungicides. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 42: 625–629.
- Ploetz, R. C. 2003. Diseases of Mango. *In*: R. C. Ploetz (ed.) Diseases of tropical fruit crops. CABI Publishing. Wallingford, UK. pp. 327-363.
- Ploetz, R. C. and S. Freeman. 2009. Foliar, floral and soilborne diseases. *In*: The mango: botany, production and uses. Litz, R. E. (ed.) Ed. CAB International. pp: 231-302.
- Ploetz, R. C., D. Benscher, A. Vázquez, A. Colls, J. Nagel, and B. Schaffer. 1996. A reexamination of mango decline in Florida. *Plant Disease* 80(6): 664-668.
- Prusky, D., I. Kobilier, I. Miyara, and N. Alkan. 2009. Fruit diseases. *In*: The mango: botany, production and uses. Litz, R. E. (ed.) Ed. CAB International. pp: 210-230.
- Punithalingam, E. 1976. *Botryodiplodia theobromae*. C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria 519: 1-3.
- Ramos, L. J., T. L. Davenport, Jr. R. T. McMillan, and S. P. Lara. 1997. The resistance of mango (*Mangifera indica*) cultivars to tip dieback disease in Florida. *Plant Disease* 81(5): 509-514.
- Regina, S. R., David, D. D., and J. R. Rusty. 2001. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? *The New Phytologist* 151: 705-716.
- Rodríguez, G. E., D. E. Maldonado, and M. A. Díaz. 1999. Incidence of mango stem-end rot caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Piura, Peru. *Fitopatología*. 34: 90-95.
- Sakalidis, M. L., J. D. Ray, V. Lanoiselet, G. E. StJ. Hardy, and T. I. Burgess. 2011. Pathogenic Botryosphaeriaceae associated with *Mangifera indica* in the Kimberley Region of Western Australia. *European Journal of Plant Pathology* 130: 379-391.
- Sangchote, S. 1988. Botryodiplodia stem end rot of mango and its control. *Kasetsart J. Natural Sciences*. 22: 67-70.

- Schoch, C., R. A. Shoemaker, K. A. Seifert, S. Hambleton, J. W. Spatafora, P. W. Crous. 2006. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. *Mycologia* 98: 1041-1052.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), 2010. Disponible en: <http://siap.sagarpa.gob.mx>. Consultado el 12 de octubre de 2011.
- Sharma, R. R., D. Singh, and R. Singh. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control* 50: 205–221.
- Silimela, M. and L. Korsten. 2006. Evaluation of pre-harvest *Bacillus licheniformis* sprays to control mango fruit diseases. *Crop Protection* 26: 1471-1481.
- Silva-Rojas, H. V. and G. Avila-Quezada. 2011. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. *Plant Pathology* 60: 899-908.
- Slabaugh, W. R. 1994. Botryodiplodia finger rot. *In*: Compendium of tropical fruit diseases. Ploetz, R. C., G. A Zentmyer, W. T. Nishijima, K. G. Rohrbach, and H. D. Ohr (eds.) Ed. APS Press. pp: 5-6.
- Slippers, B., P. W. Crous, S. Denman, T. A. Coutinho, B. D. Wingfield, and M. J. Wingfield. 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96: 83-101.
- Slippers, B., G. I. Johnson, P. W. Crous, T. A. Coutinho, B. D. Wingfield, and M. J. Wingfield. 2005. Phylogenetic and morphological re-evaluation of the *Botryosphaeria* species causing diseases of *Mangifera indica*. *Mycologia* 97: 99-110.
- Slippers, B. and M. J. Wingfield. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 21: 90-106.
- Smith, H., M. J. Wingfield, P. W. Crous, T. A. Coutinho. 1996. *Sphaeropsis sapinea* and *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Pinus* spp. and *Eucalyptus* spp. in South Africa. *South African Journal of Botany* 62: 86-88.
- Srivastava, D. N. 1972. Epidemiology and prevention of Diplodia stem-end rot of ripe mango fruits. *Acta Horticulturae* 24: 235-236.

- Sutton, B. C. 1980. The Coelomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK. 696 p.
- Tamura, K., J., M. N. Dudley, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, T. J. Gibson. 1994. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–80.
- Tovar, P. J. M. 2010. Etiología, histopatología y control de la muerte descendente de injertos de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore & Stearn) en Guerrero, México. Colegio de Postgraduados. Fitosanidad-Fitopatología. Tesis para obtener el grado de Maestría. Montecillo, México. 80 p.
- Urbez-Torres, J. R., M. Battany, L. J. Bettiga, C. Gispert, G. McGourty, J. Roncoroni, R. J. Smith, P. Verdegaal, and W. D. Gubler. 2010. Botryosphaeriaceae species spore-trapping studies in California vineyards. *Plant Disease* 94(6): 717-724.
- Wang, H. L., P. H. Chen, H. F. Ni, and R. S. Chen. 2007. Physiological characterization and screen of control chemicals for *Lasiodiplodia theobromae* of papaya. *Plant Pathology Bulletin* 16: 71-77.
- Wright, A. F. and P. F. Harmon. 2010. Identification of species in the Botryosphaeriaceae family causing stem blight on southern highbush blueberry in Florida. *Plant Disease* 94(8): 966-971.
- Zea-Bonilla, T., M. A. González-Sánchez, P. M. Martín-Sánchez, and R. M. Pérez-Jiménez. 2007. Avocado dieback caused by *Neofusicoccum parvum* in the Andalusia Region, Spain. *Plant disease* 91(8): 1052.
- Zhang, J. and P. P. Swingle. 2005. Effects of curing on green mold and stem-end rot of citrus fruit and its potential application under Florida packing system. *Plant Disease* 89(8): 834-840.
- Zhang, J. and L. W. Timmer. 2007. Preharvest application of fungicides for postharvest disease control on early season tangerine hybrids in Florida. *Crop Protection* 26: 886-893.

Zhao, J. P., Q. Lu, J. Liang, C. Decock, and X. Y. Zhang, 2010. *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, a new record of pathogenic fungus from some subtropical and tropical trees in southern China. *Cryptogamie Mycologie*. 31: 431-439.