

#### **CAMPUS MONTECILLO**

POSTGRADO DE FITOSANIDAD ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

## EL PAPEL DEL ÁCARO *Aceria mangiferae* (Sayed) EN LA DEFORMACIÓN DEL MANGO O "ESCOBA DE BRUJA"

### MARTHA ELENA LÓPEZ ESTRADA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS** 

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2008

La presente tesis titulada "EL PAPEL DEL ÁCARO Aceria mangiferae (Sayed) EN LA DEFORMACIÓN DEL MANGO O "ESCOBA DE BRUJA", realizada por la alumna MARTHA ELENA LÓPEZ ESTRADA, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

# DOCTORA EN CIENCIAS FITOSANIDAD ENTOMOLOGIA Y ACAROLOGÍA

#### **CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO:	DR. GABRIEL OTERO COLINA
ASESOR:	DR. ALEJANDRO MICHEL ACEVES
ASESOR:	DRA. MARIA CONCEPCIÓN ACOSTA RODRIGUEZ
ASESOR:	DR. JORGE PEÑA
ASESOR:	DR. DAVID HERIBERTO NORIEGA CANTÚ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, marzo de 2008

## EL PAPEL DEL ÁCARO Aceria mangiferae (Sayed) EN LA DEFORMACIÓN DEL MANGO O "ESCOBA DE BRUJA"

Martha Elena López Estrada, Dra. Colegio de Postgraduados, 2008

La deformación del mango o "escoba de bruja" es una enfermedad de importancia económica que se encuentra presente en México y en otros países productores. Como agentes causales se ha propuesto a hongos del genero Fusarium y se ha sugerido que el ácaro Aceria mangiferae es portador de dicho hongo. Sin embargo, la discusión persiste respecto a la etiología de la enfermedad y no está claramente definido el papel del ácaro; de igual forma, los síntomas en brotes vegetativos e inflorescencias tienen importantes variaciones, por lo que el presente trabajo se realizó con el objetivo de generar información sobre el papel del ácaro en la deformación del mango en su etapa floral y vegetativa. Para ello, plantas de mango sembradas in vitro en condiciones de asepsia y plantas sanas de mango cv. Haden procedentes de un vivero ubicado en una zona libre de la enfermedad y previamente tratadas con fungicida y acaricida fueron inoculadas con ácaros A. mangiferae previamente desinfectados, con el hongo Fusarium subglutinans, con ejemplares del mismo ácaro colectados en yemas deformes y asintomáticas de mango y con la combinación ácaro-hongo. La técnica in vitro usada para sembrar las plantas de mango garantizó la asepsia y permitió determinar el efecto individual y combinado de los organismos inoculados. En la etapa vegetativa, el ácaro A. mangiferae produjo deformaciones en plantas de mango consistentes en la emisión repetida de brotes monopódicos, hojas atróficas y ápice acortezado, mientras que el hongo F. subglutinans indujo la emisión de brotes a partir de yemas axilares, con entrenudos cortos y hojas deformes, característicos de la escoba de bruja. Las plantas procedentes de vivero se mantuvieron en un invernadero de Tequexquinahuac, Estado de México (área no productora de mango situada a 300 km de la zona con presencia de escoba de bruja) a temperaturas no menores de 15°C y con un periodo de agobio hídrico, condiciones que indujeron floración, a fin de observar el posible desarrollo de síntomas en esta etapa. Como alteraciones en las inflorescencias, el ácaro se asoció con reducción en la proporción de flores hermafroditas, mientras que el hongo se relacionó con reducción en la longitud de los ejes, aumento en el diámetro de los ejes, reducción en la proporción de flores hermafroditas, aumento en número de estaminodios, segmentos de los nectarios y diámetro de las flores. Aunque los síntomas descritos corresponden a la deformación floral, se presentaron en bajo nivel y no aparecieron deformaciones típicas. En ambas etapas de desarrollo se observó que la asociación ácaro-hongo intensificó los síntomas, por lo que se considera que el ácaro es parte integral del fenómeno "escoba de bruja". Además, dicho ácaro portó e introdujo al hongo F. subglutinans a yemas de mango, por lo que se demostró que facilita el desarrollo de dicha enfermedad.

**Palabras clave**. Cultivo de embriones, *in vitro*, *Mangifera indica*, *Fusarium subglutinans*, Eriophyidae.

### THE ROLE OF THE MITE Aceria mangiferae (Sayed) IN MALFORMATION OR "WITCH'S BROOM" OF MANGO

Martha Elena López Estrada, Dra. Colegio de Postgraduados, 2008

Mango malformation or "witch's broom" is a disease of economic importance present in Mexico and in other countries where mango is cultured. As causal agents fungi of the genus Fusarium are proposed; the mite Aceria mangiferae is suggested as carrier of these fungi. However, the discussion remains about the aetiology of this disease and the role of the mite is not clearly defined; in addition, symptoms of malformation in vegetative buds and inflorescences have important variations, so this work was carried out to get information on the role of the mite in floral and vegetative malformations. With this goal, mango seedlings were sown in vitro under aseptic conditions, and healthy plants cv. Haden proceeding from a nursery placed in a diseasefree zone, the last ones previously treated with a fungicide and an acaricide, were inoculated with mites A. mangiferae previously disinfected, with the fungus Fusarium subglutinans, with specimens of the same mites collected in malformed and asymptomatic mango buds, or with the combination mite-fungus. The technique in vitro used to seed warranted asepsis and led to determine the individual and combined affect of the inoculated organisms. In the vegetative stage, the mite A. mangiferae induced malformations consisting on the repeated emission of monopodial sprouts, atrophic leaves and corky apex, whereas the fungus F. subglutinans induced the emission of sprouts from axillary buds, with short internodes and malformed leaves, characteristic of witch's broom. The nursery plants were kept in a greenhouse in Teguexquinahuac, State of de México (not a mango growing area, sited 300 km away from areas where malformation is present) at temperatures not lower than 15°C and water shortness, conditions that induced blooming, to observe the possible development of symptoms in that stage. As alterations to inflorescences, the mite was associated with a reduction in the ratio of hermaphrodite flowers, whereas the fungus was associated with a reduction in the length of the axes, increased diameter of axes, reduction in the ratio of hermaphrodite flowers, increased number of staminodes, segments in nectaria and diameter of flowers. Although the above symptoms correspond to mango (floral) malformation, they appeared in low level and typical malformations did not appear. In both developmental stages the association mite-fungus intensified the symptoms, so the mite is considered an integral part of the phenomenon witch's broom. In addition, the mite A. mangiferae carried and introduced the fungus F. subglutinans into mango buds, showing that it facilitates the development of this disease.

**Key words**. Embryo culture, *in vitro*, *Mangifera indica*, *Fusarium subglutinans*, Eriophyidae.

#### **DEDICATORIA**

A mis hijos: **Marelena Gutiérrez López y José Gutiérrez López**Evidentemente porque los amo!

A mis padres: **Guadalupe Estrada Pichardo** y **Perfecto G. López Flores**Como un reconocimiento a su gran esfuerzo por mantener una familia unida por el amor y el respeto

A mis hermanos: **Ma. Guadalupe, Lucía, Ulises, Leticia** y **a sus respectivas familias**Por la fortaleza y el amor que han dedicado a sus proyectos de vida

A toda mi familia indistintamente de grados y generaciones, por trascender en este mundo a pesar del tiempo y la distancia

Y para mi... para mi? sí, para ti!

#### **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por canalizar los recursos económicos en mi proyecto de posgrado a nivel doctorado.

Al Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas por ser la institución formadora en mi superación profesional.

A la Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria por incluirme en el proyecto de superación y actualización académica.

A la Brigada de Educación para el Desarrollo Rural No. 90 de Iguala, Guerrero por ser la unidad educativa que dio todas las facilidades administrativas y laborales durante este proceso de actualización.

Al Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 35 de Tlalpizáhuac, Edo. de México por sus facilidades en los trabajos realizados en el Laboratorio de Biotecnología.

Al Colegio Superior de Agricultura del Estado de Guerrero por su apoyo en los trabajos de laboratorio y campo.

Al Campo Experimental Iguala del INIFAP por sus facilidades en la investigación en sus diferentes etapas.

A los integrantes de mi Consejo Particular: Dr. Gabriel Otero Colina, Dr. Alejandro Michel Aceves, Dra. Maria Concepción Acosta Rodríguez, Dr. Jorge Peña y Dr. David Heriberto Noriega Cantú, por constituir un verdadero equipo de trabajo que respalda mi formación académica y de investigación, ya que durante todo este periodo fue un placer convivir con personas de alta calidad humana y aprender de sus acertadas observaciones, correcciones y sugerencias en todos los aspectos formativos de mi doctorado.

Al Sr. Alejandro Castresana, productor de mango en la Zona Norte de Guerrero, por su confianza en el proyecto y poner a disposición del mismo las huertas de mango y otros recurso materiales.

Al Sr. C. Guillermo Carmona Dorantes y la Profa. Aurora Palacios Guzmán por su amistad y apoyo en los trabajos de campo en la Costa Grande de Guerrero.

Al Ing. José Fernando Flores Romanis por brindarme su apoyo, amistad y motivación para continuar mis estudios de postgrado.

A mis profesores: Dr. Gabriel Otero Colina, MC. Jorge M. Valdez Carrasco, Dr. Héctor González H., Dr. Jesús Romero Napolez, Dr. Vicente Gonzalez R., Dr. José Antonio Santizo R., Dra. Celina Llanderal C., Dr. Daniel Ochoa, Dr. Gustavo Mora Aguilera, Dr. Daniel Nieto Angel, Dra. Socorro Anaya R., Dr. J. Concepción Rodriguez M., Dr. Nestor Bautista M., MC. Ramon Nieto H., MC. Carlos Castillo C. y Dra. Sandra Caselin C. por participar directamente en mi programa de estudio, por compartir sus conocimientos, experiencias y sobre todo enseñarme que la excelencia no se limita en la cantidad de conocimientos adquiridos sino además en la calidad de la persona.

A los compañeros de mi generación "Primavera 2004" Marco Antonio Reyes Rosas, Carolina Pérez Martínez, Martha Mendoza Lucas, Ernesto López Pérez, Katina Stamatiu Sanchez, Juliana Osorio Cordova, Erica Muñiz Reyes, Guillermo López Guillen, Claudio Chavarin Palacios y Alvaro Castañeda V. por el compromiso que establecimos de llegar a la meta, por su esfuerzo, dedicación y lo más importante, por dejarse seducir por el placer de ser estudiantes del Instituto de Fitosanidad.

Unas extensas gracias y un gran reconocimiento al: Dr. Gabriel Otero Colina, Dra. Maria Concepción Acosta, Dr. Francisco Hernández Rosas, Dra. Maria Teresa Santillan G., Dr. Ariel Guzman F., Dr. Daniel Nieto Angel, Dr. Esteban Rodriguez L., Dr. Julio Sanchez E., Dr. Gustavo Mora Aguilera, MC Judith Hernández A., MC. Bertha Tlapal B., por consentirme con su amistad, por compartir su apasionamiento por la investigación, el amor a la vida y la fortaleza para superar los obstáculos.

Un especial agradecimiento a "los cuatro fantásticos" que me han hecho sentir su solidaridad y aprecio. Muchas gracias por compartir las experiencias orgásmicas de la vida, por hacer el amor cada día, por el placer de aprender juntos, por contagiarme su pasión por la investigación en las Ciencias Biológicas y sobre todo por sentirme en la vanidad total al tenerlos como amigos: Marco Antonio Reyes Rosas, Carolina Pérez Martínez, Verónica Romero Valencia y Jhony Navat Enriquez Vara. Y unas gracias enormes a una gran mujer por su amistad e incondicionales apoyo: Martha Mendoza Lucas.

A mis amigos y compañeros de siempre por la convivencia y el trabajo en equipo: Maria de Jesús Flores Vega, Elvia Arzate Figueroa, Martha Mendoza L., Gabriela Hernández R., Maximiliano Martínez Gómez, Rebeca González G, Joel Cruz Vitela, A. Palemón Vargas T., Horacio López J, Ernesto López P, Carlos A. Ramos B., Misael Martínez B., Ma. Elsa Rodríguez C., Patricia Rivas V., Sotero Aguilar M., Sabino H. Martínez T., Maricarmen Sanchez B., Fernando Salazar P., Juan Pereida Hdez., Gloria Calyeca C., Eliú Herrera N., Luis Anonio Mariscal A. e Imelda León G. Yo también los quiero!

Al Prof. José Gutiérrez Nava por motivarme a emprender nuevos retos, por enseñarme que un desencanto matrimonial no solo es una dolorosa experiencia, sino el principio de nuevos proyectos, nuevas aventuras y renovados ánimos por el amor a la vida.

Un agradecimiento a Ignacio Zarco Hernández, Elvia Rosas Romero, Gudelia Barrios G., Rocío Cuellar Valdez, Sahara Flores Venega y al personal administrativo, técnico y de intendencia del Instituto de Fitosanidad, por su amabilidad y decidido apoyo en los quehaceres de gestoría, laboratorio e higiene.

Y una disculpa para todas las personas que no haya mencionado en este momento, es un olvido involuntario, resultado de este triste sueño que tengo y estrés propio de la tesis. Sin embargo, quiero hacer extensivo mi agradecimiento a todas las personas que de alguna forma participaron en mi postgrado.

#### **CONTENIDO**

	Página
Resumen y abstract	iii
Dedicatoria y agradecimientos	
Contenido	ix
Lista de figuras	xi 
Lista de cuadros	xii 
Introducción general	xiii
CAPÍTULO I	
Manejo de plántulas de mango obtenidas <i>in vitro</i> para estudios sobre	
patología	
1.1. Resumen	1
1.2. Abstract	2 3
1.3. Introducción	
1.4. Materiales y métodos	4
1.4.1 Siembra <i>in vitro</i> de embriones de mango	4
1.4.2 Trasplante a suelo <i>in vitro</i>	5
1.4.2.1. Sustrato para el transplante de plantas <i>in vitro</i>	5
1.4.3 Diseño y esterilización de los recipientes de transplante	6
1.4.3.1. Manufactura y esterilización de botes y macetas	6
1.4.3.2 Manufactura y esterilización de las torundas	7
1.4.3.3 Esterilización de las tapas	7
1.5. Resultados	8
1.5.1 Siembra <i>in vitro</i> de embriones de mango	8
1.5.2 Trasplante a suelo <i>in vitro</i>	8
1.5.2.1 Sustrato para el transplante de plantas <i>in vitro</i>	8
1.5.3 Diseño y esterilización de los recipientes de transplante	9
1.5.3.1. Manufactura y esterilización de botes y macetas	9
1.5.3.2 Manufactura y esterilización de las torundas	9
1.5.4 Esterilización de las tapas	10
1.5.5 Sistema aséptico de transplante 1.6. Discusión	11 11
1.7. Conclusiones	13
1.8. Literatura citada	17
CAPÍTULO II	
El ácaro <i>Aceria mangiferae</i> (Sayed) y su relación con la deformación	
vegetativa del mango	
2.1. Resumen	20
2.2. Abstract	20
2.3. Antecedentes	21
2.3.1 Historia de la deformación del mango o escoba de bruja	21
2.3.2 Manifestación de la escoba de bruja en brotes vegetativos	21
2.3.3 El ácaro en la etiología de la escoba de bruja	22
2.3.4 El hongo <i>Fusarium spp.</i> en la etiología de la escoba de bruja	23

2.4 Material	les y métodos	25
2.4.1	Obtención de plántulas asépticas por siembra de embriones	25
	in vitro	
2.4.2		26
2.4.3.	Preparación del hongo Fusarium subglutinans	26
2.4.4.	Respuesta de las plántulas de mango asépticas a la	27
	inoculación de <i>A. mangiferae</i> y <i>F. subglutinans</i>	
2.4.5	Recuperación de los organismos inoculados	28
2.4.6.	Identificación de contaminantes	29
2.5. Resulta	ados	29
2.5.1	Obtención de plántulas asépticas por siembra de embriones <i>in vitro</i> .	29
2.5.2	Resultados del manejo y desinfección de A. mangiferae.	29
2.5.3	Verificación del hongo <i>F. subglutinans</i>	29
2.5.4	Respuesta de las plántulas de mango asépticas a la inoculación de <i>A. mangiferae</i> y <i>F. subglutinans</i>	30
	2.5.4.1 Altura de la planta	30
	2.5.4.2 Numero de brotes axilares	30
	2.5.4.3 Flujos de crecimiento monopódicos múltiples	31
2.5.5	Recuperación de los organismos inoculados	31
2.5.6	Identificación de contaminantes en plantas de mango in vitro	33
	al final del experimento	
2.6 Discusio	ón	34
2.7. Conclu	siones	36
2.8. Literatu	ıra citada	39
	CAPÍTULO III	
	el ácaro Aceria mangiferae (Sayed) en la malformación de	
	ncias o "escoba de bruja" en mango	
3.1 Resume		44
3.2 Abstrac	t	45
3.3 Anteced	dentes	46
3.3.1	La escoba de bruja	46
3.3.2	Diferentes manifestaciones de la escoba de bruja	49
3.4 Material	les y métodos	52
3.4.1	Obtención y manejo de plantas de mango	52
3.4.2	Preparación de ejemplares del ácaro <i>A. mangiferae</i> e	53
0.4.2	identificación de microorganismos asociados con ellos	00
3.4.3	Preparación del hongo <i>Fusarium subglutinans</i>	55
3.4.4	Inoculación de <i>A. mangiferae</i> y <i>F. subglutinans</i> en plantas de	55
0.1.1	mango	00
3.4.5	Detección de los organismos inoculados	57
3.5 Resulta	<b>y</b>	58
3.5.1	Obtención y manejo de plantas de mango	58

	Preparación de ejemplares del ácaro <i>A. mangiferae</i> e identificación de microorganismos asociados con ellos	59					
3.5.3	Preparación del hongo <i>F. subglutinans</i>	60					
3.5.4	Respuesta de las plantas de mango a la inoculación de A.						
	mangiferae y F. subglutinans						
	3.5.4.1 Longitud de ejes primario y secundarios	60					
	3.5.4.2 Número de ejes secundarios y terciarios	61					
	3.5.4.3 Diámetro del eje primario	61					
	<ul><li>3.5.4.4 Diámetro de las flores</li><li>3.5.4.5 Proporción de flores masculinas y hermafroditas</li></ul>	62 63					
	3.5.4.6 Número de segmentos en el nectario y estambres	64					
	3.5.4.7 Días transcurridos para llegar a la antesis	65					
	3.5.5 Detección de los organismos inoculados	65					
3.6 Discusió	n	66					
3.7 Conclusi	ones	69					
3.8 Literatura	a citada	71					
CONCLUSIO	ONES GENERALES	77					
	Lista de Figuras						
Figura 1	Esquema del frasco para trasplante en condiciones de asepsia	15					
Figura 2	Siembra <i>in vitro</i> de embriones de mango en medio B5 modificado	15					
Eigura 2	Esterilización del sustrato y componentes del recipiente	40					
Figura 3	cerrado para el transplante aséptico de plántulas	16					
Figura 3	·	16					
	cerrado para el transplante aséptico de plántulas Proceso de transplante de plántulas a suelo en frasco cerrado						
Figura 4 Figura 5	cerrado para el transplante aséptico de plántulas Proceso de transplante de plántulas a suelo en frasco cerrado en condiciones de asepsia	16 37 37					
Figura 4	cerrado para el transplante aséptico de plántulas Proceso de transplante de plántulas a suelo en frasco cerrado en condiciones de asepsia Síntomas asociados al ácaro A. mangiferae Colonia de ácaros establecida en diferentes partes de la planta Síntomas causados por el hongo F. subglutinans en plantas de	16 37					
Figura 4 Figura 5 Figura 6 Figura 7	cerrado para el transplante aséptico de plántulas Proceso de transplante de plántulas a suelo en frasco cerrado en condiciones de asepsia Síntomas asociados al ácaro <i>A. mangiferae</i> Colonia de ácaros establecida en diferentes partes de la planta	16 37 37					
Figura 4 Figura 5 Figura 6 Figura 7 Figura 8	cerrado para el transplante aséptico de plántulas Proceso de transplante de plántulas a suelo en frasco cerrado en condiciones de asepsia Síntomas asociados al ácaro <i>A. mangiferae</i> Colonia de ácaros establecida en diferentes partes de la planta Síntomas causados por el hongo <i>F. subglutinans</i> en plantas de mango <i>in vitro</i>	16 37 37 38					
Figura 4 Figura 5 Figura 6 Figura 7 Figura 8 Figura 9 Figura 10	cerrado para el transplante aséptico de plántulas Proceso de transplante de plántulas a suelo en frasco cerrado en condiciones de asepsia Síntomas asociados al ácaro A. mangiferae Colonia de ácaros establecida en diferentes partes de la planta Síntomas causados por el hongo F. subglutinans en plantas de mango in vitro Plantas testigo inoculadas con agua destilada estéril Arquitectura de una inflorescencia sana de mango Inflorescencias de mango previamente infestadas con ácaros	16 37 37 38 38 57					
Figura 4 Figura 5 Figura 6 Figura 7 Figura 8 Figura 9	cerrado para el transplante aséptico de plántulas Proceso de transplante de plántulas a suelo en frasco cerrado en condiciones de asepsia Síntomas asociados al ácaro A. mangiferae Colonia de ácaros establecida en diferentes partes de la planta Síntomas causados por el hongo F. subglutinans en plantas de mango in vitro Plantas testigo inoculadas con agua destilada estéril Arquitectura de una inflorescencia sana de mango	16 37 37 38 38 57					

#### Lista de Cuadros

Cuadro 1.1	Medio modificado B5 (Gamborg <i>et al.</i> , 1968) para la germinación de embriones de mango	14
Cuadro 1.2	Esterilización del sustrato con calor húmedo vía autoclave a 121°C, 1.05 kg/cm <sup>2</sup>	9
Cuadro 1.3	Esterilización de botes y macetas con rayos ultravioletas (UV) germicida.	9
Cuadro 1.4	Esterilización de torundas con calor húmedo vía autoclave a 121°C, 1.05 kg/cm	10
Cuadro 1.5	Esterilización de tapaderas con calor húmedo vía autoclave a 125°C, 1.05 kg/cm <sup>2</sup>	10
Cuadro 2.1	Síntomas de escoba de bruja en brotes vegetativos	22
Cuadro 2.2	Morfometría de plantas de mango <i>in vitro</i> inoculadas con <i>F. subglutinans</i> y <i>A. mangiferae</i> , lecturas tomadas al final del experimento	31
Cuadro 2.3	Recuperación de organismos inoculados en plantas de mango <i>in vitro</i> y síntomas asociados con ellos.	32
Cuadro 2.4	Detección de contaminantes en plantas de mango <i>in vitro</i> al final del experimento	33
Cuadro 3.1	Síntomas en inflorescencias con escoba de bruja	50
Cuadro 3.2	Proporción de plantas de mango que florecieron en el invernadero	59
Cuadro 3.3	Organismos asociados al ácaro <i>A. mangiferae</i> y verificación de asepsia de ácaros desinfectados	59
Cuadro 3.4	Longitud en centímetros del eje primario y de ejes secundarios basal, medio y apical en inflorescencias de mango en la etapa de antesis (100%)	60
Cuadro 3.5	Número de ejes secundarios del eje principal y número de ejes terciarios de un eje secundario basal, medio y apical	61
Cuadro 3.6	Diámetro del eje primario de inflorescencias de mango en etapa de antesis (100%)	62
Cuadro 3.7	Diámetro en centímetros de flores abiertas ubicadas en la base y en la parte distal de los ejes secundarios básales medios y apicales	63
Cuadro 3.8 Cuadro 3.9	Proporción de sexos en inflorescencias de mango. Número de segmentos del nectario y estambres en	64 64
	inflorescencias de mango	
Cuadro 3.10 Cuadro 3.11	Días al 50% y 100 % de antesis en inflorescencias de mango Recuperación de organismos inoculados en plantas de mango en invernadero.	65 65

#### INTRODUCCIÓN GENERAL

En México, el cultivo del mango se inició en 1779 cuando el mango cv. Manila fue introducido por navegantes españoles al puerto de Acapulco, procedente de Filipinas. Posteriormente, en el siglo XIX, mangos de tipo criollo se importaron de las Antillas a la Costa del Golfo de México. La última introducción de mango y la primera comercialmente importante se efectuó a partir de 1950, sobresaliendo la plantación de 12000 árboles en Cuajinicuilapa, Guerrero, procedentes de Florida, USA. El germoplasma introducido estuvo constituido por los cultivares Haden, Palmer, Keitt, Kent, Tommy Atkins, Irwin, Smith, Sensation y Carrie (Mosqueda-Vázquez, 2005). La superficie mundial dedicada al cultivo va en aumento, pues en el año 2005 alcanzó un total de 3,870,070 hectáreas, con una producción de 27,965,749 toneladas. En ese mismo año, el principal productor a nivel mundial fue la India, con una participación de 38.6%, y en la segunda posición se encuentra China con un 13%. Estos dos países representan más de 50% de la producción mundial. México ocupa el quinto lugar como productor de mango, después de India, China, Tailandia y Pakistán (FAO 2006). En México, en el año 2006 se cosecharon 172,153.14 ha con un rendimiento de 1, 734,765.87 toneladas y un valor en miles de pesos de 3' 969,090.18. Los principales estados productores fueron: Guerrero, Nayarit, Sinaloa y Veracruz, los cuales aportaron 60.8% de la producción nacional (SIAP/SAGARPA, 2006).

Las variedades que se exportaron durante el año 2006 fueron: Tommy Atkins, Kent, Ataúlfo, Haden, Keit y Manila, principalmente hacia los Estados Unidos de América. Además, hubo un incremento aproximado de 16.75% respecto al año 2005, acumulando la cantidad de 43'198,210 cajas contra 36'624,549 cajas del año anterior (MANGO-EMEX, 2006).

Mantener esta posición implica que los productores enfrenten serios problemas de producción y comercialización; uno de ellos son los aspectos fitosanitarios, principalmente la enfermedad comúnmente conocida como "escoba de bruja" (EB). Ésta es considerada la enfermedad más importante en México y otros países productores; por la gravedad de los daños que suele causar se han realizado numerosos trabajos sobre los agentes causales a fin de generar información que permita entender este

problema. Entre las causas de la enfermedad EB se han considerado virus, ácaros, desbalances fisiológicos y hongos (Srivastava y Butani, 1973; Kumar *et al.*, 1993). Sin embargo, las investigaciones señalan consistentemente a hongos del género *Fusarium* como agentes etiológicos de la enfermedad, pues numerosos autores indujeron deformaciones vegetativas y florales mediante la inoculación de *Fusarium* spp., cumpliendo los postulados de Koch (Summanwar *et al.*, 1966; Varma *et al.*, 1974: Bhatnagar y Beniwal, 1977; Díaz y Romero, 1980; Kumar y Beniwal, 1987; Manicom, 1989; Noriega, 1996; Freeman *et al.*, 1999).

También se ha postulado al ácaro *Aceria mangiferae* como agente etiológico de la enfermedad (Narasimhan, 1954; Morales y Rodríguez, 1961; Puttarudriah y Channa Basavanna, 1961; Nariani y Seth,1962), pero más tarde se señaló a dicho ácaro como portador de esporas de *Fusarium* spp., que facilita la entrada del inóculo a los tejidos del mango (Sternlicht y Goldenberg, 1976; Mohanasundaram, 1985, Noriega 1996, Gamliel-Atinsky *et al.*, 2007). La información generada por diferentes investigadores ha aportado datos importantes sobre la etiología y los síntomas que provoca la infección; sin embargo, en la mayoría de los estudios no se ha descartado la presencia de contaminantes en las plantas inoculadas con las especies de *Fusarium* y con el ácaro *A. mangiferae*, lo que permite postular que la etiología de la EB, así como el papel que el ácaro *A. mangiferae* desempeña en la inducción de esta enfermedad, no están adecuadamente esclarecidos, por lo que el presente trabajo se desarrolló con los siguientes objetivos:

- Obtener plantas libres de contaminantes a través de la siembra *in vitro* de embriones de mango y transplante a un sistema de frasco cerrado en un ambiente aséptico, a fin de observar el efecto único de los organismos inoculados.
- Determinar qué tipo de relación existe entre el ácaro *A. mangiferae* y la aparición de los diferentes síntomas que caracterizan la deformación del mango en floración y vegetativa, por él mismo y en su asociación con el hongo *F. subglutinans*.

Para lograr los objetivos mencionados, el trabajo de investigación se dividió en tres fases: La primera (Capítulo I) consistió en producción de plantas en condiciones de asepsia, las cuales podrían ser usadas como material experimental para la inoculación de todos los posibles agentes etiológicos de la escoba de bruja para determinar su

efecto en ausencia de otros agentes. Esto se logró mediante siembra in vitro de embriones de mango en medio artificial y en un ambiente cerrado, aunque permeable a la luz y al aire. La segunda etapa (Capítulo II) consistió en la inoculación del hongo Fusarium subglutinans, el ácaro Aceria mangiferae y la combinación de ambos, en plantas in vitro producidas mediante la aplicación del método desarrollado en la primera etapa. Este estudio estuvo dirigido a corroborar el papel del hongo F. subglutinans como agente etiológico de la deformación o escoba de bruja del mango en su manifestación vegetativa, en un ambiente libre de contaminantes, así como para determinar las posibles alteraciones que el ácaro A. mangiferae puede causar por sí solo en plántulas de mango, y a verificar si el mismo ácaro es capaz de portar a F. subglutinans e introducirlo a plantas de mango, facilitando así la infección. La tercera y última etapa (Capítulo III) consistió en la inoculación del hongo y el ácaro citado, individualmente y en combinación, para corroborar si la deformación del mango en su manifestación floral es causada por dicho hongo, así como para determinar el papel que el ácaro juega en la infección e inducción de posibles alteraciones en el desarrollo de las inflorescencias.

#### LITERATURA CITADA

- Bhatnagar, S.S. y Beniwal S.P.S. 1977. Involvement of *Fusarium oxysporum*. En: causation of mango malformation. Plant Disease Reporter 61(10): 894-898.
- Díaz, B.V. y Romero C.S. 1980. Etiología de la deformación o escoba de bruja del mango en el estado de Morelos. Agrociencia 39: 35-40.
- FAO. 2006. www.fao.org información verificada el 31 octubre de 2006.
- Freemann, S., Maimon M. y Pinkas Y. 1999. Use of GUS transformants *of Fusarium* subglutinans for determining etiology of mango malformation disease. Phytopathology 89: 456-461.
- Gamlies, A. E., Sztejnberg A., Maymon M., Belausou E., Palevsky E. y Freeman S. 2007. Interaction of the mango but mite (*Aceria mangiferae*) with *Fusarium mangiferae*, causal agent of mango malformation disease. In the 28th Congress of the Israel Phytopathological Society. pp198.
- Kumar, J. y Beniwal S.P.S. 1987. Vegetative and floral malformation, two symptoms of the same disease on mango. FAO Plant Protection Bulletin 35: 21-23.
- Kumar, J., Singh U.S. y Beniwal S.P.S. 1993. Mango malformation: one hundred year of research. Annual Review Phytopathology 31: 217-232.
- MANGO-EMEX. 2006. <a href="www.mangoemex.com">www.mangoemex.com</a> información verificada el 16 de diciembre de 2006
- Manicom, B.Q. 1989. Blossom malformation of mango. South Africa Mango Grower's Association Yearbook 10: 11–12.
- Mohanasundaram M. 1985. Gall mites in India their economic status. Non-insect pests and predators 29-35.
- Morales, E.M.L., Rodríguez E.H. 1961. Breves anotaciones sobre una nueva plaga en los árboles de mango. Fitófilo (México) 14(30): 7-11.
- Mosqueda-Vázquez, R. 2005. El mango en el contexto nacional e internacional. pp. 3-12 En: H.F. Zavala, C.D.H. Noriega, A.G. Mora, P.G. Ballesteros, P.L.A. Rodríguez, G.L.S Covarrubias, L.L. Flores (eds.). El mango su cultivo, fitosanidad y comercialización. 189 p.
- Narasimhan M.J. 1954. Malformation of panicles in mango incited by a species of Eriophyes. Current Science 23:297-298.

- Nariani T.K., Seth M.L. 1962. Role of eriophyid mites in causing malformation disease in mango. Indian Phytopathology 15: 231-233.
- Noriega Cantú D.H. 1996. "Escoba de bruja" del mango: etiología. Histopatología y manejo integrado. Tesis de doctorado en ciencias en la especialidad de Fitopatología, Colegio de Postgraduados. 72 p.
- Puttarudriah M., Channa Basavanna. 1961. Mango bunchy-top and the eriophid mite. Current Science 30:114-115.
- SIAP/SAGARPA 2006. Servicio de Información Agrolimentaria y Pesquera. Organismo de la Secretaria de Agricultura Ganaderia Desarrollo Rural Pesca y Alimentación http://www.siap.gob.mx/. (Verificado 01 diciembre, 2006)
- Srivastava, R.P. y Butani D.K. 1973. La "malformation" du manguier. Fruits 28 (5): 389 397.
- Sternlicht M., Goldenberg S. 1976. Mango eriophyid mites in relation to inflorescence. Phytoparasitica 4(1): 45-50.
- Summanwar, A.S., Raychaudhuri S.P. y Phatak S.C. 1966. Association of the fungus Fusarium moniliforme Sheld. with the malformation in mango (Mangifera indica L.). Indian Phytopathol 19:227-228.
- Varma, A., Lele V.C., Raychaudhuri S.P., Ram A. y Sang A. 1974. Mango malformation: a fungal disease. Phytopathologische Zeitschrift 79: 254-257.

#### **CAPÍTULO I**

## MANEJO DE PLÁNTULAS DE MANGO OBTENIDAS *IN VITRO* PARA ESTUDIOS SOBRE PATOLOGÍA

#### 1.1. Resumen

A partir de embriones inmaduros de mango se obtuvieron plántulas in vitro libres de contaminantes externos y transmitidos por semilla, las cuales fueron trasplantadas a suelo en condiciones asépticas; para ello se diseñó un recipiente de trasplante que permitiera la independencia fotosintética. En una campana de flujo laminar se sembraron in vitro embriones de frutos de 45 a 60 días de edad en medio de cultivo B5 modificado; cuando germinaron y las plántulas alcanzaron una altura de 10 cm se trasplantaron a suelo + perlita expandida, en recipientes de plástico esterilizados, con orificios de ventilación cubiertos por torundas de algodón y gasa estériles. Después de trasplantadas, las plántulas se regaron cada 45 días, aproximadamente, con solución nutritiva universal estéril. En la etapa in vitro se presentó 10% de contaminación, se identificó a Penicillium, Aspergillus, Xanthomonas y Cladosporium posteriormente las plantas contaminadas se desecharon. La contaminación en los recipientes de trasplante asépticos alcanzó gradualmente 15 %, después de cinco meses. En el sustrato se determinó a Cladosporium, Alternaria, Aspergillus, Rhizopus y Fusarium, mientras que en los recipientes de trasplante se identificó a Helmithosporium, Curvularia, Penicillium y Syncephalastrum. Los hongos contaminantes se consideran oportunistas y ninguno está citado como endobionte. Tanto el diseño de los materiales como su manejo se consideran útiles para llevar a cabo estudios sobre etiología.

**Palabras clave**. Cultivo de embriones, *Mangifera indica*, contaminantes, sustrato, micropropagación.

#### 1.2. Abstract

In vitro plants were obtained through immature embryos of mangoes, and then they were transplanted to soil inside containers up to a stage of pre-acclimatization and photosynthetic independence, everything free from external and seed borne contaminants. Inside a clean air hood, 45 to 60 days old mango ovules were sown in vitro in modified B5 medium. When the embryos had germinated and the seedlings attained 10 cm height, they were transplanted to soil + expanded perlite in plastic sterile containers with ventilation holes stoppered with sterile cotton-gauze pads. The seedlings were irrigated approximately every 45 days with sterile universal nutritive solution. In the stage "in vitro" a 10% contamination was observed; the following contaminants were determined in embryos in B5 medium: Penicillium, Aspergillus, Xanthomonas and Cladosporium, then all the contaminated seedlings were discarded. Aseptic plants were obtained but in five months contaminated plants gradually went up to 15%. In the substratum, Cladosporium, Alternaria, Aspergillus, Rhizopus, and Fusarium were determined; in the components of closed containers, Helmithosporium, Curvularia, Penicillium and Syncephalastrum. All contaminants are considered opportunistic and none is cited as endobiont. Both the designed materials and their handling are considered useful for studies on aetiology.

**Key words**. Embryo culture, *Mangifera indica*, contaminants, substrate, micropropagation.

#### 1.3. INTRODUCCIÓN

El cultivo de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas que se basan en la siembra aséptica de tejidos y órganos sobre un medio de cultivo específico para lograr diferentes objetivos, entre los que destaca la obtención de plantas libres de contaminantes (Kozai, 2006). Sin embargo, la literatura señala una advertencia sobre los materiales "libres de organismos patógenos"; no es raro que los explantes puedan albergar microorganismos internos (Smith, 2000) y no sea posible detectarlos al momento de sembrarlos en el medio de cultivo (Hartmann y Kester, 1999), en especial virus o agentes similares, debido a que no todos los virus producen síntomas definidos en sus hospedantes (Nome, 1991; Bhojwani y Razdan, 1983; Murashige, 1979).

Mediante el aislamiento y crecimiento *in vitro*, en condiciones asépticas, de embriones sexuales o asexuales, se pueden obtener plantas viables (Razdan, 2003; Pierik, 1990). De acuerdo con Pierik (1990), se pueden cultivar embriones inmaduros o maduros; el primer caso se utiliza sobre todo para impedir el aborto embrionario, mientras que el cultivo de embriones maduros se usa para eliminar la inhibición de germinación de las semillas (Razdan, 2003).

Los embriones normalmente se desarrollan dentro de óvulos que a su vez están cubiertos por los ovarios. Puesto que existen ya en un ambiente estéril, la desinfección de la superficie del embrión es innecesaria a menos que se dañen las capas de la semilla o esté presente una infección sistémica (Razdan, 2003). Sin embargo, siempre existe la posibilidad de una contaminación por lo que se recomienda desinfectar los explantes, para lo cual existen numerosas sustancias y procedimientos. Un inconveniente inevitable de muchos desinfectantes es su efecto fitotóxico (Beyl, 2000; Franklin y Dixon, 1994; Smith, 2000; Ramming, 1983).

El explante, o parte de la planta cultivada *in vitro*, es a menudo la fuente principal de contaminantes, los cuales pueden albergarse en grietas pequeñas, entre las capas externas del bulbo, en las hojas que se convierten de brotes, etc.; además, la contaminación puede darse por manejo o en el equipo usado (Smith, 2000).

La propagación *in vitro* tiene también la aplicación de obtener material biológico para trabajar sobre los aspectos de sanidad. El presente trabajo se enmarca dentro de esa línea; en él se propuso conseguir un ambiente aséptico durante el establecimiento

in vitro de embriones de mango, germinación y transplante a un sistema de frasco cerrado, a fin de obtener plantas libres de contaminantes para observar fenómenos patológicos.

#### 1.4. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1.4.1 Siembra in vitro de embriones de mango

Se colectaron 250 frutos inmaduros de 45 a 60 días de edad a partir de la antesis y un tamaño de 9.5 a 11 cm de largo por 5.5 a 6 cm de ancho procedentes de árboles de mango criollo poliembriónico en una huerta del municipio de Iguala, Guerrero. Los frutos se trasladaron en una hielera al laboratorio para realizar la siembra in vitro. El tiempo máximo que transcurrió entre la recolección de los frutos y su siembra fue de un día, 50 frutos se destinaron para determinar si las semillas eran o no portadoras de gérmenes, entre ellos *Fusarium* spp. y 200 para la siembre *in vitro* de embriones. Dichos frutos se lavaron con detergente y se enjuagaron con agua de la llave para eliminar residuos de látex y polvo. En la campana de flujo laminar se desinfectaron con hipoclorito de sodio concentrado (Cloralex® con 6% de cloro libre) por 15 minutos y posteriormente se lavaron dos veces con agua destilada estéril (sometida a tratamiento en autoclave, 121°C, 1.05 kg/cm<sup>2</sup>, 60 minutos). Con instrumentos de disección humedecidos con alcohol y flameados se quitó la pulpa de los mangos, cuidadosamente se les abrió el endocarpio (hueso), se extrajo el óvulo, y enseguida se desprendió la nucela de cada óvulo. Los embriones sin nucela se desinfectaron en hipoclorito de sodio 0.6% por 10 minutos y se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Cada embrión se sembró en un frasco de cultivo estéril con medio basal B5 modificado (Gamborg et al., 1968) Cuadro 1.1 y Figura 2.

Los embriones para su germinación se incubaron en un cuarto de crecimiento con temperatura de laboratorio (entre 20 y 32°C) y con iluminación fluorescente. Durante este proceso de germinación, a todos los frascos de cultivo donde se desarrollaron contaminantes visualmente distintos se les tomaron muestras y se sembraron en PDA (Mathurs *et al.*, 1975). De las colonias fungosas se tomaron muestras, las que se tiñeron con lactofenol entre porta y cubreobjetos para su

observación bajo el microscopio de campo claro e identificación a nivel de género mediante las claves de Barnet y Hunter (1998).

Se realizaron pruebas para determinar si las semillas eran o no portadoras de gérmenes, entre ellos *Fusarium* spp. Para ello se sembraron 50 embriones y sus nucelas en cajas Petri con medios PDA y PCNB (Ali *et al.*, 1991), previamente manipulados como se describió para la siembra en medio B5 modificado. Las cajas Petri se colocaron bajo luz artificial a una temperatura de 25° C y se revisaron a 24, 48 y 72 horas. Para corroborar si *Fusarium subglutinans* (Wollemweb y Reinking) podía establecerse en medio B5 modificado y descartar que las semillas fueron portadoras de dicho hongo, en 20 cajas Petri se sembró la cepa GUE 1 INI-95, aislada de mango en 1995, identificada por Noriega Cantú (1996), verificada por el Fusarium Research Center, Pennsilvania State Unversity (Jean Juba), y verificada patogénicamente por Noriega-Cantú (1996), Mora-Aguilera (2000) y Joseph (2002).

#### 1.4.2 Trasplante a suelo in vitro

Cuando las plántulas germinadas en medio B5 modificado alcanzaron entre 10 y 15 cm fueron trasplantadas a recipientes mayores y a suelo, siempre dentro de la campana de flujo laminar y tratando de mantener las condiciones de asepsia por tiempo indefinido (Figura 4). Para ello hubo que desarrollar métodos de esterilización del suelo y de los recipientes, así como un método de riego que no contaminara las plantas, los cuales se describen enseguida.

#### 1.4.2.1. Sustrato para el transplante de plantas in vitro

Como sustrato para el trasplante se usó una mezcla de suelo orgánico y perlita expandida (Agrolita®) y tezontle, en proporciones 2:1:1 medidas por volumen. La tierra orgánica se pasó por un tamiz de 5 mallas/pulg². Se probaron métodos de esterilización, los cuales consistieron en someter los componentes individuales del sustrato a tratamiento de autoclave a 121°C y 1.05 kg/cm², así como a la combinación de suelo+ agrolia y la previamente descrita, durante dos o tres horas y de una a tres veces en días consecutivos (Figura 3A, 3B). Para verificar que los sustratos estaban

libres de contaminantes, se tomaron muestras de cada bolsa y se sembraron en PDA. Se comprobó la asepsia a las 48 y 72 h.

Cada tratamiento tuvo 10 repeticiones; tanto en ésta como en las siguientes pruebas, se consideró que un tratamiento era efectivo cuando en ninguna de sus repeticiones aparecieron contaminantes. Cuando se detectaron contaminantes se identificaron siguiendo el mismo procedimiento que en contaminantes de la siembra *in vitro* de embriones.

#### 1.4.3 Diseño y esterilización de los recipientes de transplante

#### 1.4.3.1 Manufactura y esterilización de botes y macetas

Para mantener la asepsia de las plántulas obtenidas de los embriones germinados *in vitro*, se trasplantaron a suelo estéril dentro de recipientes manufacturados bajo el siguiente diseño: dos frascos de plástico transparente (PC11 <sup>®</sup>) de 24 cm de altura, 14 cm de diámetro en la base y 10.3 cm de diámetro en el cuello; a un frasco se le cortó la parte inferior; al otro, la parte superior, y luego se acoplaron uno en el otro para dar un recipiente de 48 cm de altura.

Adicionalmente, al frasco de la parte superior se perforaron dos orificios laterales de 4 cm de diámetro para ventilación. En el interior del frasco ensamblado como se describió arriba, iba colocada una maceta de plástico transparente, de 12 cm de altura por 13.5 cm de diámetro en la parte superior y 11 cm en la parte inferior, a la cual se le hicieron tres orificios en la base para drenar el exceso de agua del riego (Figura 1).

Tanto los frascos como las macetas se desinfectaron con rayos ultravioleta germicidas (U.V.) bajo el siguiente proceso: luego de haber eliminado las rebabas de los cortes, se lavaron con agua y detergente; a continuación, en la campana de flujo laminar se lavaron con agua destilada, posteriormente otra lavada con alcohol 96%, se dejaron escurrir y cuando quedaron completamente secos se introdujeron en grupos de dos en dobles bolsas de polietileno (40 x 80 cm), las que se sellaron con calor y enseguida se expusieron los recipientes a rayos U.V. con duración de 90, 60, 45 y 30 minutos (Figura 3D, 3E). Para verificar la asepsia de los frascos se introdujo en cada uno un disco de PDA estéril y a las 48 h se verificó que no hubiera crecimiento de

bacterias u hongos. Cada tratamiento con rayos U.V. tuvo 10 repeticiones, excepto el testigo sin irradiar, que tuvo seis.

#### 1.4.3.2 Manufactura y esterilización de las torundas

Los orificios de ventilación de los frascos de plástico fueron tapados con torundas de algodón y gasa previamente esterilizadas, adheridas con cinta adhesiva transparente (Figura 1).

Las torundas estaban hechas de rectángulos de algodón de 6 x 14 cm que al doblarlos por la mitad quedaron de 6 x 7 cm envueltos en gasa. Las torundas se colocaron en doble bolsa de polipapel y se sometieron a tratamientos en autoclave, secas o húmedas, en tiempos de 1 a 3 h y durante tres días consecutivos (Figura 3C). Para todos los ensayos se realizaron pruebas de esterilización sembrando pedazos de algodón y gasa en cajas con PDA. Cada tratamiento tuvo 20 repeticiones excepto el testigo, que tuvo siete.

#### 1.4.3.3 Esterilización de las tapas

Otro de los componentes del diseño del frasco fueron tapaderas de plástico; en este caso se buscó un tiempo de esterilización en que las tapaderas no se deformaran por el calor y conservaran sus características de cerrado por rosca a la boca del frasco. Las tapaderas se lavaron con agua y detergente; después, en la campana de flujo laminar se lavaron con agua destilada, otra lavada más con alcohol 96%, se dejaron escurrir y cuando quedaron completamente secas se introdujo cada una en doble bolsa de polipapel (24 x 18 cm), inmediatamente se sellaron con calor y enseguida se sometieron a un tratamiento de autoclave a 121°C y 1.05 kg/cm² por 60 y 30 minutos (Figura 3F).

Riegos con solución nutritiva. Las plantas sembradas en el nuevo sustrato se colocaron en un cuarto de crecimiento y se regaron cada 45 días con solución nutritiva universal de Steiner (1968) esterilizada en autoclave a temperatura de 121°C y presión de 1.05 kg/cm² por 60 minutos. Cada riego se realizó bajo la campana de flujo laminar para mantener la asepsia de las plantas.

#### 1.5. RESULTADOS

#### 1.5.1. Siembra in vitro de embriones de mango

Los embriones sembrados *in vitro* en medio B5 germinaron en 95% en promedio a los 18 días y en este medio llegaron a una altura de 10 a 15 cm. Ya que se usaron óvulos de mango poliembriónico, de cada óvulo germinaron entre una y cuatro plantas. Las plantas aparecían visualmente sanas y vigorosas; aunque el estudio no estuvo dirigido a determinar diferencias en desarrollo asociadas al tamaño de los frutos u óvulos, se observó que los óvulos más pequeños dieron origen a plantas muy pequeñas, al contrario de los óvulos grandes pero éstos tuvieron mayores problemas de contaminación.

Se presentó contaminación en 10% de los frascos, que posteriormente se esterilizaron y luego se desecharon. Los contaminantes identificados en la siembra de embriones en medio B5 modificado fueron de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Xanthomonas* y *Cladosporium* y en ningún caso se identificó a *F. subglutinans*, el cual además sí fue capaz de establecerse en ese medio cuando se le sembró la cepa GUE1 INI-95. Los embriones sembrados en medio PDA y PCNB no presentaron ningún contaminante después de 24, 48 y 72 h.

#### 1.5.2 Trasplante a suelo in vitro

Cuando las plántulas germinadas en medio B5 modificado alcanzaron entre 10 y 15 cm se seleccionaron 70 frascos con plantas vigorosas, sin contaminantes que fueron trasplantadas a sustrato de suelo+agrolita en recipientes mayores (Figura 1) dentro de la campana de flujo laminar con las características que se describen enseguida.

#### 1.5.2.1 Sustrato para el transplante de plantas in vitro

Los mejores resultados en la esterilización de los sustratos solos o combinados se obtuvieron con un tiempo de esterilización de 3 h por tres días consecutivos (Cuadro 1.2). Los hongos contaminantes correspondieron a los géneros *Cladosporium, Alternaria, Aspergillus, Rhizopus* y *Fusarium*.

Cuadro 1.2 Esterilización del sustrato con calor húmedo vía autoclave a 121°C, 1.05 kg/cm<sup>2</sup>

Ng/offi						
Sustrato	Tiempo en horas esterilización		noras	de Rep.	Pruebas con PDA	
	1° día	2° día	3° día		Cont.	No. Cont.
Suelo + agrolita + tezontle	3	-	-	10	6	4
Suelo + agrolita	2	2	-	10	7	3
Suelo + agrolita	3	3	3	10	0	10
Suelo orgánico	3	3	3	10	1	9
Agrolita	2	2	2	10	8	2
Agrolita	3	3	3	10	0	10
Arena de Tezontle	3	-	-	10	6	4
Testigos sin tratar para c/u	-	-	-	7	7	0

#### 1.5.3 Diseño y esterilización de los recipientes de transplante

#### 1.5.3.1. Manufactura y esterilización de botes y macetas

En el Cuadro 1.3 se aprecia que los botes y macetas quedaron estériles con un tiempo mínimo de exposición de 45 minutos a los UV. Este tiempo se consideró suficiente para la esterilización de los frascos y, aunque tiempos mayores pueden ser útiles, se considera recomendable no usarlos para optimizar el uso de las lámparas de luz U.V., que tienen una vida media, así como para reducir el riesgo de exposición para quienes llevan a cabo el proceso.

Cuadro 1.3 Esterilización de botes y macetas con rayos ultravioletas (UV) germicida.

Material	minutos	repeticiones	Prueba	Pruebas con PDA		
			Cont.	No Cont.		
Botes	90	10	0	10		
Botes	60	10	0	10		
Botes	45	10	0	10		
Botes	30	10	4	6		
Macetas	45	10	0	10		
Macetas	30	10	5	5		
Testigo sin tratar para c/u		6	6	0		

#### 1.5.3.2 Manufactura y esterilización de las torundas

Respecto a las torundas de algodón, los resultados se muestran en el Cuadro 1.4, en el cual se puede observar que las torundas quedaron estériles con tres horas de autoclave por tres días consecutivos independientemente de las opciones de

humedad. Sin embargo, para este trabajo de investigación se optó por las torundas sin humedecer ya que se les fijó a los frascos con cinta adhesiva y mostraron mejor adhesión que las torundas húmedas.

Cuadro 1.4 Esterilización de torundas con calor húmedo vía autoclave a 121°C, 1.05 kg/cm

ng, em		Tiempo esteriliza	en ación	horas de	Rep.	Pruebas	s en PDA
			2° día	3° día		Cont.	No Cont.
Torundas mojada	ıS	1	1	1	20	20	0
Torundas mojadas		2	2	2	20	6	14
Torundas mojada	S	3	3	3	20	0	20
Torundas humedecer	sin	2	2	2	20	4	16
Torundas humedecer	sin	3	3	3	20	0	20
Torundas húmedas		2	2	2	20	4	16
Torundas húmedas		3	3	3	20	0	20
Testigo sin tratar				7	7	0	

#### 1.5.4 Esterilización de las tapas

La esterilización de las tapaderas de rosca de plástico duro se logró con 30 minutos de autoclave a 121°C, 1.05 kg/cm<sup>2</sup>. Además, con este tratamiento mantuvieron su forma y fueron apropiadas para sellar los botes (Cuadro 1.5).

Cuadro 1.5 Esterilización de tapaderas con calor húmedo vía autoclave a 125°C, 1.05 kg/cm²

	Kg/\	CITI						
Tapade	era		Tiempo	n	Pruebas con PDA		Observac	ciones
					Contaminantes No conta-			
						minantes		
Dos	en	c/	1 h.	20	0	20	Torcidas	y sin
paquet	е						cerrar	
Una	en	c/	30 min.	10	0	10	En	buenas
paquet	е						condicion	ies
Una er	n c/paq	uete	0	10	10	0	En	buenas
sin trat	ar						condicion	ies

Al igual que en el sustrato, se identificaron los hongos contaminantes en cada unos de los componentes de los recipientes y los géneros determinados fueron: Helmithosporium, Curvularia, Penicillium y Syncephalastrum.

#### 1.5.5 Sistema aséptico de transplante

Las plántulas transplantadas a recipientes cerrados en sustrato de suelo + agrolita inicialmente estuvieron libres de contaminantes, pero gradualmente se fueron contaminando, presumiblemente durante el manejo y sobre todo por el riego, de manera que luego de transcurridos cinco meses se había contaminado 15% de ellas. Pero aun las plantas contaminadas continuaron su desarrollo, emitieron repetidos brotes vegetativos monopódicos y las hojas formadas se expandieron normalmente, hecho que continuó durante más de un año y mostró que las plantas llegaron a ser fotosintéticamente activas. En la etapa de desarrollo en suelo se identificaron los hongos *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.*, ninguno de los cuales es considerado un endobionte (Pierik, 1990).

#### 1.6. DISCUSIÓN

Los embriones de mango sembrados en las condiciones descritas mostraron un alto grado de viabilidad, prácticamente de 100%, y germinaron en corto tiempo, (un promedio de 18 días) hechos que se asocian con su condición de semillas recalcitrantes (Corbinaeu et al., 1987) y con su relativamente alto grado de madurez, pues tenían abundantes reservas. De tal forma, el medio de cultivo B5 modificado (Gamborg et al., 1968) proporcionó ante todo humedad, nutrimentos complementarios y soporte para el crecimiento, lo que permitió el desarrollo de una raíz pivotante, pero también sirvió como un primer filtro para la eliminación de contaminantes pues, como se dijo antes, todas las plantas contaminadas fueron desechadas.

El uso de mango criollo poliembriónico permitió obtener una a cuatro plántulas de cada óvulo, las que variaron en vigor pero todas crecieron rápidamente, al grado que alcanzaron aproximadamente 15 cm en 21 días. Cualitativamente se observó que las semillas pequeñas daban lugar a plantas muy pequeñas y débiles, pero en ellas el porcentaje de contaminación fue de 3%. Una tendencia opuesta se encontró en los frutos con un mayor grado de madurez, por lo que para obtener plantas vigorosas y con bajo índice de contaminantes, se recomienda sembrar óvulos de 9 a 11 cm, correspondientes a 60 días después de la antesis.

El hecho de haber usado mangos poliembriónicos permite trabajar con material genéticamente diferente: una de las plantas obtenidas derivaba del óvulo fecundado y el resto son de origen somático de la nucela. Lo anterior permite contar con una variación en el material biológico y tener en consecuencia mayor representatividad en la respuesta de plantas en estudios de patogenicidad. Esta técnica es aplicable también a mangos monoembriónicos, de los que germinan sólo plantas resultantes del zigoto.

La técnica de desinfección de los óvulos propuesta fue considerada aceptablemente efectiva. Adicionalmente, los óvulos manipulados se hallaban protegidos por la nucela y los tejidos del fruto, por lo que era de esperarse que estuvieran prácticamente asépticos (Razdan, 2003). Todos los contaminantes identificados se consideran organismos oportunistas que se establecieron durante el proceso a pesar de las condiciones de asepsia, y ninguno ha sido citado como patógeno o endofíto en mango (Morales-Rondón y Rodríguez-González, 2006).

En ninguno de los óvulos sembrados apareció *F. subglutinans*, lo cual confirma que dicho hongo no es transmitido por semilla, hecho notado por Youssef *et al.* (2007), quienes citan a la especie con el nombre de *Fusarium mangiferae* (Britz, Wingfield, Marasas)), y que las plantas de mango obtenidas por el método desarrollado no son portadoras del mismo.

El hecho de que las plantas hayan sido trasplantadas a suelo ofrece como ventaja que son independientes de reguladores de crecimiento y sustancias orgánicas que podrían afectar el crecimiento de hongos o bacterias inoculadas durante estudios de patogenicidad *in vitro*. Adicionalmente, las plantas toleraron de 40 a 45 días sin ser regadas por estar en un medio semi-cerrado, lo que facilitó su manejo y redujo los riesgos de contaminación. Esto es una ventaja con respecto a la siembra en sustrato inerte, o hidroponia, la que requiere de manejo frecuente.

El ambiente semi-cerrado en el que se desarrollaron las plantas puede resultar en varios efectos; por una parte, se postula que las condiciones controladas de temperatura y la alta humedad prevaleciente pueden permitir una mayor expresión de los síntomas de los patógenos que se inoculen; por otra parte, la alta humedad ambiental en el interior de los recipientes resultó en que las plantas aparentemente no desarrollaron una cutícula cérea, por lo que su condición puede considerarse de "pre-

aclimatación". Las plantas obtenidas por el método *in vitro* desarrollado pueden ser sacadas de sus frascos y aclimatadas al ambiente de laboratorio o invernadero, en cuyo caso inevitablemente perderán su condición de asepsia. Sin embargo, podrá garantizarse que están libres de patógenos selectos y con un manejo adecuado podrán mantenerse libres de dichos patógenos o inocularlas selectivamente, lo que las hace útiles para aclarar relaciones de etiología.

El diseño de los envases asépticos y el método de esterilización y riego de las plantas son aportaciones del presente trabajo. Con los métodos descritos se garantizó la obtención de plantas asépticas, o al menos libres de todos los organismos que pueden desarrollarse en medio B5, en suelo o en las plantas mismas, pero no hay garantía de que dichas plantas estén libres de virus, viroides o fitoplasmas. Ya que las principales enfermedades de mango son de naturaleza fúngica (Ploetz, 2004; Akhtar y Alam, 2002), las plantas obtenidas con el método desarrollado en este estudio pueden ser usadas para estudios de patogenicidad de hongos.

#### 1.7. CONCLUSIONES

Los embriones de mango sembrados *in* vitro mostraron un alto grado de viabilidad, de ellos germinaron plantas sanas y vigorosas.

El medio B5 modificado proporcionó los elementos necesarios de humedad, nutrimentos complementarios y soporte para la germinación del embrión y crecimiento de las plántulas.

El diseño de los envases asépticos, el método de esterilización y el de riego garantizaron la obtención de plantas asépticas, o al menos libres de todos los organismos que pueden desarrollarse en medio B5, en suelo o en las plantas mismas, lo que las hace útiles para aclarar relaciones de etiología.

Los contaminantes identificados en embriones en medio B5 modificado fueron: Penicillium sp., Aspergillus sp., Xanthomonas sp. y Cladosporium sp.

Los contaminantes identificados en el sustrato suelo + tezontle + agrolita fueron: Cladosporium sp., Alternaria sp., Aspergillus sp., Rhizopus sp. y Fusarium sp.

Los contaminantes identificados en los componentes del frasco cerrado fueron: *Helmithosporium* sp., *Curvularia* sp., Penicillium sp. y *Syncephalastrum* sp. Los contaminantes identificados en la siembra de embriones de mango *in* vitro en medio B5 modificado y en suelo se consideran organismos oportunistas que se establecieron por el manejo de los embriones y durante el riego.

Cuadro 1.1 Medio modificado B5 (Gamborg *et al.*, 1968) para la germinación de embriones de mango

embriories de mango	CANTIDAD DADA DDEDADAD
SUSTANCIAS	CANTIDAD PARA PREPARAR
	UN LITRO DE MEDIO
MACRONUTRIMENTOS	
$KNO_3$	2 500 mg
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	250 mg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	150 mg
CaCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	150 mg
	100 mg
MICRONUTRIMENTOS	
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0.017 a
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	
NaMoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	<b>.</b>
• =	3
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.000025 g
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.000025 g
QUELATOS	
•	0.0070 ~
Na <sub>2</sub> EDTA. 2H <sub>2</sub> O	0.0373 g
FeSO <sub>4.</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.0278 g
ORGÁNICOS	
	13 ~
Sacarosa	42 g
Mio-inositol	100 mg
Tiamina	1 mg
Carbón activado	<u>1</u> g
Agar (Merck)	5.5 g
IK	0
Sulfato de amonio	0

Medio de cultivo para embriones de mango de frutos maduros; es decir, que los embriones cubren toda la cavidad de la cáscara. Para frutos inmaduros se utilizó  $KH_2PO_4$  en lugar de  $NaH_2PO_4$ .



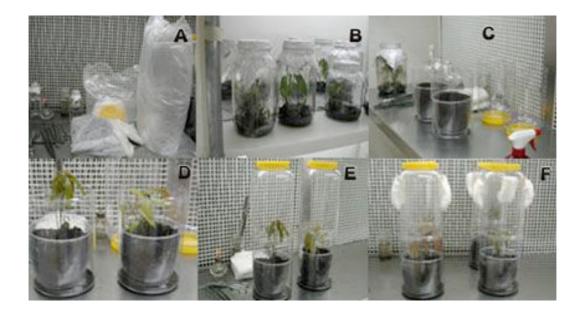
Figura 1. Esquema del frasco para trasplante en condiciones de asepsia



**Figura 2**. Siembra *in vitro* de embriones de mango en medio B5 modificado. **A** lavado con detergente y agua. **B** desinfección con hipoclorito de sodio concentrado. **C-E** quitar pulpa y endocarpio. **F** desprender la nucela de cada óvulo. **G** desinfección de embriones con Cloralex® al 10%. **H-I** siembra de embriones en medio B5



**Figura 3.** Esterilización del sustrato y componentes del recipiente cerrado para el transplante aséptico de plántulas. **A-B.** Mezcla de suelo orgánico+agrolita y esterilización a121°C y 1.05 kg/cm². **C** Torundas esterilizadas. **D-E** empaque de botes y macetas en doble bolsa de polietileno para esterilizar con rayos UV. **F** tapaderas en doble bolsa de polipapel para esterilizar en autoclave.



**Figura 4**. Proceso de transplante de plántulas a suelo en frasco cerrado en condiciones de asepsia. **A** limpieza superficial con alcohol concentrado a los componentes del frasco. **B** selección de frascos y limpieza superficial con alcohol **C** verter el sustrato en la maceta **D** depositar la plántula en el suelo **E** colocar la segunda parte del frasco. **F** sellar con cinta canela y pegado de torundas

#### 1.8. LITERATURA CITADA

- Akhtar, K.P. y Alam S. S. 2002. Assessment keys for some important diseases of mango. Pakistan Journal of Biological Sciences 5 (2): 246-250.
- Ali, H., Summerell B.A. y Burgess L.W. 1991. An evaluation of three media for the isolation of *Fusarium*, *Alternaria* and other fungi from sorghum grain. Australasian Plant Pathology 20(4): 134 138.
- Beyl, C.A. 2000. Getting started with tissue culture media preparation, sterile technique, and laboratory equipment. pp. 21-38. En: N.R. Trigiano, y D.J. Gray (eds.). Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. CRC Press LLC, Washington, D.C. USA. 454 p.
- Bhojwani, S.S. y Razdan M.K. 1983. Plant Tissue Culture: Theory and Practice. First edition. ELSEVIER. Amsterdam, The Netherlands. 502 p.
- Barnet, L.H. y Hunter B.B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth edition. The American Phytopathological Society. St. Paul Minnesota, USA. 218 p.
- Corbineau, F., Kante M. y et Come D. 1987. Germination des graines et développement des plantules de manguier (*Mangiferae indica* L.). Fruits 42(2): 113-120.
- Franklin, C.I. y Dixon R.A. 1994. Initiation and maintenance of callus and cell suspension cultures. pp. 1- 25. En: R.A. Dixon y R.A. Gonzalez (eds.). Plant Cell Culture A Practical Approach. Oxford University Press. Oxford, England. 230 p.
- Gamborg, O., Miller P.A. y Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. Experimental Cell Research 50: 151-158.
- Hartmann, H. T. y Kester D. E. 1999. Propagación de plantas: Principios y prácticas. Segunda edición. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. México 760 p.
- Joseph Pierre-Louis, D. 2002. Aplicación de fertilizantes foliares y silicio para incrementar el rendimiento y calidad del mango c.v. Haden. Tesis de maestría en ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. 130 p.
- Kozai, T. 2006. Closed systems for high quality transplants using minimum resources. pp. 275-312. En: S. Dutta Gupta y Yasuomi Ibaraki (eds.). Plant Tissue Culture Engineering. Springer. Printed in the Netherlands. 480 p.

- Mathur, S.K., Mathur S.B. y Neergaard, P. 1975. Detection of seed-borne fungi in sorghum and location of *Fusarium moniliforme* in the seed. Seed Science & Technology 3: 683-690.
- Mora-Aguilera, J.A. 2000. Patogénesis y epidemiología de la "escoba de bruja" Fusarium subglutinans (Wollemweb & Roinking) y F. oxysporum (Sdhlecht) del mango (Mangifera indica L.) en Michoacán, México. Tesis de doctorado en ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. 107 p.
- Morales-Rondón, V. y Rodríguez-González M. 2006. Hongos endofitos en plantaciones de mango "Haden" de la planicie de Maracaibo, Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía del Zulia. (LUZ) 23: 273-283.
- Murashige, T. 1979. Plant tissue culture and its importance to agriculture. pp. 27-44. En: K. Maramorosch y H. Hirumi (eds.). Practical Tissue Culture Applications. Academic Press. New York, USA. 426 p.
- Nome, S.F. 1991. Pruebas de detección de virus, viroides y organismos fitopatógenos sistémicos aplicadas al cultivo de tejidos. pp. 663-695 En: W.M. Roca y L.A. Mroginski (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali Colombia. 969 p.
- Noriega-Cantú, D.H. 1996. "Escoba de bruja" del mango: etiología, histopatología, epidemiología y manejo integrado. Tesis de Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. 72 p.
- Pierik, R.L.M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Versión española de L.A. Mateo-Sagasta Ed. Mundi-prensa Madrid, España. 326 p.
- Ploetz, R.C. 2004. The major diseases of mango: strategies and potencial for sustainable management. Acta Horticulturae 645: 137-151.
- Ramming, D. 1983. Embryo culture. pp. 36-144 En: J.N. Moore y J. Janick (eds.). Methods in fruit breeding. W. Lafayette, Indiana. Purdue Univ. Press. 464 p.
- Razdan, M.K. 2003. Introduction to plant tissue culture. Second edition. Science Publishers, Inc. Enfield, New Hampshire. U.S.A. 375 p.
- Smith, H.R. 2000. Plant tissue culture: Techniques and experiments. Second edition. Academic Press. San Diego. U.S.A. 229 p.

- Steiner A. A. 1968. Soil less culture. Proceedings of the 6<sup>th</sup> Coloquium of international Potash Institute. Florence Italy Published by International Potash Institute Berne Switzerland. pp. 324-341.
- Youssef, S. A., Maymon M., Zveibil A., Klein-Gueta D., Sztejnberg A., Shalaby A. A. y Freeman S. 2007. Epidemiological aspects of mango malformation disease caused by *Fusarium mangiferae* and source of infection in seedlings cultivated in orchards in Egypt. Plant Pathology 56 (2): 257–263.

## **CAPÍTULO II**

# EL ÁCARO *Aceria mangiferae* (Sayed) Y SU RELACIÓN CON LA DEFORMACIÓN VEGETATIVA DEL MANGO

#### 2.1. RESUMEN

Plantas de mango sembradas *in vitro* en condiciones de asepsia fueron inoculadas con ejemplares del ácaro *Aceria mangiferae* previamente desinfectados, con el hongo *Fusarium subglutinans*, con ejemplares del mismo ácaro colectados en yemas de mango, de manera que probablemente portaran contaminantes (entre ellos hongos del género *Fusarium*) y con la combinación ácaro-hongo. El objetivo del estudio fue determinar si el ácaro es capaz de provocar deformaciones conocidas como "escoba de bruja", atribuidas a *Fusarium* spp., así como determinar si el ácaro es capaz de transportar al hongo e influir sobre el desarrollo de la escoba de bruja. El ácaro *A. mangiferae* produjo deformaciones en plantas de mango consistentes en la emisión repetida de brotes monopódicos, hojas atróficas y ápice acortezado; el hongo *F. subglutinans* indujo la emisión de brotes a partir de yemas axilares, con entrenudos cortos y hojas deformes, característicos de la escoba de bruja, El ácaro *A. mangiferae* portó e introdujo al hongo *F. subglutinans* a yemas de mango, por lo que se demostró que facilita el desarrollo de dicha enfermedad.

PALABRAS CLAVES Mangifera indica, deformación, in vitro, Fusarium subglutinans

#### 2.2. ABSTRACT

Mango plants sown *in vitro* under aseptic conditions were inoculated with specimens of the mite *Aceria mangiferae* previously disinfected, with the fungus *Fusarium subglutinans*, with specimens of the above mite collected from mango buds in such a way that they probably carried contaminants (including *Fusarium*), and with the combination mite-fungus, The aim of the study was to determine whether the mite is capable to induce malformations known as "bunchy top", attributed to *Fusarium* spp., and to determine if the mite is capable to carry the fungus and so promote the development of bunchy top. The mite *A. mangiferae* induced malformations in mango plants characterized by the repeated emission of monopodial sprouts, atrophic leaves

and corky apex. The fungus *F. subglutinans* induced the emission of sprouts starting from axillary buds, with short internodes and malformed leaves, characteristic of bunchy top. The mite *A. mangiferae* carried and introduced the fungus *F. subglutinans* to mango buds, showing that it facilitates the development of the disease.

**KEY WORDS** *Mangifera indica*, bunchy top, *in vitro*, *Fusarium subglutinans* 

#### 2.3. ANTECEDENTES

## 2.3.1. Historia de la deformación del mango o escoba de bruja

En la mayoría de los países productores de mango se presenta una enfermedad que consiste en la alteración de los patrones de crecimiento de los brotes vegetativos y florales de este cultivo. Cuando se presenta en inflorescencias su nombre en inglés es "inflorescence malformation", mientras que cuando se presenta en brotes vegetativos se le conoce como "bunchy top". En México, a ambos problemas se les asigna el nombre de "escoba de bruja". Esta enfermedad, en su manifestación floral, fue citada por Watt, en 1891(citado por Kumar y Beniwal, 1992), y en su manifestación vegetativa fue citada por Nirvan en 1953. Un año más tarde, Tripathi (1954) observó una correlación positiva entre el porcentaje de inflorescencias y brotes vegetativos deformes en árboles individuales de diferentes cultivares, por lo que propuso que la deformación floral y la vegetativa son dos manifestaciones de la misma enfermedad. La propuesta de Tripathi a sido ampliamente aceptada, y Kumar y Beniwal (1987) presentaron evidencias experimentales que la apoyan; sin embargo, queda por responder por qué la deformación vegetativa apareció o llamó la atención de los investigadores aproximadamente 60 años más tarde que la floral, así como por qué en algunos países o partes de México sólo se presenta la deformación floral.

# 2.3.2. Manifestación de la escoba de bruja en brotes vegetativos

La deformación vegetativa se caracteriza porque las yemas axilares de plantas de mango desarrollan multitud de brotes hasta formar una masa compacta con aspecto de cogollo racimoso. Los brotes formados son más gruesos y las hojas son pequeñas, en forma de escamas y las hojas también pueden desarrollar filodia (Marasas *et al.*,

2006). El Cuadro 2.1 muestra las diferentes descripciones de los síntomas vegetativos dadas por varios autores.

Cuadro 2.1. Síntomas de escoba de bruja en brotes vegetativos

Cuadro 2. 1. Sintor							1	1
Autor síntomas	Schlösser 1971	Ibrahim v Foad	Campbell y Marlatt	Doreste (1984)	Burhan 1990	Kumar y Beniwal	Kumar et al	Otero- Colina
	1371	1981	1982	(1304)	1330	1992	1993	et al.
						.002		2005
Entrenudos cortos	<b>√</b>		<b>√</b>					V
Muerte de hojitas en				V				
formación								
Desarrollo anormal		V		V				
de las yemas								
Pérdida de		V					$\sqrt{}$	V
dominancia apical								
Hoja primordial								
distorsionada								
Proliferación de	√							$\sqrt{}$
yemas axilares					,	,		,
Gran número de	√		√					V
pequeñas hojas								
escamosas,								
rudimentarias y								
tallos aglomerados	1				1	1		
Brotaciones	<b>√</b>				<b>V</b>	V	V	
aglomeradas en una								
cabeza compacta								
con aspecto de								
cogollo racimoso			2		2/			
Brotes y yemas del			V		V			
racimo más gruesos								
que el tallo principal								

## 2.3.3. El ácaro en la etiología de la escoba de bruja

Entre las primeras explicaciones sobre el agente causal de la deformación o escoba de bruja se señaló al ácaro *Aceria mangiferae* por el hecho de que habita bajo las escamas de yemas terminales de árboles con síntomas de la enfermedad (Hassan, 1944; Narasimhan, 1954; Morales y Rodríguez, 1961). Conclusión con pocos elementos científicos, pero que se consideró como una respuesta al problema, que más tarde se abordó con trabajos como el de Puttarudriah y Channa Basavanna (1961), quienes llevaron ácaros *A. mangiferae* de brotes deformes a yemas vegetativas terminales de plantas de mango sanas; después de tres meses de observación, las plantas de mango presentaron numerosos brotes aglomerados en racimo como se encuentran en campo. Un estudio similar fue realizado por Nariani y Seth (1962) con la variante de infestar con ácaros procedentes de plantas aparentemente sanas, ya que habían

observado que el eriófido también se encontraba en ese tipo de yemas. Depositaron ambos ácaros en yemas apicales de plantas sin síntomas aparentes de la enfermedad y cubrieron el punto de inoculación con una tela de algodón para proporcionar alta humedad. Después de un mes observaron proliferación de yemas axilares en las plantas inoculadas, independientemente de la procedencia de los ácaros, y a los cinco meses apareció la típica deformación de escoba de bruja. Estos resultados los llevaron a la conclusión de que el ácaro fue responsable de la deformación del mango.

Sin embargo, en ninguno de los trabajos citados se descartó la posibilidad de que el ácaro no fuera el único factor en las deformaciones del mango y que existiera la interacción con otro factor biótico. Por otra parte, Bindra y Bakhetia (1971) inocularon ácaros procedentes de yemas deformes en plantas de mango por tres años consecutivos; dichas plantas no mostraron deformaciones, lo que debilitó la hipótesis de que el ácaro es el agente directo causante de las deformaciones. Más bien se ha sugerido que el hongo *Fusarium moniliforme* produce las deformaciones (Summanwar *et al.*, 1966 y Varma *et al.*, 1972) y que el eriófido sólo trasmite al patógeno (Noriega, 1996. y Gamliel-Atinsky *et al* 2007)

#### 2.3.4. El hongo Fusarium spp. en la etiología de la escoba de bruja

Los resultados experimentales de varios autores comenzaron a señalar consistentemente que hongos del género *Fusarium* son causantes de la escoba de bruja. En un primer trabajo, Summanwar *et al.* (1966) aislaron *Fusarium moniliforme* de yemas florales deformes y lo inocularon a través de heridas en plantas sanas de 8 a 10 meses de edad más plantas testigos sin infectar, y las mantuvieron en un invernadero. Un mes y medio después de la inoculación aparecieron brotes deformes, lo que permitió postular a *F. moniliforme* como el agente causal de las deformaciones. Por su parte, Bhatnagar y Beniwal (1977) identificaron a *Fusarium oxysporum* de diferentes partes de las plantas en tejido enfermo y lo determinaron como causante de la malformación del mango, ya que infectaron por herida plantas sanas de 7 a 8 meses de edad, mientras que otra forma fue inocular el suelo y colocar en él semillas germinadas de mango. Con ambas formas de inoculación aparecieron síntomas de la enfermedad y

reprodujeron los postulados de Koch reaislando *F. oxysporum* de diferentes partes de la planta.

Otros trabajos presentan resultados similares, en los cuales se aisló a *F. oxysporum* de ramas y flores enfermas, y además se reprodujeron síntomas de escoba de bruja cuando se inoculó a dicho hongo (Díaz y Romero, 1980; Noriega, 1996) así como *F. subglutinans* en brotes vegetativos (Freeman *et al.*, 1999 y 2000; Otero-Colina *et al.*, 2007). Como evidencia adicional puede citarse a Crookes y Rijkenberg (1985), Ploetz y Gregory (1993), y Noriega *et al.* (1999), quienes colectaron muestras de diferentes partes y flujos de crecimiento de la planta, e identificaron *F. subglutinans* en asociación con brotes deformes, y Freeman *et al.* (2004) quienes identificaron a *F. mangiferae* como agente causal de la deformación del mango.

A pesar del cúmulo de evidencia que sostiene la etiología fúngica de la escoba de bruja, al menos en su manifestación vegetativa, es sorprendente que algunos autores, como Kumar et al. (1993), consideran que dicha enfermedad es causada por un agente desconocido. Una fuente de error es el hecho de que cuando se inocularon hongos para cumplimiento de los postulados de Koch no se garantizó la ausencia de contaminantes, con lo que se cometió el mismo error que en los trabajos donde se postuló a A. mangiferae como agente causal. Como fuente adicional de duda está el hecho de que en investigaciones recientes, en las que se identifica a hongos del género Fusarium con técnicas moleculares, aparecen especies adicionales de dicho género asociadas a deformaciones. Entre ella se cita a F. mangiferae, F. sterilihyphosum y F. proliferatum (Steenkamp et al., 2000; Britz et al., 2002; Marasas et al., 2006), lo que obliga a postular que varias especies del hongo causan las mismas deformaciones.

Otero-Colina et al. (2007) y López-Estrada (Capítulo I de este documento) desarrollaron un método para la obtención de plantas asépticas o libres de contaminantes, las cuales pueden ser usadas para la inoculación de gérmenes individuales y para la determinación de asociaciones causa-efecto entre éstos y la aparición de deformaciones u otro tipo de enfermedades. Con plantas de mango obtenidas con el método citado, Otero-Colina et al. (2007) corroboraron la etiología fúngica de la escoba de bruja (vegetativa), pero además describieron síntomas consistentes en la emisión repetida de brotes monopódicos (a partir de la yema apical)

múltiples, cortos, con hojas atróficas y con epidermis acortezada, los que postularon que el ácaro *A. mangiferae* es capaz de causar por sí solo. Sin embargo, no identificaron los hongos contaminantes ni los que los ácaros podrían portar, entre los cuales podría aparecer *Fusarium* spp., por lo que dicho trabajo dejó ese punto inconcluso.

Dado lo anterior, el presente trabajo repite la aplicación de los postulados de Koch en plantas asépticas, pero se agrega la identificación de los hongos del genero *Fusarium* presentes, que portaron los ácaros y los contaminantes que se presentaron durante el experimento, a fin de corroborar la etiología fúngica de la escoba de bruja del mango en su manifestación vegetativa, en plantas asépticas. El objetivo de este trabajo fue determinar el tipo de daños que el ácaro *A. mangiferae* puede causar a plántulas de mango en ausencia de otros organismos, y determinar asimismo si dicho ácaro es vector de hongos del género *Fusarium*.

#### 2.4 MATERIALES Y METODOS

# 2.4.1. Obtención de plántulas asépticas por siembra de embriones in vitro

Se obtuvieron plántulas *in vitro* de mango en condiciones de asepsia, con el propósito de inocularlas tanto con *F. subglutinans* como con *A. mangiferae*, los dos por ser organismos consistentemente asociados con la deformación vegetativa. Para conseguir lo anterior, se colectaron 250 frutos inmaduros de 45 a 60 días de edad a partir de la antesis y un tamaño de 9.5 a 11 cm de largo por 5.5 a 6 cm de ancho procedentes de árboles de mango criollo poliembriónico (plantas de semilla derivadas de la recombinación libre de mangos de origen filipino, o Manila) en una huerta en el municipio de Iguala, Guerrero. Los frutos se trasladaron en una hielera al laboratorio para realizar la siembra *in vitro*. El tiempo máximo que transcurrió entre la recolección de los frutos y su siembra fue de un día. Dichos frutos se procesaron como se describe en el Capítulo I. Una vez germinados se incubaron en un cuarto de crecimiento con temperatura de laboratorio (entre 20 y 32°C) y con iluminación fluorescente, hasta que alcanzaron una altura aproximada de 10 - 15 cm; entonces se trasplantaron a suelo estéril y se incubaron y regaron, siguiendo también el proceso descrito en el Capítulo I, hasta el fin de las observaciones.

# 2.4.2. Preparación del ácaro Aceria mangiferae

Se colectaron yemas vegetativas deformes y asintomáticas en huertas de mango Haden de Tuxpan, Guerrero; éstas se colocaron en una hielera y se trasladaron al laboratorio. Una parte de las yemas vegetativas colectadas se utilizó para capturar ácaros y someterlos al siguiente tratamiento de desinfección. En la campana de flujo laminar y con ayuda del microscopio estereoscópico y una pestaña esterilizada con alcohol se colectaron eriófidos y se colocaron en una canastilla construida con tubos Eppendorf y malla de nylon para serigrafía (300 mallas por pulgada cuadrada) previamente esterilizada por sumersión en hipoclorito de sodio (Cloralex ®) al 5% por 15 minutos; la canastilla se colocó en una caja Petri Ilena con solución de Tween 80 al 0.01%; al término de la recolección de los ácaros, la canastilla se cubrió con un pedazo de malla también esterilizada y éste se sujetó con un anillo de popote plástico; posteriormente la canastilla, ya con los ácaros, se sumergió en una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex ®) 5% por 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se lavó la canastilla y por sumersión en agua destilada estéril tres veces, después se escurrió sobre un papel filtro esterilizado, se quitó la cubierta de malla, se dejaron secar los ácaros y entonces se les colectó nuevamente con una pestaña estéril bajo el microscopio estereoscópico para transferirlos a las yemas apicales de las plantas asépticas de mango. Para verificar que los ácaros establecidos en la colonia estaban libres de contaminantes, se tomaron algunas muestras al azar y se sembraron en PDA.

## 2.4.3. Preparación del hongo Fusarium subglutinans

Para las inoculaciones del hongo en plantas asépticas de mango, se contó con la cepa monospórica GUE INI 95 de *F. subglutinans,* donada por el Dr. Antonio Mora Aguilera e identificada por Jean Juba, del Fusarium Research Center (Noriega *et al.,* 1999). Esta cepa se reactivó en medio PDA, luego de ocho días de crecimiento en ese medio se preparó una suspensión en 50 mL de agua destilada estéril a una concentración de 2 x 10<sup>6</sup> conidios/mL; la concentración de conidios se estimó con ayuda de la cámara de Neubauer (Nucles y Kuc, 1988).

# 2.4.4. Respuesta de las plántulas de mango asépticas a la inoculación de *A. mangiferae* y *F. subglutinans*

Los dos organismos citados, involucrados en la escoba de bruja, se inocularon en las plántulas de mango obtenidas en asepsia, en el momento en que éstas se trasplantaron a suelo en frascos cerrados, en la campana de flujo laminar. Se estableció un diseño experimental completamente al azar con siete tratamientos y diez repeticiones cada uno, bajo las siguientes características.

Tratamiento 1. Consistió en la infestación de plántulas de mango cada una con 20 ejemplares de *A. mangiferae* procedentes de yemas deformes sin ningún proceso de desinfección. Éstos se transfirieron a la yema apical con un pincel fino.

Tratamiento 2. Radicó en la infestación de plántulas de mango cada una con 20 ejemplares de *A. mangiferae* procedentes de yemas asintomáticas y sin proceso de desinfección. La transferencia de ácaros fue como en el tratamiento 1.

Tratamiento 3. Veinte ejemplares de *A. mangiferae* previamente desinfectados con hipoclorito de sodio, usando el método descrito en el punto 2.4.2, fueron transferidos a la yema apical de plántulas de mango.

Tratamiento 4. Consistió en la inoculación de cada plántula de mango con 20 ejemplares de *A. mangiferae*, previamente desinfectados con hipoclorito de sodio y enseguida bañados en 1 mL de suspensión de *F. subglutinans* a una concentración de  $2 \times 10^6$  conidios / mL

Tratamiento 5. Inoculación de las plántulas de mango con *F. subglutinans*. Se fijó un pedazo de algodón estéril en la base de la yema terminal y con una pipeta de vidrio estéril se depositó 1 mL de suspensión de conidios a una concentración de 2 x 10<sup>6</sup> conidios / mL. sin causar heridas.

Tratamiento 6. Infección de plántulas de mango con el hongo *F. subglutinans*, siguiendo el mismo procedimiento que el tratamiento 5, con la diferencia de que la yema apical fue herida con una jeringa hipodérmica antes de depositar la suspensión de esporas.

Tratamiento 7. Testigo. Las plántulas fueron inoculadas con agua destilada estéril, previamente se fijó un algodón estéril en la base de la yema terminal y sobre él se depositó el agua.

Los frascos con las plántulas inoculadas fueron etiquetados y permanecieron en un cuarto de crecimiento con temperatura de laboratorio (20-32°C), iluminación artificial y riegos cada 45 días con solución nutritiva universal (Steiner, 1968) esterilizada en autoclave a temperatura de 121°C y presión de 1.05 kg/cm² por 60 minutos. Cada riego se realizó bajo la campana de flujo laminar para mantener la asepsia de las plantas. Cinco meses después de la inoculación se midió la altura de las plantas en centímetros y se contó el número de brotes monopólicos; éstos son las emisiones de crecimiento procedentes directamente de la yema apical, las cuales son consideradas normales a condición de que el tallo se alargue y se formen hojas normales, expandidas. Se contó también el número de brotes simpódicos, que resultan de la activación de yemas axilares, y son considerados anormales porque las yemas axilares de las plantas sanas permanecen latentes como resultado del proceso conocido como dominancia apical (Phillips, 1975). Los valores obtenidos se compararon por ANOVA y prueba de diferencia mínima significativa (LSD).

# 2.4.5. Recuperación de los organismos inoculados

La presencia de *A. mangiferae* y de *F. subglutinans* se verificó al término del experimento en todas las plantas, indistintamente si fueron inoculadas con uno, los dos o ningún organismo. Para el ácaro se realizó un muestreo destructivo de la yema terminal de cada planta, se observaron bajo el microscopio estereoscópico y los ácaros colectados se colocaron en ácido láctico para aclararlos, posteriormente se montaron entre porta y cubreobjetos con líquido de Hoyer y se corroboró su identificación con las claves de Jeppson *et al.* (1975) y la descripción dada por Abou-awad (1981) para *A. mangiferae*.

Para el hongo *F. subglutinans* se hicieron siembras de pequeñas muestras de tejido en medio PCNB (pentacloronitrobenzeno-agar). De los crecimientos en el medio se tomaron muestras y se pasaron a PDA, posteriormente de los crecimientos en este medio se tomaron pequeñas porciones y se tiñeron con lactofenol entre porta y cubreobjetos para su observación bajo el microscopio de campo claro e identificación con las claves de Barnet y Hunter (1998) y el Manual de *Fusarium* de Leslie y Summerell (2006).

#### 2.4.6. Identificación de contaminantes

En las plantas donde se observaron contaminantes se tomaron muestras de tejidos vegetales, suelo o ambos, se sembraron en medio PDA y posteriormente fueron identificados a nivel de género con las claves de Barnet y Hunter (1998).

#### 2.5. RESULTADOS

### 2.5.1. Obtención de plántulas asépticas por siembra de embriones in vitro

Los embriones sembrados en medio B5 modificado en condiciones de asepsia germinaron en 95 %, en promedio a los 18 días y en este medio permanecieron hasta alcanzar una altura de 10 a 15 cm. De dichas plántulas se seleccionaron para el trasplante las que tuvieran apariencia vigorosa, sin alteraciones visibles, con altura de 10 a 15 cm y sin crecimiento de contaminantes. En todos los casos que presentaron contaminación, las plántulas fueron sometidas a 30 minutos de autoclave y posteriormente desechadas. Las plántulas que fueron transplantadas continuaron su desarrollo, emitieron brotes vegetativos y las hojas formadas se expandieron normalmente.

## 2.5.2. Resultados del manejo y desinfección de A. mangiferae

Los ácaros procedentes de yemas deformes y asintomáticas que no fueron sometidos a ningún proceso de desinfección mantuvieron su actividad a pesar de la manipulación en el proceso de infestación. También se observó que los ácaros después del tratamiento de desinfección conservaron su dinamismo y cuando se les colocó en plántulas de mango fueron capaces de reproducirse. Además, cuando se sembraron en PDA no hubo crecimiento de hongos ni de bacterias, con lo que se confirmó la eficiencia del tratamiento de desinfección.

# 2.5.3. Verificación del hongo Fusarium subglutinans

La cepa monospórica *GUE INI 95* de *F. subglutinans* se rehabilitó y verificó su identificación por la ausencia de clamidosporas y por la formación de microconidios en polifiálides (Nelson *et al.*, 1983; Leslie y Summerell, 2006).

# 2.5.4. Respuesta de las plántulas de mango asépticas a la inoculación de *A. mangiferae* y *F. subglutinans*

# 2.5.4.1 Altura de las plantas

El Cuadro 2.2 muestra los valores morfométricos de las plantas de mango. Las plantas testigo fueron más cortas que todas las que recibieron tratamientos con ácaros y/o hongos, y aunque el tratamiento inoculado con *F. subglutinans* por herida no mostró diferencias significativas con el testigo, se aprecian dos bloques: en los tratamientos que recibieron ácaros (posiblemente contaminados con *Fusarium* spp.) la altura de las plantas es mayor, y en los tratamientos que recibieron sólo *F. subglutinans* la altura de las plantas tiene valores intermedios.

#### 2.5.4.2. Número de brotes axilares

Tanto en las plantas testigo como en las que fueron infestadas con ácaros previamente descontaminados, no hubo desarrollo de brotes a partir de las yemas axilares. En los tratamientos donde se aplicó *F. subglutinans*, así como en los que fueron infestados con ácaros sin tratamiento de descontaminación, se desarrollaron brotes a partir de las yemas axilares, y en los casos en que dichos brotes tuvieron su mayor desarrollo aparecieron las manifestaciones características de la escoba de bruja vegetativa. Las más claras manifestaciones de la escoba de bruja se vieron en las plantas infestadas con ácaros no descontaminados, y el más alto porcentaje de plantas con brotes axilares se dio en plantas inoculadas con *F. subglutinans* aplicado con heridas. Los hechos anteriores muestran que el ácaro *A. mangiferae*, cuando actúa por sí solo, no induce la brotación de las yemas axilares, sino que esta alteración la producen hongos del género *Fusarium*; sin embargo, al parecer la infección por parte del hongo se facilita cuando las plantas sufren heridas, entre otras las causadas por el ácaro *A. mangiferae* (Cuadro 2.2). Por su parte, las plantas testigo no mostraron desarrollo de brotes a partir de las yemas axilares.

Cuadro 2.2 Morfometría de plantas de mango *in vitro* inoculadas con *F. subglutinans* y *A. mangiferae*, lecturas tomadas al final del experimento. Los valores corresponden sólo a las plantas donde aparecieron los síntomas descritos.

Tratamientos	Altura e	Altura en cm		Número de brotes axilares			Flujos de crecimiento monopódicos múltiples *		
Ácaros procedentes de yemas deformes	21.5	a b	13.3	(n=3)	b	9.00	) (n=6)	а	
Ácaros procedentes de yemas asintomáticas	22.9	a b	15.3	(n=3)	а	9.00	0 (n=3)	а	
Ácaros desinfectados Ácaros desinfectados +	25.45	а	0	(n=10)	d c	9.7	50 (n=4)	a a	
Fusarium subglutinans F. subglutinans inoculado	19.85	bс	4.0	(n=5)		7.66	67 (n=6)	b	
sin heridas  F. subglutinans inoculado	19.35	bс	2.0	(n=1)	- **	0	(n=10)	b	
con heridas	17.3	c d	3.29	(n=7)	С	0	(n=10)		
Testigo	15.2	d	0	(n=10)	d	0	(n=10)	b	

<sup>\*</sup>Como los descritos por Otero-Colina *et al.* (2007). n = número de plantas \*\* no se consideró en el ANOVA por ser valor único.

## 2.5.4.3 Flujos de crecimiento monopódicos múltiples

En todos los tratamientos que incluyeron la infestación con ácaros, algunas plantas desarrollaron brotes monopódicos repetidos; esto es, la yema apical de cada planta emitió un brote, el cual sólo alcanzó la longitud de aproximadamente 0.5 cm, y el proceso se repitió sucesivamente hasta más de nueve veces (Cuadro 2.2). Las hojas emitidas fueron reducidas y secas, como escamas, y la epidermis adquirió tono café claro y aspecto de corteza (Figura 5A-E). En contraste, en ninguno de los tratamientos donde no se infestó a las plantas con ácaros apareció este tipo de síntomas, lo que permite determinar de manera categórica que los síntomas definidos como crecimiento de brotes monopódicos múltiples son causados por el ácaro *A. mangiferae*. En ninguna de las plantas testigo aparecieron brotes monopódicos múltiples.

## 2.5.5 Recuperación de los organismos inoculados

En el Cuadro 2.3 se observa que al final del experimento, en las plantas infestadas con *A. mangiferae* se recuperaron estos ácaros, pero también se identificó *F. subglutinans*; donde se inoculó a *F. subglutinans* se le recuperó también, mientras que en las plantas testigo no se recuperó ninguno de los dos organismos, cumpliendo así con los postulados de Koch.

El tratamiento donde se infestaron plantas con ácaros no sometidos a descontaminación, procedentes de yemas deformes y asintomáticas de campo, se recuperó a *F. subglutinans* en 60 y 40%, respectivamente, lo que permite sugerir que el eriófido lleva el hongo en su cuerpo y lo introduce en las yemas. En contraste, cuando las plantas fueron inoculadas con ácaros previamente desinfectados, en ninguna de ellas se identificó *F. subglutinans*, con lo que se confirma la efectividad del método de descontaminación de los ácaros (Cuadro 2.3).

El Cuadro 2.3 muestra el desarrollo de brotes a partir de las yemas axilares se asocia claramente con la recuperación de *F. subglutinans*, mientras que el desarrollo de brotes monopódicos múltiples se asocia con la recuperación de *A. mangiferae*, lo que refuerza los planteamientos presentados en 2.5.4.2. y 2.5.4.3. Sin embargo, debe resaltarse que se dio el caso de plantas asintomáticas, algunas con el ácaro y otras con el hongo. Esto permite postular que el ácaro y el hongo pueden dañar a la planta por separado o en asociación, pero también estar presentes en ellas y no mostrar síntomas.

Cuadro 2.3. Recuperación de organismos inoculados en plantas de mango *in vitro* y síntomas asociados con ellos.

	Porcentaje de	presencia de	Plantas con	Plantas con	Porcentaje de plantas	
Tratamientos	A. mangiferae	F.	brotes	brotes		
		subglutinans.	axilares %	monopódicos	asintomáticas	
				atróficos %		
Acaros procedentes	80	60	30	60	30	
de yemas deformes						
Ácaros procedentes	80	40	30	30	50	
de yemas						
asintomáticas						
Ácaros desinfectados	70	0	0	40	60	
,						
Ácaros desinfectados	70	100	50	60	40	
+ Fusarium						
subglutinans						
F. subglutinans	0	70	10	0	90	
inoculación sin						
heridas						
F. subglutinans	0	90	70	0	30	
inoculación con						
heridas						
Testigo	0	0	0	0	100	

# 2.5.6. Identificación de contaminantes en plantas de mango *in vitro* al final del experimento

En plántulas asépticas obtenidas por siembra de embriones *in vitro* se presentó contaminación en 10% de embriones en medio B5 modificado. Los contaminantes identificados fueron de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Xanthomonas* y *Cladosporium*, y en ningún caso se identificó a *F. subglutinans*. Luego del transplante a sustrato de suelo+agrolita en frasco cerrado, las plantas se fueron contaminando gradualmente, de modo que transcurridos cinco meses se había contaminado 75% de ellas.

Los tratamientos que se contaminaron primero fueron aquéllos donde se depositaron ácaros sin ningún tratamiento de desinfección, posteriormente los que involucraron *F. subglutinans* y por último el testigo. Los contaminantes identificados en cada tratamiento se muestran en el Cuadro 2.4 y se consideran organismos oportunistas que no interfirieron en el establecimiento del ácaro y el hongo ya que ninguno ha sido citado como patógeno o endofíto en mango (Noriega *et al.*, 2005; Morales-Rondón y Rodríguez-González, 2006).

Cuadro 2.4 Detección de contaminantes en plantas de mango *in vitro* al final del experimento

Tratamientos	Contaminantes
Testigo	Penicillium sp. Alternaria sp. Aspergillus sp. Pseudomonas sp.
Ácaros procedentes de yemas deformes	Xanthomonas sp. Penicillium sp. Cladosporium sp. Cephalosporium sp.
Ácaros procedentes de yemas asintomáticas	Xanthomonas sp. Penicillium sp.
Ácaros desinfectados	Trichoderma sp. Cladosporium sp. Xanthomonas sp. Alternaria sp.
Ácaros desinfectados + Fusarium subglutinans	Pseudomonas sp. Cladosporium sp. Xanthomonas sp.
F. subglutinans inoculación sin heridas	Xanthomonas sp.
F. subglutinans inoculación con heridas	Pseudomonas sp. Cladosporium sp. Xanthomonas sp.

## 2.6. DISCUSIÓN

La producción de plantas de mango por siembra de embriones *in vitro* para realizar los trabajos de etiología y descripción de síntomas de la escoba de bruja, es una técnica que garantizó la asepsia de las plantas primero porque permitió identificar visualmente contaminantes en el proceso de germinación y segundo porque las pruebas para determinar si las semillas eran o no portadoras de gérmenes, entre ellos *Fusarium* spp. realizadas en el Capítulo I, dieron como resultado que los embriones fueron asépticos, hecho previsible ya que los embriones normalmente se desarrollan en un ambiente estéril (Razdan, 2003)

Las plántulas desarrolladas en suelo estéril en frascos cerrados permitieron determinar el efecto individual y combinado de los organismos inoculados sin la interferencia de otros organismos. Sin embargo, es claro que las condiciones en que se desarrollaron las plantas son totalmente artificiales y el ambiente semicerrado donde se desarrollaron propició un ambiente con elevada humedad ambiental, lo que representa condiciones muy favorables para el desarrollo de los hongos pero los resultados no necesariamente se pueden extrapolar a condiciones de campo.

Fue sorprendente el hecho de que las plantas testigo resultaron más cortas que las inoculadas con *A. mangiferae* y con *F. subglutinans*. No se encontraron datos sobre la altura de las plantas en las investigaciones donde se inocularon hongos del género *Fusarium* para verificar la inducción de deformaciones vegetativas en mango; sin embargo, en varios trabajos se ha presentado la escoba de bruja vegetativa como acortamiento de entrenudos, lo que contrasta con el presente trabajo (Schlösser 1971; Campbell y Marlatt 1982; Otero-Colina *et al.*, 2005).

Cuando se involucraron sólo ácaros *A. mangiferae*, ya sea tal como venían del campo o bajo un proceso de desinfección, provocaron otro tipo de deformaciones en las plantas, las cuales son diferentes de deformaciones atribuidas a otros ácaros de la familia Eriophyidae (Westphal y Manson, 1996). Los síntomas que se atribuyen al ácaro fueron que las plantas presentaron daños en las hojas superiores y en el tallo a la misma altura de las hojas, la yema apical desarrolló brotes monopódicos cortos múltiples, en los que no se formaron hojas normales; más bien las hojas tomaron forma de pequeñas escamas y pronto se secaron, por lo que el tallo tenía una serie de

entrenudos cortos, sin hojas o con vestigios secos de ellas (Figura 5A-F). El tallo principal tenía un aspecto de acortezamiento con tendencia a la muerte del mismo (Figura 5D-E). Además las plantas mostraron engrosamiento del tallo cerca de la yema apical (Figura 5 E), escamas gruesas (Figura 5E-F) y en ninguna de las plantas infestadas sólo por ácaros se observaron deformaciones vegetativas típicas de escoba de bruja. La descripción anterior coincide con la de Otero-Colina et. al. (2007). Por lo anterior se postula que los ácaros por sí solos también son capaces de provocar deformaciones, pero éstas no se presentan en condiciones naturales sino sólo en las condiciones descritas que, como se ha dicho, son muy artificiales y además los ejemplares de A. mangiferae estaban totalmente libres de enemigos naturales. En varias plantas infestadas por ácaros éstos alcanzaron poblaciones muy elevadas, probablemente de varios miles de ejemplares, y los ácaros se encontraban en hojas, tallos y peciolos (Figura 6A-D), contrariamente a lo que ocurre en el campo, donde habitan confinados al interior de las yemas (Abou-awad, 1981).

Los síntomas ocasionados por el hongo *F. subglutinans* se manifestaron en el desarrollo de yemas axilares (Figura 7A-B), que en algunas plantas dieron origen a varias ramas con hojas cortas o deformes, el tallo con entrenudos cortos (Figura 7D-F) y pérdida de dominancia apical (Figuras 7C) síntomas que en lo general coinciden con los descritos por Schlösser 1971), Ibrahim y Foad (1981), Campbell y Marlatt (1982), Burhan (1990), Kumar y Beniwal (1992), Kumar *et. al.* (1993) y Otero-Colina *et al.* (2005). Los brotes deformes se mantuvieron verdes en comparación con los causados por el ácaro, que tendieron a secarse. No se observó una deformación severa como las masas compactas con aspecto de cogollo racimoso (Burhan 1990; Kumar y Beniwal 1992 y Kumar *et al.*, 1993) pero los brotes axilares formados fueron más gruesos, con hojas más pequeñas y a pesar de que no mostraron una deformación típica de escoba de bruja, sí se apartaron del crecimiento normal de la planta (Phillips, 1975).

Es importante señalar que en los tratamientos inoculados con la cepa GUE INI 95 de *F. sublgutinans*, sólo 10% de las plantas mostraron alguno de los síntomas de la escoba de bruja cuando fueron infectadas sin causar herida, en contraste con 70%, cuando las plantas fueron heridas. Este fenómeno permite proponer que la infección de *F. subglutinans* se facilita cuando la epidermis está dañada. Dado que *A. mangiferae* 

portaba propágulo de *F. subglutinans* y se sabe que causa heridas a las plantas cuando se alimenta, se puede postular que dicho ácaro es vector del hongo citado, o al menos lo porta superficialmente, y facilita la infección al abrir vías de entrada al hongo. Sin embargo, también existe la posibilidad de que el hongo se establezca en la planta sin la presencia del ácaro, como sucedió en los tratamientos donde se infectó la planta con una suspensión de *F. subglutinans* a través de una herida o simplemente depositándola sobre la yema apical, lo que sugiere que los ácaros aparentemente no son vectores obligados para el hongo y cualquier herida en la planta huésped puede ser vía de entrada para la infección (Malo y Mc Millan Jr., 1972; Noriega, 1996; Freeman *et al.*, 1999 y 2000).

Todas las plantas testigo se mantuvieron sanas durante todo el experimento, sin ningún tipo de deformación y no se detectaron en ellas al ácaro ni al hongo (Figura 7B). Lo anterior muestra que la emisión anormal de brotes, sea a partir de las yemas axilares o de la apical, son problemas infecciosos derivados del ataque del hongo *F. subglutinans* y del ácaro *A. mangiferae*, respectivamente.

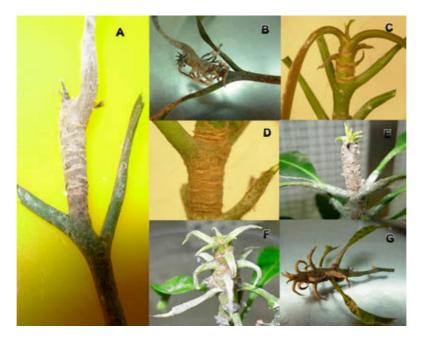
## 2.7. CONCLUSIONES

El ácaro *A. mangiferae* se desempeña como medio de transporte y además facilita la infección de la planta.

La asociación ácaro-hongo promueve e intensifica los síntomas de escoba de bruja en estado vegetativo, lo que señala al ácaro como parte de este síndrome.

El ácaro A. mangiferae por sí solo es capaz de crear deformaciones en las plantas, pero no del tipo característico de la escoba de bruja sino por desarrollo de brotes múltiples y anormales a partir de la yema apical. Dicho ácaro no suprime la dominancia apical.

Los datos del presente trabajo corroboran al hongo *Fusarium subglutinans* como agente causal de la escoba de bruja o deformación vegetativa del mango.



**Figura 5.** Síntomas asociados al ácaro *Aceria mangiferae*. **A-B** crecimientos monopódicos multiples. **C-E** tallo principal tenía un aspecto de acortezamiento con tendencia a la muerte. **F-G** engrosamiento del tallo, hojas anormales y escamas gruesas.



**Figura 6.** Colonia de ácaros establecida en diferentes partes de la planta. **A** yema apical. **B** hojas pequeñas. **C** pecíolo. **D** y tallo.



**Figura 7**. Síntomas causados por el hongo *Fusarium subglutinans* en plantas de mango *in vitro* **A-B** desarrollo de brotes axilares. **C** perdida de dominancia apical. **D –F** ramas con hojas cortas o deformes y tallo con entrenudos cortos



**Figura 8.** Plantas testigo inoculadas con agua destilada estéril. **A** crecimiento normal de brotes monopódicos. **B-C** desarrollo normal de tallos. **D** y hojas.

#### 2.8. LITERATURA CITADA

- Abou-awad, B.A. 1981. Ecological and biological studies on the mango bud mite, *Eriophyes mangiferae* (Sayed), with description of immature stages (Eriophyoidea: Eriophydae) Acarologia 22(2):145–150.
- Barnet, L.H. Y Hunter B.B. 1998. Ilustrated genera of imperfect fungi. Fourth edition. The American Phytopathological Society. St. Paul Minnesota, USA. 218 p.
- Bhatnagar, S.S. y Beniwal S.P.S. 1977. Involvement of *Fusarium oxysporum* in causation of mango malformation. Plant Disease Reporter 61(10): 894–898.
- Bindra, O.S. y Bakhetia D.R. 1971. Investigations on the etiology and control of mango malformation. Indian Journal of Horticulture 28: 80–85.
- Britz, H., Steenkamp E.T., Coutinho T.A., Wingfield B. D., Marasas W. F. O. y Wingfield
  M. J. 2002. Two new species of *Fusarium* section Liseola associated with mango malformation. Mycologia 94 (4):722–730.
- Burhan, M.J. 1990. Mango malformation disease recorded in United Arab Emirates. FAO Plant Protection Bulletin 39 (1): 46–47.
- Campbell, W.C. y Marlatt R.B. 1982. Current status of mango malformation disease in Florida. University of Forida. IFAS. Tropical Research Education Center Hamestead. Florida Agricultural Experiment Station Journal 33031: 223-226.
- Crookes, C.A. y Rijkenberg F.h.J. 1985. Isolation of fungi associated with blossom malformation of mangoes. SAMGA Research report 5:10-14.
- Díaz, B. V. y Romero C. S. 1980. Etiologia de la deformación o escoba de bruja del mango en el estado de Morelos. Agrociencia 39: 35-40.
- Doreste, S.E. 1984. Información sobre el eriófido del mango, *Eriophyes mangiferae* (Sayed) en Venezuela. Revista Facultad Agronomía (Maracay) 13(1-4) 91-100.
- Freeman, S., Maimon M. y Pinkas Y. 1999. Use of GUS transformants of *Fusarium* subglutinans for determining etiology of mango malformation disease. Phytopthology 89:456-461.
- Freeman, S., Maimon M. y Pinkas Y. 2000. Etiology of mango malformation disease using GUS transformants of *Fusarium subglutinans*. Acta Horticulturae 509: 731-758.

- Freeman, S., Klein-Gueta D., Korolev N. y Sztejnberg, A. 2004. Epidemiology and survival of *Fusarium mangiferae*, the causal agent of mango malformation disease. Acta Horticulturae 645: 487-492.
- Gamliel, A. E., Sztejnberg A., Maymon M., Belausou E., Palevsky E., y Freeman S. 2007. Interaction of the mango but mite (*Aceria mangiferae*) with *Fusarium mangiferae*, causal agent of mango malformation disease. In the 28th congress of the Israel . Phytopathological Society. pp 198.
- Hassan, A.S. 1944. Notes on *Eriophyes mangiferae* S.N. (Acarina) Bulletin de la Société Fouad 1er d'Entomologie 28: 179-180
- Ibrahim, I.M. y Foad M.K. 1981 Histological studies on mango malformation. Egyptian Journal of Horticulture 8:33-43.
- Jeppson, R.L., Keifer H. y Baker E W. 1975. Mites Injurious to Economic Plants.

  University of California Press. 614p.
- Kumar, J. y Beniwal S.P.S. 1987. Vegetative and floral malformation, two symptoms of the same disease on mango. FAO Plant Protection Bulletin 35: 21-23.
- Kumar, J. y Beniwal S. P.S. 1992. Mango Malformation p. 357-393. En: Plant Diseases of International Importance. V3. J. Kumar, H.S. Chawbe, V. S. Singh y A.N. Mukhopadhay. (eds.). Prentica Hall. Englewood Cilifts, N J.
- Kumar, J., Singh U.S. y Beniwal, S.P.S. 1993. Mango malformation: one hundred year of research. Annual Review of Phytopathology 31: 217-232.
- Leslie, J. F. y Summerell B.A. 2006. The Fusarium. Laboratory Manual. First edition. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 388 p.
- Malo, S.E. y Mc Millan Jr. R.T. 1972. A disease of *Mangifera indica* L. in Florida similar to mango malformation. Florida Agricultural Experiment Station Journal Series 4718: 264–268.
- Marasas, W.F.O., Ploetz R.C., Wingfield M.J., Wingfield B.D. y Steenkamp T. 2006.

  Mango malformation disease and the associated *Fusarium* species.

  Phytopathology 96 (6): 667-672.
- Morales, E.M.L. y Rodríguez E.H. 1961. Breves anotaciones sobre una nueva plaga en los árboles de mango. Fitófilo (México) 14(30): 7-11.

- Morales-Rondón, V. y Rodríguez-González M. 2006. Hongos endofitos en plantaciones de mango "Haden" de la planicie de Maracaibo, Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía del Zulia. (LUZ). 23: 273-283.
- Narasimhan, M.J. 1954. Malformation of panicles in mango incited by a species of *Eriophyes*. Current Science 23:297-298.
- Nariani, T.K. y Seth M.L. 1962. Role of eriophyid mites in causing malformation disease in mango. Indian Phytopathology 15: 231-233.
- Nelson, P.E., Toussoun T.A. y Marasas W. F. O. 1983. Fusarium species: an illustrated manual for identification. Pennsilvania State University Press. University Park. 193 p.
- Nirvan, R.S. 1953. Bunchy top of young mango seedlings. Science and Culture 18 (7): 335-336.
- Noriega-Cantù, D.H., Téliz-Ortiz D., Mora-Aguilera G., Rodríguez A. J., Zavaleta-Mejia E., Otero-Colina G. y Campbell C.L. 1999. Epidemiology of mango malformation in Guerrero, México, with traditional and integrate management. Plant Disease 83: 223-228.
- Noriega-Cantú, D.H., Téliz-Ortiz D., Mora-Aguilera A., Mora A.G. 2005. Enfermedades del mango. pp 91–113. En: H. F. Zavala., C.D.H. Noriega., A.G Mora., P.G. Ballesteros, P.L.A. Rodríguez., G.L.S. Covarrubias., L.L. Flores. (eds.). El mango, su cultivo, fitosanidad y comercialización 189 p.
- Noriega-Cantú, D.H. 1996. "Escoba de bruja" del mango: etiología, histopatología y manejo integrado. Tesis de doctorado en ciencias en la especialidad de Fitopatología, Colegio de Postgraduados 72p.
- Nuckles, E.M. y Kuc J. 1988. Use of a hemacytometer. En: de Baudoin, A.B.A.M. Laboratory exercises in plant pathology: an instructional kit American Phytopathological Society. St. Paul Minnesota 3-1p.

- Otero-Colina, G., Noriega-Cantú D.H., Sánchez-Martínez R., Acosta-Rodríguez Ma. C., Santillán-Galicia Ma. T. y Miranda-Zalasar F. 2005. Descripción morfológica de la escoba de bruja en brotes vegetativos y florales. pp 105–114. En: H. F. Zavala., C.D.H. Noriega., A.G Mora., P.G. Ballesteros, P.L.A. Rodríguez., G.L.S. Covarrubias., L.L. Flores. (eds.). El mango, su cultivo, fitosanidad y comercialización 189 p.
- Otero-Colina, G., Acosta-Rodríguez Ma. C. y Santillán-Galicia Ma. T. 2007. Malformations induced by *Aceria mangiferae* (Trombidiformes: Eriophyidae) and *Fusarium subglutinans* (Fungi: Deuteromycetes) to *in vitro* mango seedlings. pp. 83-86. En: Acarology XI: Proceedings of the International Congress. Morales-Malacara J.B., Behan-Pelletier V., Ueckermann E., Pérez T.M., Estrada E., Gispert, C. y Badii M. (eds.). Instituto de Biología, UNAM; Facultad de Ciencias, UNAM; Sociedad Latinoamericana de Acarologia. México.
- Phillips, I.D.J. 1975. Apical dominance. Annual Review of Plant Physiology 26:341-367.
- Ploetz, R. C. 1994. Distribution and Prevalence of *Fusarium subglutinans* in mango trees affected by malformation. Canadian Journal of Botany 72 (1): 7-9.
- Ploetz, R.C. y Gregory N. F. 1993. Mango Malformation in Florida: distribution of *Fusarium subglutinans* in affected trees, and relationships among strains within and among different orchards. Acta Horticulturae 341: 388-394.
- Puttarudriah, M. y Channa Basavanna G.P. 1961. Mango bunchy-top and the eriophid mite. Current Science 30: 114-115.
- Razdan, M.K. 2003. Introduction to plant tissue culture. Second edition. Science Publishers, Inc. Enfield, New Hampshire. U.S.A. 375p.
- Schlösser, E. 1971. Mango malformation: symptoms, occurrence and varietals susceptibility. FAO Plant Protection Bulletin 19(1):12-14.
- Steenkamp, E., Britz H., Coutinho T., Wingfield M. J., Marasas W. F.O. y Wingfield B.D. 2000. Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation. Molecular Plant Pathology 1(3):187-193.
- Steiner, A. A. 1968. Soil less culture. Proceedings of the 6<sup>th</sup> Coloquium of the International Potash Institute. Florence Italy Published by International Potash Institute Verne Switzerland: 324-341 p.

- Summanwar, A.S., Raychaudhuri S. P. y Phatak S. C. 1966. Association of the fungus Fusarium moniliforme Sheld with the malformation in mango (Mangifera indica L.) Indian Phytopathol 19: 227-228.
- Tripathi, R. D. 1954. Bunchy top and malformation disease mango. Indian Journal of Horticulture 11:122-124.
- Varma, A., Raychaudhuri S.P., Lele V. C. y Ram A. 1972. Towards the understanding of the problem of mango malformation. Acta Horticulturae 24: 237-237.
- Westphal, E. y Manson D. C. M. 1996. Feeding effects on host plants gall formation and other distortions pp 231-242. En: E. E. Lindquist., M. W. Sabelis y J. Bruin (eds.). Eriophyoid mites. Their biology, natural enemies and control. World Crop Pests. 790 p.

## CAPÍTULO III

# EL PAPEL DEL ÁCARO *Aceria mangiferae* (Sayed) EN LA DEFORMACIÓN DE INFLORESCENCIAS O "ESCOBA DE BRUJA" EN MANGO

#### 3.1 RESUMEN

En la mayoría de las zonas productoras de mango en México y otros países se presenta un problema fitosanitario denominado deformación o malformación floral, proliferación vegetativa o "escoba de bruja". Entre las causas de esta enfermedad se señala a hongos del género Fusarium y al ácaro Aceria mangiferae, aunque existe más evidencia de que el ácaro es únicamente portador de las esporas del hongo. Los síntomas de deformación de las inflorescencias tienen importantes variaciones, la etiología de la deformación floral no está tan claramente definida como la deformación vegetativa y de igual forma no está claramente definido el papel del ácaro A. mangiferae en la etiología de ambas deformaciones, por lo que el presente trabajo se desarrolló para determinar qué tipo de relación existe entre el ácaro A. mangiferae y el hongo F. subglutinans en la aparición de los diferentes síntomas que caracterizan a la deformación de inflorescencias del mango. Para ello se seleccionaron plantas sanas de mango cv. Haden de un vivero ubicado en zona libre de la enfermedad y además se trataron con fungicida y acaricida previo al establecimiento del experimento. Dichas plantas fueron infestadas de las siguientes formas: (1) con ácaros procedentes de yemas deformes; (2) con ácaros procedentes de yemas asintomáticas; (3) con ácaros sometidos a un proceso de desinfección; (4) con ácaros desinfectados bañados en una suspensión de F. subglutinans de 2 X 10<sup>6</sup> conidios/mL; (5) con F. subglutinans a la misma concentración que en (4), el inóculo se depositó hiriendo previamente la yema apical; (6) mismo hongo y concentración de conidios, aplicado en plantas sin causarles heridas; y por último, (7) plantas testigo inoculadas con agua destilada estéril. Las plantas se mantuvieron en un invernadero a temperaturas no menores de 15°C y con un periodo de agobio hídrico, condiciones que indujeron floración. Los resultados muestran que el ácaro no sólo porta al hongo sino que lo introduce y además se asocia con reducción en la proporción de flores hermafroditas. El hongo se asocia con reducción en la longitud de los ejes, diámetro de ejes, reducción en la proporción de

flores hermafroditas, aumento en número de estaminodios, segmentos del nectario y diámetro de las flores. La asociación ácaro-hongo intensifica los síntomas, por lo que se considera parte integral del fenómeno "escoba de bruja". Aunque se desarrollaron síntomas de deformación floral, fueron de bajo nivel y no aparecieron deformaciones típicas.

**Palabras claves.** Deformación del mango, *Mangifera indica*, Eriophyidae, *Fusarium subglutinans* 

### 3.2 ABSTRACT

In most mango growing areas in Mexico and other countries a phytosanitary problem is present; it is named mango malformation, bunchy top or witch's broom. Among the causes of this disease fungi belonging to the genus *Fusarium* and the mite Aceria mangiferae are proposed, although the evidence postulates that the mite is only a carrier of fungal conidia. The symptoms of mango (floral) malformation have important variations, the etiology of floral malformation is not as well defined as that of bunchy top, and also the role played by the mite A. mangiferae in both malformations is not well known, so present work was developed to determine what kind of relation exists among the mite A. mangiferae, the fungus F. subglutinans and the appearance of different symptoms characterizing floral malformations. Mango trees cv. Haden were selected in a nursery placed in a disease-free area, they were treated with a fungicide and an acaricide before the experiment. These trees were infested the following ways: (1) with mites proceeding from malformed buds; (2) with mites proceeding from asymptomatic buds; (3) with mites submitted to a disinfection process; (4) with mites disinfected and then immersed in a suspension of F. subglutinans 2 X 10<sup>6</sup> conidia/mL; (5) with F. subglutinans at the same concentration than (4), the inoculum was deposited on the previously injured apical buds; (6) the same fungus and concentration of conidia, applied on uninjured apical buds; (7) control plants treated with distilled water. The trees were kept in a glasshouse at temperatures 15°C and higher ad with a period of water shortness to induce blooming. Results show that the mite not only carries the fungus but that introduces it; by itself it is associated to a reduction in the ratio of hermaphrodite

flowers. The fungus is associated with a reduction in length of axes, reduction in the ratio of hermaphrodite flowers, increase in the number of staminodes, segments of nectaria and diameter of flowers. The association mite-fungus intensifies the symptoms and then it is considered a component of the malformation phenomenon. Although symptoms of floral malformation developed, they were moderate and typical malformed inflorescences did not appear

**Key words.** Inflorescence malformation, *Mangifera indica*, Eriophyidae, *Fusarium subglutinans* 

#### 3.3 ANTECEDENTES

# 3.3.1 La escoba de bruja

En la mayoría de las zonas productoras de mango en México y el mundo se presenta un problema fitosanitario denominado deformación o malformación floral (inflorescence malformation), proliferación vegetativa o "escoba de bruja". El término "malformation" se ha referido para describir los síntomas en floración, mientras que proliferación vegetativa (bunchy top) se usa para síntomas en brotes vegetativos (Kumar *et al.*, 1993) y en México ambas manifestaciones se conocen como escoba de bruja (Díaz y Romero, 1980). Por la gravedad de los daños que la escoba de bruja suele causar se han realizado numerosos trabajos sobre este problema, los cuales han aportado información para entenderlo, pero persisten todavía muchos aspectos que tratar sobre este síndrome.

La deformación floral fue registrada por primera vez en la India por Watt en 1891 (citado por Kumar y Beniwal, 1992), mientras que la deformación vegetativa fue citada por vez primera más de 60 años después (Nirvan, 1953). Tripathi (1954) observó que existía una correlación entre la severidad de las deformaciones vegetativa y floral en árboles de mango de diferentes cultivares, por lo que postuló que la deformación vegetativa y la floral son dos expresiones de la misma enfermedad. A partir de ese momento se tomó prácticamente como un consenso la propuesta de Tripathi, aunque tuvieron que pasar más de 30 años para que hubiera una evidencia experimental de que efectivamente los síntomas vegetativos y florales tienen el mismo origen, cuando

Kumar y Beniwal (1987), en pruebas mediante injertos, determinaron que las ramas que habían dado lugar a inflorescencias deformes en el año "on", originaron brotes vegetativos deformes en el año "off".

La evidencia experimental presentada por Kumar y Beniwal fue un importante soporte a la hipótesis de que los síntomas vegetativos y florales tienen el mismo origen, pero en realidad pasó casi desapercibida porque la hipótesis mencionada ya era ampliamente aceptada entre especialistas. Sin embargo, queda sin explicación el hecho de que la deformación vegetativa empezó a llamar la atención y fue citada más de 60 años después que la deformación floral; que en varias partes del mundo, incluyendo a México, la aparición de la deformación vegetativa tiene un rezago de varios años con respecto a la deformación floral, y que en varias partes de México únicamente se conoce la deformación floral (Otero-Colina)<sup>1</sup>

Entre las causas de la enfermedad "escoba de bruja" se han considerado virus, ácaros, desbalances fisiológicos y hongos (Srivastava y Butani, 1973; Kumar *et al.*, 1993). Sin embargo, las investigaciones señalan consistentemente a hongos del género *Fusarium* como agentes etiológicos de la enfermedad, particularmente en su manifestación vegetativa, pues numerosos autores indujeron deformaciones vegetativas mediante la inoculación de *Fusarium* spp., cumpliendo los postulados de Koch (Summanwar *et al.*, 1966; Bhatnagar y Beniwal, 1977; Díaz y Romero, 1980; Manicom, 1989; Noriega, 1996; Freeman *et al.*, 1999). Sin embargo, debe llamar la atención que, a pesar de la evidencia obtenida en estudios tempranos, y que los postulados de Koch se han repetido en numerosos países; todavía se discute si hongos del género *Fusarium* son los causantes de la enfermedad, y Kumar *et al.* (1993), entre otros, todavía consideran que ésta tiene un agente etiológico desconocido.

Partiendo del supuesto de que, como se ha dicho, la deformación vegetativa y la deformación floral son dos manifestaciones de la misma enfermedad, los datos obtenidos por el cumplimiento de los postulados de Koch en brotes vegetativos han sido extrapolados a brotes florales (Díaz y Romero, 1980; Noriega, 1996; Kumar *et al.*, 1993), lo cual no necesariamente es una extrapolación válida. En contraste, Varma *et al.* (1974) y Freeman *et al.* (1999) indujeron deformaciones florales mediante la

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Comunicación personal Gabriel Otero-Colina Profr investigador, del Colegio de Postgraduados Montecillo, México

inoculación de *F. subglutinans*. El primero de esos estudios tiene importantes deficiencias, como es el hecho de que no incluye un testigo, por lo que sólo queda la evidencia de Freeman *et al.* sobre la asociación entre *Fusarium* spp. y la deformación floral. En esto se contrasta con la abundante evidencia experimental de la asociación entre dicho hongo y la deformación vegetativa.

La correcta identificación de especies de *Fusarium* asociadas con la escoba de bruja ha representado importantes problemas. Aunque inicialmente *F. subglutinans* (citado como *F. moniliforme* por Summanwar *et al.*, 1966) fue considerado el agente etiológico de la escoba de bruja, *Fusarium oxysporum* fue citado un agente etiológico adicional de ella (Varma *et al.*, 1974; Díaz y Romero, 1980; Noriega, 1996). Sorprendentemente, las especies *F. mangiferae*, *F. sterilihyphosum*, *F. proliferatum*, más otras posiblemente, también se asocian con la enfermedad y han sido postuladas como posibles agentes etiológicos (Steenkamp *et al.*, 2000; Britz *et al.*, 2002; Marasas *et al.*, 2006), lo cual introduce el hecho intrigante de que varias especies de hongos causan la misma enfermedad.

Como posible fuente de error en los estudios para determinar la etiología de la escoba de bruja está el hecho de que en muchos estudios no se ha excluido la presencia de contaminantes en las plantas experimentales inoculadas con especies de *Fusarium*. Entre estos contaminantes destaca el ácaro *Aceria mangiferae* (familia Eriophyidae), el cual también de manera consistente está asociado con yemas de mango afectadas por la enfermedad. Ya que los ácaros de la familia Eriophyidae son parásitos obligados de plantas y numerosas especies de esa familia han sido citados como causantes de alteraciones en el crecimiento de las plantas (Westphal y Manson, 1996), el ácaro *A. mangiferae* ha sido también postulado como agente etiológico de la escoba de bruja (Narasimhan, 1954; Srivastava y Butani, 1973). Hace mas de 54 años, esta era la creencia, incluso Nariani y Seth (1962) afirmaron haber inducido deformaciones típicas de escoba de bruja en plantas de mango luego de haberlas inoculado con ejemplares de *A. mangiferae*, pero este trabajo ha sido ignorado por los investigadores en la materia, probablemente porque ambos autores no determinaron si el ácaro estaba o no contaminado con *Fusarium* u otro tipo de contaminantes.

Al parecer el ácaro *A. mangiferae* tiene distribución mundial en mango y siempre está presente en áreas donde existe escoba de bruja. Sin embargo, existe también en partes del mundo no afectadas por escoba de bruja, por ejemplo Australia, país libre de la malformación (Ridgeway, 1989, citado por Ploetz y Prakash, 1997) y Florida donde no se ha visto la enfermedad en mas de 20 años (Peña *et al.*, 2005), lo que va en contra de postularlo como agente etiológico de la enfermedad. Se ha sugerido que *A. mangiferae* más bien es portador de esporas de *Fusarium* spp. o facilita la entrada de esporas de dichos hongos a los tejidos del mango, sea introduciéndolas en las yemas o causando lesiones que faciliten la infección. Debe remarcarse que en la mayoría de los estudios sobre la asociación de *Fusarium* spp. con la escoba de bruja del mango, sólo se han reproducido los síntomas cuando la inoculación de dicho hongo se ha hecho de forma sistémica inyectando suspensiones de esporas o causando heridas en las plantas al momento de aplicar las esporas (Summanwar *et al.*, 1966; Varma *et al.*, 1973; Díaz y Romero, 1980; Noriega, 1996; Freeman *et al.*, 1999), lo que sugiere que el hongo requiere de un portador o facilitador de la infección.

Otero-Colina *et al.* (2007) y los resultados obtenidos en el Capítulo II describen un método para producir plantas de mango libres de patógenos; en ellas inocularon esporas de *F. subglutinans*, ejemplares de *A. mangiferae* y combinaciones de ambos. En ambos estudios se corroboró que el hongo citado causa deformaciones vegetativas en mango y que el ácaro puede causar alteraciones en el crecimiento de plántulas de mango, pero no deformaciones del tipo característico conocido como escoba de bruja, y confirmaron también que el mismo ácaro es portador de esporas de *F. subglutinans*, las cuales causaron deformaciones vegetativas cuando fueron introducidas por el ácaro en yemas de mango.

## 3.3.2. Diferentes manifestaciones de la escoba de bruja

La deformación vegetativa, de manera general, se caracteriza porque las yemas axilares ramas y ápices de plantas de mango, que normalmente deberían permanecer latentes por el fenómeno de la dominancia apical (Phillips, 1975), entran en actividad y desarrollan multitud de brotes.

Cuadro 3.1. Síntomas en inflorescencias con escoba de bruja

Cuadro 3.1. Sínto	Campbell	Schlosse	Srivastav	Shawky	Dorest	Burha	Kumar y	Kumar	Otero-
	y Marlatt (1982)	r (1971)	a y Butani	et al. (1980)	e (1984)	n (1990)	Beniwal (1992)	et al. (1993)	Colina et al. (2005)
Síntomas	(1902)		(1973)	(1900)	(1304)	(1990)	(1992)	(1993)	ai. (2003)
Producción de			(1010)		1				
inflorescencias muy									
limitada									
Inflorescencias hipertróficas						V	1	V	
Eje principal grueso	V			V		V			V
Reducción en la longitud	V	V		V		V	V		V
de eje primario		<b>Y</b>		•		<b>'</b>	•		
Engrosamiento de los									V
ejes secundarios									,
Reducción en la longitud		V					V		
de eje secundario							,		
Entrenudos cortos	V								
Más ramas por panícula	V			V			V	<b>√</b>	
con aspecto aglomerado									
Mayor número de ejes				V					
laterales sobre todo en la									
segunda ramificación	<u> </u>								
Agrandamiento de			V						
panículas									
Agrandamiento de			<b>V</b>						
pedúnculos florales									
Flores aglomeradas	<b>√</b>					<b>√</b>			
Las flores permanecen							$\checkmark$	√	
más tiempo sin abrir						,		,	
Mayor numero de flores	V					V	V	V	
Flores individuales más						V	<b>√</b>	<b>√</b>	V
grandes									
Flores con grandes						V			
discos									,
Aumento en el número									<b>√</b>
de estambres		1							
Cambio en la proporción		<b>√</b>							
de sexos Flores con ovario no					-		<b>√</b>		
funcional							V		
Cambio de flores		V							
hermafroditas a		<b>Y</b>							
estaminíferas									
Pocas flores			V			V		√	
hermafroditas						,		,	
Mayor numero de flores				<b>V</b>	1			√	
masculinas									
Periodo de floración más		<b>√</b>				V			V
extenso	<u> </u>								
Panículas más verdes y							$\sqrt{}$	<b>√</b>	
pesadas	<u> </u>								
Masa compacta de flores				V					
estériles.									<u> </u>
Panículas deformes no	<b>√</b>	<b>√</b>	1					√	<b>√</b>
presentan frutos	L ,								
Frutos en panículas	$\checkmark$	$\checkmark$					$\checkmark$	√	$\checkmark$
enfermas caen en un									
estado temprano de									
desarrollo	1	1	1				1		1
Permanecen como	V	V							<b>√</b>
masas obscuras en los									
árboles	<del>                                     </del>	1	1						
El árbol muere en un					V				
período de dos a tres									
años	<del>                                     </del>	<del>                                     </del>	<del>                                     </del>		+			V	
El polen muestra una								V	
pobre viabilidad					1			1	

Las yemas axilares de éstos, a su vez, entran también en actividad y dan lugar a brotes adicionales, y así sucesivamente proliferan hasta formar una masa compacta de brotes que se aparta considerablemente de la arquitectura normal de la planta. Los brotes formados son bastante más gruesos que aquéllos de los que nacen y las hojas son pequeñas, en forma de escamas (Kumar *et al.*, 1992; Otero-Colina *et al.*, 2005, entre otros).

Las descripciones de la deformación floral muestran más variaciones; comúnmente se dice que el eje primario y los ejes secundarios se engruesan, las flores son más grandes y los entrenudos son más cortos, todo lo cual resulta en inflorescencias compactas. El desarrollo es más lento, no se producen frutos y las inflorescencias permanecen como masas negras hasta el siguiente año (Schlosser, 1971; Srivastava y Butani., 1973; Kumar y Beniwal, 1992; Kumar *et al.*, 1993).

Debe recalcarse que, en las inflorescencias, el desarrollo de ejes laterales a partir de las yemas axilares del eje primario es un fenómeno normal (Singh, 1960; Litz, 1997), por lo que la deformación floral no es una proliferación.

Sin embargo, llama la atención que hay importantes variaciones en la descripción de la deformación floral, de uno a otro estudio. El Cuadro 3.1 muestra las principales características de la deformación floral, donde se anotan las fuentes que citan cada característica. Algunas diferencias pueden ser simples omisiones o diferentes formas de expresión, pero otras son francamente antagónicas. Por ejemplo, en observaciones llevadas a cabo en mango en el estado de Guerrero, México, Otero-Colina *et al.* (2005) no encontraron diferencia significativa en la longitud del eje primario y los secundarios, en el número de ejes secundarios ni en la proporción de flores femeninas y hermafroditas entre inflorescencias deformes y asintomáticas, hechos que contrastan con la mayor parte de las descripciones. En el mismo artículo se observó que las flores tienen un aumento significativo en el número de estaminodios, característica que no había sido citada antes.

De las diferencias citadas se puede sugerir que la escoba de bruja, al menos en su manifestación floral, podría haber sido descrita por diferentes parámetros y sin un método uniforme, no ser la misma de una parte a otra del mundo, o tratarse de un conjunto de enfermedades que al presentarse juntas se confunden en un solo síndrome. Esta suposición es congruente con el hecho, citado antes, de que varias especies de hongos y una especie de ácaro (y posiblemente otros organismos no determinados) están asociados con la escoba de bruja. Resulta difícil postular que varias especies de patógenos causen la misma enfermedad.

Partiendo de lo antes expuesto se postula que la etiología de la escoba de bruja en su manifestación floral, así como el papel que el ácaro *A. mangiferae* desempeña en la inducción de esta enfermedad, no están adecuadamente esclarecidos, por lo que el presente trabajo se desarrolló con los objetivos de determinar qué tipo de relación existe entre el ácaro *A. mangiferae* y la aparición de los diferentes síntomas que caracterizan a la deformación de inflorescencias del mango, por él mismo y en su asociación con el hongo *F. subglutinans*, en condiciones de invernadero.

#### 3.4 MATERIALES Y METODOS

#### 3.4.1 Obtención y manejo de plantas de mango

En un vivero comercial ubicado en la ciudad de Atoyac, en la región conocida como la Costa Grande de Guerrero, se adquirieron 150 plantas de mango Haden, injertadas sobre un patrón de mango criollo. El sitio anotado fue seleccionado porque presenta un porcentaje mínimo de la enfermedad "escoba de bruja" (EB)². Un requisito indispensable en la selección de las plantas fue que no presentaran deformación o escoba de buja, daños a simple vista por plagas o enfermedades, ni daños físicos; es decir, visualmente sanas. Las plantas tenían un tamaño aproximado de 1 a 1.5 m de alto y mismo desarrollo fisiológico.

Antes de establecer el experimento, las plantas de mango se mantuvieron 12 meses en un vivero de Coyuca de Benítez, Guerrero, fuera del área con incidencia de EB. Se trasplantaron a bolsas de polietileno negro de 12 kg de capacidad con suelo orgánico previamente tratado con Counter 15G® (terbufos 5%) 2g/L y Benlate 50 WP® (benomilo 50%) 1.5 g/L. En el transcurso de los 12 meses se fumigaron con el insecticida Malathion 1000® (malatión) 1.5 cc/L de agua, el fungicida Manzate® (mancozeb) 1.5 g/L, a fin de controlar plagas y patógenos, y se fertilizaron con 17-17-17 de NPK, con lo que se mantuvieron sanas para establecer en ellas los tratamientos.

\_

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Comunicación personal MC Rubén Cruzaley Sarabia, Investigador en el área de frutales del INIFAP-Guerrero

En agosto de 2005, las plantas de mango fueron trasladadas a un invernadero en Tequexquinahuac, Estado de México, área no productora de mango situada a una altitud de 2250 msnm. El invernadero fue acondicionado con malla antiáfidos, doble cortina de plástico, arena de escoria basáltica (tezontle) en el piso y se le instaló un calefactor de gas con el propósito de que las plantas se mantuvieran en un período de bajas temperaturas (15 ± 2 °C); es decir, condiciones de un invierno benigno que hiciera detener sensiblemente el crecimiento vegetativo, se acumularan almidones en los brotes y se propiciara la diferenciación a yemas de floración (Núñez-Elisea y Davenport, 1994). Además de las bajas temperaturas, se sometieron a un periodo de sequía con el mismo propósito (Lu y Chacko, 2000).

Antes de establecer los tratamientos las plantas de mango se fumigaron con Fumino 56® (i.a fosfuro de aluminio 56% de peso) a una dosis de 1.8 mg / L para eliminar al 100% los eriófidos que pudieran estar presentes, siguiendo el procedimiento desarrollado por Bharadwaj y Banerjee (1973) con ligeras modificaciones. Para ello, cada planta se colocó en un recipiente cerrado de plástico de 80 L de capacidad, se aplicó la dosis en la base de la maceta y se selló el recipiente por 72 horas. Pasado el tiempo de fumigación, las plantas se extrajeron del recipiente y se colocaron en el invernadero. Para verificar la efectividad de la fumigación, 48 horas después de aplicado el tratamiento se seleccionaron 10 plantas al azar, a cada una se le cortó la yema apical y ésta se revisó al microscopio estereoscópico para confirmar que no hubiera ácaros vivos presentes.

# 3.4.2 Preparación de ejemplares del ácaro *A. mangiferae* e identificación de microorganismos asociados con ellos

Se colectaron yemas vegetativas enfermas y asintomáticas en huertas de mango Haden de Tuxpan, Guerrero; éstas se colocaron en una hielera y se trasladaron al laboratorio. Las yemas colectadas se dividieron en tres lotes aproximadamente iguales de yemas enfermas o asintomáticas (tercios), los cuales se procesaron de la siguiente forma:

Un tercio de las yemas asintomáticas y otro de enfermas se conservó en refrigeración para recolectar ácaros (*A. mangiferae*) presentes en ellas, los cuales estaban destinados a ser inoculados en las plantas de mango sin ningún tratamiento posterior.

Otro tercio de las muestras obtenidas (enfermas y asintomáticas) en campo se utilizó para recolectar ácaros con ayuda del microscopio estereoscópico y con una pestaña esterilizada con alcohol a 96% se sembraron en PDA (papa-dextrosa-agar) con la finalidad de identificar los hongos y bacterias que se presentaron asociados al ácaro. Luego de 48 y 72 horas de incubación, se tomaron muestras de los organismos que visualmente aparecían distintos en el medio de cultivo y éstos se tiñeron con lactofenol entre porta y cubreobjetos para su observación bajo el microscopio de campo claro e identificación con las claves de Barnet y Hunter (1998).

El último tercio de las yemas vegetativas se utilizó para colectar ácaros y someterlos al siguiente tratamiento de desinfección. En la campana de flujo laminar y con ayuda del microscopio estereoscópico y una pestaña esterilizada con alcohol se colectaron los ácaros y se colocaron en una canastilla construida con tubos Eppendorf y malla de nylon para serigrafía (300 mallas por pulgada cuadrada) previamente esterilizada por sumersión en hipoclorito de sodio (Cloralex ®) al 5% por 15 minutos; la canastilla se puso en una caja Petri con solución de Tween 80 al 0.01%; al término de la recolección de los ácaros, la canastilla se cubrió con un pedazo de malla también esterilizada y éste se sujetó con un anillo de popote plástico; posteriormente la canastilla, ya con los ácaros, se sumergió en una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex ®) al 5% por 15 minutos. Transcurridos los 15 minutos, se sacó la canastilla y se sumergió tres veces en agua destilada estéril, después se escurrió sobre un papel filtro esterilizado, se quitó la cubierta de malla, se dejaron secar los ácaros y entonces se les colectó nuevamente con una pestaña estéril bajo el microscopio estereoscópico para transferirlos a las yemas apicales de las plantas de mango. De los ácaros que pasaron el proceso de desinfección, se tomó una muestra al azar de cinco por cada planta inoculada y se sembraron en medio PDA para verificar la asepsia de los mismos.

## 3.4.3 Preparación del hongo Fusarium subglutinans

Para las inoculaciones del hongo en plantas de mango, se contó con la cepa monospórica de *F. subglutinans* GUE INI 95, donada por el Dr. Antonio Mora Aguilera e identificada por Jean Juba, del Fusarium Research Center (Noriega *et al.,* 1999). Esta cepa se reactivó en medio PDA; luego de ocho días de crecimiento en ese medio se colectaron conidios con un asa bacteriológica y con ellos se preparó una suspensión en 50 mL de agua estéril a una concentración de 2 x 10<sup>6</sup> conidios/mL; la concentración de conidios se estimó con ayuda de la cámara de Neubauer (Nucles y Kuc, 1988). Además se montaron porciones de micelio y conidios para corroborar su identificación bajo el microscopio estereoscópico con el objetivo 40X.

# 3.4.4 Inoculación de A. mangiferae y F. subglutinans en plantas de mango

Se inocularon ácaros procedentes de yemas enfermas y asintomáticas, ácaros desinfectados, el hongo *F. subglutinans* y la combinación de ambos para determinar la respuesta de plantas de mango instaladas en invernadero en las condiciones previamente descritas.

Se utilizó un diseño completamente al azar con siete tratamientos y quince repeticiones, bajo las siguientes características.

Tratamiento 1. Consistió en la inoculación de plantas de mango cada una con 20 ejemplares de *A. mangiferae* procedentes de yemas deformes y sin tratamiento de desinfección. Éstos se transfirieron a las inmediaciones de la yema apical sin causar heridas a las plantas.

Tratamiento 2. Consistió en la inoculación de plantas de mango cada una con 20 ejemplares de *A. mangiferae* procedentes de yemas asintomáticas y sin tratamiento de desinfección. La transferencia de ácaros fue como en el tratamiento 1.

Tratamiento 3. Veinte ejemplares de *A. mangiferae* previamente desinfectados con hipoclorito de sodio, usando el método descrito arriba, fueron transferidos a las inmediaciones de la yema apical de plantas de mango.

Tratamiento 4. Consistió en la inoculación de cada planta de mango con 20 ejemplares de *A. mangiferae*, previamente desinfectados con hipoclorito de sodio y enseguida

bañados en 1 mL de suspensión de *F. subglutinans* a una concentración de 2 x 10<sup>6</sup> conidios / mL.

Tratamiento 5. Inoculación de las plantas de mango con *F. subglutinans*. Se fijó un pedazo de algodón estéril en la base de la yema apical y se depositó con una pipeta de vidrio estéril 1 mL de suspensión de conidios a una concentración de 2 x 10<sup>6</sup> conidios / mL, sin causar heridas. Inmediatamente después se cubrió la rama con una bolsa de plástico transparente durante 48 h para mantener una alta humedad en los puntos de inoculación.

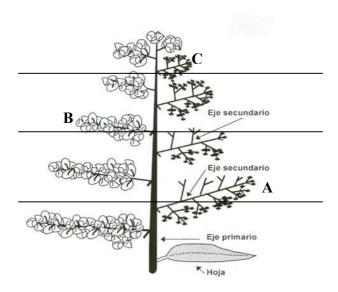
Tratamiento 6. Inoculación de las plantas de mango con el hongo *F. subglutinans,* siguiendo el mismo procedimiento que el tratamiento 5, con la única diferencia de que la yema apical fue herida con jeringa hipodérmica antes de depositar la suspensión de esporas.

Tratamiento 7. Testigo. Las plantas fueron inoculadas con agua destilada estéril en la yema apical. Al igual que los dos últimos tratamientos, se fijó un algodón estéril en la base de la yema apical, sobre él se depositó 1 mL de agua destilada estéril y el extremo de la rama se cubrió con una bolsa de plástico durante 48 horas.

Los tratamientos 3 y 4 se realizaron en el laboratorio de Acarología del Colegio de Postgraduados debido al proceso de desinfección que tuvieron los ácaros. El resto de los tratamientos se establecieron en el invernadero. Todas las plantas se mantuvieron a una temperatura no menor a15° C y con riegos semanales.

Las variables se tomaron desde las yemas de floración hinchada hasta la antesis al 100%. Como referencia para comparación de valores se dividió longitudinalmente al eje primario en cuatro partes iguales, de la base al ápice; se seleccionó el eje secundario más cercano al primer cuarto y se le designó como eje secundario basal; el eje más cercano al segundo cuarto se designó como eje secundario medio; el eje más cercano al tercer cuarto se designó como eje secundario distal como se muestra en la Figura 9 y de acuerdo con Otero-Colina et al. (2005). Con esa base las variables a medir fueron: longitud en centímetros del eje primario y de ejes secundario basal, medio y apical; número de ejes secundarios del eje principal y número de ejes terciarios de un eje secundario basal, medio y apical; diámetro del eje primario en etapa de antesis (100%); diámetro en centímetros de las flores abiertas ubicadas en la base y parte distal del eje

secundario basal medio y apical; proporción de sexos; número de segmentos del nectario y número de estambres, incluyendo estaminodios; y número de días que transcurrieron desde la activación de las yemas apicales hasta 50% y 100 % de antesis.



**Figura 9**. Arquitectura de una inflorescencia sana de mango. **A** eje secundario basal, **B** secundario medio y **C** apical.

Para estimar el diámetro de las flores se midieron cuatro flores de la base y cuatro flores de la parte apical en un eje secundario medio, en un basal y en un apical. Para la estimación de la proporción de sexos se tomaron 50 flores de cada inflorescencia y se observaron al microscopio estereoscópico para definir el sexo. Para número de segmentos del nectario y estambres se tomaron cinco flores por inflorescencia e igualmente se observaron bajo el microscopio.

## 3.4.5 Detección de los organismos inoculados

La presencia de *A. mangiferae* y de *F. subglutinans* se verificó al término del experimento, tanto en plantas que habían sido inoculadas con ellos como las que no habían recibido a dichos organismos. Para ello se tomaron muestras de inflorescencias y se procesaron por medio de la técnica de lavado y tamizado usando tamices de 325, 400 y 500 mallas (Southwood, 1978). Posteriormente, los sedimentos se observaron con el microscopio estereoscópico. Los ácaros colectados se colocaron en ácido

láctico para aclararlos, posteriormente fijarlos en líquido de Hoyer y se corroboró su identificación con las claves de Jeppson *et al.* (1975) y la descripción dada por Hassan (1944) para *A. mangiferae*.

Para el hongo *F. subglutinans* se hicieron siembras de pequeñas porciones de la floración o brote apical, previamente desinfectados con Cloralex® al 1.5% por un minuto y lavados con agua destilada estéril, en medio PCNB agar (pentacloronitrobenzeno-agar). De los crecimientos en el medio se tomaron muestras, se tiñeron con lactofenol entre porta y cubreobjetos para su observación bajo el microscopio de campo claro e identificación con las claves de Barnet y Hunter (1998) y el Manual de *Fusarium* de Leslie y Summerell (2006).

#### 3.5 RESULTADOS

### 3.5.1 Obtención y manejo de plantas de mango

Las plantas de mango Haden que se mantuvieron en la Costa de Guerrero y que fueron tratadas como se describió en materiales y métodos se mantuvieron visualmente sanas y en condiciones de recibir los organismos asociados a la "escoba de bruja". El tratamiento con Fumino 56® (i.a. fosfuro de aluminio 56% de peso) a una dosis de 1.8 mg / L causó la muerte de los ácaros alojados en las yemas apicales de las plantas; es decir, en todas las yemas examinadas bajo el microscopio estereoscópico se observaron eriófidos muertos en un 100%.

Durante el experimento, las plantas se mantuvieron a una temperatura promedio de 20°C en el día y temperaturas no menores a 15°C en la noche. Estas temperaturas promovieron una floración en la mayoría de las plantas, la cual duró entre 60 y 77 días. El Cuadro 3.2 muestra la proporción de plantas que florecieron en cada uno de los tratamientos.

Cuadro 3.2 Proporción de plantas de mango que florecieron en el invernadero

Tratamiento	Plantas que florecieron	Plantas que no florecieron
Ácaros procedentes de yemas	0.466	0.534
deformes		
Ácaros procedentes de yemas	0.800	0.200
asintomáticas		
Ácaros desinfectados	0.733	0.267
Ácaros desinfectados + Fusarium	0.400	0.600
subglutinans		
F. subglutinans inoculación sin	0.533	0.467
heridas		
F. subglutinans inoculación con	0.733	0.267
heridas		
Testigo	0.900	0.100

# 3.5.2. Preparación de ejemplares del ácaro *A. mangiferae* e identificación de microorganismos asociados con ellos

La manipulación de los ácaros no produjo en ellos daños aparentes, incluso cuando se les sometió a tratamiento para su desinfección. Se observó que los ácaros después del tratamiento mantuvieron su actividad y cuando se les colocó en plantas de mango fueron capaces de reproducirse. Además, cuando se hizo la prueba de asepsia resultó que no hubo crecimientos de hongos ni bacterias (Cuadro 3.3)

Los ácaros provenientes de yemas deformes y de yemas asintomáticas sembrados en PDA llevaban en su cuerpo *F. subglutinans, Fusarium oxysporum* y *Botryodiplodia* sp. (Cuadro 3.3). Estos hongos se presentaron indistintamente de la procedencia del ácaro.

Cuadro 3.3 Organismos asociados al ácaro *A. mangiferae* y verificación de asepsia de ácaros desinfectados

Muestras en PDA	Contaminantes a las 48 h	Contaminantes a las 72 h
Ácaros procedentes de yemas	Fusarium oxysporum	Fusarium oxysporum
deformes	Botryodiplodia sp	Botryodiplodia sp
	Fusarium subglutinans	Fusarium subglutinans
Ácaros procedentes de yemas asintomáticas	Fusarium subglutinans	Fusarium oxysporum Botryodiplodia sp
		Fusarium subglutinans
Ácaros previamente desinfectados	ninguno	ninguno

## 3.5.3 Preparación del hongo *F. subglutinans*

La cepa monospórica de *F. subglutinans, GUE INI 95* se rehabilitó y verificó su identificación por la ausencia de clamidosporas y por la formación de microconidios en polifiálides (Leslie y Summerell, 2006; Nelson *et al.*, 1983).

# 3.5.4 Respuesta de las plantas de mango a la inoculación de *A. mangiferae* y *F. subglutinans*

## 3.5.4.1 Longitud de ejes primario y secundarios

De manera consistente las inflorescencias de las plantas testigo tuvieron los valores más altos de longitud del eje primario, así como de los ejes secundarios basal, medio y apical, pero ninguna de las inflorescencias observadas tenía el aspecto característico de las afectadas en campo (Figura 10A). Cuando se inocularon separadamente *A. mangiferae* o *F. subglutinans* se observaron ligeras reducciones en la longitud de los ejes, pero sólo se observó una reducción significativa en la longitud de los ejes secundarios apicales con tratamiento de *F. subglutinans* sin heridas. Cuando se inocularon ácaros procedentes de yemas deformes y ácaros previamente bañados en una suspensión de esporas de *F. subglutinans*, se observó una reducción significativa en la longitud del eje primario y al menos uno de los secundarios (Figura 10B y Figura 11B). Lo anterior sugiere que la reducción en la longitud de los ejes primarios y secundarios de las inflorescencias se asocia con el ataque simultáneo del ácaro y el hongo (Cuadro 3.4).

Cuadro 3.4 Longitud en centímetros del eje primario y de ejes secundario basal, medio v apical en inflorescencias de mango en la etapa de antesis (100%)

Tratamientos	Longitud	(cm)	Longitu	` ,	Longitud	` '	Longitud	` ,
	del eje pri	mario	eje sec	undario	eje secundario		eje seci	undario
			basal		medio		apical	
Ácaros procedentes de	16.255	b	3.238	b	4.078	а	1.083	a b
yemas deformes								
Ácaros procedentes de	22.905	a b	6.425	a b	4.581	а	1.877	а
yemas asintomáticas								
Ácaros desinfectados	25.969	a b	5.188	a b	3.502	а	1.571	a b
Ácaros desinfectados +	16.960	b	3.446	b	2.748	a	0.9073	b
Fusarium subglutinans								
F. subglutinans inoculación	30.828	а	4.981	a b	4.179	а	0.9071	b
sin heridas								
F. subglutinans inoculación	25.749	a b	7.304	а	3.642	а	1.360	a b
con heridas								
Testigo	25.105	a b	5.748	a b	4.267	а	1.703	a b

Valores en la misma columna y con al menos una misma letra en común no son estadísticamente diferentes (LSD al 0.05%)

## 3.5.4.2. Número de ejes secundarios y terciarios

El cuadro 3.5 presenta datos sobre el número de ejes secundarios y terciarios. Se aprecia una reducción significativa en el número de ejes totales y terciarios basales, medios y apicales, luego de la inoculación de ácaros previamente bañados con conidios de *F. subglutinans*, así como una reducción en el número de ejes terciarios medios luego de la inoculación de ácaros procedentes de yemas asintomáticas (Figura 10C). La inoculación con ácaros desinfectados, así como los tratamientos en los que se inoculó sólo *F. subglutinans*, no resultaron en diferencia con respecto al testigo en el número de ejes secundarios o terciarios (Cuadro 3.5; Figura 10D y Figura 11C, 11D). Lo anterior sugiere que la asociación ácaro-hongo es la que resulta en una modificación en el número de ejes de las inflorescencias.

Debe resaltarse que en ninguno de los tratamientos se observó un número significativamente mayor de ejes secundarios ni terciarios, en lo que se difiere de los estudios previos donde se califica a la deformación floral como una proliferación.

Cuadro 3.5. Número de ejes secundarios del eje principal y número de ejes terciarios de un eje secundario basal, medio y apical.

Tratamientos	No. de ejes secundarios totales		No. de ejes terciarios en eje secundario basal  No. de ejes terciarios en eje secu			No. ejes terciario secunda apical	s en eje	
Ácaros procedentes de yemas deformes	23.714	bс	7,857	a b	8.714	a b	4.714	abc
Ácaros procedentes de yemas asintomáticas	19.5	bс	7.917	a b	7.25	b	4.00	abc
Ácaros desinfectados	31.167	а	11.083	а	8.917	a b	5.167	a b
Ácaros desinfectados + Fusarium subglutinans	17.00	С	7.00	b	5.667	b	3.00	С
F. subglutinans inoculación sin heridas	30.250	а	9.625	a b	8.250	a b	4.125	abc
<i>F. subglutinans</i> inoculación con heridas	30.727	а	10.909	а	7.00	b	3.364	bс
Testigo	29.375	a b	11.375	а	11.5	а	5.625	Α

Valores en la misma columna y con al menos una misma letra en común no son estadísticamente diferentes (LSD al 0.05%)

#### 3.5.4.3 Diámetro del eje primario

El Cuadro 3.6 muestra el diámetro del eje primario, medido en la etapa de 100% de antesis. Se observó un incremento significativo en el diámetro del eje primario de inflorescencias en los tratamientos con inoculación de ácaros procedentes de campo y

sin ningún tratamiento previo, donde los ácaros presumiblemente estaban contaminados por microorganismos, entre ellos especies de *Fusarium*, en comparación con el testigo (Figura 10B y 11C). Tanto el tratamiento con ácaros desinfectados como en los tratamientos donde sólo se inoculó *F. subglutinans* no mostraron incremento significativo en el diámetro de los ejes primarios, lo que sugiere una vez más que las deformaciones observadas en inflorescencias de mango son el resultado del ataque conjunto de *A. mangiferae* y *F. subglutinans* (Figura 10D y Figura 11C y D). Sin embargo y sorprendentemente, el tratamiento de inoculación de *A. mangiferae* previamente bañados en conidios de *F. subglutinans* no resultó en el incremento significativo del diámetro del eje primario en las inflorescencias. Para este hecho se sugiere que este tratamiento bajo las condiciones experimentales de este estudio no influyeron en cambios en el diámetro de la inflorescencia.

Cuadro 3.6. Diámetro del eje primario de inflorescencias de mango en etapa de antesis (100%)

Tratamientos		o (cm) del rimario
Ácaros procedentes de yemas deformes	0.9166	а
Ácaros procedentes de yemas asintomáticas	0.8692	а
Ácaros desinfectados	0.6687	b
Ácaros desinfectados + Fusarium subglutinans	0.6573	b
F. subglutinans inoculación sin heridas	0.6106	b
F. subglutinans inoculación con heridas	0.6073	b
Testigo	0.6585	b

Valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes (LSD al 0.05%)

#### 3.5.4.4. Diámetro de las flores

Un panorama general del Cuadro 3.7 muestra que las flores más grandes se observaron en la parte distal de los ejes secundarios. Sin embargo, las flores ubicadas en la parte basal de estos ejes también mostraron mayor diámetro que el testigo. Esta diferencia fue más marcada cuando los ácaros procedían de yemas deformes; es decir, ácaros que presumiblemente tenían alguna especie de *Fusarium* en su cuerpo. Respecto a las flores ubicadas en la parte distal, los resultados muestran que las flores con mayor diámetro se ubicaron en el eje basal y corresponden a las plantas inoculadas

con el hongo y el ácaro y aquéllas infestadas con ácaros procedentes de yemas deformes ubicadas en ese mismo eje y en el eje secundario apical. En este mismo cuadro también se puede observar que en el eje medio, las flores más grandes se ubicaron en las plantas infectadas con *F. subglutinans* previamente heridas. Lo anterior sugiere que las flores con mayor diámetro se desarrollaron cuando estaba involucrado el hongo en asociación con el ácaro.

Cuadro 3.7. Diámetro en centímetros de flores abiertas ubicadas en la base y en la parte distal de los ejes secundarios básales medios y apicales.

Tratamientos	Flores	abiertas ι	ubicadas	en la b	ase del		Flores	abiertas	ubicada	s en la	parte dist	al del
	Eje ba	sal	Eje me	dio	Eje api	cal	Eje bas	al	Eje med	dio	Eje api	cal
Ácaros procedentes de yemas deformes	1.117	а	0.917	a b	0.954	а	1.225	b	0.971	b	1.166	а
Ácaros procedentes de yemas asintomáticas	0.953	bс	0.926	a b	0.918	а	0.959	С	0.965	b	0.997	bс
Ácaros desinfectados	0.880	c d	0.893	b	0.943	а	0.911	С	0.985	b	1.017	b
Ácaros desinfectados + Fusarium subglutinans	0.970	b	0.855	b	0.799	b	1.446	а	0.887	b	0.903	С
F. subglutinans inoculación sin heridas	0.985	b	0.996	а	0.981	а	1.053	bс	1.524	а	1.105	a b
F. subglutinans inoculación con heridas	0.869	c d	0.910	a b	0.910	а	0.952	С	1.011	b	1.026	b
Testigo	0.864	d	0.866	b	0.975	а	0.942	С	0.932	b	1.008	bс

Valores en la misma columna y con al menos una misma letra en común no son estadísticamente diferentes (LSD al 0.05%)

## 3.5.4.5. Proporción de flores masculinas y hermafroditas

Todos los tratamientos inoculados sólo con *A. mangiferae*, con *F. subglutinans* y con sus combinaciones, fueron diferentes estadísticamente del testigo respecto a la proporción de flores masculinas y hermafroditas. En todos ellos existió un mayor porcentaje de flores masculinas y el tratamiento donde se infestaron las plantas con ácaros procedentes de yemas deformes se observó una mayor proporción que con ácaros bajo un proceso de desinfección (Cuadro 3.8). La reducción de la proporción de flores hermafroditas aparece entonces como efecto tanto del ácaro como del hongo cuando actúan individualmente, y se acentúa cuando actúan juntos.

Cuadro 3.8. Proporción de sexos en inflorescencias de mango

Tratamientos	Flor ♂ %		Flor he	rmafrodita %
Ácaros procedentes de yemas deformes	82.00	а	18.00	С
Ácaros procedentes de yemas asintomáticas	75.09	a b	24.90	bс
Ácaros desinfectados	64.66	b	35.33	b
Ácaros desinfectados + Fusarium subglutinans	81.33	а	19.00	С
F. subglutinans inoculación sin heridas	82.25	а	17.75	С
F. subglutinans inoculación con heridas	75.45	a b	22.72	С
Testigo	44.75	С	55.25	а

Valores en la misma columna y con al menos una misma letra en común no son estadísticamente diferentes (LSD al 0.05%)

## 3.5.4.6. Número de segmentos en el nectario y estambres

Se observaron flores con estambres adicionales así como segmentos en el nectario, característica más marcada en las plantas inoculadas con ácaros procedentes de campo, comparadas con las inoculadas con ácaros desinfectados y el testigo (Cuadro 3.9 y Figura 12 A). En este cuadro también se puede observar que las plantas inoculadas con ambos organismos o sólo *F. subglutinans* tenían mayor número de segmentos y estambres. Esto nos permite postular que los síntomas observados se pueden atribuir a la acción de ambos organismos o bien al hongo (Figura 12 B, C, D). En esta variable se observa que el número de segmentos del nectario y el número de estaminodios son mayores en el tratamiento de inoculación de *F. subglutinans* sin heridas; esto sugiere que el mayor efecto lo produce el hongo sin necesidad de heridas o de un agente facilitador.

Cuadro 3.9. Número de segmentos del nectario y estambres en inflorescencias de mango

Tratamientos	No. de		No. Estam	bres
	segmen	tos		
Ácaros procedentes de yemas deformes	6.942	С	7.028	С
Ácaros procedentes de yemas asintomáticas	6.690	С	7.072	С
Ácaros desinfectados	5.516	d	6.116	d
Ácaros desinfectados + Fusarium subglutinans	7.75	b	8.000	b
F. subglutinans inoculación sin heridas	8.625	а	9.325	а
F. subglutinans inoculación con heridas	7.127	С	7.836	b
Testigo	5.400	d	6.075	d

Valores en la misma columna y  $\,$  con al menos una misma letra en  $\,$  común no son estadísticamente diferentes (LSD al 0.05%)

## 3.5.4.7. Días transcurridos para llegar a la antesis

En el Cuadro 3.10 se observa que no existieron diferencias significativas al 50% de antesis; sin embargo, al final del periodo de floración el testigo culminó la antesis en un tiempo significativamente más corto que las plantas inoculadas con ácaros procedentes de yemas deformes. Los valores observados muestran un ligero atraso en el desarrollo de las inflorescencias, asociado a la combinación de ácaros y hongos.

Cuadro 3.10. Días al 50% y 100 % de antesis en inflorescencias de mango

Tratamientos	Días al 50	% de antesis	Días al 1	00% de antesis
Ácaros procedentes de yemas deformes	27.143	а	40.167	а
Ácaros procedentes de yemas asintomáticas	24.9	а	37.3	a b
Ácaros desinfectados	24.583	а	37.58 3	a b
Ácaros desinfectados + Fusarium subglutinans	28.5	а	37.250	a b
F. subglutinans inoculación sin heridas	26.5	а	36.125	a b
F. subglutinans inoculación con heridas	27.00	а	38.455	a b
Testigo	26.750	а	34.00	b

Valores en la misma columna y con al menos una misma letra en común no son estadísticamente diferentes (LSD al 0.05%)

# 3.5.5 Detección de los organismos inoculados

En el Cuadro 3.11 se puede observar que donde se infestó con ácaros se recuperaron ácaros, pero no en todos los casos, ya que el hábitat natural en campo es principalmente la yema vegetativa y cuando la planta florece el eriófido tiende a emigrar (Abou-awad, 1981). En los tratamientos donde se inoculó *F. subglutinans* se recuperó el hongo, también se recuperó en los tratamientos donde se colocaron ácaros directos de campo. En las plantas testigo no se encontraron ácaros ni *F. subglutinans*. Los crecimientos que se desarrollaron en las muestras de las plantas testigo no mostraron asociación con ningún tipo de enfermedad, por lo que se les ignoró.

Cuadro 3.11Recuperación de organismos inoculados en plantas de mango en invernadero.

Tratamientos	% de plantas con presencia de ácaros	% de plantas con presencia de <i>F. subglutinans</i>
Ácaros procedentes de yemas deformes	33.3	40.00
Ácaros procedentes de yemas asintomáticas	46.6	53.3
Ácaros desinfectados	26.6	0
Ácaros desinfectados + Fusarium subglutinans	33.3	80.0
Fusarium subglutinans inoculado sin heridas	0	86.6
Fusarium subglutinans inoculado con heridas	0	86.6
Testigo	0	0

## 3.6 DISCUSIÓN

Las condiciones a las que las plantas de mango fueron sometidas indujeron la floración en proporciones variables de plantas, según los tratamientos aplicados. El más alto porcentaje de floración ocurrió en las plantas testigo, lo que sugiere que la inoculación de A. mangiferae y/o F. subglutinans interfiere de alguna manera con la floración. Los valores obtenidos son únicos (no hay repeticiones), por lo que no son susceptibles de compararse estadísticamente, y en este aspecto no hay antecedentes bibliográficos. Por lo tanto, el hecho de que el ácaro y/o el hongo en estudio pudieran interferir con la floración del mango podría ser un interesante tema de investigación. Repetidamente se ha postulado que el ácaro A. mangiferae actúa en mango como portador de esporas de *Fusarium* spp., y que son estos hongos los agentes etiológicos de la escoba de bruja. Sin embargo, la mayor parte de los estudios no dan evidencias sino sólo postulan este hecho como una posibilidad (Summanwar et al., 1966: Bhatnagar y Beniwal 1977; Kumar y Beniwal, 1992; Ploetz y Gregory, 1993; Labuschagne et al., 1993; Noriega, 1996; Freeman et al., 1999 y 2000). El presente estudio proporciona evidencias que apoyan la posibilidad mencionada, pues se obtuvieron hongos de varias especies, incluso *F. subglutinans* y *F. oxysporum*, cuando se sembraron ejemplares de A. mangiferae en medio PDA (Cuadro 3.3) procedentes directamente de las plantas en campo. De la misma forma, se extrajo a *F. subglutinans* de plantas de mango que habían sido infestadas con ácaros procedentes de campo, presumiblemente infestados por estos hongos, mientras que no se extrajo a F. subglutinans de plantas testigo o de las que habían sido infestadas con ácaros previamente tratados con hipoclorito de sodio para la eliminación de hongos (Cuadro 3.11). Lo anterior muestra que el ácaro no sólo portaba a hongos del género Fusarium sino que también fue el vehículo mediante el cual dichos hongos se pudieron establecer en plantas de mango.

El ácaro *A. mangiferae* no tiene vías respiratorias, su ano no es funcional y el diámetro de su intestino anterior es de 15  $\mu$ m (Nuzzaci y Alberti, 1996), por lo que se considera imposible que las esporas de *Fusarium* spp., que miden entre 25 y 35  $\mu$ m (Leslie y Summerell, 2006), pudieran penetrar en su interior. Por lo anterior no se le

considera un vector sino portador de esporas, que estarían sobre su cuerpo, como fue demostrado en las etapas inicial y final de este experimento.

La escoba de bruja del mango está caracterizada morfológicamente por la alteración en las variables que se discuten enseguida. En todas ellas hubo algún efecto de *A. mangiferae* y/o *F. subglutinans*. Sin embargo, en ninguno de los tratamientos ni repeticiones se observaron inflorescencias deformes con el aspecto típico como se ven en campo; por lo tanto, hablando estrictamente, el presente estudio no corrobora al ácaro y al hongo citados como agentes etiológicos de dicha enfermedad.

La longitud de los ejes primario y secundarios de las inflorescencias fue significativamente menor en plantas tratadas con *A. mangiferae*, con *F. subglutinans* y sobre todo con tratamientos en los que se combinaban los dos organismos. Este hecho apoya la hipótesis de que el efecto combinado de ácaro-hongo es causal de deformaciones, como se ha postulado, posiblemente porque el ácaro transporta las esporas del hongo o las introduce donde pueden germinar e invadir a la planta hospedante (Noriega *et al.*, 1999; Freeman *et al.*, 1999 y 2000; Gamliel-Atinsky *et al.*, 2007). De hecho, en plantas infestadas con ácaros previamente tratados para eliminar a los hongos asociados, no se observó diferencia significativa en la longitud de los ejes primarios y secundarios con respecto al testigo.

Sin embargo, la reducción en la longitud de los ejes no representa un resultado concluyente, pues en un estudio sobre la morfometría de inflorescencias de mango Haden, realizado en el estado de Guerrero (Otero-Colina *et al.*, 2005), las inflorescencias deformes típicas no tenían reducción significativa en la longitud de los ejes, excepto en las inflorescencias designadas en ese estudio como de tipo 4, las que no representaban más de 10% del total.

En relación con el número de ejes secundarios y terciarios, fue sorprendente que las plantas inoculadas con *F. subglutinans*, así como con ácaros presumiblemente infestados con ese hongo, tuvieron un número significativamente menor de dichos ejes. Este hecho contrasta con descripciones previas de la deformación floral, que la consideran una proliferación (Campbell y Marlatt, 1982; Shawky *et al.*, 1980; Kumar y Beniwal, 1992; Kumar *et al.*, 1993). De igual manera contrasta con los valores

obtenidos por Otero-Colina *et al.* (2005), quienes observaron una mayor cantidad de ejes terciarios en los ejes secundarios mediales y distales de inflorescencias deformes. El diámetro de las inflorescencias y el tamaño de las flores son posiblemente los caracteres que de manera más consistente representan a la deformación floral del mango. Probablemente, más que un acortamiento de las inflorescencias, el aumento en el calibre de los ejes, así como en el tamaño de las flores, es lo que da a las inflorescencias su aspecto compacto característico. De hecho, es claro que las inflorescencias deformes son claramente más pesadas que las sanas, o asintomáticas, pero no se cuenta con valores numéricos sobre el peso de unas y otras. En el presente estudio se observó un incremento significativo en el diámetro del eje primario de las inflorescencias infestadas con ácaros procedentes de campo, presumiblemente infestados con *Fusarium* spp., lo que sugiere que es la asociación ácaro-hongo la que resulta en dicho incremento. Sin embargo, aunque las inflorescencias citadas tuvieron un incremento en el ancho y en el diámetro de las flores, no alcanzaron el aspecto compacto característico de las inflorescencias típicas.

El cambio en el sexo de las flores, o dicho de otra forma, la alteración en la proporción de flores masculinas con respecto a hermafroditas, ha sido tema de discusión pues algunos autores lo consideran parte de las características de la deformación floral, mientras que otros opinan lo contrario (ver Kumar et al., 2003). En el presente estudio todos los tratamientos resultaron con una proporción significativamente mayor de flores hermafroditas con respecto al testigo, aunque la proporción más elevada se asocia con tratamientos que incluyen la inoculación de Fusarium spp. En contraste, en el mismo cultivar (Haden) y en sitio relativamente cercano (Tuxpan, Guerrero), Otero-Colina et al. (2005) no observaron diferencias significativas en la proporción de flores masculinas y hermafroditas entre inflorescencias deformes y asintomáticas en condiciones de campo.

Dentro de las múltiples descripciones de la deformación floral, hechas por numerosos autores en otros tantos países, sólo Otero-Colina *et al.* (2005) observaron que las flores de mango de inflorescencias deformes tienen un incremento significativo en el número de segmentos en que se divide el disco de nectarios, así como en el número de estaminodios. Esta característica podría estar presente sólo en México o

bien ser un parámetro no considerado por otros investigadores. Es una característica muy evidente, aun a simple vista, y el número de segmentos y estaminodios iba de 12 a 14, contra cinco en flores "normales". En el presente estudio el número de estaminodios fue significativamente mayor en plantas inoculadas con los tratamientos que incluían a *Fusarium* spp., lo que concuerda con Otero-Colina *et al.* (2005) y asocia a dicho hongo con la aparición de una de las características de la deformación, al menos a nivel local. Sin embargo, el número de estaminodios fue en promedio más allá de nueve.

Entre las características de la deformación floral está la prolongación en el desarrollo de las inflorescencias (Srivastava y Butani 1973; Sternlicht y Goldenberg, 1976); es decir, el periodo de floración es más extenso. En el presente estudio no se observó diferencia significativa en el tiempo requerido para alcanzar el 50% de antesis, pero en el tratamiento infestado por ácaros procedentes de yemas deformes sí se observó diferencia en el tiempo transcurrido para alcanzar 100% de antesis. Estos ácaros presumiblemente estaban contaminados con *Fusarium* spp., en cuyo caso el atraso en la antesis podría asociarse con la infección con dicho hongo. Sin embargo, el atraso en la antesis en dicho tratamiento fue de seis días con respecto al testigo, en lo que se contrasta con Otero-Colina *et al.* (2005), quienes observaron atrasos hasta de tres meses. Además, en los demás tratamientos que incluyeron alguna forma de aplicación de *Fusarium* no se observó atraso en la antesis, lo que va en contra de postular la asociación *Fusarium*-atraso.

#### 3.7 CONCLUSIONES

El ácaro *A. mangiferae* no sólo porta a *F. subglutinans* sino que facilita su entrada al interior de las yemas y con ello favorece el desarrollo de deformaciones.

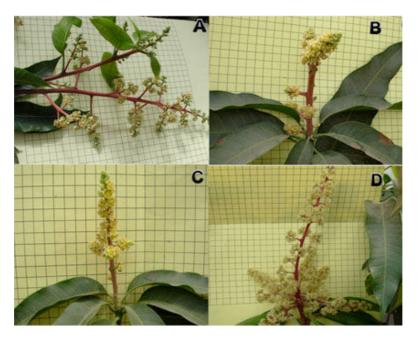
El ácaro *A. mangiferae* por sí solo se asocia con reducción en la proporción de flores hermafroditas.

El hongo *F. subglutinans* se asocia con reducción en la longitud de los ejes, diámetro de ejes, reducción en la proporción de flores hermafroditas, aumento en número de estaminodios y segmentos del nectario y aumento en diámetro de las flores.

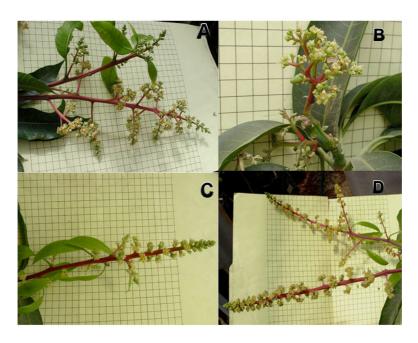
La asociación ácaro-hongo intensifica los síntomas de deformación floral.

El ácaro *A. mangiferae* es parte integral del fenómeno escoba de bruja.

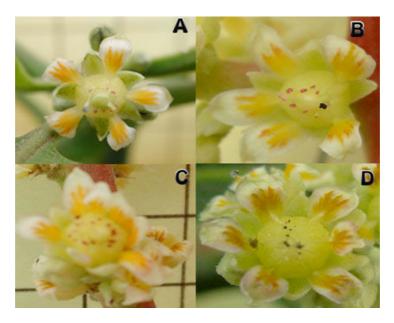
Aunque se desarrollaron síntomas de deformación floral, fueron de bajo nivel y no se desarrollaron deformaciones típicas.



**Figura 10.** Inflorescencias de mango previamente infestadas con ácaros. **A** Testigo, **B** con ácaros procedentes de yemas deformes, **C** con ácaros provenientes de yemas asintomáticas y **D** con ácaros bajo un proceso de desinfección.



**Figura 11.** Inflorescencias de mango previamente inoculadas con *Fusarium subglutinans* y en asociación con el ácaro *A. mangiferae*. **A** Testigo **B** hongo + acaro **C** *F. subglutinans* inoculado sin causar herida **D** *F. subglutinans* inoculado previas heridas.



**Figura 12**. Flores que muestran un aumento en el número de estambres y segmentos en el nectario. **A** Planta inoculada con ácaros de yemas deformes. **B** Con *Fusarium subglutinans* sin causar herida. **C** Con hongo + ácaro. **D** Con *F subglutinans* con herida.

#### 3.8. LITERATURA CITADA

- Abou-awad, B.A. 1981. Ecological and biological studies on the mango bud mite, *Eriophyes mangiferae* (Sayed), with description of immature stages (*Eriophyoidea: Eriophyidae*). Acarologia. 22 (2):145–150.
- Barnet, L.H. y Hunter B.B. 1998. Ilustrated genera of imperfect fungi. Fourth Edition.

  The American Phytopathological Society. St. Paul Minnesota, USA. 218 p.
- Bharadwaj, R.K. y Banerjee S.K. 1973. Phostoxin <sup>™</sup> for control of *eriophyes mangiferae* (Acarina: Eriophydae) associated with malformation disease in mango. The Florida Entomologist 56(2)147-148.
- Bhatnagar, S.S. y Beniwal S.P.S. 1977. Involvement of *Fusarium oxysporum* in causation of mango malformation. Plant Disease Reporter 61(10): 894-898.
- Britz, H., Steenkamp E.T., Coutinho T.A., Wingfield B. D., Marasas W. F. O., y Wingfield
  M. J. 2002. Two new species of *Fusarium* section Liseola associated with mango malformation. Mycologia 94: 722–730.

- Burhan, M.J. 1990. Mango malformation disease recorded in United Arab Emirates. FAO Plant Protection Bulletin 39 (1): 46–47.
- Campbell, C.W. y Marlatt R. B.1982. Current status of mango malformation disease in Florida. Florida Agricultural Journal Series 4154: 223-226.
- Díaz-Balderas,V., y Romero-Cova S. 1980. Etiología de la deformación o escoba de bruja del mango en el estado de Morelos. Agrociencia 39: 35-40.
- Doreste, S.E. 1984. Información sobre el eriófido del mango, *Eriophyes mangiferae* (Sayed) en Venezuela. Revista Facultad Agronomía (Maracay) 13(1-4): 91-100.
- Freemann, S., Maimon M. y Pinkas Y. 1999. Use of GUS transformants *of Fusarium subglutinans* for determining etiology of mango malformation disease. Phytopthology 89:456-461.
- Freemann, S., Maimon M. y Pinkas Y. 2000. Etiology of mango malformation disease using GUS transformants of *Fusarium subglutinans*. Acta Horticulturae 509: 731-758.
- Gamliel- Atinsky E., Sztejnberg A., Maymon M., Belausov E., Palevsky E. y Freeman S. 2007. Interaction of the mango bud mite (*Aceria mangiferae*) with *Fusarium mangiferae*, causal agent of mango malformation disease. Abstracts of presentations in: The 28<sup>th</sup> Congress of the Israel. Phytopathological Society pp198.
- Hassan, A.S. 1944. Notes on *Eriophyes mangiferae* S.N. (Acarina) Bulletin de la Société Fouad 1er d'Entomologie 28: 179-180
- Jeppson, R.L., Keifer H. y Baker E. W. 1975. Mites Injurious to Economic Plants.

  University of California Press. U.S.A. 614 p.
- Kumar, J. y Beniwal S.P.S. 1987. Vegetative and floral malformation, two symptoms of the same disease on mango. FAO Plant Protection Bulletin 35:21-23.
- Kumar, J. y Beniwal S. P.S. 1992. Mango Malformation. pp. 357-393. En: J. Kumar.,H.S. Chawbe., V.S. Singh., y A.N. Mukhopadhay (eds.). Plant Diseases of International Importance. V3. Prentica Hall. Englewood Cilifts, N J.
- Kumar, J., Singh U.S. y Beniwal S.P.S. 1993. Mango malformation: one hundred year of research. Annual Review Phytopathology 31:217-232.

- Kumar, P. S., Reddy Y. N., y Srihari D. 2003. Effect of pruning on production of new shoots, subsequent growth end flowering of mango cv. Beneshan. Journal of Research ANGRAU 31(1); 26-30.
- Labuschagne, T.I., Joubert M.H. y Steyn A. 1993. Role of the mango bud mite, *Aceria mangiferae*, in mango malformation. ITSC Information bulletin Nelspruit South Africa 246:19-24.
- Leslie, J. F. y Summerell B.A. 2006. The *Fusarium*. Laboratory Manual. First edition. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 388 p.
- Litz, R.E. 1997. The mango: botany, production and uses. CAB International, New York. USA. 587 p.
- Lu, P. y Chacko E. K. 2000. Effect of water stress on mango flowering in low latitude tropics of northern Australia. Acta Horticulturae 509: 283-289.
- Manicom, B.Q. 1989. Blossom malformation of mango. South Africa Mango Grower's Association Yearbook 10:11-12.
- Marasas, W. F. O., Ploetz R. C., Wingfield M. J., Wingfield B. D. y Steenkamp E. T. 2006. Mango malformation disease and the associated *Fusarium* species. Phytopathology 96(6):667-672.
- Narasimhan, M.J. 1954. Malformation of panicles in mango incited by a species of Eriophyes. Current Science 23:297-298.
- Nariani, T.K. y Seth M.L. 1962. Role of eriophyid mites in causing malformation disease in mango. Indian Phytopathology 15: 231-233.
- Nelson, P. E. 1997. Fusarium. Memorial Symposium. Pensilvania State University. APS:Press. The American Phytopathological Society St Paul Minesota. 391 p.
- Nirvan, R.S. 1953. Bunchy-top of young mango seedlings. Science and Culture 18(7):335-336.
- Noriega Cantú D.H. 1996. "Escoba de bruja" del mango: etiología. histopatología y manejo integrado. Tesis de doctorado en ciencias en la especialidad de Fitopatología, Colegio de Postgraduados. 72 p.

- Noriega-Cantú, D.H., Téliz-Ortiz D., Mora-Aguilera G., Rodríguez A. J., Zavaleta-Mejia E., Otero-Colina G. y Campbell C.L. 1999. Epidemiology of mango malformation in Guerrero, México, with traditional and integrate management. Plant Disease 83 (3): 223-228.
- Nuckles, E.M. y Kuc J. 1988 Use of a hemacytometer. En: de Baudoin, A.B.A.M. Laboratory exercises in plant Pathology: an instructional kit. American Phytopathologycal Society. St. Paul Minnesota 3:1.
- Núñez-Elisea R, y Davenport T. L. 1994. Flowering of mango trees in containers as influenced by seasonal temperature and water stress. Scientia Horticulturae 58 (1-2):57-66.
- Nuzzaci, G. y Alberti, G. 1996. Internal anatomy and physiology. pp 101-150. En: E. E. Lindquist., M. W. Sabelis., y J. Bruin (eds.). Eriophyold Mites. Eriophyoid mites. Their biology, natural enemies and control. World Crop Pests.790 p.
- Otero-Colina, G., Noriega-Cantú D.H., Sánchez-Martínez R., Acosta-Rodríguez M. C., Santillán-Galicia M. T., Miranda-Salazar F. 2005. Descripción morfológica de la escoba de bruja en brotes vegetativos y florales. pp 105 114. En: H. F. Zavala., C.D.H. Noriega., A.G Mora., P.G. Ballesteros, P.L.A. Rodríguez., G.L.S. Covarrubias., L.L. Flores. (eds.). El mango. su cultivo, fitosanidad y comercialización 189 p.
- Otero-Colina, G., Acosta M. C., y Santillán-Galicia M. T. 2007. Malformations induced by *Aceria mangiferae* (Trombidiformes: Eriophyidae) and *Fusarium subglutinans* (Fungi: Deuteromycetes) to *in vitro* mango seedlings. pp. 83-86. En: Acarology XI: Proceedings of the International Congress. J.B. Morales-Malacara., V.Behan-Pelletier., E. Ueckermann, T.M. Pérez, E. Estrada., C. Gispert. y M.Badii. (eds.). Instituto de Biología, UNAM; Facultad de Ciencias, UNAM; Sociedad Latinoamericana de Acarología. México.
- Peña, J.E., Palevsky E., Otero-Colina G., Ochoa R. y Meister Ch.W. 2005. Mango bud mite, aceria mangiferae bionomics and control under Florida conditions. Proceedings of the Florida State Horticultural Society. 118:228-234.
- Phillips, I.D.J. 1975. Apical dominance. Annual Review of Plant Physiology 26:341-367.

- Ploetz, R.C., y Gregory N.F. 1993. Mango malformation in Florida: distribution of *Fusarium subglutinans* in affected trees, and relationships among strains within and among different orchards. Acta Horticulturae 341:388-394.
- Ploetz, R.C. y Prakash O. 1997. Foliar, floral and soil borne diseases. pp 281-325. En: R.E. Litz. (editor). The mango, botany and uses. 587 p.
- Schlosser, E. 1971. Mango malformation: incidence of "bunchy top" on mango seedlings in West Pakistan. FAO Plant Protection Bulletin 19: 41-42.
- Shawky, I., Zidan Z., El-Tomi A. y Dahshan D.1980. Flowering malformation in relation to vegetative growth of "Taimour" mangoes. Egyptian Journal Horticulture 7(1):1-8.
- Singh, L.B. 1960. The mango, botany, cultivation and utilization. Leonard Hill. London. 438 p.
- Srivastava, R.P. y Butani D.K. 1973. La "malformation" du manguier. Fruits 28(5):389–397
- Southwood, T.R.E. 1978. Ecological methods with particular reference to the study of insect populations. Chapman & Hall. London. 521 p.
- Steenkamp, E., Britz H., Coutinho T., Wingfield M. J., Marasas W. F.O. y Wingfield B.D. 2000. Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation. Molecular Plant Pathology 1(3):187-193.
- Sternlicht, M. y Goldenberg S. 1976. Mango eriophyid mites in relation to inflorescence. Phytoparasitica 4(1):45-50.
- Summanwar, A.S., Raychaudhuri S.P. y Phatak S.C. 1966. Association of the fungus Fusarium moniliforme Sheld. with the malformation in mango (Mangifera indica L.). Indian Phytopathol 19:227-228.
- Tripathi, R. D. 1954. Bunchy top and malformation disease mango. Indian Journal of Horticulture 11:122-124.
- Varma, A., Raychaudhuri S. P., Lele V. C. y Ram A. 1973. Preliminary investigations on epidemiology and control of mango malformation. Proceedings of the Indian National Science Academy 37: 291-300.
- Varma, A., Lele V.C., Raychaudhuri S.P., Ram A. y Sang A. 1974. Mango malformation: a fungal disease. Phytopathologische Zeitschrift 79: 254-257.

Westphal, E. y Manson D. C. M. 1996. Feeding Effects on Host Plants Gall formation and Other Distortions pp 231-242. En: E. E. Lindquist., M. W Sabelis y J. Bruin (eds.). Eriophyoid Mites. Their biology natural enemies and control. World Crop Pests. 790 p.

#### **CONCLUSIONES GENERALES**

La información generada en la presente investigación arroja datos importantes sobre la enfermedad denominada escoba de bruja; algunos de estos datos corroboran los estudios etiológicos realizados por otros investigadores, pero además aporta elementos que permiten esclarecer qué tipo de relación existe entre el ácaro *Aceria mangiferae* y la aparición de los diferentes síntomas que caracterizan la enfermedad en floración y vegetativa, por él mismo y en su asociación con el hongo *Fusarium subglutinans*. Por lo tanto, los resultados nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- La siembra *in vitro* de embriones de mango permitió la germinación de plántulas sanas, vigorosas y garantizó que dichas plantas estuvieran libres de todos los contaminantes que pudieran desarrollarse en medio B5.
- El diseño de los envases asépticos, el método de esterilización y el de riego mantuvieron a las plantas libres de todo organismo contaminante que pudiera desarrollarse en suelo o en las plantas mismas, lo que las hace útiles para aclarar relaciones de etiología.
- Los contaminantes identificados en embriones en medio B5 modificado (*Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Xanthomonas* sp. y *Cladosporium* sp.) en el sustrato suelo+agrolita, (*Cladosporium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp. y *Fusarium* sp.) y en los componentes del frasco cerrado (*Helmithosporium* sp., *Curvularia* sp., *Penicillium* sp. y *Syncephalastrum* sp.) se consideran organismos oportunistas que se establecieron por el manejo de los embriones y durante el riego.
- El ácaro *A. mangiferae* se desempeña como medio de transporte y facilita la infección de la planta por parte del hongo *F. subglutinans*. Además, la asociación ácarohongo promueve e intensifica los síntomas de escoba de bruja en estado vegetativo y de floración, lo que señala al eriófido como parte de este síndrome.
- El ácaro *A. mangiferae* por sí solo es capaz de crear deformaciones en las plantas en etapa vegetativa, pero no del tipo característico de la escoba de bruja sino por desarrollo de brotes múltiples y anormales a partir de la yema apical. Dicho ácaro no suprime la dominancia apical.

- Los datos del presente trabajo corroboran al hongo *F. subglutinans* como agente causal de la escoba de bruja o deformación vegetativa del mango.
- El ácaro *A. mangiferae* en etapa floral, por sí solo se asocia con reducción en la proporción de flores hermafroditas.
- El hongo *F. subglutinans* en época de floración se asocia con reducción en la longitud de los ejes, diámetro de ejes, reducción en la proporción de flores hermafroditas, aumento en número de estaminodios y segmentos del nectario y aumento en diámetro de las flores.
- Aunque se desarrollaron síntomas de deformación floral, fueron de bajo nivel y no se desarrollaron deformaciones típicas de la enfermedad. Por lo tanto, el presente trabajo no corrobora al hongo *F. subglutinans* como agente etiológico de la deformación floral del mango.