



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

**PROGRAMA DE PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL
TRÓPICO**

**SELECCIÓN DE PATRONES DE CÍTRICOS TOLERANTES AL VIRUS
DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS (VTC) CON RESISTENCIA A LA
GOMOSIS DE LOS CÍTRICOS EN LA SABANA DE HUIMANGUILLO,
TABASCO.**

JORGE ALBERTO ACOSTA PÉREZ
T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO

2008

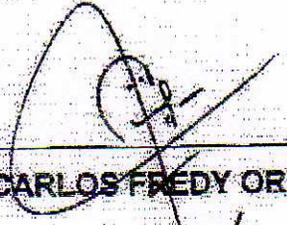
La presente tesis, titulada: **Selección de Patrones de Cítricos Tolerantes al Virus de la Tristeza de los Cítricos (VTC) con Resistencia a la Gomosis de los cítricos en la Sabana de Huimanguillo, Tabasco**, realizada por el alumno: **Jorge Alberto Acosta Pérez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

PROGRAMA DE PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. CARLOS FREDY ORTIZ GARCIA

ASESOR



DR. JUAN MANUEL ZALDIVAR CRUZ

ASESOR



DR. CRESCENCIO DE LA CRUZ CASTILLO AGUILAR

ASESOR



M.C. MARIO RODRIGUEZ CUEVAS

H. Cárdenas, Tabasco, 10 de Diciembre de 2008

SELECCIÓN DE PATRONES DE CÍTRICOS TOLERANTES AL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS (VTC) CON RESISTENCIA A LA GOMOSIS DE LOS CÍTRICOS EN LA SABANA DE HUIMANGUILLO, TABASCO.

Jorge Alberto Acosta Pérez, MC
Colegio de Postgraduados, 2008

La gomosis de los cítricos o podredumbre del pie es una enfermedad producida por especies del género *Phytophthora*. en cultivos de naranja y limón persa en la sabana de Huimanguillo, Tabasco. En el presente estudio se presenta la identificación morfológica y molecular de la especie de *Phytophthora* causante de la gomosis. De un total de 34 sitios muestreados sistemáticamente se lograron obtener 13 aislamientos de tejidos de tallo y frutos enfermos de naranja y limón. Para esto se utilizaron medios de cultivos Zanahoria-Agar 10%-V8 selectivos a base de Rifampicina, Piramicina, Vancomicina, Penicilina, Pentacloronitrobenzeno (PCNB) y Benlate. Las caracterizaciones morfológicas de dichos aislamientos presentaron micelio tularoso cenocítico, esporangios papilados, clamidosporas intercalares y terminales de pared gruesa y que de acuerdo a las claves morfológicas de Stamps, Watherhouse, Newhook y Hall 1990 pertenecen a la especie *P. parasitica* Dastur [(sin. *P. nicotianae* Breda de Haan var. *parasitica* (Dastur) Waterhouse)]. Así mismo, la identificación molecular de las cepas aisladas se basó en la amplificación del gen 18S DNAr. Para esto, las 13 cepas fueron crecidas en medio líquido YEPD. Se extrajo el ADN cromosómico y se amplificó el gen 18S DNAr por PCR empleando los iniciadores: LV1(5'CCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCT3') y LV2(5'CACCTACGGAAACCTTGTTACGACT3'). Los fragmentos de ADN obtenidos se secuenciaron y fueron analizados con el software Chromas Versión 2.31 (Technelysium Pty Ltd.) y alineados con secuencias depositadas en la base de datos de la NCBI (National Center for Biotechnology Information). Los porcentajes de similitud nucleotídica se calcularon con el programa MEGA versión 2.1 (Kumar y col., 2001). Con los datos del alineamiento múltiple, se construyó un árbol filogenético. La amplificación y secuenciación del gen 18S DNAr, permitió la identificación molecular de los hongos aislados como *P. parasitica* o *P. nicotianae* var *parasitica*). Adicionalmente se puede señalar que con base a las evaluaciones de las 34 fincas visitadas la incidencia de la gomosis es 17.5 % con un rango de variación de 1.4 a 45.0%; siendo los daños mayores en plantaciones de limón Persa que en naranja Valencia. Asimismo, se puede señalar que en las plantaciones de limón Persa, existe una nueva enfermedad con sintomatología externa algo semejante a la gomosis y que los productores equivocadamente están manejándola como tal. Esta enfermedad estuvo presente en las 44 % de las plantaciones de limón Persa con una incidencia promedio de 10.2% y rango de 1.7 a 25.0%. Este es el primer reporte de *P. parasitica* como agente causal de la gomosis de los cítricos en Tabasco.

Selection of tolerant rootstocks to Citrus Tristeza Virus (CTV) with resistance to the
Citrus gummosis in the Sabana of Huimanguillo, Tabasco.

Jorge Alberto Acosta Pérez, MC
Colegio de Postgraduados, 2008

The gomosis of the citrus or rottenness of the foot is a disease produced by species of the *Phytophthora* in cultures of orange and Persian lemon in the savannah of Huimanguillo, Tabasco. In the present study the morphologic and molecular identification of the species of *Phytophthora* appears cause of the gomosis. Of a total of 34 sites sampled systematically they were managed to obtain 13 stem ill weaver isolations and fruits of orange and lemon. For this means of selective Carrot-Agar cultures were used 10%-V8 with Rifampicin, Piramicin Vancomycin, Penicillin, Pentacloronitrobenzeno (PCNB) and Benlate. The morphologic characterizations of these papilados isolations presented/displayed cenocítico tularoso mycelium, esporangios, clamidosporas intercalary and terminals of heavy wall and that according to the morphologic keys of Stamps, Waterhouse, Newhook and Hall 1990 belong to species *P. parasitica* Dastur [(without *P. nicotianae* Breda de Haan bar. parasitica (Dastur) Waterhouse)]. Also, the molecular identification of the isolate stocks I am based on the amplification of the gene 18S DNAr. For this, the 13 stocks were swellings in the middle liquid YEPD. The chromosomal DNA was extracted and the gene was amplified 18S DNAr by PCR using the initiators: LV1 (5' CCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCT3') and LV2 (5' CACCTACGGAAACCTTGTTACGACT3'). The obtained DNA fragments were sequenced and were analyzed with software Chromas Version 2.31 (Technelysium Pty Ltd.) and aligned with sequences deposited in the data base of the NCBI (National Center Biotechnology Information). The percentage of nucleotide similarity calculated with the program MEGA version 2.1 (Kumar and cabbage., 2001). With the data of the multiple alignments, a Phylogenetic tree was constructed. The amplification and sequencing of the gene 18S DNAr, allowed to the molecular identification of the fungi isolated like *P. parasitica* or *P. nicotianae* var *Parasitica*). Additionally it is possible to be indicated that with base to the evaluations of the 34 visited property the incidence of the gomosis is 17,5% with a rank of variation from 1,4 to 45,0%; being the damages majors in plantations of Persian lemon that in Valencia orange. Also, it is possible to be indicated that in the plantations of Persian lemon, something similar to the gomosis exists a new disease with group of symptoms external and that the producers wrongly are handling it like so. This disease was present in 44% of the plantations of Persian lemon with an incidence 10,2% average of and rank from 1,7 to 25,0%. This it is the first report of parasitica *P.* like causal agent of the gomosis of the citrus in Tabasco.

DEDICATORIA

Primeramente a Dios por darme la oportunidad de vivir y darme las fuerzas y las ganas de seguir adelante.

A mis padres Daniel Acosta y Aurora Pérez, permitirme llegar a este maravilloso mundo y apoyarme siempre, espero pronto vean los frutos de nuestros sacrificios.

A mi esposa Beatriz Adriana por el amor y comprensión que ha tenido conmigo y por impulsarme siempre para llegar a mis metas.

A el principal motor que forma mi vida que son mis hijos Jorge Adrian y Estefany

Mi suegro Agustin Rodriguez y mi suegra Elisa Pablo por apoyarme moral y económicamente.

Gracias a todos ustedes, por estar siempre apoyandome, gracias por estar en mi vida.

Gracias

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados *Campus* Tabasco, por permitir realizar mi tesis dentro de sus instalaciones y haberme brindado todas las facilidades necesarias durante la realización de ésta investigación.

A CONACYT por el apoyo económico brindado para la realización tanto de la tesis como del trabajo en campo.

Al Dr. Carlos Fredy Ortiz García por haberme permitido estar dentro de su grupo de trabajo para la realización de la tesis, por su asesoría, por sus amables consejos y paciencia. Gracias

Al Dr. Juan Manuel Zaldívar Cruz por su colaboración en el desarrollo de esta tesis por sus acertadas observaciones y sobre todo por su amable trato. Gracias por tu amistad y apoyo incondicional.

Al M.C Mario Rodríguez Cuevas por su apoyo para el trabajo en campo, así como por su ayuda para la realización de la teoría en esta tesis sobre todo por su amistad incondicional por su paciencia, en especial por su amable amistad. Gracias maestro.

Al Dr. Crescencio De la Cruz Castillo Aguilar Por su participación y comprensión en la realización de esta tesis. Gracias.

A todos los productores de cítricos del Estado de Tabasco en especial a los de Huimanguillo, por la experiencia obtenida en sus plantaciones y por su amable atención.

A mis compañeros de generación 2006- 2007 por su compañerismo y amistad en la cotidiana tarea de superación. Gracias colegas

CONTENIDO

	<i>Página.</i>
RESUMEN -----	<i>ii</i>
ABSTRAC -----	<i>iii</i>
INDICE DE CUADROS -----	<i>ix</i>
INDICE DE FIGURAS -----	<i>x</i>
INTRODUCCIÓN -----	<i>1</i>
I. OBJETIVOS E HIPOTESIS -----	<i>6</i>
1.1. Objetivo General: -----	<i>6</i>
1.1.1. Objetivos Específicos:-----	<i>6</i>
1.2. Hipótesis-----	<i>6</i>
 II. REVISION DE LITERATURA -----	 <i>7</i>
2.1. Factores ambientales favorables al desarrollo de los cítricos-----	<i>7</i>
2.2. Sistema de producción de naranja y limón en Huimanguillo, Tabasco. -----	 <i>9</i>
2.2.1. Preparación del terreno-----	<i>10</i>
2.2.2. Sistemas de plantación-----	<i>10</i>
2.2.3. Cepas-----	<i>10</i>
2.2.4. Trasplante-----	<i>11</i>
2.3. Portainjertos utilizados-----	<i>11</i>
2.3.1. Poda. -----	<i>11</i>
2.3.1.1. Poda de formación.-----	<i>11</i>
2.3.1.2. Poda de mantenimiento.-----	<i>12</i>
2.3.1.3. Control de malezas -----	<i>12</i>
2.3.1.4. Nutrición y Fertilización de los cítricos en Huimanguillo-----	<i>12</i>
2.4. Cosecha-----	<i>14</i>
2.5. Principales plagas-----	<i>15</i>
2.5.1. Mosca de la fruta <i>Anastrepha ludens</i> (Loew.)-----	<i>15</i>
2.5.2. Arador o negrilla <i>Phyllocoptura oleivora</i> -----	<i>15</i>
2.5.3. Pulgón café <i>Toxoptera citricida</i> -----	<i>15</i>
2.6. Principales enfermedades.-----	<i>15</i>
2.6.1. Antracnosis <i>Colletotrichum ocutatum</i> -----	<i>15</i>
2.6.2. Mancha grasienta <i>Mycosphaerella citri</i> -----	<i>16</i>
2.6.3. Virus de la Tristeza de los Cítricos (VTC)-----	<i>16</i>
2.7. Patrones Tolerantes al VTC-----	<i>16</i>
2.7.1. Investigación sobre portainjerto-----	<i>17</i>
2.7.2. Efecto y características de los portainjertos en limón Mexicano-----	<i>17</i>
2.8. Enfermedades causadas por <i>Phytophthora</i> en cítricos-----	<i>18</i>
2.9. Caracterización y cuantificación de los daños por gomosis-----	<i>21</i>
2.9.1. Daño reversible-----	<i>21</i>
2.9.2. Daño irreversible-----	<i>22</i>
2.9.3. Portainjertos tolerantes a <i>Phytophthora</i> -----	<i>22</i>

2.10. Taxonomía de <i>Phytophthora</i> -----	23
2.10.1. Identificación de las especies de <i>Phytophthora</i> -----	26
2.10.2. Micelio -----	29
2.10.3. Esporangios y zoosporas-----	29
2.10.4. Morfología de las zoosporas-----	31
2.10.5. Presencia de clamidosporas-----	31
2.10.6. Órganos sexuales-----	32
2.10.7. Factores del ambiente que inciden en al clasificación de las especies-----	32
2.10.8. Técnicas moleculares para diferenciar especies de <i>Phytophthora</i> -----	32
2.10.9. Cuantificación de ácidos nucleicos y Determinación espectrofotométrica-----	33
2.11. Determinación de la calidad del ADN en geles de agarosa-----	34
2.11.1. Separación de fragmentos de ADN por electroforesis-----	35
2.11.2. Electroforesis en geles de agarosa-----	36
III. MATERIALES Y MÉTODOS-----	37
3.1. Área de estudio-----	37
3.2. Sitios de Muestreos-----	37
3.3. Aislamiento e identificación del agente causal-----	38
3.3.1. Colecta de muestras vegetales de plantas enfermas-----	38
3.3.2. Aislamientos de corteza/madera-----	39
3.3.3. Aislamiento en frutos colectados del suelo-----	40
3.4. Identificación-----	40
3.4.1. Identificación morfocultural-----	40
3.5. Identificación molecular-----	41
3.5.1. Extracción de DNA cromosómico-----	41
3.5.2. Amplificación del gen 18S DNAr por PCR-----	42
3.5.3. Electroforesis en geles de agarosa-----	43
3.5.4. Purificación de los fragmentos de DNA amplificados-----	43
3.6. Secuenciación del DNA purificado-----	44
3.6.1. Linearización de las secuencias-----	44
3.7. Establecimiento de Dendrogramas o Árbol de similitud-----	45
3.8. Evaluación de la incidencia de la gomosis-----	45
3.9. Evaluación de la susceptibilidad de Porta injertos a <i>P. parasítica</i> -----	46
3.9.1. Cepas empleadas en la prueba-----	46
3.9.2. Patrones evaluados-----	46
3.9.3. Establecimiento de la Prueba de susceptibilidad y Variables cuantificadas-----	47
3.9.4. Confirmación de la acción del patógeno-----	49
IV. RESULTADOS Y DISCUSION-----	50
4.1. Detección de signos visibles de la enfermedad-----	50
4.2. Identificación de los aislamientos-----	51
4.2.1. Identificación morfológica-----	51

4.3. Determinación del tipo de reproducción sexual-----	53
4.4. Identificación Molecular-----	54
4.4.1. Alineamiento múltiple de secuencias de genes 18S DNAr	
Descritas-----	-54
4.4.2. Relaciones de similitud entre las secuencias de genes 18S DNAr	
descritas-----	55
4.5. Evaluación la incidencia de la gomosis. -----	58
4.6. Pruebas de resistencia genética a <i>Phytophthora nicotianae</i> o	
<i>parasítica</i> sobre tallos de porta injertos de cítricos tolerantes al VTC-----	60
4.7. Resultados complementarios-----	62
	64
V. CONCLUSIONES-----	
VIII. LITERATURA CITADA-----	65

INDICE DE CUADROS

		Página
CUADRO 1	Unidades y subunidades de suelo muestreadas en la zona citrícola de Huimanguillo, Tabasco. -----	14
CUADRO 2	Principales especies de <i>Phytophthora</i> causantes de la gomosis, pudrición del pie, pudrición de raíces y el aguado o podredumbre marrón de los frutos, aisladas de cítricos a nivel mundial.	21
CUADRO 3	Identificación de phytophthora morfológica y fisiológica-----	28
CUADRO 4	Aislamientos de <i>Phytophthora</i> obtenidos de lesiones de gomosis de los cítricos y frutos de limonero en el Municipio de Huimanguillo, Tabasco-	54
CUADRO 5	Parámetros de alineamiento de cada uno de los alineamientos de cítricos.-----	55
CUADRO 6	Porcentaje de incidencia de gomosis de los cítricos (NaranjaValencia y Limón Persa) cuantificada en huertas de productores de distintas localidades de la Sabana de Huimanguillo, Tabasco.-----	59
CUADRO 7	Comparación múltiple de medias y las respuestas de varetas de cultivares cítricos empleados como porta injertos en la Sabana de Huimanguillo, Tabasco.-----	61

INDICE DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Diversidad de series de suelos de la zona citrícola de Huimanguillo, Tabasco y localización de huertos de naranja valencia, limón persa y otros cítricos-----	38
FIGURA 2	Fragmento de DNA amplificado por PCR con marcador de tamaño de fragmento 1 Kb plus DNA Ladder - Gibco BRL-----	44
FIGURA 3	Distribución de tallo de patrones de cítricos en bloques y parcela grande, infectadas con cepa de <i>P. parasitica</i> e incubación a temperatura ambiente.	48
FIGURA 4	Tallo de cítrico con lesión provocadas por <i>P. parasitica</i> inoculadas artificialmente -----	49
FIGURA 5	Síntomas de gomosis en tallo de naranja valencia cancro en el patrón (a), cancro sobre el injerto (b) cancro en ramificación (c) y pudrición en fruto de limón Persa.-----	51
FIGURA 6	Colonia de <i>P. parasitica</i> en medio zanahoria-A, esporangios, clamidosporas y micelio con hinchamientos (swellings).-----	52
FIGURA 7	Relaciones de similitud de las secuencias nucleotídicas del gen 18S rDNA de la cepas de PCR1-LV1 , PCR10-LV1 , PCR11-LV1 , PCR12-LV1 y PCR13-LV1 aisladas de tallos y fruto de limón Persa y naranja Valencia-----	57
FIGURA 8	Síntomas de la secadera del limón Persa injertado sobre <i>C volkameriana</i> .-----	63

INTRODUCCIÓN

Los cítricos se encuentran cultivados en los cinco continentes y en muchos países productores se le considera como la fruta de mayor importancia, tanto por la superficie destinada para su cultivo, como por la producción y el consumo per cápita. Entre las principales variedades cultivadas se encuentran las naranjas (*Citrus sinensis* Osbeck), Mandarinas (*Citrus reticulata* L), limas (*Citrus aurantifolia*) y limones (*Citrus limon* L.). La especie de la naranja por sí sola, ocupa el tercer lugar a nivel mundial después del plátano y la uva. Los cítricos juegan un rol de gran importancia en la alimentación humana, ayudando al fortalecimiento de las defensas del organismo, debido a su contenido de vitaminas C, B1, B2, B3, B5, B6 y E, sales minerales, ácidos orgánicos, pectina, y componentes que fortalecen a la circulación y cuentan con propiedades anticancerígenas. La cáscara y la flor se utilizan para la elaboración de medicina naturista. Brasil y los Estados Unidos son los dos principales países productores de cítricos del mundo.

En el caso de la Naranja, los principales países productores son, Brasil, Estados Unidos, China y México; seguidos por España y la India. El mayor consumo per cápita de naranja procesada se concentra en los países desarrollados de América del Norte y Europa, lo que las distingue como las dos regiones que consumen de más del 88% de la producción mundial. Así, en la comunidad Europea el consumo de naranjas frescas y procesada per cápita es de 9.7 kg y 30 kg, respectivamente (ASERCA, 2007).

Spreen, (2001) estimó que la producción de naranja para el 2010 sería de 64 millones de toneladas métricas, de las cuales previó que 35.7 millones se consuman como fruta fresca y 28.3 millones de toneladas métricas sean procesadas. De estas, Brasil y los Estados Unidos tendrán un crecimiento anual de 0.6% respecto al año anterior. Asimismo, las economías emergentes de América Latina como México, Argentina y Brasil mantendrán un ritmo anual de crecimiento del 0.8%. La producción en Europa tendrá igualmente incrementos en España, Italia y Grecia.

Asimismo, Sudáfrica continuará como el país abastecedor hemisferio norte con naranja producida fuera de temporada, y la mayor parte del aumento en el consumo sucederá en países en vía de desarrollo, como India, Pakistán, China, México y Brasil.

La producción de mandarinas está dominada por países desarrollados y en vía de desarrollo, y que se comportan como, exportadores y consumidores, Entre estos destaca España que exporta más del 50% de la producción mundial con la variedad clementinas sin semilla; además, de Marruecos y China. Los principales mercados son Estados Unidos y la Comunidad Europea. La producción mundial de mandarinas se calcula en 15,4 millones de toneladas métricas. Se estima que en el 2010, habrá un crecimiento anual del 0.17%. Las preocupaciones fitosanitarias han limitado la habilidad tanto de México como de Brasil, de iniciar la exportación de tangerinas frescas. La epidemia de cancro de cítrico que ataca al Brasil restringió los planes de expandir las exportaciones de mandarina y otras variedades de cítricos (Spreen, 2001).

Las limas y los limones, a diferencia de la naranja, son frutas cítricas ácidas que típicamente se consumen con otros alimentos, por lo que no tienen competencia de otras variedades. Las limas y los limones se cultivan esencialmente para el mercado fresco, y el jugo de ellos se utiliza ante todo en las bebidas para darles un sabor característico. Sin embargo, en algunos países gran parte de la producción de limas está destinada a la industria, para la obtención de aceite esencial destilado, terpenos, pectinas, jugos y ácido cítrico entre otros.

El limón es el principal fruto productor de ácido cítrico, se desarrolla muy bien en las regiones de climas fríos, como en el occidente de los Estados Unidos, España, Italia y Argentina producen frutos de óptima calidad. También se adapta a climas más secos como el de Egipto y el de Irán. La lima, por su parte, es sumamente sensible al frío y crece exclusivamente en climas tropicales. Los principales países productores son México y Brasil. Se tiene registros que de 1996-1998, la

producción de lima y limón fue de 9.25 millones de toneladas métricas, de las cuales 7.3 millones fueron destinados para el mercado de frescos y 1.9 millones de toneladas métricas fueron procesadas (Spreen 1998). España, Argentina y México son los exportadores más grandes de limones frescos. Proyecciones realizadas por Spreen (2001) estimaban que para el 2010 la producción mundial de la lima y el limón será 10,6 millones de toneladas métricas. Asimismo, señaló que los Estados Unidos se convertirán en el mayor importador de limas y limones frescos, en el 2010 y alcanzara un 20% de las importaciones mundiales, dada la reducción de la producción en la Florida a causa del ataque severo de enfermedades y pese a la producción estable de limones en California y Arizona.

La importancia de la citricultura en México radica en que es una de las principales fuentes de divisas con una superficie total sembrada de 515,929 ha incluyendo naranja, limón y pomelo (ASERCA, 2008). De las cuales 344,590 ha corresponden a la naranja Valencia (*Citrus sinensis* Osbeck) y el limón Persa (*Citrus latifolia* Tan) con 152,811 ha, siendo éstas las de mayor importancia económica (Gómez y Rinderman, 1994; Pastrana *et al.*, 1998). Esta actividad se desarrolla en 22 estados de la República Mexicana, siendo Veracruz, Colima, Tamaulipas, Nuevo León los estados con mayor superficie y producción anual. En Tabasco, la citricultura está establecida en una superficie total de 13, 910.71 has. De estas el 95% (13,172.22 ha) se producen en el municipio de Huimanguillo (SAGARPA, 2006) y aunque solo cuenta con un 2.2% de la superficie nacional cultivada con cítricos juega un rol importante en la producción de limón ya que este es para el mercado exterior.

Entre los factores que limitan la producción de cítricos a nivel mundial están las enfermedades. En este sentido se ha pronosticado que el virus de la tristeza de los cítricos (VTC) eliminará millones de árboles en regiones altamente productivas del mundo como es Brasil y Estados Unidos; además de los problemas fitosanitarios que los están soportando como el cancro de los cítricos y la clorosis variegada de los cítricos (CVC); factores que reducirán aun mas la producción.

Igualmente, México se muestra con alta vulnerabilidad al VTC, se han encontrado plantas con infección positiva al virus en los estados de Baja California Norte, Campeche, Colima, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Quintana Roo, Veracruz, Yucatán y Tabasco (SAGAR, 1997; SAGARPA 2004; Villarreal *et al.*, 1996, 2000).

Dentro de las enfermedades causadas por hongos que afectan a los cítricos en Tabasco (Hernández, 2002) La gomosis o pudrición del pie de los cítricos ha sido una de las enfermedades más importantes ya que anualmente produce la muerte de muchos árboles de cítricos de pie franco e injertados. El manejo sustentable de esta enfermedad, se había logrado mediante el empleando patrones resistentes como ha sido el naranjo agrio (*Citrus aurantium*) (Klotz, 1973). Sin embargo, la alta susceptibilidad de este patrón al VTC ha inducido a nivel mundial su inminente reemplazo. La selección de nuevos patrones como “Troyer”, “Volkameriana”, “Swingle”, “Cleopatra”, etc, con resistencia al VTC han permitido continuar con la actividad citrícola de EUA y Europa (Rocha *et al*, 1995).

Sin embargo es conocido que la gomosis de los cítricos puede ser causada por 12 o más especies de *Phytophthora* (*P. parasitica*, *P. citrophthora*, *P. citricola*, *P. palmivora*, *P. cryptogea*, etc.) las cuales no responden igual forma a las estrategias de control (Klotz, 1973), lo que da una mayor relevancia a la selección de patrones tolerantes al VTC, que por lo general, se ha hecho al margen de la susceptibilidad a *Phytophthora*. Ya que la resistencia probada a una especie de *Phytophthora* no implica que cuente con la resistencia a todas ellas. Por ejemplo, Vanderweyen (1983) señaló al patrón *C. troyer* como resistente a *P. citrophthora* y a *C. volkameriana* como altamente susceptible a dicha especie.

En México, se reconoce a *P. parasítica* como la especie que provoca la gomosis de los cítricos en los estados de Colima (Vidales, 1982, Orozco, 1995) y Nuevo León (Rocha, comunicación personal). Sin embargo, no se cuentan con diagnósticos específicos del agente causal de la gomosis en los otros estados productores de

cítricos. Esta carencia no permite conocer la diversidad de especies de *Phytophthora*, como Veracruz, Nuevo León, Península de Yucatán, Oaxaca y Tabasco que conforman áreas cítricas geográficamente distantes y con orígenes de establecimiento diferentes. Del mismo modo, la resistencia probada de algunos patrones de cítricos tolerantes al VTC, a *P. palmivora*, o a *P. citrophthora* no implica que cuenten con la resistente a las otras especies del Patógeno. Así en cada estado o en cada región cítrica se requiere, conocer a las especies locales y realizar las pruebas de resistencias para seleccionar el o los patrones más adecuado (Rocha *et al.*, 1995). En Tabasco, no existe ningún estudio que reporte al agente responsable de la gomosis de los cítricos (Morales, 1990 y Hernández, 2001). Por todo lo anterior, el presente estudio realizado en la zona cítrica de Huimanguillo como apoyo al programa de reconversión cítrica de Tabasco, tuvo los siguientes objetivos.

I. OBJETIVOS

1.1. Objetivo General:

El presente estudio tuvo como objetivo identificar morfológica y molecularmente la o las especies de *Phytophthora* causantes de la gomosis de los cítricos en los cultivos de naranja Valencia y limón Persa; conocer el nivel de daño que se observan bajo las condiciones agroclimáticas y edáficas de la sabana y establecer una evaluación preliminar de la susceptibilidad, a la o las especies *Phytophthora* endémica en Tabasco, de los patrones tolerantes al VTC, empleados en el programa de reconversión citrícola en Huimanguillo, Tabasco.

1.2. Objetivos Específicos:

Identificar morfológica y molecularmente la o las especies de *Phytophthora* causante de la gomosis de los cítricos en cultivos de naranja Valencia (*C. sinensis* Osbeck) y limón persa (*C. aurantifolia* Tan) en la zona citrícola de Huimanguillo, Tabasco.

Conocer el nivel de daños de la Gomosis de los cítricos en los cultivos de naranja y limón en la sabana de Huimanguillo, Tabasco.

Evaluar y seleccionar preliminarmente los patrones tolerantes al VTC con resistencia a *Phytophthora*.

1.3. Hipótesis

Ho 1. En la zona citrícola de Huimanguillo Tabasco, existe al menos una especie del género *Phytophthora* responsable de la gomosis de los cítricos

Ho 2. El nivel de daño de la gomosis de los cítricos en naranja Valencia y limón Persa, son diferentes.

Ho 3. Al menos un patrón tolerante al VTC establecido en Huimanguillo, no es susceptible a la especie de *Phytophthora* endémica en Tabasco.

II. REVISION DE LITERATURA

Las especies silvestres y cultivadas de cítricos, tuvieron su origen en las regiones tropicales y subtropicales de Asia y el archipiélago Malayo (González, 1968). Su dispersión mundial se debe principalmente al hombre, quien lo llevó de su centro de diversificación a Europa y posteriormente a América y el Caribe, dentro del proceso histórico de la humanidad.

En la familia de las rutáceas, es importante distinguir al género *Citrus* con 16 especies (Ver anexo 1), dentro de los agrios conocidos comúnmente, debido a que incluyen no solo especies comestibles del género *Citrus* y sus cultivares, híbridos y portainjertos, sino que también incluyen a los géneros *Eremocitrus*, *Poncirus* y *Clymenia* cada uno con una especie (Swingle y Reece, 1967; Jones, 1989; Pinhas S. y Goldschmitd E. 1996)..

2.1. Factores ambientales favorables al desarrollo de los cítricos

Alvin y Kozlowiski, (1997) señalan que en general, los cítricos crecen en zonas de alta humedad relativa, en lugares de clima suave con corrientes frías, y en regiones calientes de los trópicos; en el trópico y regiones cercanas al ecuador con elevaciones de hasta 1000 m, las temperaturas del día y la noche favorecen durante todo el año, así también les favorecen la buena distribución de lluvias y el riego. Además, precisan que en los subtrópicos sólo es favorecido únicamente durante los 5 o 6 meses calientes del año. Asimismo, consideran que de 1000 ó 1200mm de precipitación anual son suficientes para los cítricos, aunque pueden prosperar en zonas con 3500mm de lluvia anual. Los cítricos requieren una temperatura óptima de 30°C, detienen su crecimiento debajo de los 12°C y arriba de los 40°C. En los trópicos la mayoría de las variedades maduran sus frutos 6 o 7 meses después de la floración, y de 8 a 13 meses después en los subtrópicos. Otra diferencia significativa, la constituye el hecho de que en las regiones tropicales la fruta madura permanece

en el árbol hasta 4 semanas, y en los subtrópicos, esta permanece con buenas características de mercado entre 4 y 5 meses (Alvin y Kozlowiski, 1997).

En México, las plantaciones de cítricos crecen en regiones con diferente clima y condición ecológica. Así, en el noreste constituido por los estados de Tamaulipas y Nuevo León, los cítricos se cultivan bajo condiciones de altas temperaturas en verano y bajas en el invierno, lo cual proporciona un adecuado microclima para el desarrollo de un excelente color y calidad de jugo en el fruto. Debido a que la precipitación pluvial (700 mm/año) es escasa y errática, en esta región se requiere aplicar riego. Los principales problemas que afectan a este cultivo son el abastecimiento limitado de agua para riego y el riesgo de la presencia recurrente de heladas cada año. Los cítricos también se cultivan en el noroeste principalmente en el estado de Sonora, donde el clima es cálido y extremadamente seco la mayor parte del año, con una precipitación de solo 200-300 mm/año. También en esta región, la coloración y calidad del jugo en el fruto son bastante aceptables. La mayoría de los cítricos dulces de México, se cultivan en los estados de Veracruz y San Luis Potosí bajo condiciones de clima cálido húmedo. En otras regiones las lluvias son abundantes, con un promedio de 1500-2000 mm anuales, irregularmente distribuidas a través del año. Algunas de las plantaciones reciben agua de riego para compensar los períodos cuando la precipitación es errática. En esta parte del país, algunos huertos se cultivan en terrenos cerriles con pendientes variables, lo cual dificulta el manejo de los árboles. Bajo estas condiciones tropicales, la calidad de fruta es aceptable (Rocha *et al*, 2004)

La naranja dulce junto con algunas mandarinas y toronjas son los cultivos de cítricos predominantes en los estados de Nuevo León, Tamaulipas, Sonora, San Luis Potosí, Veracruz, Tabasco y Yucatán. La mayoría de las plantaciones de limón Mexicano se encuentran establecidas en dos regiones, Pacífico-Centro y Pacífico-Sur. En la primera participan los estados de Colima, Michoacán y Guerrero con cerca de 67,000 ha; predomina el clima trópico seco y la incidencia de precipitación pluvial es de 700-800 mm por año. En el Pacífico Sur, el estado productor más importante es

Oaxaca, con más de 15,000 ha plantadas; el clima es trópico húmedo con una precipitación de 1000-1200 mm anuales. En ambas regiones la calidad de la fruta de limón Mexicano es aceptable. El limón Persa comenzó a ser importante en la década de 1980. Actualmente se cultivan cerca de 32,000 ha distribuidas principalmente en los estados de Veracruz, Tabasco y Campeche. Asimismo, existen plantaciones crecientes de limón Persa en Colima, Michoacán y Oaxaca. La calidad interna y externa del fruto de limón es aceptable (Rocha *et al.*, 2004).

En las diversas áreas ecológicas del país donde se cultivan los cítricos, inciden una serie de problemas fitosanitarios que afectan la productividad del cultivo. La ocurrencia e intensidad en que se presentan los problemas fitosanitarios en cada una de las diversas zonas cítricas, es condicionada por los factores ambientales prevalecientes en cada región en particular, la especie de cítricos presente, así como por el manejo y atención que los productores proporcionan a sus plantaciones. Sin embargo, existen algunas enfermedades (e.g. pudrición del pie o “gomosis”) y plagas (mosca mexicana de la fruta) que prevalecen comúnmente en la mayoría de las regiones cítricas; asimismo, existen algunos problemas también de importancia (e.g. mancha café de mandarinas) que se encuentran confinados solo a determinadas zonas productoras del país (Rocha *et al.*, 2004).

2.2. Sistema de producción de naranja y limón en Huimanguillo, Tabasco.

El manejo agronómico de la plantación permite que los cítricos se desarrollen vigorosamente, aunque es necesario implementar programas de fertilización, considerando la existencia de diferencias que incluye suelos, patrones, variedades, edad de la planta, plagas y enfermedades, así como las condiciones de clima (Varela, et al 2006). De acuerdo con Pastrana *et al.*, 1998, el manejo de los cítricos en Tabasco, se realiza de la siguiente manera.

2.2.1. Preparación del terreno

Esta práctica es muy importante debido a que el cultivo no tolera encharcamientos prolongados. En caso de que existan partes bajas en las áreas seleccionadas, es necesario drenar para desalojar el exceso de agua de lluvia (Pastrana et al., 1998).

Se requiere de una buena preparación del suelo. En suelos planos y profundos sin problemas de erosión, se recomiendan las labores tradicionales de chapeo, barbecho y rastreo. En aquellos suelos con alto riesgo de erosión, esta labor se realiza siguiendo las curvas de desnivel, rotulando mínimamente el suelo (Pastrana et al., 1998).

2.2.2. Sistemas de plantación

El naranjo puede establecerse de diversas formas de acuerdo al tipo de terreno que se tenga: en terrenos planos, se puede plantar empleando el sistema de marco real o rectangular, en ambos se facilitan las labores de mecanización del cultivo y ofrecen buena iluminación y aireación a los árboles. El sistema tresbolillo permite un 15% más de árboles y puede usarse en terrenos con pendientes mayores de 30%. Es importante trazar hileras de la plantación en la misma dirección de los vientos dominantes (norte-sur). Las densidades de plantación menores de 200 árboles por hectárea se recomiendan para los suelos ligeros (vega de río) donde los árboles logran un mayor vigor (Pastrana et al., 1998).

2.2.3. Cepas

El tamaño y la forma de las cepas estará en función del método empleado: si se realiza manualmente, se forma un cubo de dimensiones de 50x50x50 cm entre sus lados. Si es mecanizado, el barreno cava en forma de un cilindro y la dimensión esta en función del barreno empleado (Pastrana et al., 1998).

2.2.4. Trasplante

Los arbolitos procedentes del vivero se distribuyen en el campo para su trasplante en las cepas abiertas. Es necesario aplicar una primera dosis de fertilización. Pastrana *et al.*, 1998 señala que los trasplantes pueden hacerse casi todo el año sólo hay que evitar los meses secos (Febrero- Mayo).

2.3. Portainjertos utilizados

La altura del injerto debe ser de 25 cm sin enterrar completamente al arbolito, sin embargo se ha encontrado que se pueden injertar a 45 cm.

2.3.1. Poda.

Esta es una práctica muy importante y debe iniciarse antes o inmediatamente después de establecerse la plantación. Existen varios tipos de podas; sin embargo, para los cítricos se recomiendan las siguientes:

2.3.1.1. Poda de formación.

Se debe despuntar el tallo principal a unos 10 cm para que se estimule la brotación de ramas laterales. De éstas se dejan solamente tres o cuatro ramas vigorosas, situadas a diferentes alturas y orientación de copas. Cuando éstas alcancen una longitud de 20 cm, se vuelve a despuntar a uno 5 cm, para seleccionar nuevamente dos o tres brotes por rama. Con estos se logra que el árbol tenga de 6 a 12 ramas bien distribuidas. Es importante manejar bien la poda por que permite formar una buena estructura del árbol resistente a fuertes vientos; además, circula mejor el aire, se aprovechan eficientemente los rayos solares y se mejora la calidad de la fruta (Varela *et al.*, 2006).

2.3.1.2. Poda de mantenimiento.

Facilita en aquellos árboles que se podaron y tiene una buena formación y sólo requerirá podas ligeras, como la eliminación de ramas muertas, improductivas y enfermas. Los cortes de las ramas gruesas deben de protegerse con pintura vinílica, de esmalte o cubre poda (Varela *et al* 2006).

Se recomienda realizar la poda de mantenimiento después de la cosecha y antes de la siguiente floración, en la época seca.

2.3.1.3. Control de malezas

Los cítricos, como todos los cultivos, necesitan un adecuado control de malezas ya que estas compiten por agua, luz, espacio y nutrimentos con los árboles. Esto permitirá que los árboles se desarrollen, aprovechen mejor los elementos y produzcan buena cosecha. Sin embargo, un huerto siempre limpio puede traer problemas tanto en los costos y por los posibles daños al suelo, al dejarlo desprotegido de la cubierta vegetal y expuesto a la erosión por el escurrimiento provocado por las lluvias. Por ello, se sugiere controlar las malezas en forma integral, es decir mediante métodos manuales (machetes o azadón), mecánicos (chapeos, rastreos) y químicos (herbicidas preemergentes, postemergentes (Pastrana *et al* 1998).

2.3.1.4. Nutrición y Fertilización de los cítricos en Huimanguillo

La calidad del fruto depende de factores como la intensidad de producción, el portainjerto, tipo de suelo, plagas y enfermedades, irrigación, fertilidad del suelo y estado nutrimental de los árboles (Barbazan, 1998; Quaggio *et al.*, 2002, Salgado *et al.*, 2007). A mayor producción se incrementa la competencia entre frutos, lo que limita las posibilidades de crecimiento, y por consiguiente su tamaño final y el contenido de sólidos solubles. Para lograr una buena producción y calidad es necesario contar con una evaluación de las necesidades nutricionales reales de la

plantación y a partir de estas aplicar un programa de fertilización, basado en los métodos de análisis de suelo y plantas (Pastrana *et al.*, 1998); el método más usual es del análisis foliar (Salgado *et al.*, 2006)

Considerando que los nutrimentos son esenciales para el funcionamiento metabólico del árbol de naranja y limón, para obtener buenos rendimientos y frutos de calidad, es necesario que en cada ciclo de producción se restablezcan los niveles de nutrimentos esenciales que el árbol toma del suelo, principalmente Nitrógeno (N), Fosforo (P) y Potasio (K). El restablecimiento de nutrimentos puede lograrse mediante aplicaciones al suelo y al follaje; así mismo es necesario realizar análisis foliares para diagnosticar el estado nutrimental de los árboles (Curtí *et al.*, 2000)

Los fertilizantes comerciales que se recomiendan como fuente de nitrógeno, fósforo, potasio, zinc y manganeso son: urea (46% de N), superfosfato triple (46% de P_2O_5), cloruro de Potasio (60% de K_2O), sulfato de Zinc (36% de Zinc) y sulfato de manganeso (29.5% de Mn). Todos los fertilizantes son solubles en agua, y por consiguiente los nutrimentos son rápidamente aprovechables por las plantas (Pastrana, *et al* 1998). Sin embargo estudio realizado por Salgado *et al.*, 2007; en la zona productora de Huimanguillo Tabasco encontró que los cítricos se encuentran establecidas en dos unidades de suelo, la unidad Acrisol presentada con nueve sub unidades y la unidad Cambisol sólo dos subunidades.

Cuadro 1. Unidades y subunidades de suelo muestreadas en la zona citrícola de Huimanguillo, Tabasco.

Códigos de subunidades de suelos	Denominación de suelos
Acdyhfr	Acrisol Hiperdistri-Férrico
Acumgl	Acrisol Umbri-Gléyico
Acfrum	Acrisol Ferri-Úmbrico
Acumpl	Acrisol Umbri-Plíntico
Acglpl	Acrisol Gleyi-Plíntico
Achuum	Acrisol Humi-Úmbrico
Achupl	Acrisol Humi-Plíntico
Acfrpl	Acrisol Ferri- Plíntico:
ACdyhum	Acrisol Hiperdistri-Úmbrico
CMflgl	Cambisol Ferrari-Gléyico
CMcrfl	Cambisol Cromo-Ferrálico

Fuente: Salgado *et al.*, 2007

Se recomiendan las siguientes dosis de fertilización de N-P-K para naranja valencia en las subunidades Acumpl CMcrfl y Achupl 138-46-120, y 184-46-180 Achuum Acglpl, Acfrpl y Acglpl. Limón persa para las subunidades CMcrfl, Achupl, Acdyhfr y CMflgl en que se encuentra establecidos es de 184-69-210; una segunda recomendación para las subunidades Acumpl, Acfrpl, 207-69-240 y la tercera recomendación en las Acglpl, Acumgl y Acdyhfr es de 207-92-240 (Salgado *et al.*, 2007).

2.4. Cosecha

En la región citrícola de Huimanguillo se realizan tres cosechas de naranja durante el año, estas son: temporada, mayera y la agostera. La temporada (enero a marzo) es la más importante por su volumen y calidad de la fruta, sin embargo tiene menor precio. La cosecha de mayo es una fruta fuera de temporada, de menor volumen y de menor calidad en su apariencia externa y con poco jugo; la de agosto es otra cosecha fuera de temporada, de mayor importancia y junto con la cosecha de mayo, alcanzan los mejores precios en el mercado local y nacional (Pastrana *et al.*, 1998).

2.5. Principales plagas

2.5.1. Mosca de la fruta *Anastrepha ludens* (Loew.)

La mosca de la fruta ataca diversas especies frutícolas entre ellos la toronja y la naranja. El daño lo causan las larvas que surgen de los huevecillos ovipositados en el interior del fruto. En Tabasco las pérdidas por esta plaga alcanza un 10% de daños y en otros estados se reporta una pérdida del 15-18% (Pastrana *et al* 1998).

2.5.2. Arador o negrilla *Phyllocoptura oleivora*

Este ácaro es de importancia económica, ya que demerita la calidad externa del fruto, lo que provoca la depreciación de la fruta en el mercado nacional y extranjero (Pastrana *et al.*, 1998).

2.5.3. Pulgón café *Toxoptera citricida*

Como vector principal del Virus de la tristeza de los cítricos VTC, es uno de las grandes amenazas para las plantaciones de cítricos de nuestro estado (Pastrana *et al* 1998).

2.6. Principales enfermedades.

2.6.1. Antracnosis *Colletotrichum ocutatum*

Es conocida como la caída de frutos pequeños; en Tabasco la mayor incidencia ocurre de enero a marzo, cuando se presenta la floración más compacta. Se beneficia por la presencia de nortes y por temperaturas de 16°C. Su combate es mediante la aplicación de Benomyl, en dosis de 120 gramos en 100 litros de agua (Pastrana *et al.*, 1998).

2.6.2. Mancha grasienta *Mycosphaerella citri*

Esta enfermedad causada por este hongo es la más común en Huimanguillo, los síntomas aparecen en el envés de las hojas como un ligero ampollamiento y en el haz se presenta un amarillamiento del tejido, posteriormente se torna negro, mas tarde las hojas caen provocando una defoliación severas de Esta enfermedad puede ser controlada mediante aplicaciones de oxiclورو de cobre, sulfato de cobre tribásico y Benomyl (Pastrana *et al* 1998).

2.6.3. Virus de la Tristeza de los Cítricos (VTC)

Ataca a naranjo agrio, limón disminuyendo: calidad, cantidad o matar árboles en periodos cortos. El agente causal es un closterovirus, ARN monocatenal, y partícula en forma de barilla flexible de 11x20000nm. Los síntomas tipo declinamiento asocian la necrosis del floema en el sitio del injerto en plantas de naranjo, toronjo, o mandarino, injertadas en naranjo agrio o en *Citrus macrophylla*. Declinamiento gradual o repentino y muerte de la planta. Tipo picado de tallo, inducen acanaladuras en la madera de naranjo, toronjo, limas y limones en la parte superior (copa o cultivar) o en el porta injerto, justo debajo de la unión del injerto. Afectan en el vigor y la productividad de plantas afectadas. Esta raza causa declinamiento gradual o repentino en plantas injertadas sobre naranjo agrio. Tipo amarillamiento, clorosis uniforme en plántulas de naranjo agrio, limón (*Citrus limon*) y toronjo bajo condiciones de invernadero. Tipos débiles, son aquellas que no inducen ninguno de los síntomas asociados al VTC, solo ocasionan una ligera aclaración de las nervaduras en plantas de lima mexicana (Febres *et a.*,/ 1996).

2.7. Patrones Tolerantes al VTC

Para enfrentar enfermedades virales como el VTC; se han realizado estudios de transformación genética en algunos patrones, obteniendo plantas transgénicas de naranjo agrio (*C. aurantium* L.) a partir de raíces transformadas con *Agrobacterium*

rhizogenes (Chávez, *et al* 2003). Se ha demostrado que la opción para seguir usando el naranjo agrio como portainjertos es la generación de plantas resistentes a VTC, y la herramienta más eficiente para lograrlo es la transformación genética. En la mayoría de transformaciones genéticas en cítricos se ha usado sistemas basados en *Agrobacterium tumefaciens* (Peña y Navarro, 1999).

2.7.1. Investigación sobre portainjertos

En México a partir de 1973, el INIFAP desarrolló un proyecto de investigación encaminada a resolver el problema de gomosis. Se evaluó el comportamiento de 13 genotipos de diferentes especies de cítricos: Limones: *C. Macrophylla* y *C. Volkameriana*; Limas: Lima Rangpour; Mandarinas: Shekwasha, Cleopatra Y Amblicarpa; Naranjo Agrio: Selección regional, Agrio de Brasil y Taiwanica. También se probaron Híbridos intergenéricos: *Citranges*, *Troyer* y *Carrizo*, *Citrumelo Swingle* y limón Mexicano de pie franco usado como testigo.

Después de 12 años de evaluar su tolerancia a gomosis, las características de crecimiento del árbol, rendimiento y calidad de la fruta, se determinó que: *Macrophylla*, *Volkameriana* y *Amblicarpa* fueron los mejores portainjertos para limón Mexicano, superando a los *Citranges*, *Troyer* y *Carrizo*, el *Citrumelo Swingle* y la mandarina *Cleopatra*, los cuales son conocidos como los mejores portainjertos para naranja y toronja (Valdez y Medina, 1981; Medina, 1994; Medina, 1996; Pinto y Col. 1994).

2.7.2. Efecto y características de los portainjertos en limón Mexicano

Volkameriana (*Citrus Volkameriana* Pasq). Del grupo de los limones verdaderos. Es compatible con limón mexicano, con el que se desarrolla árboles vigorosos, fructifican precoz y muy productivos producen frutos de muy buena calidad (Valdez y Medina, 1984). Los árboles se adaptan bien a cualquier tipo de suelo, especialmente en los arenosos y profundos. En los primeros meses de la plantación muestran

sensibilidad a los CaCO_3 , pero después los síntomas desaparecen. Su sistema radicular abundante es tolerante a *Phytophthora* parasítica Dastur. Además se reporta como tolerante al virus de la tristeza de los cítricos (VTC) (Valdez y Medina, 1981; Medina, 1994; Medina, 1996).

Macrofila (*C. macrophylla* Wester). También del grupo de los limones verdaderos, tiene excelente compatibilidad con limón mexicano, propicia el crecimiento sano y vigoroso, fructificación precoz y alta producción. Produce frutos de buen tamaño y excelente calidad interna. Su sistema radicular profundo y abundante tolera la gomosis, aunque se reporta como susceptible al VTC. *Macrophylla* tiene la particularidad de tolerar intervalos de riego de más de 60 días en suelos profundos (Valdez y Medina, 1981; Medina y Col, 1993; Medina, 1994; Medina, 1996).

Amblicarpa (*C. amblicarpa*). En suelos franco arcillo-arenoso este portainjerto induce el máximo crecimiento de los árboles de limón, son más tardíos para entrar en producción respecto a Volkameriana y Macrophylla. Su tolerancia a gomosis y al VTC es también muy aceptable (Medina y Valdez, 1981; Medina y Col; 1993).

2.8. Enfermedades causadas por *Phytophthora* en cítricos

Las especies del genero *Phytophthora*, presentan una gran distribución mundial, y se caracterizan por desarrollar pudrición del pie, con presencia de lesiones necróticas en la parte basal del tronco o en el cuello, pudiendo anillar y causar la muerte del árbol, pudrición de raíces y gomosis en la base del tronco (Latorre, 2004), y el aguado o podredumbre marrón de los frutos (Keen, 2000). Esto provoca un decaimiento progresivo de los huertos, disminuyendo considerablemente los rendimientos, con pérdidas económicas estimadas en millones de dólares anuales en huertos sobre patrones susceptibles (Martins *et al.*, 2001; Dirac *et al.*, 2003; Timmer *et al.*, 2003).

Entre las enfermedades causadas por hongos, la gomosis o podredumbre del pie de los cítricos es de las de mayor importancia económica, por lo que los productores realizan prácticas de manejo anualmente pese a que sus huertos están establecidos con planta injertadas sobre el patrón naranjo agrio el cual es resistente a esta enfermedad (Timmer, 1972). La gomosis del tronco es la enfermedad más grave causada por *Phytophthora* spp. Esta afecta la producción, baja los rendimientos o calidad de la fruta, en casos extremos causa la muerte del árbol. La infección se da a nivel del suelo, produciendo infecciones hacia abajo del injerto y hacia arriba sobre las ramas de los cítricos. La corteza interior y el cambium son los tejidos más dañados. En la base del tallo la corteza externa permanece firme con pequeñas grietas en las cuales se exuda abundante goma; la cual es soluble en agua y desaparece tras fuertes lluvias en climas subtropicales, pero en condiciones secas la goma permanece en el tronco. Cuando las lesiones se extienden alrededor de la circunferencia del tronco, provoca la muerte del cambium anillando lentamente al árbol y finalmente provoca su muerte. Los árboles afectados gravemente tienen las hojas de color verde pálido, con nervaduras amarillas; si la lesión cesa su expansión o si el hongo muere, el área afectada se rodea de un callo cicatricial y comienza a sanar. Los árboles de vivero y plantaciones jóvenes con pequeñas circunferencias de tronco pueden ser estrangulados y morir rápidamente. Los árboles adultos pueden morir pero, por lo general, sólo resultan anillados parcialmente y los daños producen un decaimiento de la copa, con defoliación, muerte de ramas jóvenes y escaso crecimiento de brotes. En condiciones de alta humedad, los frutos sobre o cerca del suelo pueden ser infestados por *Phytophthora* spp. El área afectada, circular y correosa, es de color café o café claro y hundido comparada con la corteza adyacente. Al tener condiciones favorables el hongo produce esporangios en la superficie del fruto. Los esporangios se extienden a los frutos, en toda la copa por la salpicadura de agua, la lluvia acompañada de vientos o los caracoles. La mayoría de los frutos infestados se caen, las epidemias de pudriciones en fruto aparecen cuando las lluvias coinciden con las primeras fases de madurez del fruto. Todos los cultivares son afectados especialmente los cultivos de limón en invierno, tal es el caso en California y las naranjas de principio de estación en Florida.

En diversos países productores de cítricos la gomosis se ha atribuido a diferentes especies de *Phytophthora* como son *P. parasitica* Dastur [(sin. *P. nicotianae* Breda de Haan var. *parasitica* (Dastur) Waterhouse)] *P. citrophthora* (Sm. and Sm.) Leonian, *P. palmivora* Butler; (Vanderweyen, 1983, Feld *et al.*, 1990; Matheron y Matejka, 1993; Erwin y Ribeiro, 1996; Dirac *et al.*, 2003; Timmer *et al.*, 2003), y con menor frecuencia se han relacionado *P. hibernalis*, *P. syringae*, *P. citricola* y *P. cactorum* De Bary (Keen, 2000), también a *P. cryptogea* y *P. inundata* identificada recientemente en Chile (Vial *et al.*, 2004). En Estados Unidos, se le atribuye como agente causal a *P. parasitica* en los estados de Florida, Texas, Arizona y California; Arizona; *P. citrophthora* en California; *P. citrophthora*, *P. syringae* y *P. hibernalis*. Y *P. palmivora* (Butler) en Florida (Matheron, *et al.* 1997; Timmer, 1973, Timmer, *et al.* 1993, Fawcett 1936. Klotz, *et al.* 1958, Klotz, 1978, Timmer, 1988 y Whitside, 1988 Zitko, *et al.*, 1991). En Brasil en el estado de Sao Paulo, se reporta a *Phytophthora parasitica* Dastur [*P. nicotianae* Breda de Haan var. *parasitica* Dastur) Waterhouse] y *P. citrophthora* (Sm. & Sm.) Leonian (Carpenter & Furr; 1962; Graham, 1990; 1995; Matheron *et al.*, 1998, Feichtenberger, 2001 Medina Filho, *et al.* 2003). Y en Chile a *P. citrophthora* (Mújica, *et al.*, 1980), *P. palmivora* (Vargas, 1989) *P. inundata* y *P. criptogea* (Vial *et al.*, 2004). Para México, estudios realizados en Tecomán, Colima, indican que la Gomosis en *C. aurantifolia* Swingle es causada por *Phytophthora parasitica* Dastur (Vidales, 1982).

Cuadro 2. Principales especies de *Phytophthora* causantes de la gomosis, pudrición del pie, pudrición de raíces y el aguado o podredumbre marrón de los frutos, aisladas de cítricos a nivel mundial.

Países	Agente causal	Descriptor
Estados Unidos	<i>P. parasítica</i> ,	Fawcett 1936. Fawcett, <i>et al</i> 1948. Klotz, <i>et al.</i> 1958. Timmer,1973. Klotz, 1978. Timmer, <i>et al</i> 1993. Timmer, 1988. Matheron, <i>et al.</i> 1997 y Whitside, 1988.
	<i>P. citrophthora</i>	
	<i>P. palmivora</i>	
	<i>P. syringae</i> y <i>P. hibernalis</i>	
Brasil	<i>Phytophthora parasítica</i> Dastur [<i>P. nicotianae</i> Breda de Haan var. <i>parasítica</i> Dastur) Waterhouse] y <i>P. citrophthora</i> (Sm. & Sm.) Leonian	Carpenter & Furr; 1962; Graham, 1990; 1995; Matheron <i>et al.</i> , 1998, Feichtenberger, 2001, Medina Filho, <i>et al</i> 2003
Chile	<i>P. citrophthora</i> , <i>P. palmivora</i> , <i>P. inundata</i> y <i>P. criptogea</i>	Mujica, <i>et al.</i> , 1980, Vargas, 1989, Vial <i>et al</i> , 2004
México	<i>Phytophthora parasítica</i> Dastur, <i>P. citrophthora</i> Leonina	Vidales, 1982
Francia	<i>P. parasítica</i> , <i>P. citricola</i> , <i>P. citrophthora</i>	
España		
Italia	<i>P. cactorum</i> , <i>P. citricola</i> , <i>P. hibernalis</i> , <i>P. sysingae</i> , <i>P. citrophthora</i>	Favarolo <i>et al.</i> , 1973
Israel		
Argentina		
China		
Portugal		
India	<i>P. palmivora</i> Bult	Devarajan <i>et al</i> 1944 y Ramakrishnan 1954.

2.9. Caracterización y cuantificación de los daños por gomosis

2.9.1. Daño reversible

Los árboles de semilla, afectados por gomosis, pero aun con posibilidad de recuperación, presentan varios niveles de daño. El daño más fuerte se manifiesta en los limoneros y que se reconoce por medio de una alta proporción de ramas secas, poco follaje y clorosis general severa. (Orozco, 1995). La gomosis en arboles reduce su rendimiento hasta en 60%. En contraste, aquellos con daño ligero presentan un solo sector o una rama con follaje clorótico, mientras el resto de árbol presenta un

aspecto normal. Las pérdidas de rendimientos en plantas con daño ligero se estiman entre 5 y 10%. En ambos casos, los árboles pueden o no presentar lesiones en el tronco con escurrimientos de goma y agrietamientos de corteza.

2.9.2. Daño irreversible

Por lo general, los árboles con daño irreversible presentan canchales bastante visibles en el tronco y una alta proporción de ramas muertas. La recuperación con medios curativos es muy difícil, por lo que en poco tiempo mueren. Las pérdidas en rendimientos son de 100%.

2.9.3. Portainjertos tolerantes a *Phytophthora*

Las primeras pruebas de resistencia a *Phytophthora* spp. en variedades de cítricos fueron realizadas por Fawcett (1923), quien estableció la naturaleza parasítica del patógeno. Klotz & Fawcett (1930), utilizando métodos de inoculación artificial del patógeno en la base del tronco, evaluó el área de la lesión producida, este trabajo fue la base para futuras investigaciones en busca de nuevos portainjertos tolerantes a la gomosis (Fawcett & Bitancourt, 1940; Rossetti, 1947; Medina *et al.*, 2003). Así pues, el patrón más común que se utiliza es en naranjo agrio, porque representa resistencia a la gomosis; pero es susceptible al Virus de la Tristeza de los Cítricos (VTC), que puede causar la muerte de los árboles rápidamente. Sin embargo existen otros portainjerto resistentes y tolerantes a las dos enfermedades. Se tiene que *Citrumelo Swingle* y *Citrus macrophylla* Wester están identificados como tolerantes a infecciones desarrolladas en la base del tronco y raíces. Moderadamente susceptibles se tiene a la tangerina Sunki (*Citrus sunki* Hort. ex. Tan.), tangerina Cleópatra (*C. reshni* Hort. ex. Tan.), Limón volkameriano (*Citrus volkameriana* Tan. e Pasq.), *Citrango Troyer* y *Citrango Carrizo* (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*). Otros portainjertos, como limón rugoso, pomelos (*Citrus paradisi* Macf.) y lima ácida [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing.] presentan una alta susceptibilidad (Hutchison & Grimm, 1973; Graham, 1990; 1995, Widmer *et al.*, 1998; Medina *et al.* 2004.).

En Tabasco, de acuerdo con Pastrana *et al.*, (1998) los patrones que se están empleando dentro del programa de reconversión citrícola son *C. volkameriana*, *Citrange carrizo*, *C. troyer*, mandarina Cleopatra, Naranja Trifoliado, Limón Rugoso y *C. swingle*.

2.10. Taxonomía de *Phytophthora*

El género *Phytophthora* es el causante de graves enfermedades en diversos cultivos, presentándose de forma endémica en diversas latitudes y regiones climáticas a nivel mundial (Zentmyer, 1976; Hansen *et al.*, 1988, Ortiz, 1996). *Phytophthora* es uno de los patógenos en los cuales se invierte la tercera parte de los fungicidas químicos producidos en el mundo (Schwinn, 1983). Su posición taxonómica dentro de los organismos vivos se define a continuación:

Reino: Cromista (grupo Stramenophyle)

Phyllum: Oomycota

Clase: Oomycete

Subclase: Peronosporomycetidae

Orden: Pythiales

Familia: Pythiaceae

Género: *Phytophthora*

Especie: spp.

El *Phyllum Oomycota*, perteneciente al reino *Cromista*, comprende más de 700 especies, las cuales no tienen pigmentos fotosintéticos, poseen dos flagelos en las zoosporas y los gametos masculinos, con paredes formadas por celulosa o polímeros similares a celulosa y tienen hábitos acuáticos y terrestres, aunque siempre necesitan la presencia de agua.

Por sus formas filamentosas parecidas a hifas, se agruparon originalmente como hongos. (Raven, Evert y Eichhorn, 1999), lo que luego fue confirmado por las

filogenias moleculares, basadas en las secuencias del RNA ribosomal, datos de los aminoácidos compilados para las proteínas de las mitocondria y cuatro proteínas que codifican para los genes cromosómicos, evidenciando que los *Oomycetes* adquirieron la habilidad de infectar las plantas de manera independiente de los hongos verdaderos (Kamoun, 2002).

Los *Oomycetes*, están mas relacionados con las algas, dado que presentan meiosis en los gametangios, por lo tanto sus núcleos vegetativos son de naturaleza diploide. Son conocidos como organismos “heterocontes”, lo que significa que poseen flagelos en las zoosporas con longitud y ornamentación diferente. Los flagelos se presentan en pares, un flagelo largo y adornado con nastigonemas (pelos) distintivos (plumosos) y un flagelo mas corto, delgado, cilíndrico y en forma de látigo o flecha.

Las características que diferencian el género *Phytophthora* de los hongos se basan en la morfología de las crestas mitocondriales (tubulares) y la bioquímica de las paredes celulares, las cuales contienen microfibrillas de celulosa con una matriz amorfa de β 1-3 glucano en vez de quitina, carencia de hipoxidación del esqualeno a esteroides y diferencias en las vías metabólicas, como resultado de un sistema genético único (Griffith *et al.* 1992, cit. Por Erwin y Ribeiro, 1996).

Los análisis de las secuencias moleculares de la subunidad del gen 18S del rDNA (ribosomal) han confirmado que los *Oomycetes*, están estrechamente relacionados con las Crhysophytas, Diatomeas y algas cafés, pero se separaron relativamente temprano de las formas pigmentadas. (Raven, Evert y Eichhorn, 1999). Foster (1990) observó que las secuencias de la subunidad 18S del rDNA son similares entre las algas fotosintéticas heterocontes y miembros del género *Phytophthora*. Al comparar las secuencias de la subunidad 28S rDNA, encontraron poca sustitución de nucleótidos entre los seis grupos de *Phytophthora*, mostrando gran homogeneidad y por lo tanto poca utilidad de esta región para los análisis filogenéticos (Briand,1995, citado por Smart *et al.*, 2000).

Al analizar el gen de la familia actina, Bhattacharia y Stickel (1994) (citados por Smart et al., 2000), encontraron que todos los miembros de Oomycota contienen dos tipos de actina, los cuales probablemente surgieron por una duplicación del gen, que ocurrió después de la divergencia de los *Oomycetes* y de las algas cromofitas.

La mayoría de las especies de *Oomycetes* se reproducen sexual y asexualmente: la reproducción asexual, es por medio de las zoosporas móviles cuyos flagelos son característicos y distintivos de las especies. La reproducción sexual es oogámica. El gameto femenino (oogonio) es relativamente grande, en forma de huevo no flagelado y es fecundado por el gameto masculino (anteridio) que es notablemente más pequeño.

En los *Oomycetes*, uno o muchos huevos se producen en una estructura denominada Oogonio. El anteridio contiene numerosos núcleos masculinos. La fertilización resulta en la formación de un cigoto con paredes gruesas (la Oospora, que le da el nombre al Phylum Oomycota) que puede entrar en estado de reposo y tolerar condiciones de estrés, permaneciendo inactiva o en reposo, cuando las condiciones no son favorables para la germinación.

Las esporas asexuales (zoosporas) son producidas en el esporangio, de manera, más precisa el zoosporangio. Los esporangios se desarrollan sobre esporangióforos, los cuales son similares en diámetros a las hifas. En algunas especies emergen nuevos esporangióforos a través de las bases de esporangióforos viejos, de las cuales se han liberado zoosporas uninucleadas.

Un grupo de grande de especies de este phylum son acuáticos, algunos saprófitos y otros son parásitos, que causan enfermedades en peces y sus huevos. Otros son terrestres como los géneros *Phytophthora* y *Pythium* estrechamente relacionados y pertenecen a la familia *Pythiaceae*, los cuales causan enfermedades en las plantas, pero requieren del agua líquida para la movilidad de las zoosporas en el suelo o en el follaje.

2.10.1. Identificación de las especies de *Phytophthora*

Las primeras descripciones e identificaciones utilizadas para *Phytophthora* se realizaron a base de características morfológicas de los órganos de reproducción, el tamaño y forma de los esporangios, los anteridios, oogonios, las oosporas y las clamidosporas; así como también las características fisiológicas y de patogenicidad de las cepas (Stamps *et al.*, 1992, Waterhuose *et al.*, 1983)

Aunque la identificación de algunas especies de *Phytophthora*, parece ser relativamente simple, existen diferencias morfológicas con otras especies del mismo género en otros casos existen algunas características variables, que induce a los expertos a considerar que el género es difícil de clasificar, más aún para los que no están relacionadas con la taxonomía de este grupo. Por esta razón es necesario acudir a las técnicas de patrones isoenzimáticos (Ortíz, 1996) y RFLPs de DNA nuclear y mitocondrial (La court, 1994), para diferenciar las especies

En el cuadro 3 se comparan el número de especies descritas en tres diferentes períodos primero, Rosenbaum (1917), utilizando características como el tipo de anteridio, la prominencia de las papilas sobre el esporangio, el tamaño y la relación longitud y ancho del esporangio, la presencia y tamaño de las clamidosporas y el tamaño y la abundancia de las oosporas, para separar 11 especies de *Phytophthora*, (Leonian y Geer, 1929).

Tucker en 1930, además de la morfología, utilizó la fisiología y la patología, en las que incluyó la habilidad para crecer en ciertos medios, el tipo anteridio, la presencia o ausencia de órganos sexuales, la naturaleza de las papilas (especie de trompo compuesto de un material hidratado, con un índice de refracción diferente al material de la pared celular de las hifas), la presencia de clamidosporas, la patogenicidad, el tamaño de la oospora, la presencia de hinchamientos hifales, las temperaturas mínima, óptima y máxima para el crecimiento y la especificidad patogénica.

Posteriormente, se publicaron muchas otras claves sobre especies de *Phytophthora*, pero la clave taxonómica producida por Waterhouse (1983), fue la primera en ubicar las categorías de las especies en grupos morfológicos y parámetros fisiológicos, lo que significó un gran avance en la taxonomía de *Phytophthora*, la cual es muy útil y aún aceptada. Una revisión más reciente de Stamps, *et al.*, 1992. Es empleada para describir las especies morfológicas, además de la adopción de criterios fisiológicos. Las especies de *Phytophthora* descritas de manera morfológica y fisiológica se describen en el cuadro 3.

Dentro de los parámetros incluyeron patrones de ramificación de los esporangióforos; ápice del esporangio; abundancia de esporangios sobre medio sólido; la caducidad del esporangio; la proliferación interna de los esporangios; la reproducción de oogonios y oosporas en un solo cultivo (homotálico) o en diferentes cultivos (heterotálico); naturaleza del anteridio; abundancia o ausencia de oosporas en los tejidos huéspedes o en el cultivo y para ciertas especies, la forma del esporangio y sus dimensiones.

Otras características incluidas en la identificación de ciertas especies son: relación longitud-ancho, esporangióforos, hinchamientos hifales, presencia o ausencia de clamidosporas, tamaño del oogonio, ornamentación de la pared del oogonio, especificidad del huésped y rangos de temperatura mínima, óptima y máxima para crecimiento.

Cuadro 3. Identificación de *Phytophthora* morfológica y fisiológica

Tucker, 1931 especies	WATERHOUSE, 1963		NEWHOOK et al., 1978	STAMPS et al., 1990	
ESPECIES	GRUPO	ESPECIES	ESPECIES	ESPECIES/DESCRIPTOR	AÑO
<i>cactorum</i>	I	<i>cactorum</i>	<i>cactorum iranica</i>	<i>cactorum</i> (Lebert & Cohn) Schroter	1886
				<i>iranica</i> Ershad	1971
				<i>pseudosugae</i> Hamm & Hansen	1983
				<i>clandestine</i> Taylor, Pascoe & Green	1985
<i>palmivora</i>	II	<i>palmivora</i>	<i>palmivora</i> MF1	<i>palmivora</i> MF1 (Butler) Butler	1919
			<i>palmivora</i> MF2	<i>palmivora</i> MF2	1976
			<i>palmivora</i> MF3	<i>megakarya</i> Brasier & Griffin	1979
			<i>palmivora</i> MF4	<i>palmivora</i> MF4	1976
				<i>p. heterocystica</i> Babacauh	1983
[<i>arecae</i>]		<i>arecae</i>	<i>arecae</i>	<i>arecae</i> (Colem.) Pethybr.	1913
<i>boehmeriae</i>		<i>boehmeriae</i>	<i>boehmeriae</i>	<i>boehmeriae</i> Saw.	1927
			<i>botryosa</i>	<i>botryosa</i> Chee	1969
non étudiée		<i>heveae</i>	<i>heveae</i>	<i>heveae</i> Thompson	1929
				<i>katsurae</i> ko & Chang	1979
[<i>meadii</i>]		<i>meadii</i>	<i>meadii</i>	<i>meadii</i> McRae	1918
<i>p. nicotianae</i>		<i>n. nicotianae</i>	<i>n. nicotianae</i>	<i>n. nicotianae</i> Breda de Haan	1896
<i>parasitica</i>		<i>parasitica</i>	<i>n. parasitica</i>	<i>n. parasitica</i> (Dastur) Wathrh.	1963
<i>capsici</i>		<i>capsici</i>	<i>capsici</i>	<i>capsici</i> Leonian	1922
<i>citrophthora</i>		<i>citrophthora</i>	<i>citrophthora</i>	<i>citrophthora</i> (Smith & Smith) Leonian	1925
<i>mexicana</i>		<i>mexicana</i>	<i>mexicana</i>	<i>mexicana</i> Hotson & Hartge	1923
[<i>citricola</i>]	III	<i>citricola</i>	<i>citricola</i>	<i>citricola</i> Saw.	1927
<i>syringae</i>		<i>syringae</i>	<i>syringae</i>	<i>syringae</i> (Kleb.) Kleb.	1909
			<i>porri</i>	<i>porri</i> Foister	1931
			<i>primulae</i>	<i>primulae</i> Tomlinson	1952
			<i>cyperi</i>	<i>cyperi</i> (Ideta) S. Ito	1935
			<i>cyperi-bulbosi</i>	<i>cyperi-bulbosi</i> Seethal. & Ramakr.	1953
			<i>inflata</i>	<i>inflata</i> Caros. & Tucker	1949
			<i>lepironiae</i>	<i>lepironiae</i> Saw.	1919
<i>colocaciae</i>	IV	<i>colocaciae</i>	<i>colocaciae</i>	<i>colocaciae</i> Racib.	1900
				<i>eriugena</i> Clancy & Kavan.	1977
[<i>hibernalis</i>]		<i>hibernalis</i>	<i>hibernalis</i>	<i>hibernalis</i> Carne	1925
			<i>ilicis</i>	<i>ilicis</i> Buddenh.	1957
<i>infestans</i>		<i>i. infestans</i>	<i>infestans</i>	<i>infestans</i> (Mont.) de Bary	1876
<i>thalictri</i>		<i>i. thalictri</i>	*	*	
			<i>melonis</i>	[]	
				<i>mirabilis</i> Galindo-A. & Hohl	1986
<i>phaseoli</i>		<i>phaseoli</i>	<i>phaseoli</i>	<i>phaseoli</i> Thaxter	1889
	V	<i>fragariae</i>	<i>fragariae</i>	<i>fragariae</i> Hickman	1940
				<i>f. oryzobladis</i> Wang & Lu	1978
		<i>m. megasperma</i>	<i>m. megasperma</i>	<i>m. megasperma</i> Dreschler	1931
		<i>m. sojiae</i>	<i>m. sojiae</i>	<i>m sojiae</i> Hildebr.	1959
		<i>quininea</i>	<i>quininea</i>	<i>quininea</i> Crand.	1947
		<i>verrucosa</i>	<i>verrucosa</i>	<i>verrucosa</i> Alcock & Foister	1940
				<i>humicola</i> Ko & Ann	1985
				<i>lateralis</i> Tucker & Milbr.	1942
				<i>insolita</i> Ann & Ko	1981
<i>cambivora</i>	VI	<i>cambivora</i>	<i>cambivora</i>	<i>cambivora</i> (Petri) Buisman	1927
<i>cinnamomi</i>		<i>cinnamomi</i>	<i>cinnamomi</i>	<i>cinnamomi</i> Rands	1922
<i>cryptogea</i>		<i>cryptogea</i>	<i>cryptogea</i>	<i>cryptogea</i> Pethybr. & Laff.	1919
			<i>drechsleri</i>	<i>d. drechsleri</i> Tucker	1931
			<i>d. cajanis</i>	<i>d. cajani</i> Pal, Grawal & Sarbhoy	1970
				[<i>melonis</i>] Katsura	1976
				<i>sinensis</i> Yu & Zhuang	1982
<i>erythroseptica</i>		<i>e. erythroseptica</i>	<i>e. erythroseptica</i>	<i>e. erythroseptica</i> Pethybr.	1913
			<i>e. pisi</i>	<i>e. pisi</i> Byw. & Hickman	1959
<i>richardiae</i>		<i>richardiae</i>	<i>richardiae</i>	<i>richardiae</i> Buisman	1927
			<i>vignae</i>	<i>vignae</i> Purs	1957
		<i>gonapodyides</i>	<i>gonapodyides</i>	<i>gonapodyides</i> (Petersen) Buisman	1927
			<i>japonica</i>	<i>japonica</i> Waterh.	1974
				<i>undulata</i> (Petersen) Dick	1989
codes:	[]	espece placee comme synonyme			
	*	espece ecartee			
	MF	forma morfológica			

2.10.2. Micelio

Las estructuras somáticas (talos) de *Phytophthora* están compuestos de filamentos, hialinos (hifas) ramificados y cenocíticos (no septados), excepto en cultivos viejos, en los cuales algunas veces se pueden observar septas, los talos varían según las especies y el medio de cultivo de crecimiento. En cultivos jóvenes, el citoplasma fluye libremente dentro del micelio. El diámetro del micelio (5-8 μ) es variable y depende de la naturaleza física y química del medio y de si el micelio está sobre la superficie aérea, sumergido o dentro de las células huéspedes. En ocasiones el micelio se esponja, se vuelve nudoso o tuberculado y raras veces crece simétricamente (Brasier, 1978; Bocca, 1980; Shaw, 1988; Erwin y Ribeiro, 1996). Las hifas se ramifican en ángulos aproximados de 90 grados y algunas veces se constriñen en la base. Aunque hay especies que tienen patrones morfoculturales de micelios característicos, éstos no son lo suficientemente útiles para diferenciar especies; tampoco lo son el crecimiento y la forma de la colonia y el hinchamiento de las hifas (Erwin y Ribeiro, 1996).

2.10.3. Esporangios y zoosporas

El género *Phytophthora* presenta estructuras vegetativas diploides (Samsome, 1965). Su ciclo de reproducción presenta dos tipos, el sexual y el asexual (Brasier, 1978; Bocca, 1980 y Shaw, 1988). Los esporangios producen esporas asexuales se reproducen sobre pedúnculos llamados esporangióforos, los cuales difieren ligeramente de las hifas vegetativas, de desarrollo indeterminado y se ramifica de diferentes formas simpodialmente, dando los esporangios liberan zoosporas en medios acuáticos o germinan estando en el tubo germinativo y dando lugar a la reproducción asexual (Brasier, 1978; Bocca, 1980 y Shaw, 1988). Los esporangios se diferencian porque en *Phytophthora* cada uno tiene un pedúnculo, cuya longitud varía con especie, en rangos de medio a corto, en el cual pueden liberar zoosporas (Sansome 1976 y Abad, 1983).

Los esporangios varían en forma y tamaño. Las formas son algo diferentes para una especie en particular, pero son a menudo variables en el rango: de esféricas, subesféricas, ovoides, ovalovoides, elipsoides, limoniformes, periformes, obperiformes (en forma de pera invertida), turbinadas (como un trompo), obtubinadas (trompo invertido). La diferencia de tamaño puede estar afectada por la luz, los esteroides y los medios nutritivos. Los esporangios miden entre 29x19 a 59x31 μ (Waterhouse, 1963). En algunas especies el esporangióforo reinicia el crecimiento a través de la base de los esporangios evacuados; el nuevo esporangio puede proliferar adentro de las paredes de uno vacío (proliferación interna) o el esporangióforo puede crecer hacia afuera y salir por el poro de esporangios anteriores y formar el próximo esporangio a alguna distancia del último (proliferación extendida).

El engrosamiento apical sobre el esporangio, el cual tiene forma de limón, se denomina papila, de cuyo extremo emergen las zoosporas. El espesor de esta estructura varía entre especies.

Es difícil interpretar la diferencia entre un esporangio semipapilado de uno no papilado. Los esporangios coloreados con azul de algodón (0.01%) en lactofenol (50mg/ml) podrían diferenciar el engrosamiento apical del protoplasma. Las coloraciones basadas en lactofenol son utilizadas debido a la conservación de los montajes que pueden ser conservados en un herbario para futuros estudios, pero a menudo se encogen los protoplasmas que están a dentro de los esporangios, lo que pueden evitarse por el uso del azul de algodón o azul-triptano en cloruro de sodio al 0.85%; sin embargo, estas coloraciones no preservan el espécimen (Erwin y Ribeiro, 1996).

Los eventos de una secuencia básica que conduce a una formación de zoosporas dentro del esporangio y la disolución de la boca apical, antes de la emisión de las zoosporas a partir de los esporangios, es igual para todas las especies. La caducidad

del esporangio y la longitud del pedicelo son factores y únicos para ciertas especies. Las especies no papiladas no son caducas o deciduas (Erwin y Ribeiro, 1996).

2.10.4. Morfología de las zoosporas

Los órganos vegetativos polinucleados al estar maduros forman las esporas y son biflageladas conocidas como zoosporas las cuales son liberadas a través de un poro apical de los esporangios siempre y cuando existan las condiciones de humedad y temperatura (Brasier, 1978; Bocca, 1980 y Shaw, 1988). El aparato flagelar típico de las zoosporas posee dos flagelos uno en forma de látigo y el otro en forma de pluma. La zoospora está formada por varias partes: el kinotesoma (cuerpo basal de la zoospora), la zona de transición que une el flagelo con el kinetosoma, y el sistema del microtúbulo, que permite anclar el flagelo a la zoospora.

Los anclajes (como raicillas) de los flagelos de *P. infestans*, son significativamente diferentes, pues solo tiene cinco “raicillas”, mientras que otras especies tienen seis. Una de las raicillas de las zoosporas de *P. infestans* contiene seis microtúbulos en comparación con otras especies que sólo presentan cuatro. Esta característica podría ser útil para diferenciar *P. infestans*, ya que parece ser la única en el género (Erwin y Ribeiro, 1996).

2.10.5. Presencia de clamidosporas

Ciertas especies producen clamidosporas multinucleadas esféricas, intercalares o terminales; por ejemplo *P. infestans* no produce clamidosporas. A las clamidosporas se les conocen como órganos de conservación en condiciones adversas a su crecimiento y temperatura (Brasier, 1978; Bocca, 1980 y Shaw, 1988). De acuerdo con Erwin y Ribeiro, (1996) consideran que la morfología de las clamidosporas no es muy útil para diferenciar especies, por lo tanto, no es una característica importante, excepto en *P. macrochlamydospora*, en la cual las clamidosporas son grandes y características.

2.10.6. Órganos sexuales

La reproducción sexual se da con mayor frecuencia en condiciones naturales, existen dos tipos el homotálicos conocido como gametos masculinos (anteridio) y el femenino (oogonio) además que se manifiesta la compatibilidad A1 y A2 (Brasier, 1978; Bocca, 1980 y Shaw, 1988). Los procesos sexuales involucran la producción del oogonio y el anteridio, los cuales surgen de las puntas del micelio que se contactan. Si el oogonio crece sobre el anteridio, éste se denomina anfiginio y si el anteridio rodea el oogonio, en su parte basal cerca del pedicelo, se conoce como paraginio. En *Pythium* el anteridio rodea completamente el oogonio. La posición del anteridio (paraginio o anfiginio) es una característica importante de diagnóstico. En *Phytophthora infestans* el anteridio es anfiginio (Erwin y Ribeiro, 1996).

2.10.7. Factores del ambiente que inciden en al clasificación de las especies

Dentro de los factores fisiológicos la temperatura, la humedad relativa y la luz son importantes para diferenciar ciertas especies de *Phytophthora*, en tre las cuales está incluida *P. infestans*, que crece bien a temperturas promedio de 18°C, con 1.300 microwatios por cm² de luz en medio agar-centeno y alta humedad relativa. En general se ha reportado que la radiación solar es el factor que más afecta la germinación de los esporangios, posiblemente por los efectos de la luz ultravioleta (Erwin y Ribeiro, 1996; Sunseri y Johnson, 2002).

2.10.8. Técnicas moleculares para diferenciar especies de Phytophthora

Las técnicas de diagnóstico han evolucionado a la par de los grandes avances logrados en genética molecular. A mediados de los 80's se inventó una técnica que permite detectar la presencia de un material genético (DNA o RNA) de interés a partir de muestras que contienen sólo unas moléculas de éste. La técnica de 'PCR' (por sus siglas en inglés, 'Polymerase Chain Reaction' o 'Reacción en Cadena de la Polimerasa') ha revolucionado, entre otras disciplinas, al diagnóstico de patógenos y

enfermedades en todos los seres vivos. Existen además otras técnicas suplementarias moleculares que permiten confirmar los diagnósticos en caso necesario. Por ejemplo, técnicas basadas en la hibridación de ácidos nucleicos. En éstas, el apareamiento de dos moléculas similares de ácidos nucleicos permite la detección de genes virales en una pequeña muestra de planta. Al contar con mejores herramientas de diagnóstico se ayuda a los productores a tener respuestas rápidas para el control de las enfermedades de sus cultivos.

Las técnicas de la biología molecular, se ha constituido en una herramienta importante para confirmar la validez de las especies determinadas, utilizando características morfológicas porque permiten detectar posibles diferencias genéticas que se desarrollan por la evolución relativamente rápida del patógeno, debido a la eficacia patogénica en muchos huéspedes, que en ocasiones no son acompañadas de cambios morfológicos.

Al comparar las secuencias de las regiones espaciadoras internas transcritas (ITSI e ITSII) de los seis grupos morfológicos descritos por Waterhouse (1983), se demuestra que el agrupamiento propuesto, coincide con las características morfológicas establecidas (Cooke y Duncan, 1997, citados por Smart *et al.*, 2002). Sin embargo, dentro de un mismo grupo, como es el caso del grupo IV, las especies *P. infestans*, *P. mirabilis* y *P. phaseoli* son indiferenciables por dicha técnica. Sin embargo, el análisis de haplotipos mitocondriales, permite tener una buena diferenciación. Las otras especies del grupo: *P. elicis*, *P. colocasiae* y *P. hibernalis* se pueden diferenciar directamente utilizando marcadores ITSII (Tooley et al, 1998, citados por Smart, 2002).

2.10.9. Cuantificación de ácidos nucleicos y Determinación espectrofotométrica

Para cuantificar la cantidad de DNA/ARN, la lectura debe hacerse a longitudes de 260 nm, lo cual permite el cálculo de la concentración de los ácidos nucleicos en la muestra. Una DO= 1 corresponde aproximadamente a 50 µg/mL de ADN de doble

cadena, 40 µg/mL del ADN de cadena sencilla y de ARN y 20 µg/mL de oligonucleótidos de cadena sencilla.

La relación entre la lectura de absorbancia a 260 y 280 nm (DO_{260/280}) aporta una estimación de la pureza de los ácidos nucleicos. Las preparaciones puras del ADN y de ARN tienen valores que van desde 1.8 a 2.0 a DO_{260/280} respectivamente. Si hay contaminación con proteínas o fenol, el valor obtenido en esta relación, puede ser significativamente diferente para los valores citados arriba y no será posible la cuantificación correcta de las moléculas (Sambrook *et al.*, 1989). Además de estimar la relación (DO_{260/280}), es conveniente realizar otra medición a 230 nm ya que esta puede proporcionar información valiosa acerca de la pureza de la muestra debido a que:

A 230 nm se localiza la absorbancia mínima de ácidos nucleicos y nucleótidos, se localiza la absorbancia máxima de enlaces peptídicos, además de que cualquier absorción a 230nm es indicativo de contaminación por proteínas.

La absorbancia a 230nm puede indicar la presencia de compuestos orgánicos (tales como solventes y antibióticos). Por ejemplo, una relación de A_{260}/A_{230} de una muestra de ARN debe ser > de 2.0. Si la relación es menor, la contaminación puede deberse, por ejemplo a la presencia de tiocinato de guanidina.

La absorbancia a 230 nm también puede indicar la contaminación con amortiguador, ya que el tris EDTA, así como otras sales, absorben a esta longitud de onda.

Concentración de ADN (µg/µL)= $[DO_{260} \times 100(\text{factor de dilución}) \times 50 \mu\text{g/mL}] / 1000$

2.11. Determinación de la calidad del DNA en geles de agarosa

El grado de degradación del DNA puede ser estimado por la electroforesis de una alícuota de la muestra en geles de agarosa. El ADN de peso molecular alto aparece como banda definida en la parte superior del gel a poca distancia de los pozos,

mientras que el material parcialmente degradado, forma un barrido (parecido a una mancha) de fragmento pequeños a lo largo del carril haciendo que la definición de la banda citada, pierda su nitidez o no se aprecie.

Algunas veces el ADN puede estar contaminado con otras sustancias que también absorben la radiación UV, como por ejemplo compuestos fenólicos y polisacáridos, principalmente. La presencia de estos compuestos, puede evitar la interpretación correcta de la calidad e incluso, la cantidad del ácido nucleico que está siendo analizado. Una forma rápida de estimar la pureza de estas moléculas, es a través de la fluorescencia que emite el bromuro de etidio cuando está mezclado con ellas. Este compuesto químico tiene afinidad por moléculas del ADN o ARN de doble cadena entre las que se intercala, de manera que al irradiar el gel con una fuente de luz UV se puede apreciar la ubicación, calidad y cantidad de la molécula en cuestión. La estimación puede llevarse a cabo, debido a que la fluorescencia emitida es proporcional al total de la masa del ADN o ARN.

La cantidad de ácidos nucleicos en la muestra, puede ser estimada al comparar el campo fluorescente de los mismos respecto a la serie de estándares utilizados (por ejemplo, ADN del fago lambda o diluciones de ADN cuantificado previamente en el espectrofotómetro).

2.11.1. Separación de fragmentos de ADN por electroforesis

Para estimar la longitud de los fragmentos de ADN producidos por el corte de las enzimas de restricción, es necesario utilizar una matriz inerte y semisólida. Esta matriz o soporte, puede ser de agarosa o poliacrilamida y dependiendo de la longitud esperada de los fragmentos, se opta por utilizar una de las dos.

La agarosa normalmente separa fragmentos que van de los 200 pb a 30 kb; mientras que la poliacrilamida resuelve fragmentos inferiores a 200 pb. La movilidad del ADN

a través de la matriz está en función de su carga negativa, por lo que los fragmentos tenderán a emigrar hacia el polo positivo de la cámara de electroforesis.

2.11.2. Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa es un método simple y eficiente para la separación, identificación y purificación de fragmentos de ADN de varias longitudes. Los geles estándar de agarosa separan y resuelven fragmentos de de 0.1 a 25 kb. Cuando se requiera resolución de fragmentos mayores de 10 a 2000 kb, se recomienda electroforesis de pulso de campo.

El porcentaje de agarosa con el que se elabora el gel, depende del tamaño de las moléculas de ADN que van a separarse. Normalmente, la agarosa al 0.8% separa fragmentos provenientes de la digestión con enzimas de restricción que reconocen seis pares de bases, mientras que la concentración de 1%, se utiliza para separar fragmentos generados por las que reconocen cuatro pares de bases, debido a que son más pequeños. Sin embargo, el uso de otras concentraciones de agarosa, permiten hacer más eficiente la separación de los fragmentos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio

La investigación se realizó en cultivos de Naranja Valencia (*C. sinensis* Obsbeck) y Limón Persa (*Citrus latifolia* Tan), establecidos en la zona citrícola de la sabana de Huimanguillo, Tabasco. Ubicada al sur, entre las coordenadas geográficas 17° 39' y 17 45' Latitud Norte, y 93° 28'y 93° 38' de longitud Oeste de acuerdo con León 1990. Clima cálido húmedo (Am (f)) con temperatura y precipitación media anual de 26.1 °C y precipitación de 2229 mm con un periodo de baja precipitación (57-92 mm) en los meses de febrero a Mayo.

3.2. Sitios de Muestreos

Los sitios de muestreos se seleccionaron en base a las unidades y sub unidades de suelos, descritas por Marín, et al. (2006), considerando que *Phytophthora* es un patógeno de suelo y puede estar influenciado por las propiedades este. La unidad Acrisol presentaba nueve sub unidades y Cambisol sólo dos subunidades (Cuadro 1). Con el fin de asegurar la exploración de la mayor heterogeneidad de ambientes, por cada subunidad de suelo se seleccionaron dos plantaciones (puntos de muestreos); ubicando cada plantación en una comunidades diferentes. Para este fin se seleccionaron 34 plantaciones 16 de naranja Valencia y 18 de limón Persa (Salgado *et al.*, 1997).

Las plantaciones empleadas como sitios de muestreo pertenecen a productores socios de las dos principales organizaciones de productores de cítricos del municipio; estas son el Consejo Citrícola de Tabasco A. C. y la Unión Agrícola Regional de Productores De Cítricos de la Chontalpa.

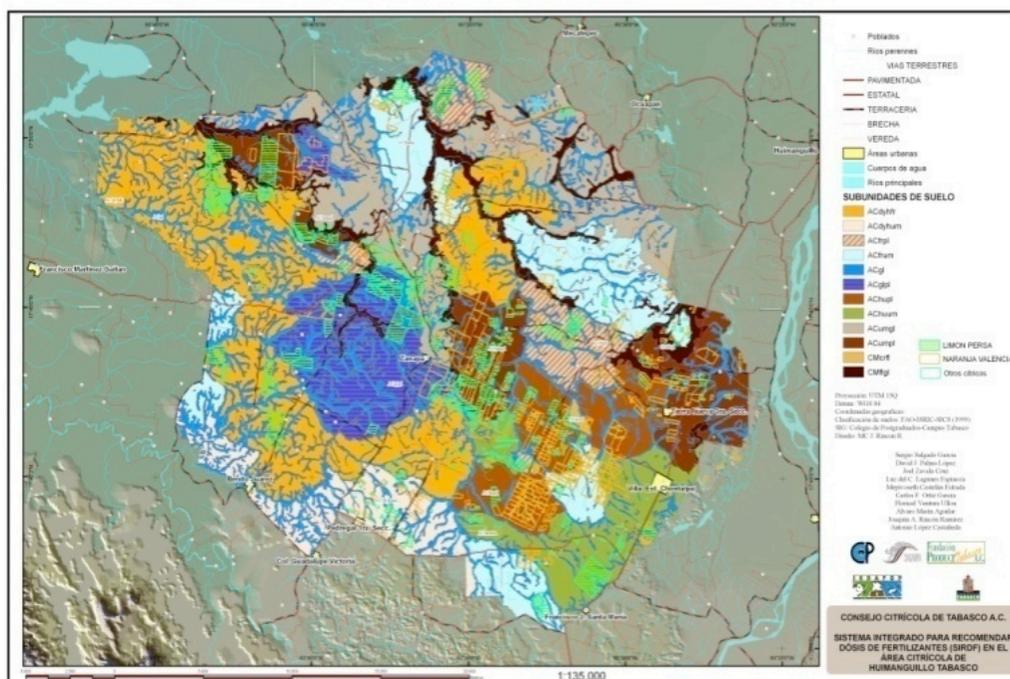


Figura 1. Diversidad de series de suelos de la zona citrícola de Huimanguillo, Tabasco y localización de huertos de naranja valencia, limón persa y otros cítricos. Salgado *et al* 2007

3.3. Aislamiento e identificación del agente causal

3.3.1. Colecta de muestras vegetales de plantas enfermas

Las muestras fueron tomadas en la base del tallo de árboles enfermos con lesiones de niveles de ligeras (2) a graves (3) y de frutos colectados del suelo que presentaban síntomas pudrición blanda o clara o oscura en el pedúnculo del fruto. La toma de muestra del tejidos necrosado de corteza/madera de una orilla canchros, se realizó con la ayuda de marro y un formón previamente desinfectado y flameado con alcohol al 70%. Así se extrajo una muestra de corteza-madera de 3 cm de ancho y 5 cm de largo del tejido enfermo. Las muestras de cada planta se colocaban en bolsas de polietileno. Una vez debidamente etiquetadas y selladas, las muestras se conservaban en una nevera a temperatura de 20°C. Después de cada toma de muestra, las lesiones de los árboles fueron cubiertas con una mezcla de pintura

acrílica (500 ml de agua corriente) previamente mezclada con fungidas Tecto 60 (20 gr) y Benlate (20 gr). Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Fitopatología del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco.

3.3.2. Aislamientos de corteza/madera

Para el aislamiento de *Phytophthora* de las muestras de tallo se cortaron diez segmentos de corteza de 5-10 mm de largo - ancho en los límites de la lesión tomando tejido sano y enfermo de la muestra. Los fragmentos seleccionados se desinfectaron por inmersión en una solución acuosa de hipoclorito de sodio a una concentración de 10 ml de cloro y 30 ml de agua destilada estéril (relación 1:3). Las muestras fueron sumergidas por 30 segundos, seguidamente se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Cada fase de lavado fue de 60 segundos. Se eliminó el exceso de agua y se depositaron en papel filtro estéril dentro de cajas Petri. Las muestra fueron sembradas en medio de cultivo selectivo ZAS (zanahoria 10%-agar Pimaricina, Rifampicina, Vancomicina y PCNB ; Modificado de Ortiz, 1996).

El medio ZAS se preparo mediante Zanahoria (rodajas) $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, Agar $15.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Merck), Ampicilina $250.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de pimaricina, $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Rifampicina, Benlate $100.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de benomilo, Pentacloronitrobenzeno (33%) $116.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y Vancomicina $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ todo aforado a 1000 ml (Modificado de Ortiz, 1996), las placas se incubaron a la oscuridad por 7 días a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, y se transfirieron trozos de medio con micelio seleccionados en los márgenes de cada colonia a medio V8 estándar en cajas Petri y en tubos de ensaye. El medio V8 estándar se preparo con 200.0 ml de jugo V8 (Campbell's), $3.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ carbonato de calcio (CaCO_3), agar $15.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y fueron aforados a 1000 ml de agua destilada. Se esterilizó a 15 lb de presión durante 15 minutos a 120°C .

Los segmentos de muestra de madera-corteza enferma se sembraron de forma horizontal para que el tejido dañado y sano, entraran en mayor contacto con la superficie del medio de cultivo. Posteriormente al desarrollo de la colonia, y con el fin

de su aislamiento, del bordo de ésta, se tomaron implantes pequeños del medio que contenían segmentos de hifas de la colonia y se transfirieron a medio sólido V8 estándar en cajas Petri (25-30 ml de solución) y posteriormente a tubos de ensaye (20 ml) respectivamente, para su colección.

3.3.3. Aislamiento en frutos colectados del suelo

Los frutos que se colectaron del suelo presentaban una necrosis blanda de color marrón rodeando el área del pedúnculo. Estos fueron lavados con agua corriente para eliminar el exceso de suelo, después desinfestado superficialmente mediante flameado con alcohol al 96%. Posteriormente de la parte infestada, se hicieron cortes tomando tejido dañado y sano. De esta manera se cortaron tres segmentos, que fueron sembrados en el medio Zanahoria-Agar selectivo (Ver anexo 2).

3.4. Identificación

La identificación de los aislamientos de *Phytophthora* se hizo preliminarmente de manera morfológica y se confirmó molecularmente, ambos procedimientos se describen a continuación.

3.4.1. Identificación morfocultural

Los 13 aislamientos obtenidos de campo fueron observados y caracterizados de acuerdo a las claves morfológicas de Stamps *et al.*, 1992, Watherhause, 1983, Newhook y Hall 1990. La inducción de formación de estructuras de micelio, de los esporangios, clamidosporas y de las oosporas (Ortiz, 1996, Vial *et al*, 2004). Para las observaciones al microscopio se realizaron preparaciones temporales en portaobjetos con lactofenol, a partir de cultivos de aislamiento de cinco días de crecimiento. Además, se determinaron las características morfoculturales de las colonias en medio V8 estándar y jugo V8 clarificado adicionado. Así como se determinó el tipo de compatibilidad sexual de cada aislamiento.

3.5. Identificación molecular

En este caso se trabajó con 16 de *Phytophthora* de los cuales 13 cepas aisladas de frutos enfermos de limón colectados del suelo así como de tallos del injerto y portainjertos. Además de otros tres aislamientos provenientes de cacao empleadas como referencias. Para la extracción de DNA, El crecimiento micelial fue inducido en medio líquido YEPD. Las cepas de *Phytophthora* sp se crecieron en matraces de 125 mL los cuales contenían 25 ml de medio líquido, hasta alcanzar el desarrollo adecuado de la biomasa celular (3 -21 días) y siguiendo el protocolo a continuación descrito.

3.5.1. Extracción de DNA cromosómico

Las cepas de *Phytophthora* sp fueron crecido en medio líquido YEPD enriquecido (extracto de levadura al 1%, Dextrosa al 2% y peptona al 2% y 10µl de Vancomicina). La extracción de DNA se realizó siguiendo la metodología descrita por Ausebel y col. (1989). En todos los casos, la centrifugación se llevó a cabo en una microcentrífuga Eppendorff, a 14 000 rpm, durante cinco minutos, a temperatura ambiente.

La biomasa de *Phytophthora* sp se obtuvo a partir de la inoculación de 25 matraces de 125 mL con 25 mL de medio líquido YEPD (extracto de levadura al 1%, Dextrosa al 2% y peptona al 2% y 10µl de Vancomicina). Los matraces se incubaron durante 96 h a temperatura ambiente, en agitación orbital a 150 rpm. Las células fueron cosechadas a partir de 3 mL de cultivo, en un microtubo de 1.5 mL. Posteriormente el medio de cultivo fue decantado y las células fueron sometidas a lisis mecánica, agregando 0.3 g de perlas de vidrio (Ballotini 0.5 µ diámetro), 200 µL de regulador de lisis (Tritón X-100 al 2%, SDS al 1%, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8.0 y EDTA 1 mM) y 200 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico (25:24:1). La muestra se agitó vigorosamente en vortex durante 20 min hasta completar 20 ciclos con pulsos de 30

seg en agitación y 30 seg en baño de hielo. Posteriormente se adicionaron 200 μ L de regulador TE (Tris 10 mM, pH 8.0 y EDTA 1 mM) y se sometió a centrifugación.

La fase acuosa se transfirió a otro tubo de 1.5 mL al que se le agregaron 200 μ L de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), nuevamente se agitó en vortex por 30 segundos y se centrifugó (1200 rev. 5min). El sobrenadante se recuperó y se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto, enfriado a -20°C . La muestra se incubó a -20°C durante 2 h, se centrifugó y eliminó el etanol residual se dejó evaporar a temperatura ambiente. El DNA se resuspendió en 400 μ L de regulador TE y se trató con 10 μ g RNAsa (Gibco BRL) a partir de una solución patrón de 10 mg/mL en Tris-HCl 0.01 M, pH 7.5 y NaCl 0.015 M. La mezcla fue incubada a 37°C , durante 15 min Posteriormente, el DNA fue precipitado con 10 μ L de acetato de amonio 4 M y 2 volúmenes de etanol absoluto, a continuación se mezcló por inversión y se incubó a -20°C durante 2 h, el etanol absoluto fue decantado y la pastilla de DNA fue lavada con 500 μ L de etanol al 75%. Finalmente, el DNA fue resuspendido en 20 μ L de agua ultra pura e incubado a 50°C durante 10 min. El DNA se almacenó a -20°C .

La concentración y pureza del DNA se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm y considerando que 1U A_{260} equivale a 50 μ g/mL de DNA de doble cadena. La calidad del DNA se determinó por la relación de absorbancias A_{260}/A_{280} (Sambrook, y col., 1989).

3.5.2. Amplificación del gen 18S DNAr por PCR

La amplificación del gen 18S DNAr se usó como gen blanco para la identificación molecular de la cepa aislada. La amplificación fue realizada empleando los iniciadores universales: 1) LV-1 5' CCT GCC AGT AGT CAT ATG CTT GTC T 3' 2) LV-2 5' CAC CTA CGG AAA CCT TGT TAC GAC T 3'. Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo con 10 ng del DNA molde, en un volumen final de 25 μ L bajo la siguiente formulación: 16.3 μ L de agua grado PCR, regulador de reacción 1X,

MgCl₂ 2mM, dNTPs 200 mM, iniciadores 0.4 mM y 1U de Taq DNA polimerasa. El DNA fue amplificado en un termociclador Techgene[®] con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min; 35 ciclos de una desnaturalización a 94 °C por 1 min; alineamiento a 67°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min; y una extensión final a 72°C por 5 min.

3.5.3. Electroforesis en geles de agarosa

Los fragmentos de DNA amplificados fueron sometidos a electroforesis convencional en geles de agarosa, siguiendo el método descrito por Meyers y col. (1976). Se prepararon geles horizontales de agarosa al 1.2% en regulador TAE 1X (Tris Base 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM). El corrimiento electroforético fue llevado a cabo a 100 V, durante 1 h. El gel fue teñido con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/mL en regulador TAE 1X, durante 15 min. Finalmente los geles fueron expuestos a luz UV en un transiluminador UV/Vis (MiniBis, Bio Imaging Systems), para visualizar los fragmentos de DNA amplificados. El tamaño de los fragmentos de DNA amplificados fue calculado por comparación con un marcador de DNA de talla molecular de 1000 pb (Invitrogen) y con la ayuda del programa Sigma Gel Versión 1.0 (Jandel Scientific Co., 1995).

3.5.4. Purificación de los fragmentos de DNA amplificados

Los fragmentos de DNA amplificados fueron purificados empleando el kit QIAquick Gel Extraction Kit (250) QIAquick Spin Columns, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El DNA fue eluído con 50 µL de agua grado PCR. (Figura 2)

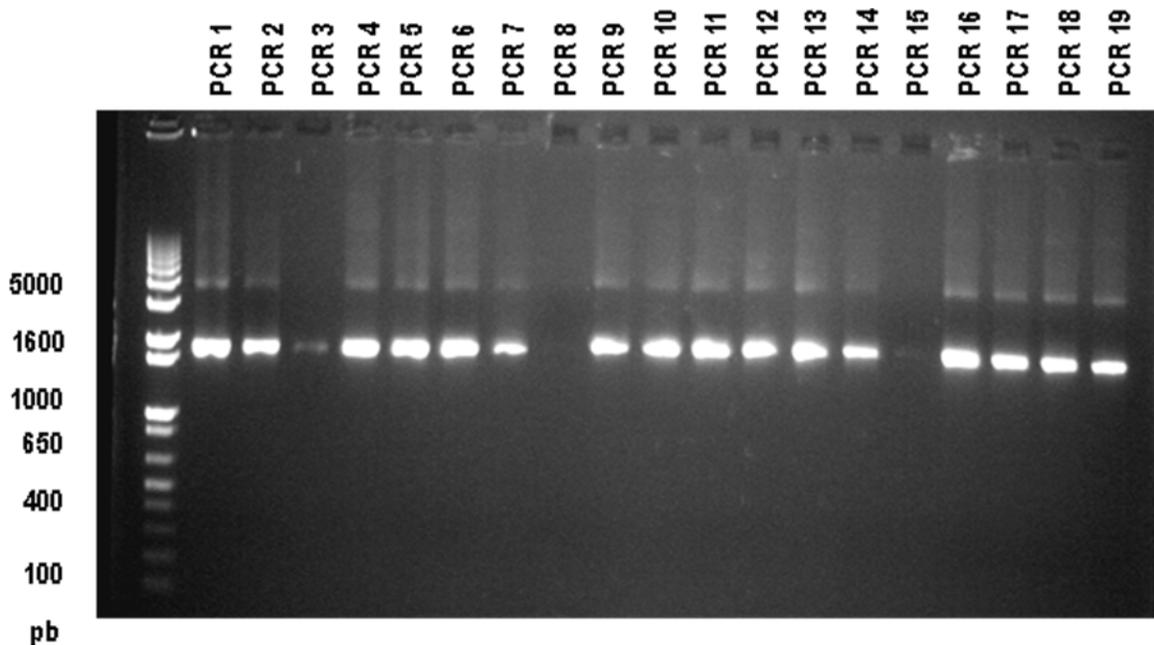


Figura 2. Fragmento de DNA amplificado por PCR con marcador de tamaño de fragmento 1 Kb plus DNA Ladder - Gibco BRL. Pistas PCR 1- PCR 13 cepas de *Phytophthora* provenientes de los cítricos, PCR 14 aislamiento de Chile, PCR 15 de cocotero y PCR16-PCR19 cepas de *Phytophthora capsici* de cacao, empleadas como referencia.

3.6. Secuenciación del DNA purificado

El producto de PCR purificado fue enviado a secuenciar al Instituto Nacional de Salud Pública en Cuernavaca, Morelos. Las secuencias de DNA serán analizadas con el software Chromas Versión 2.31 (Technelysium Pty Ltd.) y alineadas con las secuencias depositadas en la base de datos de la NCBI (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.6.1. Linearización de las secuencias

Las secuencias nucleotídicas codificantes de genes 18S DNAr de hongos descritas y depositadas en la base de datos de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), fueron alineadas con las secuencias de los fragmentos amplificados de la cepa 01 a 13 aislada. Los alineamientos múltiples de secuencias nucleotídicas se realizaron con el programa CLUSTAL X versión 1.8 (Thompson, y col., 1997). La edición de los

alineamientos se realizó con el programa GeneDoc versión 2.3 (Nicholas y Nicholas, 1997).

3.7. Establecimiento de Dendrogramas o Árbol de similitud

Con la última linearización se estableció un árbol de similitud con el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 4.0 (Tamura y col., 2007) utilizando el método de agrupamiento de Neighbour-joining con el índice Poisson (P). Y se valoraron estadísticamente para lo cual se hicieron 1000 aleatorizaciones tipo "bootstrap". Con base a la organización de este dendrograma filogenético se determinará la especie asociadas a los aislamientos de cítricos.

3.8. Evaluación de la incidencia de la gomosis

Para determinar el porcentaje de incidencia de la pudrición del pie, se llevó a cabo un muestreo sistemático; en cada una de las plantaciones muestreadas se seleccionó un área rectangular de 441 plantas repartidas en 21 filas con 21 plantas cada una. De cada fila sólo se cuantificó los daños en y en las plantas y las filas de números impares (nonas) haciendo una submuestra de 121. Así, por cada sitio se recorría la superficie de 441 árboles en los cuales se registró la presencia de la enfermedad de la gomosis de 121 plantas; Adicionalmente, se cuantificaba la severidad de la enfermedad mediante el empleo de una escala visual de daño de cuatro niveles. 0, 1, 2 y 3; donde:

- 0 = árbol sano,
- 1 = síntomas iniciales,
- 2 = lesiones ligeras
- 3 = lesiones graves.

En este mismo sitio, de plantas con lesiones ligeras, se tomaron las muestras de tejido enfermo tomando corteza y madera por debajo del cancro. Esto con la ayuda o enfermo para aislar al patógeno

Se cuantificó el número de plantas enfermas con pudriciones en la base del tronco, tallo, ramas, frutos. Por las condiciones agro climáticas los sitios elegidos fueron dirigidos hacia zonas que presentaban humedad residual, con esto asegurábamos encontrar al patógeno.

3.9. Evaluación de la susceptibilidad de Porta injertos a *P parasítica*

3.9.1. Cepas empleadas en la prueba

De un total de 13 cepas previamente identificadas morfológicamente como *Phytophthora* spp- se seleccionaron cuatro cepas de *P. parasítica* claves: PC07043 (PCR12-LV1), PC07015 (PCR10-LV1), PC07004 (PCR4-LV1) y PC07011 (PCR11-LV1), que mostraron alta virulencia en una prueba preliminar realizada sobre varetas de naranja valencia.

3.9.2. Patrones evaluados

Las evaluación de la resistencia a *Phytophthora parasítica*, se realizaron en patrones tolerantes al virus de la tristeza de los cítricos estos fueron limón *Rubidoux*, *Citrumelo swingle*, *Citrango carrizo*, *Citrus volkameriana*, *Citrango C-35* y *Citrango Troyer*, complementados con varetas de Limón Persa (*Citrus aurantifolia* Tan) y Naranja Valencia (*Citrus sinensis* Osbeck), estas últimas tomadas como patrones susceptibles. Los tallos de los patrones fueron cortadas de plantas de 1.5 años de edad mantenidas en macetas en invernadero, siguiendo la metodología descrita por Afek *et al* (1990).

Se realizaron cortes de varetas de cada patrón con longitud de 20 cm y se desinfectaron con hipoclorito de sodio 10 ml de cloro y 30ml de agua destilada estéril (relación1:3) por 60 segundos. Las varetas fueron divididas En cada vareta se hicieron cortes circulares de 3 mm de diámetro con un sacabocado previamente

esterilizado, donde se colocó un implante cilíndrico de micelio de las cepas seleccionadas, provenientes de cultivos de cuatro días de edad incubados a 24 °C.

3.9.3. Establecimiento de la Prueba de susceptibilidad y Variables cuantificadas

Este ensayo se estableció en una Caja Plástica con Tapa de forma prisma rectangular de 50 x 30 x 13 cm, modificada. En el fondo se colocó una esponja esterilizada en húmedo y se le agregó agua destilada estéril con el fin de humedecer la esponja en los casos que fue necesario. (Figura 3) Sobre dichas esponjas se colocaron las varetas desinfectadas previas a inocularse; distribuidas de acuerdo al arreglo de parcelas divididas bajo un arreglo de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. Así se evaluaron cuatro tratamientos (cuatro cepas, parcela grande), y siete portainjertos (parcela chica). Una vez inoculadas las varetas con las cepas correspondientes y después de que las cajas plásticas fueron se tapadas, estas se trasladaron al casa de malla oscura donde se conservaban las plantas donadoras de varetas a temperatura ambiente.

Los parámetros incluyeron patrones de ramificación de los esporangióforos; ápice del esporangio; abundancia de esporangios sobre medio sólido; la caducidad del esporangio; la proliferación interna de los esporangios; la reproducción de oogonios y oosporas en un solo cultivo (homotálico) o en diferentes cultivos (heterotálico); naturaleza del anteridio; abundancia o ausencia de oosporas en los tejidos huéspedes o en el cultivo y para ciertas especies, la forma del esporangio y sus dimensiones. Otras características incluidas en la identificación de ciertas especies son: relación longitud-ancho, esporangióforos, hinchamientos hifales, presencia o ausencia de clamidosporas, tamaño del oogonio, ornamentación de la pared del oogonio, especificidad del huésped y rangos de temperatura mínima, óptima y máxima para crecimiento.



Figura 3. Distribución de tallo de patrones de citricos en bloques y parcela grande, infectadas con cepa de *P. parasitica* e incubación a temperatura ambiente.

Seis días después las lesiones producidas en la corteza, con la ayuda de un vernier se cuantificaron la longitud del tejido dañado en la corteza variables y la longitud de la mancha sobre la madera, mismas que fueron utilizadas como variables de estudio. Adicionalmente se cuantifico el diámetro en la mancha en la corteza y madera (Figura 4). Los datos fueron transformados por la ecuación $X = \sqrt{x + 0.5}$ dada la evolución en muchos puntos de valores 0.0 mm (Steel y Torrier, 1985). Una vez transformados fueron realizados los análisis de varianza y las prueba de comparación de medias de Tukey, con la ayuda del paquete estadístico SAS 9.1().



Figura 4. Tallo de cítrico con lesión provocadas por *P. parasitica* inoculadas artificialmente seis días la incubación a temperatura ambiente.

3.9.4. Confirmación de la acción del patógeno

Complementariamente y con la finalidad de confirmar que las lesiones observadas fueron producidas por el patógeno inoculado. De los tejidos dañados se realizó el re-aislamiento del *Phytophthora*, en medio Zanahoria Agar Selectivo. Cuatro días después de observaron las colonias de *P parasitica*

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Detección de signos visibles de la enfermedad

Se muestrearon 34 huertos citrícolas en producción con edades que oscilaban entre los 4 a 25 años (18 huertos de limón persa *Citrus aurantifolia* Tan y 16 huertos de naranja valencia *Citrus sinensis* Osbeck); y se encontró que la gomosis está presente en el 100% de las plantaciones. Se observaron signos de la presencia de la enfermedad con base en los canchros de la base del tallo y pudriciones de fruto (Figura 5). De acuerdo a Keen, 2000 y Latorre, 2004 éstos se describen como pudrición del pie con lesiones necróticas en la parte basal del tronco del portainjerto, dándose la infección hacia abajo del injerto y hacia arriba sobre las ramas y el aguado o podredumbre marrón de los frutos.

En la cuadro 2 se presenta la lista de aislamiento logrados por tejido vegetal aislado, cultivo, sitio de muestreo (plantación) y comunidad. Los síntomas de la gomosis observados en los tallos de naranja Valencia y limón Persa correspondieron bien a los descritos por Klotz (1973) y Orozco (1995). Hay que destacar que existió un baja frecuencia de aislamiento de *Phytophthora*; de los 102 programados sólo se obtuvieron 13 (12.7 %) de acuerdo a la metodología descrita en el apartado (III) las cuales presentaban el nivel de daño 2 y 3. Se utilizó medio selectivo zanahoria-agar para sembrar las muestras provenientes de campo y se encontró que además del crecimiento de hongos, se desarrollaban bacterias las cuales inhibían el crecimiento de *Phytophthora*, por lo cual se adicionó al medio de cultivo Vancomicina (10 mg/L), y se observó que el crecimiento de las bacterias era inhibido permitiendo el crecimiento y desarrollo de *Phytophthora* y otros hongos. Con esto se procedió al aislamiento y purificación de la cepa de interés, obteniéndose 13 aislamientos de *Phytophthora*. Poner Citas

Esto pudo deberse a que los aislamientos se realizaban principalmente a partir del tejido de los canchros con gomosis en tallos (Figura 5 a-c), y que Timmer y Menge

(2002) señalan que ésta cancros por lo general no producen inóculo secundario no que limita su aislamiento o a lo que señalan Jeffers y Aldwinckle (1988) por la presencia de residuos de fungicida en los cancros, proveniente de los tratamientos realizados por los productores. Una nueva prospección de aislamiento de *Phytophthora* debe realizarse a partir de suelo con tejidos trampas o a partir de raíces de plantas con gomosis.



Figura 5. Síntomas de gomosis en tallo de naranja valencia cancro en el patrón (a), cancro sobre el injerto (b) cancro en ramificación (c) y pudrición en fruto de limón Persa.

Sin embargo, el material colectado al menos uno para el 50% de los sitios estudiados y la amplia distribución de las plantaciones origen de los aislamientos, nos permitió hacer la identificación específica primeramente de manera morfológica y posteriormente con base en los marcadores moleculares.

4.2. Identificación de los aislamientos

4.2.1. Identificación morfológica

La siembra de las 13 aislamientos (Cuadro 5) en cajas Petri con medio de cultivo V8 y Zanahoria agar, desarrollaron colonias blancas a crema de dos tipos de crecimiento una de tipo circular compacta y plana, con bordes ligeramente

indefinidos y las otras 12 colonias semejantes de crecimiento en lóbulos y de borde ligeramente indefinidos (Figura 6)

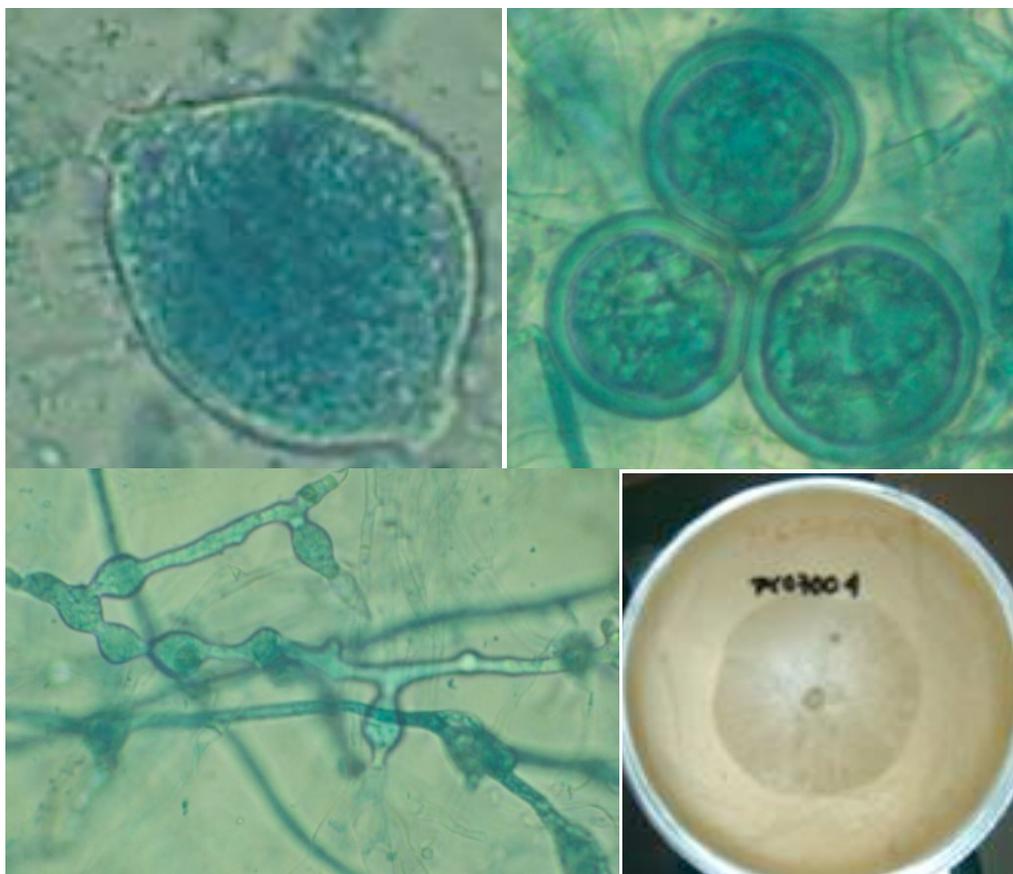


Figura 6. Colonia de *P. parasitica* en medio zanahoria-A, esporangios, clamidosporas y micelio con hinchamientos (swellings).

Los aislamientos presentan micelio cenocítico, esporangios papilados de forma grobosos, clamidosporas intercalares y terminales de pared gruesa (Figura 6). El micelio presenta una forma irregular “tuluroso”, con hifa que presenta inchamiento o swellings. Las cepas confrontadas sexualmente mostraron que los trece aislamientos perteneces al tipo A1. De acuerdo con estas descripciones, las cepas de cítricos aisladas en Huimanguilo, Tabasco cumplen con descripciones de las claves morfológicas de Stamps, Watherhause, Newhook y Hall 1990, por lo que se concluyó que los aislamientos estudiados pertenecen a la *Phytophthora nicotianae* var *parasitica* aceptadas como sinónimos de *P. parasitica* (Timmer *et al.*, 2003).

4.3. Determinación del tipo de reproducción sexual

Las cepas confrontadas sexualmente mostraron que los trece aislamientos pertenecen al tipo A1. La reproducción sexual se da con mayor frecuencia en condiciones naturales, existen dos tipos el homotálicos conocido como gametos masculinos (anteridio) y el femenino (oogonio) además que se manifiesta la compatibilidad A1 y A2 (Brasier, 1978; Bocca, 1980 y Shaw, 1988). Los procesos sexuales involucran la producción del oogonio y el anteridio, los cuales surgen de las puntas del micelio que se contactan. Si el oogonio crece sobre el anteridio, éste se denomina anfiginio y si el anteridio rodea el oogonio, en su parte basal cerca del pedicelo, se conoce como paraginio. En *Pythium* el anteridio rodea completamente el oogonio (Erwin y Ribeiro, 1996).

Cuadro 4. Aislamientos de *Phytophthora* obtenidos de lesiones de gomosis de los cítricos y frutos de limonero en el Municipio de Huimanguillo, Tabasco.

Clave de aislamiento	Claves NCBI	Comunidades cítricas	Cultivo/patrón	Órgano
PC07001	PRC1-LV1	Col. Encomendero	Limón Persa/Volcameriano	Corteza del patrón
PC07002	PCR2-LV1	Tierra nueva 3ra. sección	Limón Persa/Volcameriano	Fruto
PC07003	PCR3-LV1	Tierra nueva 3ra. sección	Limón Persa/Volcameriano	Corteza del patrón
PC07004	PCR4-LV1	Col. José Ma. Pino Suárez	Limón Persa/Volcameriano	Fruto
PC07005	PCR5-LV1	Col. José Ma. Pino Suárez	Limón Persa/Swingle	Fruto
PC07006	PCR6-LV1	Col. José Ma. Pino Suárez	Limón Persa/Volcameriano	Tallo del injerto
PC07007	PCR7-LV1	Tierra nueva 3ra. sección	Limón Persa/Volcameriano	Tallo del injerto
PC07008	PCR8-LV1	Col. Mercedes Gamas	Limón Persa/Volcameriano	Fruto
PC07009	PCR9-LV1	Tierra nueva 2ª Sección	Naranja valencia/rangpour	tallo de patrón
PC070010	PCR10-LV1	Col Mercedes Gamas	Naranja valencia/	Tallo del injerto
PC070011	PCR11-LV1	Tierra nueva 3ra. sección	Naranja valencia/	
PC070012	PCR12-LV1	Col, Gilberto Flores Magón	Naranja valencia/N agria	Corteza del Patrón
PC070013	PCR13-LV1	Tierra nueva 3ra. sección	Naranja Valencia/ N agria	Fruto de naranja
PC070014	PCR14-LV1	Tierra nueva 3ra. sección	Limón Persa/Volcameriano	Tallo del injerto
PC070015	PCR15-LV1	Tierra nueva 3ra. sección	Limón Persa/Volcameriano	Fruto
PC070016	PCR16-LV1	Col Mercedes Gamas	Limón Persa/N agria	Corteza del Patrón

4.4. Identificación Molecular.

4.4.1. Alineamiento múltiple de secuencias de genes 18S DNAr descritas

Las secuencias nucleotídicas codificantes de genes 18S DNAr de hongos descritas y depositadas en la base de datos de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), fueron alineadas con las secuencias de los fragmentos amplificados de la cepa 01 a 13

aislada. Los alineamientos múltiples de secuencias nucleotídicas se realizaron con el programa CLUSTAL X versión 1.8 (Thompson, y col., 1997). La edición de los alineamientos se realizó con el programa GeneDoc versión 2.3 (Nicholas y Nicholas, 1997). El alineamiento gráfico mostró las regiones con un alto grado de identidad (98%).

4.4.2. Relaciones de similitud entre las secuencias de genes 18S DNAr descritas

Los alineamientos múltiples de secuencias de nucleótidos de genes 18S DNAr de especies del género *Phytophthora* sp y otros hongos se realizaron con el programa CLUSTAL X versión 1.8. Se realizaron cinco alineamientos múltiples.

Cuadro 5. Parámetros de alineamiento de cada uno de los alineamientos de cítricos

Parámetros	Valores/tipo
Apertura de Gap:	10
Extensión de Gap:	0.2
Eliminación de secuencias divergentes	30%
Matriz de peso para proteínas	Series Gonnet
Uso de matriz negativa	No

El último alineamiento fue usado para establecer un árbol de similitud con el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 4.0 (Tamura y col., 2007) utilizando el método de agrupamiento de Neighbour-joining con el índice Poisson (P). Y se valoraron estadísticamente para lo cual se hicieron 1000 aleatorizaciones tipo “bootstrap” (Figura 7).

Así, los 13 aislamientos de *Phytophthora* obtenidos de las 34 plantaciones comerciales de cítricos de la zona citrícola de Huimanguillo presentaron un 98% de similitud a *Phytophthora parasitica* o *Phytophthora nicotianae* var *parasitica* aceptadas como sinónimos (Timmer *et al.*, 2003). Asimismo, se observa en el

dendrograma de la figura 7 que la asociación de los aislamientos estudio y *P. nicotianae* aparecen junto el 99 % de 1000 aleatorizaciones.

Estos resultados confirman a *P. parasítica* como la especie asociada a la gomosis de los cítricos en la zona citrícola de la sabana de Huimanguillo, del mismo modo que lo es en otras zonas citrícola de estado de Colima (Vidales, 1982) y Nuevo León. Además, *P. parasítica* es una de las tres especies de mayor importancia reportada causando gomosis o pudrición del pie de los cítricos en el mundo *P. parasítica* ha sido reportado como agente causal de gomosis en Estados Unidos, en los estados de Florida, Texas, Arizona y California; Arizona (Matheron, et al. 1997; Timmer, 1973, Timmer, et al 1993, Fawcett 1936. Klotz, et al. 1958, Klotz, 1978, Timmer, 1988 y Whitside, 1988). En Brasil en el estado de Sao Paulo, (Carpenter & Furr; 1962; Graham, 1990; 1995; Matheron *et al.*, 1998, Feichtenberger, 2001 Medina Filho, et al 2003).

Esto permite aceptar la hipótesis (Ho 1) que señalaba al menos una especie de *Phytophthora* como organismo causal de la gomosis de los cítricos en Huimanguillo, Tabasco. Este es el primer reporte de *P. parasítica* como agente causal de la gomosis de los cítricos en Tabasco. Es importante apuntar como los muestreos se realizaron en períodos del comienzo de sequías por lo que las temperaturas altas y humedad son factores que favorecen el desarrollo de esta especie en particular *P. parasítica*; por lo que no se puede descartar que exista la presencia de otra especie como *P. citrophthora* en períodos de invierno, así pues se recomienda realizar muestreos en otras épocas en la zona citrícola y despejar la duda de la existencia de otra especie de *Phytophthora*.

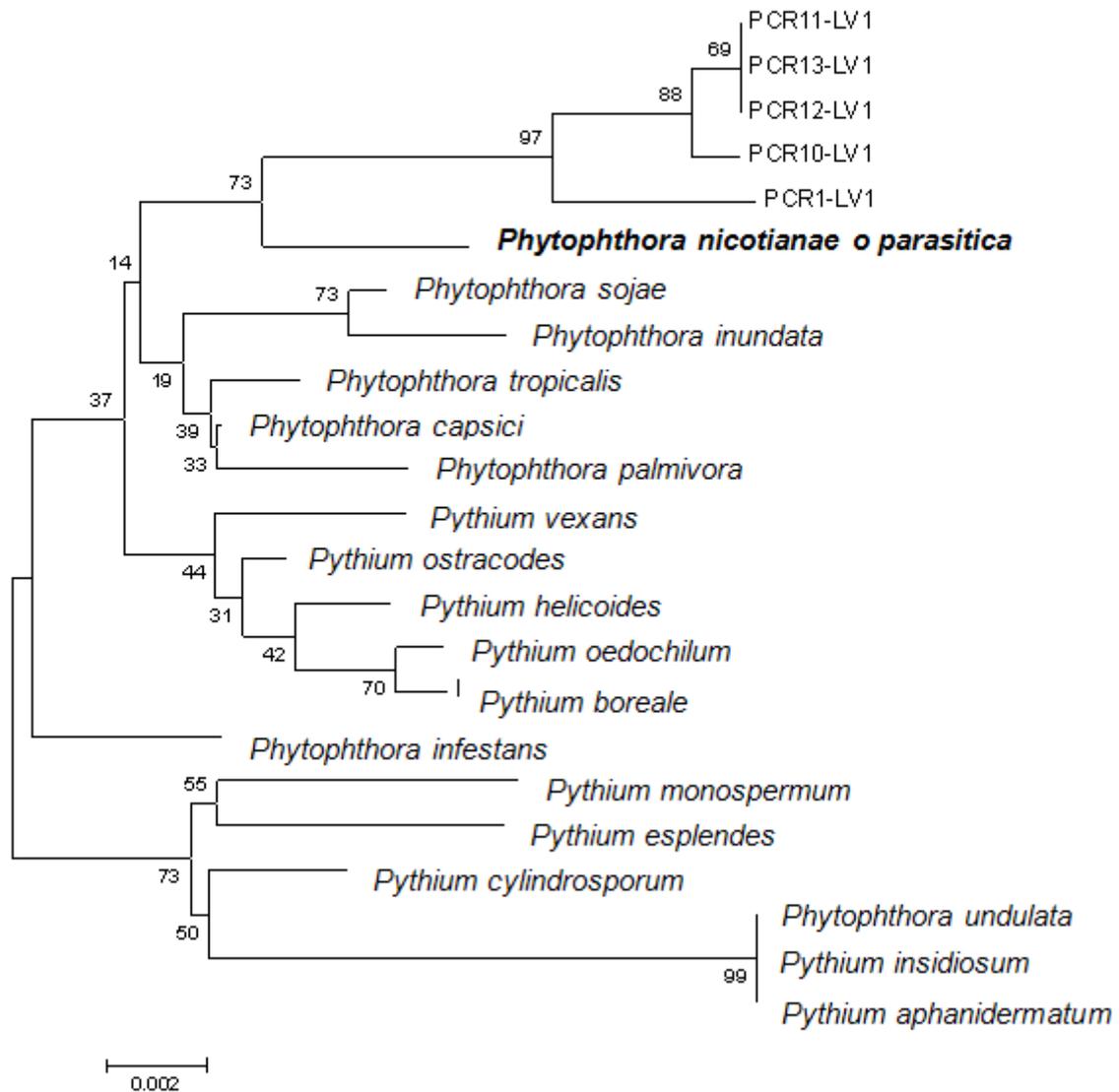


Figura 7. Relaciones de similitud de las secuencias nucleotídicas del gen 18S rDNA de la cepas de **PCR1-LV1**, **PCR10-LV1**, **PCR11-LV1**, **PCR12-LV1** y **PCR13-LV1** aisladas de tallos y fruto de limón Persa y naranja Valencia, las secuencias nucleotídicas de los genes 18S rDNA *Phytophthora nicotianae* o *P. parasitica*, *P. palmivora*, *P. capsici*, *P. tropicales*, *P. inundata*, *P. sojae*, *Pythium insidiosum*, *Py. cylindrosporium*, *Py. splendes*, *Py. monospermum*, *P. infestans*, *Py. boreales*, *Py. oedochoilum*, *Py. helicoides*, *Py. ostracodes*, *Py. Vexans*, que fueron comparados filogenéticamente con un análisis basado en los datos de sus secuencias nucleotídicas con 1000 aleatorizaciones tipo bootstrap, por medio de métodos de distancia y usando el índice P (Poisson) y el método de agrupamiento de Neighbor-joining. La barra indica el número de cambios por cada 100 nucleótidos.

4.5. Evaluación la incidencia de la gomosis.

La incidencia de gomosis evaluadas en las 34 fincas, repartidas en: 16 plantaciones de naranja Valencia y 18 plantaciones de limón Persa (Cuadro 7). Primero se puede señalar que en el 100% de plantaciones visitadas se detectaron plantas enfermas con gomosis en el tallo.

Con base en el muestreo secuencial se determinó que la incidencia promedio de la enfermedad en la zona Citrícola de Huimanguillo, para ambos cultivos es de 17.5 % con un rango de variación de 1.4 hasta 45.0%. Lo que deja apreciar que el muestreo se desarrollo en un periodo aceptable. Asimismo, se muestra que existe una distribución de inóculo en toda la región citrícola de Huimanguillo, y cuya mayor importancia entre las plantaciones se puede deber a la eficiencia del control adoptado y al propio manejo de huerta (Fawcetti, 1936, Orozco, 1995).

En referencia al tipo de suelo se puede señalar que este tiene una gran influencia sobre los niveles de incidencia de la gomosis. En este caso la mayoría de los suelos son acrisoles y presentan un horizonte superficial delgado, pardo donde las inundaciones (periódicas) retarda la mineralización de la materia orgánica, de baja fertilidad y favorecen la retención de agua en el perfil; condiciones que favorece y alarga los períodos de ataque de *Phytophthora*. Asimismo, muestra que existe una distribución de inóculo en toda la región citrícola de Huimanguillo, y cuya mayor importancia entre las plantaciones se puede deber a la eficiencia del control adoptado y al propio manejo de plantación (Timmer *et al.*, 2002). Además, de los diferentes series de suelos gleycos predominantes en la zona (Salgado, *et al.*, 2007).

Cuadro 6. Porcentaje de incidencia de gomosis de los cítricos (Naranja Valencia y Limón Persa) cuantificada en huertas de productores de distintas localidades de la Sabana de Huimanguillo, Tabasco.

Fincas de Naranja Valencia			Fincas de Limón Persa		
No de finca	Localidad	Incidencia (%)	No de finca	Localidad	Incidencia (%)
1	Col. Gilberto Flores M.	8.3	1	Tierra Nueva 3ra. Sección	37.2
2	Col. Gilberto Flores M.	9.9	2	Col. José Ma. Pino Suárez	2.5
3	Col. Gilberto Flores M.	19.0	3	Col. José Ma. Pino Suárez	28.1
4	Col. Gilberto Flores M.	14.9	4	Col. José Ma. Pino Suárez	43.8
5	Col. Gilberto Flores M.	14.0	5	Col. José Ma. Pino Suárez	24.8
6	Col. Gilberto Flores M.	12.4	6	Col. Marcelino Inurrieta	34.7
7	Col. Gilberto Flores M.	16.5	7	Col. José Ma. Pino Suárez	44.6
8	Col. Marcelino Inurrieta	7.4	8	Col. Antonio Zamora Arrijoa	21.5
9	Tierra Nueva 3ra. Sección	9.9	9		14.9
10	Tierra Nueva 3ra. Sección	10.7	10	Col. José Ma. Pino Suárez	1.7
11		14.9	11	Col. José Mercedes Gamas	41.3
12	Col Miguel Alemán	9.1	12	Col. Encomendero	14.9
13	Col. José Mercedes Gamas	33.9	13	Ej. Habanero 1ra Secc. Cárdenas	14.9
14	Col. Encomendero	24.8	14	Col. José Mercedes Gamas	4.1
15	Col. José Mercedes Gamas	10.7	15	R/a Florida	10.7
16	Tierra Nueva 3ra. Sección	7.4	16	Col. Mercedes Gamas	14.9
			17	Tierra Nueva 3ra. Sección	8.3
			18	Tierra Nueva 3ra. Sección	7.4
Incidencia promedio		14.0	Incidencia promedio		20.5

En las Plantaciones de Naranja Valencia mostraron incidencia promedio de gomosis de los cítricos es de de 14.0% con un rango de 7.4 hasta 34.0%. Se detectó la presencia de gomosis del tallo sobre la región basal del injerto, el porta injerto y

frutos. En el caso particular de las plantaciones de limón Persa, se detectó la presencia de *Phytophthora* en tallo (gomosis) y en frutos (mancha café de los frutos). El porcentaje de incidencia promedio de ataque de gomosis en limón Persa en tallo fue de 20.5 % con un rango de variación del 2 a 45.0%. Pese a estos resultados la comparación de las medias de la incidencia de la gomosis en el cultivo de la naranja y de limón mediante las muestras obtenidas de ambos cultivos consideradas como aleatorias e independientes (Infante y Zárate, 1984), y con ayuda del programa SAS 9.1. En este caso las medias de ambos cultivos no fueron diferentes con $Pr < 0.028$. Por lo que se rechaza la hipótesis (H_0 2) que establecía niveles de daño distintos entre ambas variedades cultivadas. Así podemos señalar que esta enfermedad tiene la misma importancia para el cultivo de limón Persa y para la naranja Valencia con valores promedio de 17.5 % pese al manejo fitosanitario que realizan anualmente los productores para esta enfermedad. Resultados que muestran que este problema tiene importancia económica en la región. Esto puede ser debido a la alta susceptibilidad de los limones a esta enfermedad (Timmer *et al.*, 2002).

4.6. Pruebas de resistencia genética a *Phytophthora nicotianae* o *parasitica* sobre tallos de porta injertos de cítricos tolerantes al VTC

En el cuadro 5 se presentan las medias de la longitud en centímetros de la lesión en corteza y madera producidas, en las varetas de cinco porta injertos y dos especies de cítricos, producidas por *P. parasitica*, inoculado artificialmente con discos de micelio. El Análisis de varianza de los datos transformados ($Y = \sqrt{x} + 0.5$) de longitudes de las lesiones, sobre las varetas de los porta injertos *C volkameriana*, *Citrange Troyer*, *Citrumelo Swingle*, *Rubidoux* y *Citrange Carrizo*. Además, de varetas de las variedades naranja Valencia y limón Persa, inoculados con cuatro cepas de *P. parasitica* (PC07015, PC07004, PC07003 (PCR 3-LV1) Y PC07011) de un arreglo de parcelas divididas establecido en un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones, no mostró efectos entre las diferentes cepas empleadas ($P < 0.1522$). Tampoco, se detectaron interacción cepas bloque ($P < 0.1380$) ni cepa porta injerto ($P < 0.5594$; Anexo 3). Sin embargo, si se evidenciaron deferencias

altamente significativas entre bloque ($P < 0.0001$) y entre las respuestas de la susceptibilidad de los porta injerto ($P < 0.0001$).

La comparación múltiple de medias y las respuestas de susceptibilidad de los cultivares cítricos al ataque de *P. nicotianae* B. de Haan. var. *parasitica* (Dast.) Waterhouse mostró la formación de tres grupos (Cuadro 6; Anexo 3)

Klotz *et al.* (1968), describen la naturaleza de la resistencia, indicando que la corteza de los cítricos contiene glúcidos, taninos, ácido gálico y otros materiales que le confieren propiedades fungicidas. Esto influye en el avance del hongo a través de la corteza y determina la reacción de los diferentes cultivares. Por esta misma razón se toman las lesiones de corteza para hacer esta comparación rápida de portainjertos.

Cuadro 7. Comparación múltiple de medias y las respuestas de varetas de cultivares cítricos empleados como porta injertos en la Sabana de Huimanguillo, Tabasco.

Porta injerto	Media de lesión en corteza transformadas	Agrupamiento de Tukey	Grupo
Naranja Valencia	0.83125	A	Susceptible
Limón Persa	0.81875	A	
Rubidoux	0.63125	AB	Tolerante
C, Troyer	0.55625	AB	
C. volkameriano	0.48.025	B	Resistente
C swingle	0.43125	B	
C Carrizo	0.43125	B	

Medias con la misma letra son iguales estadísticamente para $P \leq 0.001$ según la prueba de Tukey.

La susceptibilidad a *P. paracitica* varió entre portainjertos, siendo *Citrange carrizo*, *C. swingle* y *C volkameriano* los que no presentaron mancha o fueron las de menor longitud lo que se puede interpretar como los patrones más resistentes a la gomosis que de los cítricos que *C troyer*, *Rubidoux* y mucho más que *Naranja Valencia* y *Limón Persa*, conocidos como susceptibles. Estos resultados coincide parcialmente con lo previamente publicado por Rondón *et al.* (1992) que en pruebas de inoculaciones artificiales de *P parasitica* en tallos de 12 porta injertos de cítricos señalaron a *Citrange carrizo* como el clon mas resistente y al *naranja Valencia* como

la mas susceptible. Sin embargo, ubican a *Citrumelo swingle* y *Citrus volkameriano* medianamente resistentes contrariamente a nuestro resultados que lo registra con mayor grado de resistencia (Afek *et al.*, 1990). Del mismo modo, señalan a *Cintrange troyer* como resistente por detrás de *C. carrizo*. Por lo anterior se acepta la hipótesis (Ho 3) de que en Huimanguillo, Tabasco se cuentan con patrones de cítricos al menos con tolerantes a *P. parasítica* y que su comportamiento en campo se deba a una respuesta de tipo genotipo ambiente ligado a lo pesado de los suelo donde están sembrados.

4.7. Resultados complementarios

En ocho plantaciones de limón Persa injertados sobre patrón *C volkameriana*, correspondientes al programa de reconversión citrícola, de las 18 plantaciones muestreadas de este cultivo, se detectó además de la gomosis de los cítricos, la presencia de una nueva enfermedad denominada por algunos productores como secadera. Esta enfermedad provoca daños a nivel de la base del tallo del injerto, mostrando taponamiento de vasos, necrosis de tallo. Esto daños provoca marchitamiento parcial-amarillamiento y la muerte de ramas, finalizando después de un año, dos o tres años con la muerte de la propia planta. (Figura 8). La incidencia promedio de esta enfermedad, contabilizada dentro del patrón de muestreo sistemático para gomosis, fue de 10.2% con un rango de 1.6 a 24.8%. , lo que preocupa a los productores de cítricos. Asimismo, Esta enfermedad algunos productores la asocian equivocadamente con daños de gomosis o con daños de insectos, dándole el manejo semejante. La descripción de una enfermedad con tal sintomatología no se encontró reportada en la literatura. Por lo que el diagnóstico del agente causal se hace imperativo. El estudio del agente causal está en proceso en el Laboratorio de Fitopatología del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco, Bajo la responsabilidad del Dr. Carlos Fredy Ortiz García.



Figura 8. Síntomas de la secadera del limón Persa injertado sobre *C volkameriano*. Marchitamiento y amarillamiento del follaje de una rama (a), atizonamiento parcial del follaje (b), Muerte de ramas y emisión de chupones basales (c), cancro sobre el tallo o rama secundaria (d) y necrosis interna sobre el tallo o rama secundaria (e).

Estos resultados muestran que el grado de conocimiento de los productores, de los síntomas de la gomosis de los cítricos y de otras enfermedades de las raíces es deficiente. Además, que en el proceso de la producción de cítricos se siguen estrategias de manejo inapropiadas posiblemente desarrolladas en otras regiones productoras del país, que lejos de reducir las pérdidas económicas en Huimanguillo, éstas se han visto acentuadas. Por lo que se recomendaría con el fin de reducir el impacto negativo de las enfermedades deben impulsarse el desarrollo de curso de capacitación entre otras estrategias divulgativas.

V. CONCLUSIONES.

Estos resultados confirman a *Phytophthora parasitica* o *Phytophthora nicotianae* var *parasitica* (aceptadas como sinónimos) como especie asociada a la gomosis de los cítricos en la zona Citricota de la Sabana de Huimanguillo, Tabasco. Esta especie fue aislada atacando a los cultivos de Naranja valencia y limón Persa; este es el primer reporte de la identificación de *P. parasitica* causando gomosis en cítricos, en tallo y frutos de limón Persa y Naranja Valencia, en Tabasco.

Pese al manejo que los citricultores de Tabasco le están dando a esta enfermedad en ambos cultivos, la incidencia promedio de la gomosis en tronco de en Naranja valencia fue de 14.0% y en Limón Persa 20.5%. Con una media general de 17.5%. Esta incidencia es favorecida por los suelos pesados del área citrícola que retienen humedad en sus perfiles por mayor tiempo que en otras regiones.

Los patrones tolerantes al VTC que presentaron mayor resistencia a la gomosis de los cítricos fueron *Citrango carrizo*, *Citrumelo swingle* y *C. volkameriano*, seguidos de *C. troyer*, *Rubidoux* que mostraron menor resistencia a la gomosis de los cítricos; pero mucho menor a lo que se registraron en naranja Valencia y limón Persa ambos registrados como susceptibles a dicha enfermedad.

La gomosis de los cítricos es una enfermedad de importancia económica para el limón Persa y la naranja Valencia en la región citrícola de Huimanguillo, y cuyo conocimiento y manejo aun es deficiente entre algunos productores. Ciertos productores confunden los síntomas de las gomosis con los de otra enfermedad aparentemente nueva en la región la secadera, y que requiere del diagnóstico de su agente causal.

VIII. LITERATURA CITADA

- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith y K. Struhl. 1989. Current protocols in molecular biology. Greene publishing associates and Wiley-Interscience.
- Afek, U., A. Sztejnberg, and Z. Solel. 1990. Rapid Method for Evaluating Citrus Seedlings for Resistance to Foot Rot Caused by *Phytophthora citrophthora*. Plant Dis. 74:66-68
- Alencar, J. 1941. Podridão do pé dos citros. Boletim no. 6, Escola Superior de Agricultura de Minas Gerais, Viçosa.
- Brewster, Charlene, and Thomas H. Spreen. "Price Equilibrium in Spatially Separated Multi-Product Markets: An Application to the World Processed Orange Juice Market." Selected paper presented at the American Agricultural Economics Association meetings, Salt Lake City, UT, August, 1998. (Abstract: *Amer.J. Agr. Econ.* 80(1998): 1175).
- Carpenter, J. B. and Furr J. R. 1962. Evaluation of tolerance to rot root caused *Phytophthora parasitica* in seedlings of citrus and related genera. *Phytopathology* 52: 1277-1285.
- González-Estrada, A., V. Medina-Urrutia M., Robles-González, M., Martínez- Parra, R y Wood, S. 2006. Impacto económico del control de la gomosis del limonero mexicano con los portainjertos del INIFAP. Chapingo, México primera edición, 2006
- Fawcett, H. S. 1936. Citrus Diseases and Their Control. McGraw-Hill, New York. 2a. Ed.
- Klotz, L. J., DeWolfe, T. A., and Wong, P. P. 1958. Decay of fibrous roots of citrus. *Phytopathology* 48:616-622.
- Klotz, L.J., W.P. Bitters, T.A. Dewolfe And M.J. Garber. 1968. Some factors in resistance of citrus to *Phytophthora* ssp. *Plant Dis. Rep.* 52:952-955.
- Klotz, L. J. 1978. Fungal, bacterial, and nonparasitic diseases and injuries originating in the seedbed, and nursery orchard. Pages 1-66 in: *The Citrus Industry*. Vol. 4, Crop Protection. W. Reuther, E. C. Calavan, and G. F. Carman, eds. University of California Agricultural Sciences Publications, Richmond.
- López A. P. J. 1999. Tesis de Maestría. Selección de cultivares de cacao con resistencia a *Phytophthora capsici* Leonina emend. Alizadeh & Tsao. Montecillo, Texcoco, Edo. de México.
- Medina F. H. P., Bordignon, R., Siqueira, W.J., Feichtenberger, E., Carvalho, M.R.T. & Teófilo Sobrinho, J. 2003. Resistência de clones e híbridos de porta-enxertos de

citros à gomose de tronco causada por *Phytophthora parasitica*. *Fitopatologia Brasileira* 28:534-540.

Marín A. A. 2006. Caracterización, Clasificación y Cartografía de Suelos Citrícolas en Tabasco. Tesis de Maestría. Colegio De Postgraduados. H. Cárdenas, Tabasco. 117p.

Matheron, M. E., Porchas, M., and Matejka, J. C. 1997. Distribution and seasonal population dynamics of *Phytophthora citrophthora* and *P. parasitica* in Arizona citrus orchards and effect of fungicides on tree health. *Plant Dis.* 81:1384-1390.

Medina Filho, H.P., Bordignon, R., Siqueira, W.J., Feichtenberger, E., Carvalho, M.R.T. & Teófilo Sobrinho, J. Resistência de clones e híbridos de porta-enxertos de citros à gomose de tronco causada por *Phytophthora parasitica*. *Fitopatologia Brasileira* 28:534-540. 2003.

Mujica, F. y C. Vergara. 1980. Flora Fungosa Chilena. Universidad de Chile Facultad de Agronomía, Ciencias Agrícolas n°5. Santiago, Chile. 308 pp.

Ortíz, G. C.F. 1996. Etude de la diversité génétique de populations de *Phytophthora* pathogenes du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) et du cocotier (*Cocos nucifera* L.) Tesis Doctoral. Université Paul Sabatier Toulouse, Francia. 85 p.

Orozco S., M. 1995. Enfermedades presentes y potenciales de los cítricos en México. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo de México. México 150p.

Rocha, P. M. A., López, A. J. I. 2004. La citricultura de México y su fitosanidad. Memoria: Manejo integrado Fitosanitario de los cítricos en México. Veracruz, Veracruz. Julio 27, 2004.

Spreen, Thomas H. "The Free Trade Area of the Americas and the Market for Processed Citrus Products." Paper to be presented at the 13th Intergovernmental Meeting on Citrus, Food and Agriculture Organization, Beijing, China, May, 2001.

Revista "Claridades Agropecuarias" (Octubre 2008)., Datos Preliminares. Del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las Delegaciones de la SAGARPA

Sarasola, A. A. y Rocca, A. M. de S. 1975. Fitopatología. Tomo II. Ed. Hemisferio Sur. Argentina. 297-301 pp.).

Saldaña H. M. I. 2002. Tesis de maestría. Diagnóstico de la pudrición de la raíz del papayo causada por *Phytophthora* sp., en la Chontalpa y Centro, Tabasco. Colegio de Postgraduados Campus, Tabasco.

SAGARPA. 2004. Norma Oficial Mexicana NOM-031-FITO-2000, por la que se establece

la campaña contra el virus tristeza de los cítricos. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México.

SAGAR. 1997. Plan de acción contra el virus tristeza de los cítricos y el pulgón café, *Toxoptera citricida*. Dirección General de Sanidad Vegetal. Comisión Nacional Agropecuaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. México (mimeo).

Timmer, L. W., Menge, J. A., Zitko, S. E., Pond, E., Miller, S. A., and Johnson, E. L. 1993. Comparison of ELISA techniques and standard isolation methods for *Phytophthora* detection in citrus orchards in Florida and California. *Plant Dis.* 77:791-796.

Timmer, L. W. 1972. Management of soilborne diseases of citrus in the Lower Rio Grande Valley. *J. Rio Grande Valley Hortic. Soc.*, 26:44-58.

Timmer, L. W. 1973. Characteristics of *Phytophthora* isolates from Texas citrus orchards. *J. Rio Grande Valley Hortic. Soc.* 27:44-48.

Timmer, L W y Menge, J A. 2002. *Phytophthora* induced diseases In; Whiteside, J O., Garnsey, S M., and Timmer, I W. (Eds) *Compendium of citrus diseases*, Saint Paul, American Phytopathological Society Press. 1988 pp 22-24.

Timmer, L. W., Garnsey S. M., Graham J. H. 2002. *Plagas y enfermedades de los cítricos*. The American Phytopathological Society. Ed. Mundi-Prensa. 90 p

Tuset, J.J., C. Hinarejos And J. Garcia. 1984. Present status of *Phytophthora* diseases of Citrus in Spain. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1:338-343.

Vargas, R. 1989. Identificación de especies de *Phytophthora*. Tesis de grado. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 39 p.

Vanderweyen. A. 1983. Contribution a l etude de la gommose a *Phytophthora* des agrumes au Maroc. *FRUITS* Vol 38 (1) 43 P.182.

Vial, A., Latorre, B., y Ortúzar, J. 2004. Gomosis, pudrición del pie y de los frutos causada por *Phytophthora* spp. *Aconex* 84: 5-9.

Vidales F. J. A. 1982. Etiología de la Gomosis de los Cítricos en Tecomán, Colima y búsqueda de fuentes de resistencia. Tesis de Maestría. Chapingo, México, Abril de 1982.

Villarreal, L. Aguirre, L., Cruz, M. 1996. Detección del virus de la tristeza en México. *Memorias XXIII Congreso Nacional de Fitopatología*. Guadalajara, Jalisco. México.

- Villarreal, G., L.A., Ramírez D., A.M., Robles, G., P.L. 2000. Campaña contra el virus tristeza de los cítricos en México. Memorias Séptima Reunión Anual del Consejo Nacional Consultivo
- Wallace, J.M. 1978. Virus and Virus-like Diseases. pp. 67-184. In: Reuther, W., E.C. Calavan, and G.E. Carman (ed). The Citrus Industry Volume IV. University of California. División of Agricultural Sciences. Riverside, California. 362 p.'
- Zitko, S.E., Timmer, L.W., and Sandler, H.A. 1991. Isolation of *Phytophthora palmivora* patgogenic to citrus in Florida. Plant Disease 75:532-535.