



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**AISLAMIENTOS DE BOTRYOSPHERA ASOCIADOS AL TIZON DEL TALLO
DE ARANDANO Y SU PATOGENICIDAD, EN MICHOACÁN JALISCO Y
COLIMA.**

EDITH MALDONADO CRUZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2016

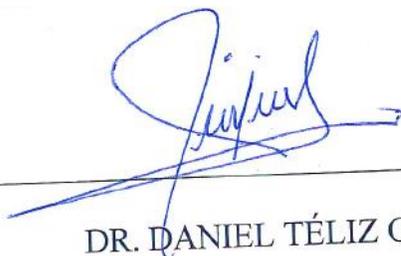
La presente Tesis titulada: **Aislamientos de *Botryosphaeria* asociados al Tizón del tallo de Arándano y su patogenicidad en Michoacán Jalisco y Colima**, realizado por la alumna: **Edith Maldonado Cruz**, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

FITOSANIDAD – FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



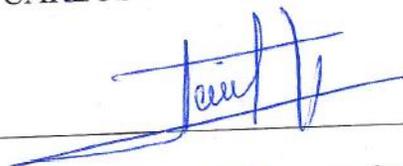
DR. DANIEL TÉLIZ ORTÍZ

ASESOR:



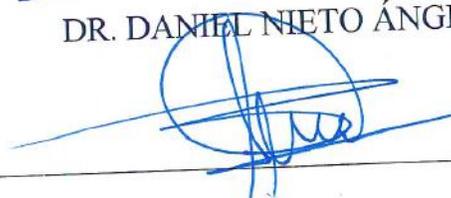
DR. CARLOS DE LEÓN GARCÍA DE ALBA

ASESOR:



DR. DANIEL NIETO ÁNGEL

ASESOR:



DR. ÁNGEL REBOLLAR ALVITER

AISLAMIENTOS DE BOTRYOSPHAERIA ASOCIADOS AL TIZÓN DEL TALLO DE ARANDANO Y SU PATOGENICIDAD, EN MICHOACÁN JALISCO Y COLIMA

**Edith Maldonado Cruz, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2016.**

RESUMEN

El arándano (*Vaccinium corymbosum*), es producido comercialmente en 16 países en todo el mundo. En México se cultiva desde 1999; su participación mundial destaca con una producción de 521583 ton, se ubica dentro de los diez países con los mayores rendimientos. El arándano es una especie vigorosa, de rápido crecimiento y altos rendimientos, susceptible a varias enfermedades que pueden alterar su desarrollo y acortar su vida productiva. El tizón del tallo es una enfermedad que causa significativas pérdidas, la incidencia de esta enfermedad es tan alta que las nuevas plantaciones se ven seriamente reducidas en productividad, esta ha sido atribuida a miembros de la familia Botryosphaeriaceae; *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Lasiodiplodia pseudotheobromae* se han registrado como agentes causales. Esta familia ha tenido una historia taxonómica confusa, donde las especies son difíciles de separar en base a las características morfológicas. El análisis filogenético basado en el análisis del ADN ha permitido una clasificación más natural de Botryosphaeriaceae, se ha utilizado secuencias de ADN, del gen ITS y de genes adicionales EF1- α , para determinar las especies involucradas en patologías de muerte regresiva y cancos. La acertada identificación de los agentes causales contribuye a la correcta toma de decisiones en el manejo de esta enfermedad.

Palabras clave: *Vaccinium corymbosum*, *Botryosphaeriaceae*, ITS y EF1- α .

**BOTRYOSPHAERIA ISOLATES ASSOCIATED WITH STEM BLIGHT OF
BLUEBERRY IN MICHOACAN JALISCO AND COLIMA AND THEIR
PATHOGENICITY**

**Edith Maldonado Cruz, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2016.**

ABSTRACT

Blueberry (*Vaccinium corymbosum*), is produced commercially in 16 countries worldwide. Grown in Mexico since 1999; its worldwide share is highlight with a production of 521583 tons, is placed within the ten countries with the highest yields. Blueberry is a vigorous species, fast growth and high yields, susceptible to various diseases that can affect their development and shorten its life. The stem blight is a disease that causes significant losses, the incidence of this disease is so high that new plantations are severely reduced in productivity; It has been attributed to members of the family Botryosphaeriaceae within the genus *Botryosphaeria*; *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Lasiodiplodia pseudotheobromae* have been registered as causal agents. The taxonomy of this group has been confused, is difficult to separate species based on morphological characteristics. Phylogenetic analysis based on DNA analysis has allowed a more natural classification of Botryosphaeriaceae, have been used DNA sequences, such as the ITS and EF1- α genes, to determine the species involved pathologies dieback and cankers. The successful identification of the causal agents contributes to the proper decision-making in the management of this disease.

Key words: *Vaccinium corymbosum*, *Botryosphaeriaceae*, ITS y EF1- α .

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca para la realización de mis estudios de Maestría.

Al Colegio de Postgraduados, programa de Fitosanidad-Fitopatología y al personal docente que formo parte de instrucción académica y fomento mi desarrollo profesional.

Al SENASICA por las facilidades otorgadas en el Área de Biología Molecular para la culminación de este proyecto, especialmente a mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biología Molecular y Laboratorio de Micología.

Al Dr. Daniel Téliz Ortiz por la dirección y guía durante el desarrollo mi maestría y de esta investigación.

A mis asesores: Dr. Carlos De León García de Alba, Dr. Daniel Nieto Ángel y Dr. Ángel Rebollar Alviter, gracias por la orientación y aportaciones a esta investigación.

A mis compañeros del Laboratorio de Enfermedades de Frutales, por el apoyo recibido durante mi estancia y los momentos compartidos.

A mis amigos: Adriana, Claudia, Edgar, Katya, Marisol, Noemí, Sandra, Raúl, gracias por su gran apoyo y amistad.

DEDICATORIA

CON AMOR PARA MIS PADRES.

Dolores Cruz Aparicio

y

Guillermo Maldonado Rosales

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
DEDICATORIA	vi
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE CUADROS.....	x
CAPITULO I	1
REVISIÓN DE LITERATURA	1
1. Origen.....	1
2. Tipos de arándano.....	1
3. Producción de arándano	4
3.1 Producción mundial	4
3.2 Producción nacional.....	6
4. Importancia en México	6
5. Enfermedades fungosas del arándano.....	7
5.1 Tizón del tallo	9
5.2 Antecedentes	9
6. Identificación de Botryosphaeriaceae.....	12
6.1 Genero Botryosphaeria	14
LITERATURA CITADA.....	15
CAPÍTULO II	19
Botryosphaeria spp PATÓGENOS DEL TIZÓN DEL TALLO EN ARÁNDANO EN MICHOACÁN, JALISCO Y COLIMA, MÉXICO.	19
RESUMEN	19
ABSTRACT	20
INTRODUCCIÓN	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Aislamientos.....	22
Extracción de ADN, amplificación y análisis filogenético.....	23
Pruebas de patogenicidad.....	24

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
Análisis filogenético.....	26
Pruebas de patogenicidad.....	27
CONCLUSIONES	30
LITERATURA CITADA.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Producción mundial de arándano por Regiones 2014.....	4
Figura 1.2 Principales países productores de arándano.....	5
Figura 1.3 Producción del cultivo de Arándano en México.....	6
Figura 2.1 Anamorfos de <i>Botryosphaeria</i> aislados de tallos de arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i>). A) Colonias de <i>Lasiodiplodia</i> sp. y B) <i>Neofusicoccum</i> sp. C) Conidios inmaduros, hialinos, aceptados de <i>Lasiodiplodia</i> sp. D) Conidios maduros, marrón con estrías longitudinales y un septo de <i>Lasiodiplodia</i> sp. E) Conidio hialino aseptado y fusiforme de <i>Neofusicoccum parvum</i>	25
Figura 2.2 Árbol filogenético combinado ITS y EF1- α de 26 secuencias en base al método Neighbor-Joining 1000 réplicas, utilizando el modelo Kimura 2 parámetro obtenidos de tallos enfermos de Arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i>). Grupo I: Aislamientos VA1, VA4, CDG9, ZM12, ZM13, ZM15, VA19, ZM20, R94, y CDG12. Grupo II: VA2, ZM31. Grupo III: CCDG2.....	27
Figura 2.3 Síntomas en arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i>) causados por la inoculación de <i>Lasiodiplodia</i> sp y <i>Neofusicoccum</i> sp. A) Marchitez foliar. B) Decoloración de flores marrón oscuro. C) Colapso y muerte de tallos.....	28

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Longitud de lesiones causadas por <i>Lasiodiplodia theobromae</i> , <i>L. pseudotheobromae</i> y <i>Neofusicoccum parvum</i> en tallos de arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i>) a los 7 días de la inoculación.	29
---	----

CAPITULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1. Origen

El arándano *Vaccinium* sp. es un género de arbustos terrestres de la familia Ericaceae, con aproximadamente 450 especies con amplia distribución geográfica, tanto en el hemisferio Norte como en las montañas de Asia tropical y Centro y Sur América, es una de las especies vegetales de más reciente domesticación. En 1906, el genetista Coville del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), inició los trabajos de mejoramiento genético con distintas especies silvestres de arándano. Estos trabajos fueron continuados y ampliados por White y Darrow. En la actualidad el USDA y diferentes universidades de América, Europa, Australia y Nueva Zelanda, han puesto en marcha programas de mejora genética con cruzamientos entre distintas especies, principalmente entre *V. corymbosum*, *V. angustifolium*, *V. myrtilloides*, *V. darrowi* y *V. ashei*. Como resultado de estos trabajos se han obtenido nuevas variedades. Uno de los mayores logros de los programas de mejoramiento genético ha sido la obtención de variedades con diferentes necesidades de horas de frío. (De Sebastián, 2011).

2. Tipos de arándano

La mayor parte de las variedades de arándano comercialmente importantes, provienen de las especies en la sección Cyanococcus incluyendo cultivares de *Vaccinium corymbosum* L. y *Vaccinium ashei* Reade (arándano ojo de conejo syn *Vaccinium virgatum* Ait) y rodales nativos de *Vaccinium angustifolium* Ait. (arándano bajo) (Hancock *et al.*, 2008), que se clasifican como sigue:

- a. Arándano alto del Norte: Corresponde a la especie *Vaccinium corymbosum*, nativa de la costa atlántica de Estados Unidos, proliferando en suelos arenosos, húmedos, con alto contenido de materia orgánica y capa freática poco profunda. Sus raíces fibrosas se desarrollan superficialmente sobre la capa de materia orgánica, generalmente a la semi sombra de los bosques. Es una especie tetraploide, de hoja caduca, y que en su mejoramiento se han introducidos genes de otras especies, como *V. angustifolium*, para hacerlas más tolerantes al frío. Arbitrariamente, se ha definido este grupo como todos aquellos cultivares que requieren más de 1000 horas frío, en base a 7°C. A este grupo pertenecen los cultivares que ocupan la mayor superficie de arándanos comerciales en el mundo, como Bluecrop, Berkeley, Duke, Jersey, Early Blue, Elliott, Blueray, Brigitta, Spartan, Patriot, Toro, Bluegold, y Aurora (Olivares, 2009).
- b. Arándano alto del Sur: Este es un grupo de cultivares también derivados principalmente de selecciones de *V. corymbosum*, al que además, en su mejoramiento se le han introducido genes de *Vaccinium darrowii*. Es una especie diploide de hoja perenne, que crece en forma silvestre en la zona de Florida y de la cual habría varios clones. Otra especie usada en este mejoramiento genético es *Vaccinium virgatum*, conocida como “rabbiteyes” u ojo de conejo. Este tipo de variedades son de floración temprana, demoran la caída de hojas en otoño o simplemente no la tiran, tienen menos tolerancia a las heladas, su fruto soporta mejor el calor durante la época de cosecha y probablemente sean más tolerantes a enfermedades de zonas cálidas como *Botryosphaeria* (tizón del tallo). Estos cultivares han aumentado su superficie de producción en las zonas más templadas o

- cálidas, como el sur de EUA (Georgia, Florida, California), centro de México, el Norte de Argentina, el Sur de España y el Centro Norte de Chile (Olivares, 2009).
- c. “Rabbiteyes” u ojo de conejo: Esta es una especie nativa del sureste de Estados Unidos, correspondiente a *Vaccinium virgatum* (ex ashei). Son plantas hexaploides, muy vigorosas, de cañas altas, muy tolerantes a suelos pobres y estrés hídrico. Requieren pocas horas frías (300 - 600) y son altamente productivas; tienen un largo período de flor a cosecha (entre 80 a 110 días) y eso las hace poco atractivas para producción temprana (Olivares, 2009).
- d. Arándano bajo: Este tipo de arándano corresponde básicamente a la producción de especies silvestres, principalmente *Vaccinium angustifolium*, que crecen en el noreste de EUA (Maine) y sur de Canadá (Quebec). Estas son plantas pequeñas, de 30 a 40 cm de altura, de raíz rizomatosa, que se cultivan como una especie de pradera y su cosecha es mecanizada o bien con un tipo de peineta manual que sirve para separar los frutos maduros del follaje. Tiene un manejo mínimo en cuanto a fertilización y control de plagas. Esta especie no tiene mayor importancia comercial para otras zonas del mundo, pero ha sido un importante aporte en el mejoramiento de los cultivares, otorgándoles resistencia al frío, mayor número de cañas basales, fruto firme y mejor calidad nutritiva (más antioxidantes) (Olivares, 2009).
- e. Híbridos: Estos corresponden a cruzamientos entre *V. corymbosum* y *V. angustifolium*. Tienen como objetivo lograr cultivares con suficiente tolerancia a bajas temperaturas invernales y a la vez con una buena calidad de fruta, especialmente en tamaño. Son plantas que pueden llegar a 1 m de altura, follaje compacto, fruto mediano y sus hojas son de un rojo brillante en otoño, muy ornamental (Olivares, 2009).

3. Producción de arándano

3.1 Producción mundial

Los arándanos son producidos comercialmente en 16 países en todo el mundo. Los rendimientos promedio han aumentado casi en un 50% en los últimos 10 años. La superficie sembrada también ha aumentado en un 37% (Ratnaparkhe, 2007).

A nivel mundial se siembran 110835 ha, de acuerdo a estimaciones internacionales (Brazelton, 2014), la superficie plantada de arándanos de arbusto alto a nivel mundial se encuentra distribuida de la siguiente manera: Norteamérica 55541 ha, México y América Central 2181 ha, Sudamérica 20178 ha, Europa 19631 ha, Asia y Pacífico 11434 ha, Mediterráneo y África 943 ha y Sudáfrica 523 ha (Brazelton, 2014). El 52% de la producción mundial se concentra en Norteamérica (Fig. 1).

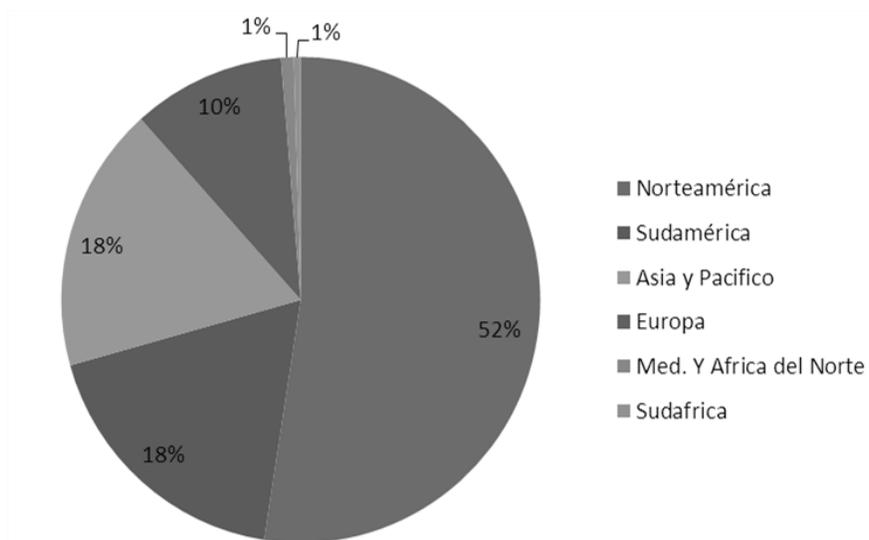


Figura1.1. Producción mundial de arándano por Regiones 2014.

La producción del cultivo, se ha ampliado recientemente a las áreas de producción no tradicionales de baja latitud, como el Norte de Chile y Argentina, México y España con rendimientos muy prometedores. Todas estas áreas se caracterizan por tener baja acumulación de horas frío durante el invierno acompañados por primaveras y veranos cálidos (Bañados, 2009). A nivel mundial, los principales productores de arándano son Estados Unidos, Chile y Canadá con el 48%, 19% y 13%, respectivamente. México ocupa el noveno lugar, está dentro de los diez países con los mayores rendimientos, con una producción de 521583 ton, representa el 2% de la producción total (Fig. 2) (Brazelton, 2014).

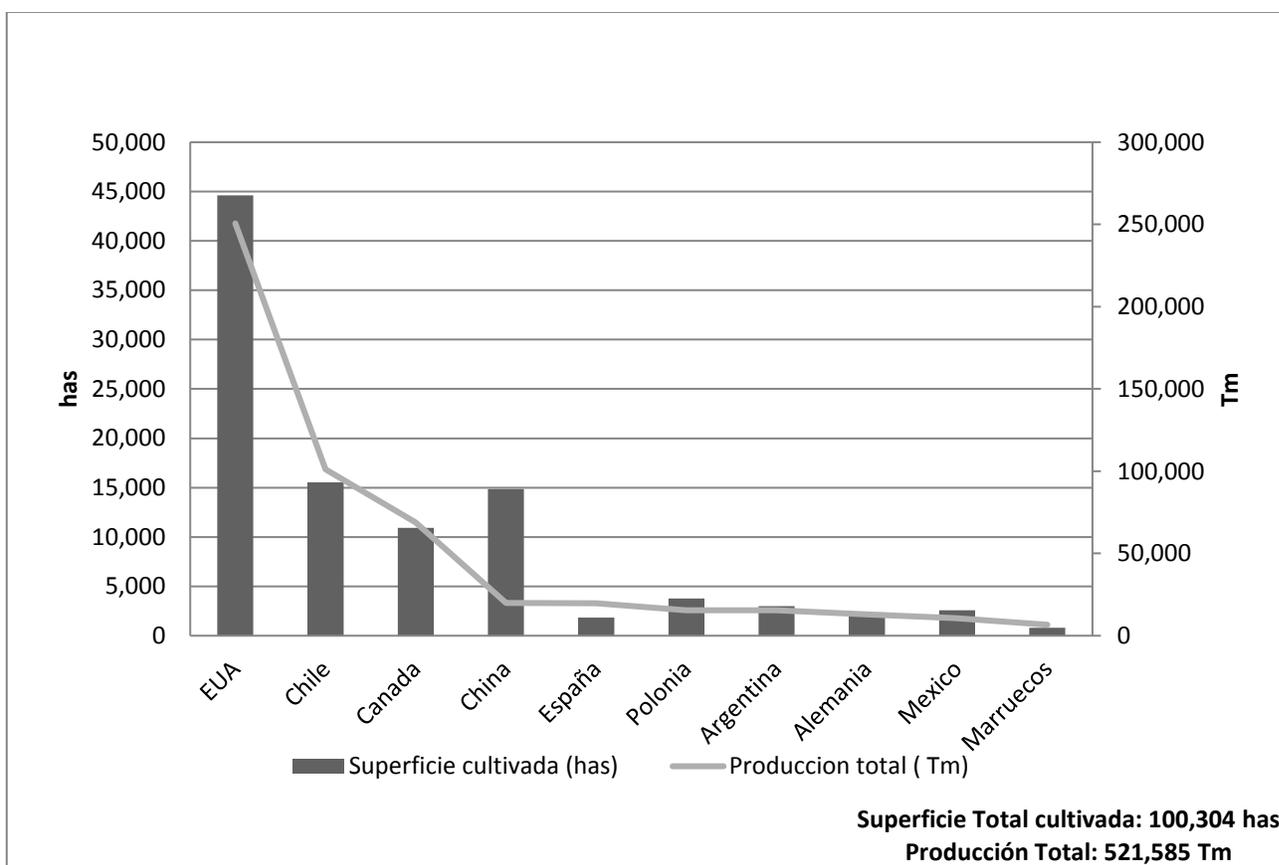


Figura 1.2 Principales países productores de arándano.

3.2 Producción nacional

El cultivo de arándano es relativamente nuevo en México, se produce desde 1999 en el estado de Puebla, con una superficie promedio de 58 hectáreas durante el período 1999-2010, con rendimientos por ciclo de alrededor de 6 t/ha (González, 2013). El arándano se cultiva en los siguientes estados: Jalisco (1244 ha), Colima (307 ha), Michoacán (245 ha), Sinaloa (350 ha), Baja California (220 ha), Puebla (210 ha) Sonora (34 ha), y Estado de México (13ha). (Fig. 3) (SAGARPA, 2016).

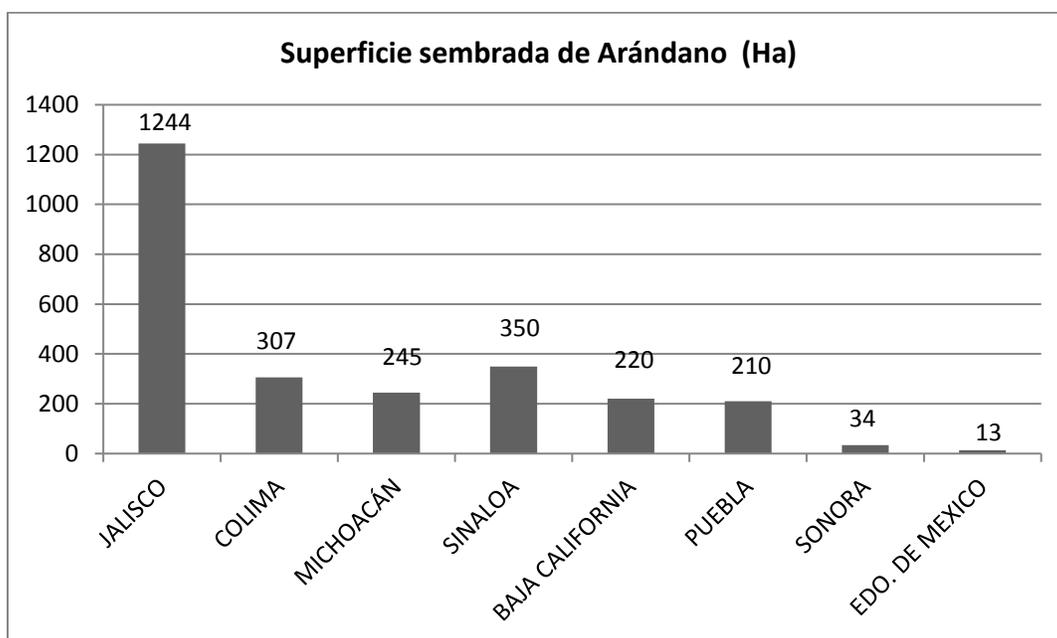


Figura 1.3 Producción del cultivo de Arándano en México.

4. Importancia en México

La industria mexicana del arándano es relativamente nueva, su participación mundial está destacando, impulsada por las ventajas comparativas y competitivas que ofrece para la producción de este cultivo como la cercanía con los mercado de exportación, principalmente a E.U, costo de mano de obra relativamente bajo comparado con otros

países productores, las condiciones edafoclimáticas óptimas para el desarrollo del cultivo y la época de producción en los meses de altos precios (noviembre-marzo). Debido a esto, empresas norteamericanas y chilenas, han decidido invertir en México para impulsar el desarrollo de esta industria. Los gobiernos regionales, como el caso de Jalisco, en coordinación con la Fundación Produce Jalisco, visualiza la implementación de una cadena productiva integral donde se incluya capacitación y transferencia de tecnología; involucrando a aproximadamente 800 productores (Bascope, 2013).

Se proyecta que México será un actor importante en la producción de arándanos frescos en el futuro. Las empresas de arándanos en México están apuntando a la ventana de la producción de abril-mayo, época de producción entre América del Sur y América del Norte (García-Salazar, 2011).

5. Enfermedades fungosas del arándano

El arándano es una especie vigorosa, de rápido crecimiento y altos rendimientos, susceptible a varias enfermedades que pueden alterar su desarrollo, acortar su vida productiva y afectar la calidad y cantidad de fruta (Undurraga y Vargas 2013).

Los hongos fitopatógenos más comunes de arándano son: a) los que causan daño en los frutos y flores causados por *Monilinia vaccinii-corymbosi* Reade que provoca la momificación de frutos, (Hancock, 2008), se registra como el mayor problema en la producción de Norteamérica, a menudo confundido por infecciones causadas por *Botrytis cinerea* que ocurren ocasionalmente, y que puede ser muy destructivo cuando se presenta y la antracnosis causada por *Colletotrichum acutatum* Simmonds, su daño se manifiesta afectando directamente la calidad poscosecha de la fruta (Prodorutti *et al.*, 2007).

b. En otro grupo se incluye a los hongos foliares que causan manchas, tizón de brotes y canchros: *Septoria albopunctata* Cooke, y *Gloesporium minus* Shear que inducen tizón y defoliación prematura, afectando también la formación de yemas florales. Tizón del tallo causado por *Botryosphaeria dothidea* (Moug: Fr.) Ces y de no.). Cancro del tallo *Botryosphaeria corticis* Demaree y Wilcox, cancro por Phomopsis, *Phomopsis vaccinii* Shear (Hancock 2008). Este último solo está presente en Norteamérica y Chile (Prodorutti et al, 2007). El oidio, *Microsphaera vaccini* Schwein, presente frecuentemente en huertos de Estados Unidos y que aún no se encuentra en otros países, es considerado un patógeno de importancia económica (Prodorutti et al, 2007). La roya, *Thekopsora minima* se considera la principal enfermedad en vivero, que en infecciones severas puede llegar a reducir la producción de brotes en un 30% (Lynch, 2009); en México se registró en el 2007 causando defoliación e infecciones graves en los estados de Jalisco y Michoacán (Rebollar et al., 2011).

c. Finalmente, los patógenos que provocan pudrición de raíz, *Armillaria mellea* y *Armillaria gallica*, afectan a una amplia gama de huéspedes de plantas, que por lo regular se encuentran en áreas donde se ha eliminado la vegetación nativa para su conversión en un campo de arándanos. El hongo se propaga en el suelo a través de rizomorfos (Pscheidt y Weiland, 2015). Por su parte, *Phytophthora cinnamomi* Rands, provoca infecciones graves haciendo que el sistema radicular se vea reducido, se presenta clorosis, enrojecimiento y defoliación de hojas, muerte de ramas, retraso en el crecimiento, y la muerte de total de la planta (Ellis y Nita, 2006). La pudrición de raíces por *Phytophthora* junto con el tizón del tallo son las principales enfermedades registradas en plantas de arándano alto en E.U.A (Smith, 2006).

5.1 Tizón del tallo

La enfermedad del tizón del tallo en arándano ha sido atribuida a miembros de la familia Botryosphaeriaceae dentro del género *Botryosphaeria* (Millholland, 1972; Wright y Harmon, 2009; Rebollar *et al.*, 2016). Un aspecto recientemente reconocido de Botryosphaeriaceae es su habilidad para infectar hospederos y persistir como patógenos endofíticos latentes. Antes de esto, se creía que estos hongos eran patógenos sistémicos (Mehl, 2013). Otros estudios han confirmado que prácticamente todas las especies in la familia ocupan una planta huésped endófitamente para pasar una parte de sus ciclo de vida (Slippers y Wingfield, 2007).

Las especies de *Botryosphaeria* son de distribución cosmopolita y se producen en una amplia gama de monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas en ramas leñosas, hojas herbáceas, tallos de gramíneas; sobre brotes y en los talos de líquenes (Denman *et al.*, 2000).

5.2 Antecedentes

Esta enfermedad fue reportada en 1972 afectando al arándano alto en Estados Unidos y en huertos muestreados en el sureste de Carolina del Norte. (Millholland, 1972). Desde entonces, en el Sureste de los Estados Unidos (Carolina del Norte, Georgia, Florida, Alabama y Mississippi) se presenta *Botryosphaeria dothidea* y *Botryosphaeria corticis* causando tizón y cancro del tallo en arándanos altos cultivados y silvestres y en el arándano ojo de conejo silvestre (Espinoza *et al.*, 2009); es presenta como la principal enfermedad que limita el establecimiento de nuevas plantaciones de arándano alto en el norte de Carolina (Cline *et al.*, 1993). La incidencia de esta enfermedad es tan alta que las nuevas plantaciones se ven seriamente reducidas en productividad o totalmente destruidas antes de

que entren en plena producción (Espinoza *et al.*, 2009). El tizón del tallo en Estados Unidos se ha atribuido principalmente a *Botryosphaeria dothidea*. Sin embargo, en un estudio en Florida (Wright y Harmon, 2009), se inspeccionaron tallos de arándano con síntomas que incluían necrosis de ramas con hojas adheridas y decoloración vascular que se extendía en todas las rama afectadas. Los resultados arrojaron como agentes causales a *Botryosphaeria dothidea* y *Neofusicoccum parvum* que previamente han sido reportados causando esta enfermedad, adicionalmente *Lasiodiplodia theobromae* fue identificado; este fue el primer reporte de este patógeno causando tizón de tallo en arándano (Wright y Harmon, 2009).

En Nueva Zelanda, se reportaron diferentes especies de *Botryosphaeria* causando muerte descendente y pudrición de la corona con pérdidas del 18 % de las plantaciones en las principales áreas de producción de arándano; estas fueron identificadas como; *B. lutea*, *B. parva*, *B. australis* (Sammonds *et al.*, 2009).

En 2010 en China, fue reportado a *Botryosphaeria dothidea* causando tizón del tallo en arándano alto en huertos comerciales en Lijiang y Zongdian, en la provincia de Yunnan, con daños del 10 al 15% (Yu *et al.*, 2016).

En Buenos Aires Argentina, se reportó por primera vez a *Neofussicocum parvum* como patógeno de *V. corymbosum* 'Brighitta' y 'Duke' causando tizón de ramas y tallo con una incidencia del 40% provocando ocasionalmente la muerte de plantas. (Wright *et al.*, 2012).

En México, se cultivan variedades tipo arándano alto del Sur, las cuales han mostrado ser susceptibles al cáncer o tizón del tallo. Esta enfermedad fue detectada en arándano (*Vaccinium corymbosum* cv. 'Biloxi') entre 2011 y 2014, en sistemas de producción de túnel y campo abierto en Michoacán y Jalisco, con síntomas como un resquebrajamiento de la

base del tallo, las hojas se tornaron color marrón claro, ya muertas permanecieron unidas al tallo, tizones en el tallo y muerte regresiva fueron observados; la especie identificada fue *Neofusicoccum parvum* (Rebollar *et al.*, 2016); se registraron niveles de incidencia de la enfermedad de hasta el 41 %. (Mondragón *et al.*, 2012). Otros agentes causales asociadas a esto síntomas fueron identificados como *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Pestalotiopsis photiniae* y *P. microspora* (Rebollar *et al.*, 2013).

5.1.2 Síntomas

Los síntomas de tizón del tallo incluyen amarillamiento, marchitez, y hojas café-bronceado sobre cañas individuales. El tejido leñoso de las ramas infectadas es de color marrón, con frecuencia se observa a un solo lado del tallo afectado (Millholand, 1972). El hongo se disemina hacia abajo a través del tejido vascular hasta la base de la planta. El marchitamiento se produce tan rápidamente que el tallo no se deshoja antes de morir, lo que resulta en un tallo muerto con las hojas marrones adheridas a él. Los síntomas de tizón del tallo generalmente se hacen evidentes en junio, poco después de la cosecha y el desarrollo de la enfermedad se puede observar a lo largo de los meses de verano. Temperaturas por debajo de 0°F causan grietas en las horquillas de los tallos, lo que resulta en epidemias relacionadas con el principio de la temporada (Cline, 2016).

Plantas jóvenes mueren rápidamente dentro de 1 a 2 años posteriores a la siembra. La tasa de mortalidad es más alta cuando la infección se desarrolla cerca o en la corona. El hongo pasa el invierno en los tallos infectados y la infección primaria ocurre por ascosporas o conidios a finales de primavera. La temperatura óptima para el crecimiento y la esporulación del hongo es de 25 a 28 °C (Michigan State University, 2014).

6. Identificación de Botryosphaeriaceae

Esta familia de hongos ha tenido una historia taxonómica confusa, con nombres inicialmente vinculados a los hospedantes y a características morfológicas. Las especies de *Botryosphaeria* son difíciles de separar en base a las características de su teleomorfo y su morfología difiere poco entre especies (Phillips *et al.*, 2005), esto sumado a que los teleomorfos de las especies de este grupo rara vez se observan en la naturaleza o en condiciones de laboratorio, por lo tanto, se considera que presentan poco valor taxonómico debido a la superposición de características morfológicas (Slippers *et al.*, 2004). Mientras que las especies anamorficas presentan un amplio rango de características (Luque y Phillips, 2005); por lo que su morfología por lo general se ha adoptado para identificar las especies de Botryosphaeriaceae, pero esto no ha podido resolver la separación especies estrechamente relacionadas (Denman *et al.*, 2000; Slippers *et al.*, 2004).

La aparición del análisis filogenético basado en el análisis del ADN ha permitido una clasificación más natural de Botryosphaeriaceae (Crous *et al.*, 2006), los métodos de secuenciación de ADN proporcionan fuertes herramientas para determinar las relaciones filogenéticas en los hongos en los distintos niveles taxonómicos desde órdenes hasta especies (Phillips *et al.*, 2013). Schoch *et al.* (2006) construyó una filogenia multigénica de 96 taxones Dothideomycetes, basada en los genes SSU, 28S RNA (LSU), EF1- α y RPB2 de secuencias, esto mostró que especies de *Botryosphaeria* y *Guignardia* formaron un clado que no pudo ser asociado con ningún otro. Por esta razón se propuso un nuevo orden Botryosphaeriales que incluye una única familia Botryosphaeriaceae (Phillips *et al.*, 2013).

Las comparaciones de secuencias de ADN por diversas regiones de genes han dado lugar a una nueva evaluación de Botryosphaeriaceae, y numerosos géneros y especies se han propuesto (Denman *et al.*, 2000, Phillips *et al.*, 2005, Crous *et al.*, 2006).

En diversos estudios se ha utilizado secuencias de ADN del gen ITS para determinar las especies involucradas patologías de muerte regresiva y canchales (Denmann *et al.*, 2000, Phillips *et al.*, 2005). La mayoría de los estudios taxonómicos sobre Botryosphaeriaceae usando secuencias de ADN han utilizado el gen ITS, sin embargo el uso de este único gen puede minimizar la verdadera diversidad de especies, entre especies estrechamente relacionadas o crípticas (Phillips *et al.*, 2005; Slippers y Wingfield, 2007).

Por lo anterior, se ha recurrido al uso de secuencias de genes adicionales, tales como secuencias parciales del gen β -tubulina y factor de elongación 1 alfa (EF1 α), y el análisis multi-locus de los genes SSU, ITS, LSU, junto con β -tubulina y EF1- α (Phillips *et al.*, 2013); apoyado con la descripción morfológica de las especies en cada género, para diferenciar entre ellas dentro Botryosphaeria y establecer las relaciones filogenéticas entre géneros (Slippers *et al.* 2004, Van Niekerk *et al.* 2004, Phillips *et al.*, 2005, Phillips *et al.*, 2013). Frecuentemente, los datos de factor de elongación 1 alfa (EF1 α) combinados con secuencias ITS; han sido más utilizados en la identificación de especies crípticas o de identidad incierta previamente estudiadas dentro de Botryosphaeriaceae (Phillips *et al.*, 2005; Slippers y Wingfield, 2007).

Los morfos asexuales de Botryosphaeriaceae han sido asignado a varios géneros Coelomycete: *Aplosporella*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Fusicoccum*, *Lasiodiplodia*, *Macrophomina*, *Microdiplodia*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium*, y *Pseudofusicoccum*

Sphaeropsis, varios de estos se relacionan con la especie sexual *Botryosphaeria* (Denman *et al.*, 2000).

6.1 Genero Botryosphaeria

El género *Botryosphaeria* fue introducido en 1863 por Cesati y De notaris, quienes designaron como especie tipo a *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. &De Not. en este tiempo el taxón fue establecido en el grupo llamado *Sphaeria* (Denmann, 2000). Las especies anamórficas de *Botryosphaeria* han sido asignadas a 18 géneros de Coelomycete, entre los cuales los más comunes son *Botryodiplodia* (Sacc.) Sacc., *Diplodia* P., *Dothiorella* Sacc., *Fusicoccum* Corda, *Lasiodiplodia* Ellis & Everh., *Macrophoma* (Sacc.) y *Sphaeropsis* Sacc. (Denmann *et al.*, 2000; Phillips *et al.*, 2005).

Las especies de este género se encuentran en todas las regiones templadas, tropicales y subtropicales del mundo, al parecer, sólo no se encuentran en las regiones polares. Se presentan en un amplio rango de hospedantes monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas causando muerte regresiva, chancros, escobas de bruja y tizones foliares, o como endófitos. Se les describe con frecuencia como patógenos débiles u oportunistas que causan la enfermedad en hospedantes sometidos a estrés.

Las especies de este grupo representan gran diversidad y sobresalientes componentes de muchas comunidades endófitas, los factores que influyen en su patogenicidad no siempre son claros y por consiguiente su importancia como hongos cuarentenarios son pobremente definidos, su presencia y su papel ecológico en las comunidades vegetales no han sido muy estudiados. Dificultades para abordar estas cuestiones e interpretarlas, es trabajo especialmente difícil (Slippers y Wingfield, 2007).

LITERATURA CITADA

- Bañados, M. P; Strik, B. 2009. Manipulation of the annual growth cycle of blueberry using photoperiod. *Acta Hort.* 715:65-72.
- Bascope A. 2013. Realidad productiva del arándano en EE.UU. y México. ODEPA. Santiago de Chile. <http://www.agrimundo.cl/wp-content/uploads/Informe-ArandanoVF21012013.pdf>. Consultado noviembre 2015.
- Brazelton C. 2014. World blueberry acreage and production. Blueberry Council. U.S. <http://dev.manicmoosemedia.com/SERegional/wp-content/uploads/4.-Cort-Brazelton-World-Blueberry-Acreage-and-Production-2016.pdf>. Consultado junio 2016.
- Cline W, O., D. Milholland R., D. Rooks S., and R. Ballington J. 1993. Techniques in breeding for resistance to blueberry stem blight caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Acta Hort.* 346, 107-110. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1993.346.14>.
- Cline W, O. 2016. Stem blight of blueberry Fruit Disease Information Note 9. Extension Plant Pathologist. <http://articles.extension.org/pages/29307/stem-blight-of-blueberry>.
- Crous, P. W., B. Slippers, M. J. Wingfield, J. Ruediger, W. F. O. Marasas, A. J. L. Philips, A. Alves, T. Burgess, P. Barber, and J. Z. Groenwald. 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology*. 55: 235–253.
- Denman S., P. Crous W., JE. Taylor, JC. Kang, I. Pascoe, MJ. Wingfield. 2000. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria* and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology* 45:129–140.
- De Sebastián P. J.I 2011. Los frutos del bosque o pequeños frutos en la cornisa cantábrica: El arándano. Gobierno de Cantabria. Consejería de Desarrollo Rural, Ganadería, Pesca y Biodiversidad. http://cifacantabria.org/Documentos/2011_arandano.pdf. Consultado agosto 2016.
- Ellis and Nita. Organic Small Fruit Disease Management Guidelines: Integrated Management of Blueberry Diseases. <http://www.oardc.ohio-state.edu/fruitpathology/>. Consultado mayo 2015.
- Espinoza J. G., E. Briceño X., E. Chávez R., J. Úrbez-Torres R. and A. Latorre B. 2009. *Neofusicoccum* spp. Associated with Stem Canker and Dieback of Blueberry in Chile. *Plant Disease*. 93:1187-1194.
- García-Salazar C. 2011. Blueberry production south of the border. Extensión de la Universidad del Estado de Michigan. http://msue.anr.msu.edu/news/blueberry_production_south_of_the_border. Consultado febrero 2016.

- González M. E. 2013. Cultivo del arándano, una opción más para el Sur de Sinaloa. http://www.fps.org.mx/divulgacion/ind_Manipulation_of_the_anual_growth_cycle_of_blueberry_using_photoperiod_ex.php?option=com_content&view=article&id=1257:cultivo-del-arandano-una-opcion-mas-para-el-sur-de-sinaloa&catid=37:sinaloa-produce&Itemid=373. Consultado febrero 2014.
- Hancock, F. J., P. Lyrene, C.E. Finn, N. Vorsa, G.A., Lobos. 2008. Blueberries and cranberries. Springer, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 115-150 pp.
- Lynch, K. 2009. Leaf Diseases of Wild Blueberry. Factsheet C.3.3.0. New Brunswick Department of Agriculture, Aquaculture and Fisheries. <http://www2.gnb.ca/content/dam/gnb/Departments/10/pdf/Agriculture/WildBlueberries-BleuetsSauvages/0171100029-e.pdf>. Consultado marzo 2016.
- Mehl, J. W. M, B. Slippers, J. Roux, and M. J. Wingfield. 2013. Cankers and other diseases caused by the Botryosphaeriaceae. In: Infectious Forest Diseases. Gonthier, P. and G. Nicolotti (eds.). CABI. pp: 298-317.
- Michigan state University. Botryosphaeria stem blight. <http://msue.anr.msu.edu/uploads/files/Botryosphaeria%20stem%20blight.pdf>. Consultado Junio 2014.
- Millholland R.D. 1972. Histopathology and pathogenicity of Botryosphaeria dothidea on blueberry stems. *Phytopathology*. 62: 654-660 pp.
- Mondragón F. A., J. López M., S. Ochoa A., y M. Gutiérrez C. 2012. Hongos Asociados a la Parte Aérea del Arándano en Los Reyes, Michoacán, México *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:141-144.
- Olivares B. R. 2009. Cultivares de Arándanos para la Zona Norte de Chile. Driscoll's de Chile. http://bp.driscolls.cl/plataformas/web_corporativa_v2/presentacion/nuestros_berreries.aspx?id=10.
- Phillips A. J. L., A. Alves, A. Correia, J. Luque. 2005. Two new species of Botryosphaeria with brown, 1-septate ascospores and Dothiorella anamorphs. *Mycologia* 97:513-529.
- Phillips A.J. L., A. Alves., J. Abdollahzadeh., B. Slippers., M. Wingfield J., J. Groenewald Z., and P. Crous W. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology* 76: 51–167.
- Pscheidt J. and Weiland J. 2015. Blueberry bacterial and fungal diseases. University Oregon. http://oregonstate.edu/dept/NWREC/sites/default/files/pg_programs/berry/documents/107-113-blueberry_bacterial_and_fungal_diseases.pdf Consultado: Junio 2016.
- Prodorutti D., I. Pertot, L. Giongo, C. Gessler. 2007. Highbush Blueberry: Cultivation, protection, breeding and biotechnology. *The European journal of plant science and biotechnology* . 1: 44-56.

- Ratnaparkhe M. R. 2007. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. Fruits and Nuts. Chapter 10 Blueberry Springer- Verlag, Berlin Heidelberg. pp 217-227. doi:10.1007/978-3-540-34533-6_10.
- Rebollar-Alviter, A. Minnis M., L. Dixon J., L. Castlebury A, M. R. Ramírez-Mendoza , H. V. Silva-Rojas., G. Valdovinos-Ponce. 2011. First Report of Leaf Rust of Blueberry Caused by *Thekopsora minima* in Mexico. Plant disease 95:772. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-12-10-0885>.
- Rebollar A., A., J. Boyzo M., H. V. Silva R., G. Ramirez, 2013. Fungi and oomycete pathogens causing stem blight and root rots on blueberry in central Mexico. Phytopathology, 113, S119.
- Rebollar A., A., J. Boyzo M., H. V. Silva R., and G. Ramirez M. 2016. First Report of *Neofusicocum parvum* Causing Stem Blight and Dieback of Blueberry in Mexico. Plant Disease. In press: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0381-PDN>
- SAGARPA, 2014. Agricultura producción anual. Cierre de la producción por cultivo. <http://www.siap.go.mx>. Consultado septiembre 2016.
- Sammonds J., R. Billones, M. Rocchetti., Ridgway, H, J., Walter M, and Jaspers. M, V. 2009. Survey of blueberry farms for *Botryosphaeria* dieback and crown rot pathogens. New Zealand Plant Protection 62: 238-242.
- Slippers B, P. Crous W., S. Denman, T. Coutinho A., B. Wingfield D., M. Wingfield J. 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. Mycologia 96:83–101.
- Slippers, B. and M. Wingfield, J. 2007. *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. Fungal biology Reviews 21:90-106.
- Schoch, C. L., Shoemaker, R. A., Seifert, K. A., Hambleton, S., Spatafora, J. W., & Crous, P. W. (2006). A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. Mycologia. 98:1041-1052.
- Smith, B.J. 2006. *Phytophthora* root rot and *Botryosphaeria* stem blight: important diseases of southern highbush blueberries in the southern United States. Acta Hort. 715:473-480.
- Undurraga, P., y Vargas, S. 2013. Manual del arándano. Boletín INIA N° 263. 120 p. Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Chillán, Chile.
- Wright, A. F., and, P. Harmon F. 2009. First report of *Lasiodiplodia theobromae* associated with stem blight of southern highbush blueberries in Florida. Plant Disease, 93: 962-962.

- Wright, E. R., Mandolesi A, Rivera M. C., Pérez B.A., Mezzetti B., Brás de Oliveira P. 2012. *Neofusicoccum parvum*, blueberry pathogen in Argentina. *Acta Horticulturae* 926:619-623.
- Yu, L., Rarisara, I., Xu, S. G., Wu, X., and Zhao, J. R. 2016. First report of stem blight of blueberry caused by *Botryosphaeria dothidea* in China. *Journal of Integrative Agriculture* Mar, 15:573-579.

CAPÍTULO II

Botryosphaeria spp PATÓGENOS DEL TIZÓN DEL TALLO EN ARÁNDANO EN MICHOACÁN, JALISCO Y COLIMA, MÉXICO.

**Edith Maldonado Cruz, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2016.**

RESUMEN

El tizón o cancro del tallo se registró por primera vez en Michoacán y Jalisco entre 2012 y 2014 y atacó hasta un 41% plantas de arándano (*Vaccinium corymbosum*). Para identificar al patógeno se colectaron 268 tallos de arándano con síntomas de marchitez, necrosis vascular y sectorial y muerte descendente en Michoacán Jalisco y Colima durante 2014-2015. Aislamientos *Botryosphaeria* fueron identificados en 137 (51%) de 268 tallos de arándano colectados durante 2014-2015, con síntomas de marchitez, necrosis vascular y sectorial y muerte descendente en Michoacán, Jalisco y Colima. Trece de estos aislamientos se caracterizaron; seis de Michoacán, tres de Jalisco y cuatro de Colima asociados a tizón del tallo y se agruparon molecularmente (método de neighbor joining con primers ITS y genes parciales EF1- α) en tres especies: *Lasiodiplodia theobromae*, *L. pseudotheobromae* y *Neofusicoccum parvum*. La especie aislada con mayor frecuencia fue *L. pseudotheobromae* un 77%. Los tres grupos filogenéticos causaron lesiones de 16.9 a 87mm en el tallo de plantas de arándano var. Biloxi. Las dos especies de *Lasiodiplodia* fueron más patogénicas que *Neofusicoccum parvum*. Este es el primer reporte de *L. theobromae* causando Tizón del tallo del arándano en México; y el primer reporte de *L. pseudotheobromae* en arándano en Colima.

Palabras clave: *Vaccinium corymbosum*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum parvum*, ITS y EF1- α .

**Botryosphaeria spp PATHOGENS OF BLUEBERRY (*Vaccinium corymbosum*)
STEM BLIGHT IN MICHOACAN, JALISCO AND COLIMA, MEXICO.**

**Edith Maldonado Cruz, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2016.**

ABSTRACT

Blueberry (*Vaccinium corymbosum*) stem blight was first registered in 2016 in Michoacan, Mexico. To identify the pathogen 268 blueberry stems with symptoms of wilting, vascular necrosis and dieback were collected from the states of Michoacan, Jalisco, and Colima, Mexico, during 2014-2015. *Botryosphaeria* was identified in 137 (51%) of PDA isolations. Six isolations from Michoacan, three from Jalisco and four from Colima were characterized and molecularly grouped (neighbor joining method with ITS primers and EF1- α partial genes) in three species: *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (77% frequency), *L. theobromae* and *Neofusicoccum parvum*. The three groups were pathogenic causing 17 to 87 cm lesions on inoculated stems of blueberry plants, var. Biloxi. The two *Lasiodiplodia* species were more pathogenic than *N. parvum*. This is the first report of *L. theobromae* causing blueberry stem blight in Mexico; and the first report of *L. pseudotheobromae* in blueberry from Colima.

Key words: *Vaccinium corymbosum*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum parvum*, ITS y EF1- α .

INTRODUCCIÓN

Las frutillas (*Fragaria ananassa*, *Rubus ulmifolius*, *Rubus idaeus* y *Vaccinium corymbosum*) se cultivan en México y son el quinto captador de divisas. Esta actividad genera 200 mil empleos directos e indirectos al año y tiene un valor comercial de más de 900 millones de dólares anuales (SAGARPA, 2014a). El arándano es un cultivo de reciente introducción en México; en 1993 se sembraron 175 ha que se incrementaron en 2014 a 1,843 ha y una producción de 18,031 t de fruta (SAGARPA, 2014 b). El tizón o cancro del tallo se presentó en Michoacán y Jalisco entre 2012 y 2014 *Neofusicoccum parvum* anamorfo de *Botryosphaeria* sp se identificó como agente causal (Rebollar *et al.*, 2016). En huertos comerciales en Los Reyes Michoacán se registró la muerte de plantas y una incidencia de 41% por esta enfermedad (Mondragón *et al.*, 2012). También se han registrado como agentes causales a *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Pestalotiopsis photiniae* y *P. microspora* (Rebollar *et al.*, 2013). Las especies de *Botryosphaeria* causan muerte regresiva, canchros, proliferación de ramas e inflorescencias y tizones foliares y pueden ser endófitos en muchos hospedantes dentro de monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas (Phillips, 2004). Estados Unidos es el mayor productor de arándano en el mundo y el tizón o cancro del tallo es la enfermedad de mayor importancia económica, causando la muerte prematura de las plantas (Wright *et al.*, 2010). Miembros de *Botryosphaeria* se han reportado en México causando tizón del tallo en pitahaya (Valencia *et al.*, 2004), muerte descendente en mamey (Vásquez *et al.*, 2009), pudrición de la corona y canchros provocados en eucalipto (De la Mora *et al.*, 2014), pudrición del pedúnculo en mango (Sandoval *et al.*, 2013) y mancha negra en frutos de aguacate (Molina *et al.*, 2014).

El presente estudio tuvo por objetivo precisar los patógenos del tizón del tallo en la zona productora de arándano de Michoacán, Jalisco y Colima, y determinar su patogenicidad, para generar información para el diseño de programas de manejo de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una colecta de 268 tallos con síntomas de marchitez, tizón de tallo y muerte regresiva de ramas en huertos comerciales de arándano, en agosto 2014 en Zamora Michoacán, en noviembre 2014 en Ciudad Guzmán, Jalisco, en marzo 2015 en Villa de Álvarez, Colima, y en abril de 2015 en Los Reyes, Michoacán. Se colectaron de 2 a 3 tallos de aproximadamente 15 cm, por cada planta con diferente grado de avance de la enfermedad.

Aislamientos

Nueve segmentos por tallo, de aproximadamente 5 mm³ de la zona de avance de los síntomas se desinfectaron por inmersión en alcohol al 70% durante 1 min y luego en una solución de hipoclorito de sodio al 3 % por 3 min. Posteriormente se lavaron por 3 min con agua destilada estéril, se secaron a temperatura ambiente del laboratorio y se sembraron en cajas Petri con papa-dextrosa-agar acidificado. Las cajas se incubaron a 26 °C y las colonias se purificaron mediante punta de hifa en PDA (Bioxon®). Treinta colonias puras se identificaron morfológicamente a género con las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998). Para inducir su esporulación, se sembraron en agua-agar 2%+ acículas de pino (Espinoza *et al.*, 2009). En base a su morfología, micelio esponjoso blanco cremoso o pigmentado de color marrón verdoso o gris a gris negro, que representan potencialmente al grupo Botryosphaeriaceae (Mehl *et al.*, 2013) se seleccionaron trece colonias.

Extracción de ADN, amplificación y análisis filogenético

El ADN de las trece colonias se aisló de micelio de 5 días de crecimiento, el que fue procesado por el método de CTAB (Sambrook, and Russell, 2001). Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 25 μ L con 2.5 μ l de buffer 10 \times PCR, 0.1 mM de dNTPs (Invitrogen[®]), 0.4 μ M de cada uno de los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990), genes parciales α -EF1, primers EF1-688F y EF1-1251R (Phillips *et al.*, 2005), 1.25 U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen[®]), y 100 ng de cada extracto de ADN. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Applied Biosystems, 2720[®]), utilizando el programa descrito por White (1990). Para α -EF se siguió la metodología propuesta por Phillips *et al.* (2005). Posteriormente, 5 μ L de este producto se analizaron en geles de agarosa 1.5% (p/v) (PROMEGA[®]) preparados en TAE 1 X (40 mM Tris-acetato, 1 mM Na₂ EDTA) y teñidos con bromuro de etidio (Promega[®]). Los productos de PCR fueron secuenciados en ambas direcciones (Macrogen).

El conjunto de secuencias analizadas se compararon con otras de los genes ITS y α -EF1, depositadas en el Genbank. Como grupo raíz estrechamente relacionado con *Botryosphaeria* se seleccionó a *Nectria aurantiaca*. Las secuencias fueron editadas manualmente con el programa Mega 6.0. El alineamiento múltiple se realizó con clustal W. Se construyó un árbol filogenético concatenado con los genes ITS y EF1- α , por el método Neighbor-Joining, con valores Bootstrap de 1000 repeticiones (Tamura *et al.*, 2013). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método Kimura- 2 parámetro. Se analizaron 26 secuencias de nucleótidos 670 posiciones.

Pruebas de patogenicidad

Cinco aislamientos (VA2, VA19, ZM12, R94, y CDG2) se eligieron en base a la separación por especies resultado del análisis filogenético y correspondientes a diferentes regiones. Cuatro plantas de arándano var. Biloxi de año y medio de edad se inocularon en cámaras bioclimáticas (26°C, 75% H.R) y como testigo, una planta se inoculó con discos de PDA sin micelio, en un diseño completamente al azar. La inoculación se realizó desinfectando tres tallos por planta con alcohol 70% a los que se hizo una punción a 40 cm de la corona y posteriormente se colocó un disco (5 mm) con micelio de seis días de edad del aislamiento seleccionado y se fijó con parafilm. A los tres días después de la inoculación se registró la longitud de la lesión, durante siete días. La homogeneidad de los datos fue verificada mediante la prueba de Levene ($P < .0001$). Después de esta prueba los datos fueron sometidos a una comparación de medias por diferencia mínima significativa (DMS) ($p \leq 0.05$) usando el programa SAS (9.0v).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Lasiodiplodia fue identificado en 131 (49%) y *Neofusicoccum* en 6 (2%) de los 268 tallos de arándano con síntomas de marchitez, necrosis vascular y sectorial y muerte descendente de tallos, colectados en Michoacán, Jalisco y Colima. Los aislamientos presentaron inicialmente micelio blanco que cambió a gris, gris verde y gris oscuro (Figura1-A y B). *Lasiodiplodia* sp presentó conidios hialinos, aseptados, de forma elipsoide a oval en su fase inmadura; con el tiempo se pigmentaron marrón oscuro, con un septo y estrías longitudinales. El tamaño de los conidios osciló de 23 a 31 x 12 a 15 μ (Figura 1-C y D), estas características coinciden con información previa en arándano (Alves *et al.*, 2008),

mango (Marques *et al.*, 2013). *Neofusicoccum* presentó conidios hialinos aseptados, fusiformes con la base truncada, y de 12 a 19 x 4 a 7 μ ; coincidiendo con registros previos (Espinoza *et al.*, 2009, Phillips *et al.*, 2013) (Figura 1-E).

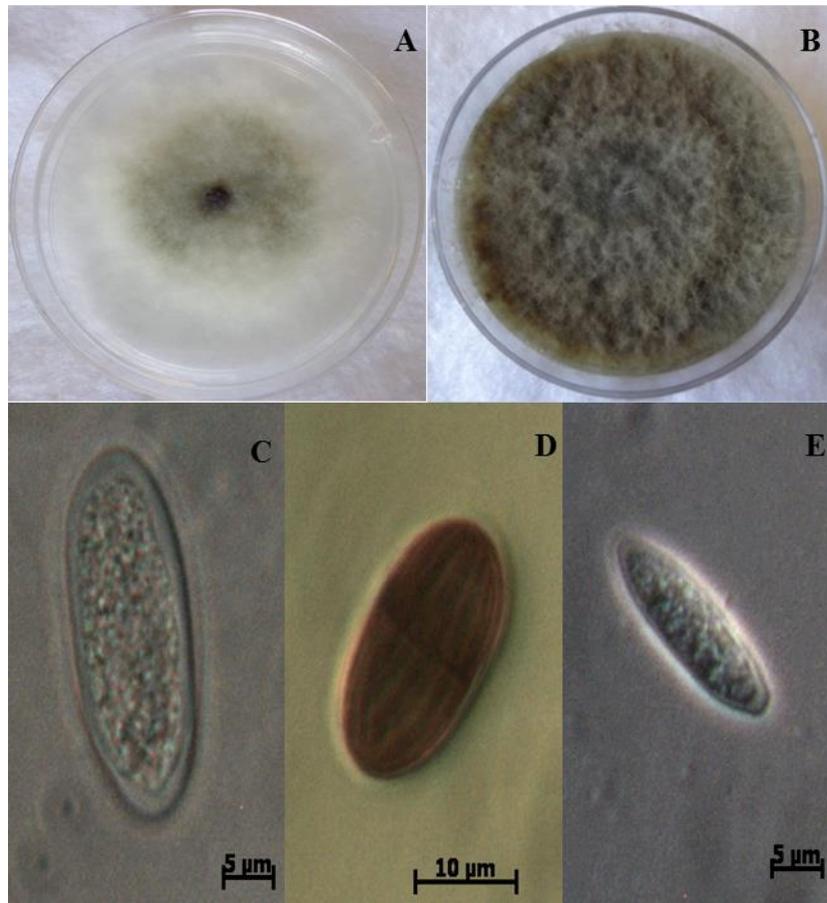


Figura 2.1 Anamorfos de *Botryosphaeria* aislados de tallos de arándano (*Vaccinium corymbosum*). A) Colonias de *Lasiodiplodia* sp. y B) *Neofusicoccum* sp. C) Conidios inmaduros, hialinos, aseptados de *Lasiodiplodia* sp. D) Conidios maduros, marrón con estrías longitudinales y un septo de *Lasiodiplodia* sp. E) Conidio hialino aseptado y fusiforme de *Neofusicoccum parvum*.

Análisis filogenético

Las secuencias analizadas se alinearon de la siguiente forma: VA1, VA4, CDG9, ZM12, ZM13, ZM15, VA19, ZM20, R94, y CDG12, presentando un porcentaje de identidad del 99 y 100% con *L. pseudotheobromae* (KU507479). VA2 presento un 99% de identidad con *L. theobromae* (KC806062.1). ZM31 coincidió en 100% de identidad con *L. theobromae* (KU507477). CDG2 correspondió a *N. parvum* con 100% de identidad (JQ647912.1).

Las trece secuencias analizadas se concentraron en tres grupos; I: 10 aislamientos de *L. pseudotheobromae* encontrados en las cuatro regiones de estudio, Zamora Mich., Ciudad Guzmán Jal., Villa de Álvarez Col. y Los Reyes Mich. Grupo II con dos aislamientos de *L. theobromae*, uno de Zamora, Mich. y el otro de Villa Álvarez, Col. En el Grupo III sólo se obtuvo un aislamiento de *Neofusicoccum parvum* en Ciudad Guzmán Jal . La identificación de *Botryosphaeria* mediante morfología ha sido confusa por lo que en los últimos años las herramientas moleculares basadas en el análisis filogenético de las secuencias utilizando diversos genes como ITS, β -tubulina y EF1- α han ayudado a clarificar y resolver la identidad de especies (Crous *et al.*, 2006, Luque and Phillips, 2005). En nuestro caso el análisis filogenético del conjunto de secuencias de los genes ITS y EF1- α fueron adecuados para la separación de las especies de *Botryosphaeria* sp (Figura 2).

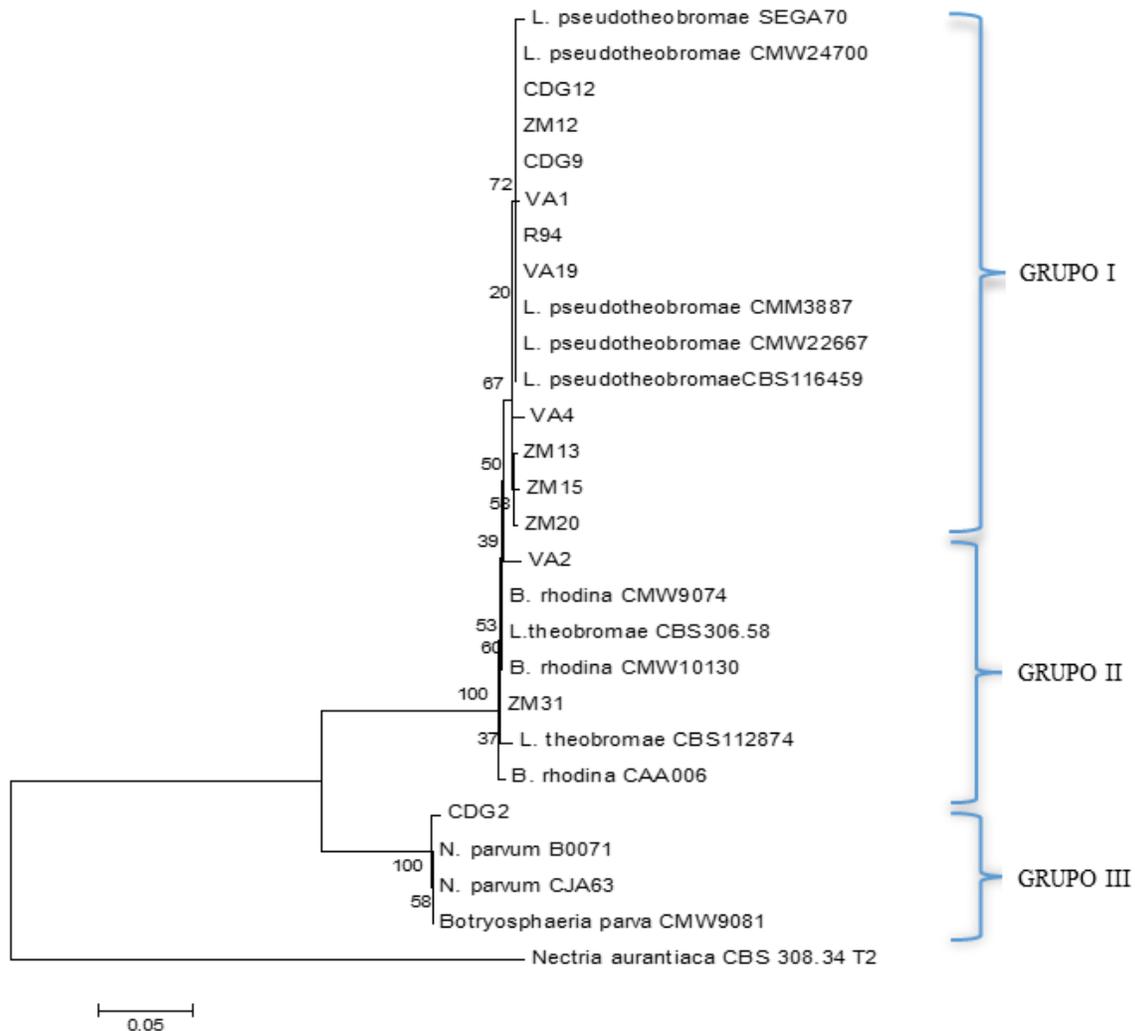


Figura 2.2 Árbol filogenético combinado ITS y EF1- α de 26 secuencias en base al método Neighbor-Joining 1000 réplicas, utilizando el modelo Kimura 2 parámetro, obtenidos de tallos enfermos de Arándano (*Vaccinium corymbosum*). Grupo I: Aislamientos VA1, VA4, CDG9, ZM12, ZM13, ZM15, VA19, ZM20, R94, y CDG12. Grupo II: VA2, ZM31. Grupo III: CCDG2.

Pruebas de patogenicidad

Las especies de *Botryosphaeria* son conocidas por causar tizón, muerte descendente y canchales (Phillips, 2004). En el presente estudio los cinco aislamientos inoculados fueron patogénicos y causaron lesiones marrón oscuro a negro, decoloración y necrosis vascular; en algunos tallos se produjo marchitamiento foliar y decoloración de flores a marrón-

oscuro (Figura 3 A y B) lo que coincide con registros anteriores (Rebollar *et al.*, 2013). Al cabo de 7 días algunos de los aislamientos provocaron el colapso y muerte de los tallos (Figura 3C)



Figura 2.3 Síntomas en arándano (*Vaccinium corymbosum*) causados por la inoculación de *Lasiodiplodia* sp y *Neofusicoccum* sp. A) Marchitez foliar. B) Decoloración de flores marrón oscuro. C) Colapso y muerte de tallos.

Al comparar la longitud de la lesión hubo diferencias significativas entre aislamientos ($p \leq 0.05$). Los aislamientos que indujeron el mayor tamaño (63.99 a 87mm) fueron VA2 (*L. theobromae*), ZM12 y R94 (*L. pseudotheobromae*), siete veces mayor a lo reportado en *Neofusicoccum parvum* (Rebollar *et al.*, 2016). *Lasiodiplodia theobromae* y *L. pseudotheobromae* fueron más patogénicas que *Neofusicoccum parvum*. Los aislamientos CDG2 y VA19 causaron lesiones inferiores que VA2 en un 81%. En este caso la lesión de *Neofusicoccum parvum* (CDG2) causó lesiones mayores en un 60% a lo reportado por Rebollar *et al.* (2016) en arándano. La diferencia pudo estar influida porque en nuestro caso, la patogenicidad se probó en cámara bioclimática, con temperatura, humedad y luz constantes. (Cuadro 1).

Cuadro 1. Longitud de lesiones causadas por *Lasiodiplodia theobromae*, *L. pseudotheobromae* y *Neofusicoccum parvum* en tallos de arándano (*Vaccinium corymbosum*) a los 7 días de la inoculación.

Aislamiento	Especie	Medias (mm)
VA2	<i>L. theobromae</i>	87.01±13.46
ZM12	<i>L. pseudotheobromae</i>	80.73±14.25
R94	<i>L. pseudotheobromae</i>	63.99±15.60
CDG2	<i>Neofusicoccum parvum</i>	25.06± 6.41
VA19	<i>L. pseudotheobromae</i>	16.92±2.95

Medias de 15 repeticiones ± error estándar (Prueba DMS, $p \leq 0.05$).

Las especies identificadas *L. pseudotheobromae* y *N. parvum* coinciden con registros previos de tizón y muerte descendente del arándano en Jalisco y Michoacán (Rebollar *et al.*, 2013), *N. parvum* en Chile (Espinoza *et al.*, 2009) y *L. theobromae* en EUA (Wright *et al.*, 2010).

Este es el primer hallazgo de *L. theobromae* como causante del tizón del tallo en arándano en México. También es el primer reporte de *L. pseudotheobromae* y *L. theobromae* en huertos comerciales de arándano en Colima.

Lasiodiplodia pseudotheobromae y *L. theobromae* están jugando un papel económicamente importante como causantes del tizón del tallo del arándano, por lo que deben incluirse en las estrategias de manejo integrado del arándano.

CONCLUSIONES

L. theobromae, *L. pseudotheobromae* y *Neofusicoccum parvum* causan el tizón del tallo del arándano var. Biloxi en Michoacán, Jalisco y Colima.

Todos los aislamientos de este estudio se obtuvieron de forma anamórfica (*Lasiodiplodia* y *Neofusicoccum*), no se obtuvo la fase teleomórfica *Botryosphaeria*.

La especie aislada con mayor frecuencia (77%) fue *L. pseudotheobromae*, y con menor frecuencia *L. theobromae* (15%) y *N parvum* (8%).

Las lesiones resultado de las inoculaciones en el tallo variaron de 16.9 a 86.9 mm.

El presente trabajo es el primer registro de *L. pseudotheobromae* y *L. theobromae* en huertos comerciales de arándano var. Biloxi en Colima.

Esta información es importante para el diseño de estrategias de manejo integrado del cultivo para disminuir las pérdidas causadas por estos hongos.

LITERATURA CITADA

- Alves, A.P. W Crous, A. Correia, and A. J. L. Phillips. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity*. 28: 1-13.
- Barnet, H. L. and B.B. Hunter. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. APS Press. 240 p.
- Crous, P. W., B. Slippers, M. J. Wingfield, J. Rheeder, W. F. O. Marasas, A. J. L. Philips, A. Alves, T. Burgess, P. Barber, and J. Z. Groenwald. 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology*. 55: 235–253.

- De la Mora C., J. G., D. Cibrián T. y O. A. Pérez V. 2014. *Neofusicoccum eucalyptorum* (sin= *Botryosphaeria eucalyptorum*) y *N. parvum*: Patógenos en plantaciones de eucalipto en México. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 20: 187-197.
- Espinoza J. G., E. Briceño X., E. Chávez R., J. Úrbez-Torres R. and A. Latorre B. 2009. *Neofusicoccum* spp. Associated with Stem Canker and Dieback of Blueberry in Chile. *Plant Disease*. 93:1187-1194.
- Luque, J., S. Martos and A. J. L. Phillips. 2005. *Botryosphaeria viticola* sp.nov. on grapevines: a new species with a *Dothiorella* anamorph. *Mycologia*. 97: 1111–1121.
- Marques, M. W., N. B. Lima, M. A. de Morais Jr., M. A. G. Barbosa, B. O. Souza, S. J. Michereff, and M. P. Câmara. 2013. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity*. 61: 181-193.
- Mehl, J. W. M, B. Slippers, J. Roux, and M. J. Wingfield. 2013. Cankers and other diseases caused by the Botryosphaeriaceae. *In: Infectious Forest Diseases*. Gonthier, P. and G. Nicolotti (eds.). CABI. pp: 298-317.
- Molina G., E., H. V. Silvia R., S. García M., and G. Avila Q. 2014. First report of black spots on avocado fruit caused by *Neofusicoccum parvum* in Mexico. *Plant Disease*. 98: 716-726.
- Mondragón F., A., J. López M, S. Ochoa A. y M. Gutiérrez C. 2012. Hongos asociados a la parte aérea del arándano en Los Reyes, Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:141-144.
- Phillips, J. L. 2004. The genus *Botryosphaeria*. Centro de Recursos Microbiológicos, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad Nova de Lisboa, Portugal. http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/. Consultado febrero 2014.
- Phillips, A. J. L., A. Alves, A. Correia, and J. Luque. 2005. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia* 97: 513-529.
- Phillips, A. J. L., A. Alves, J. Abdollahzadeh, B. Slippers, M. J. Wingfield, J. Z. Groenewald, and P. W. Crous. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*. 76: 51-167.
- Rebollar A., A., J. Boyzo M., H. V. Silva R., and G. Ramirez M. 2013. Fungi and oomycete pathogens causing stem blight and root rots on blueberry in central Mexico. *Phytopathology*: 113-119.

- Rebollar A., A., J. Boyzo M., H. V. Silva R., and G. Ramirez M. 2016. First Report of *Neofusicocum parvum* Causing Stem Blight and Dieback of Blueberry in Mexico. Plant Disease. In press: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0381-PDN>
- SAGARPA.2014a. Diversificarán producción de berries con la integración de pequeños productores. <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2015B063.aspx>. Consultado enero 2015.
- SAGARPA, 2014b. Agricultura producción anual. Cierre de la producción por cultivo. <http://www.siap.go.mx>. Consultado octubre. 2015.
- Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY: Cold Spring Harbor.
- Sandoval S., M., D. Nieto A. J. S. Sandoval I., D. Téliz, O., M. Orozco S. y Silva R. H. 2013. Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera indica* L.). *Agrociencia* 47: 61-73.
- Tamur, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. 2013. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725–2729.
- Valencia B., A. J., J. S. Sandoval I., E. Cárdenas S., T. J. Michailides y G. Rendón S. 2004. A new stem spot disease of pitahaya (*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton and Rose) caused by Fusicocum-like anamorph of *Botryosphaeria dothidea* (Moug.: Fr.) Ces. and De Not. Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22: 140-142.
- Vásquez L., A., J. A. Mora A., E. Cárdenas S. y D. Téliz O. 2009. Etiología e histopatología de la muerte descendente de árboles de mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) HE Moore y Stearn) en el estado de Guerrero, México. *Agrociencia* 43: 717-728.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds.). *In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic. pp: 315–322.
- Wright, A. F. and P. F. Harmon. 2010. Identification of species in the Botryosphaeriaceae family causing stem blight on southern highbush blueberry in Florida. *Plant Disease* 94: 966-971.