



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS



**CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FRUTICULTURA**

**ETIOLOGÍA DE LA PUDRICIÓN DEL COGOLLO DE LA PIÑA
(*Anana comosus* L. Merrill) EN ISLA, VERACRUZ MÉXICO**

CÉSAR JOEL ESPINOSA RODRÍGUEZ

**T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2014

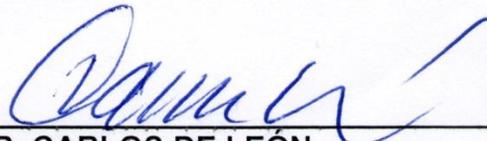
La presente tesis titulada: **Etiología de la pudrición del cogollo de la piña (*Anana comosus* L. merril) en Isla, Veracruz México**, realizada por el alumno **César Joel Espinosa Rodríguez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

RECURSOS GENETICOS Y PRODUCTIVIDAD FRUTICULTURA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. CARLOS DE LEÓN

ASESOR:



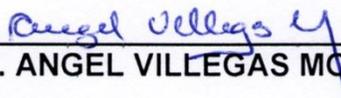
DR. DANIEL NIETO ANGEL

ASESOR:



M.C. LUIS ALFONSO AGUILAR PEREZ

ASESOR:



DR. ANGEL VILLEGAS MONTER

Montecillo, Texcoco, Edo. de México, Agosto de 2014.

DEDICATORIAS

Con respeto y admiración a mis amados padres Mariano Espinosa Rodríguez† y Socorro Rodríguez Cruz por su amor, cariño y comprensión.

A mis queridos hermanos Mariana, Moisés y José.

A mis apreciados sobrinos Elías y Said.

A mis estimados tíos Feliciano y Soledad Espinosa Rodríguez.

César Joel Espinosa Rodríguez

AGRADECIMIENTO

Primeramente a *Dios*, por permitirme estar de pie ante tantas adversidades, por darme esperanza, fuerzas y principalmente vida para llegar hasta donde estoy.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos por darme la oportunidad de realizarme profesionalmente.

A la sociedad mexicana, ya que a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con los impuestos de los contribuyentes me fue posible tener acceso a una beca para culminar esta meta.

A la empresa Productora y Exportadora de piña en Isla, Veracruz México, por las facilidades otorgadas para la realización de la presente investigación.

Mi más sincero reconocimiento, agradecimiento y admiración al Dr. Daniel Nieto Ángel, por su amistad, apoyo y sobre todo su paciencia durante esta etapa de mi vida.

Al M.C. Luis Alfonso Aguilar Pérez y a su señora madre Victoria Pérez, por las atenciones brindadas durante mi estancia en Veracruz.

Al Dr. Carlos De León García de Alba y Dr. Ángel Villegas Monter, por sus aportaciones al presente trabajo; así como a la Dra. Yolanda Leticia Fernández por aceptar ser parte de mi consejo particular.

A la M.C. Victoria Ayala Escobar y al C. Oscar Moreno Cernas por su apoyo para el desarrollo de mi investigación.

A las secretarías Elsa y Lupita de Fruticultura, así como a Verito e Hilda de Fitosanidad, por facilitarme y apoyarme para mi presentación

A la Sra. Rosario Torres por su simpatía y apoyo brindado para terminar esta meta.

Al Ing. Juan Domingo Hernández Vázquez por su apoyo y amistad.

A la Sra. Silvia Carmona y Alejandro Jaime García por apoyarme y darme ánimos durante la etapa más difícil de mi vida.

Al Ing. Francisco Javier Valdivia Reyes y su esposa Velia Flores Pauli, por su amistad y apoyo para culminar esta meta.

A mis compañeros y amigos que me acompañaron durante estos dos años: Araceli, Lucero, Dolores, René, Ana, Jaime, Edgar.

RESUMEN

La pudrición del cogollo de la piña (*Ananas comosus* L. Merrill) es una enfermedad con alta incidencia en la regiones productoras de Veracruz, México, el cultivar MD2 es el más susceptible. El objetivo de este estudio fue identificar morfológica y filogenéticamente el agente causal de la enfermedad. Muestras de piña se colectaron entre Septiembre de 2011 y Marzo de 2012. De las hojas basales en contacto con el cogollo con pudrición se aisló un oomicete. Para la identificación morfológica se utilizó el micelio y las estructuras reproductivas asexuales (esporangios y clamidosporas). Para la identificación filogenética, se amplificó el espacio transcrito interno del ADN ribosomal utilizando los iniciadores ITS6 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del Banco de Genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2012) USA, con la accesión JN699566. En la caracterización morfológica se identificó al oomicete *Phytophthora nicotianae*. La identificación filogenética tuvo 100% de similitud con *Phytophthora nicotianae*, con la secuencia reportada por el NCBI. Se realizaron pruebas de patogenicidad *in vitro* e *in vivo*. Para las pruebas *in vitro* se inoculó el oomicete en coronas de piña, los primeros signos y síntomas aparecieron 7 - 9 días después de la inoculación (ddi) en el 100% de las coronas inoculadas; para las pruebas *in vivo* se utilizaron vástagos (gallos) sembrados en una mezcla de tierra y tezontle (3:2 v/v) cultivados por 5 meses, los signos y síntomas se presentaron 16 - 20 ddi en el 95% de las plantas inoculadas. Por lo que se considera el primer reporte de *Phytophthora nicotianae* en piña para esta zona.

Palabras clave: Pudrición del cogollo, *Ananas comosus*, *Phytophthora nicotianae*.

ABSTRACT

Bud rot of pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill) is a disease with high incidence in the growing regions of Veracruz, Mexico, MD2 cultivar is the most susceptible. The objective of this study was to identify morphological and phylogenetically the causative agent of the disease. Samples were collected pineapple between September 2011 and March 2012. Basal leaves from contact with the bud rot oomycete isolated one. For morphological identification mycelium and asexual reproductive structures (sporangia and chlamydo spores) was used. Phylogenetic identification for the internal transcribed space ribosomal DNA was amplified using primers ITS6 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). The sequences obtained were compared with the database of Gen Bank National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2012) USA, with JN699566 accession. In the morphological characterization the oomycete *Phytophthora nicotianae* was identified. Phylogenetic identification was 100% similarity to *Phytophthora nicotianae*, with the sequence reported by the NCBI. Tests in vitro and in vivo pathogenicity were performed. For in vitro tests in the oomycete inoculated pineapple crowns, early signs and symptoms appeared 7-9 days after inoculation (dai) in 100% of inoculated crowns; for in vivo testing stems (roosters) planted in a mixture of earth and volcanic rock (3:2 v / v) grown for 5 months, the signs and symptoms presented were used 16 - 20 ddi in 95% of the plants inoculated. It is considered the first report of *Phytophthora nicotianae* in pineapple for this area

Keywords: bud rot, *Anana comosus*, *Phytophthora nicotianae*.

CONTENIDO

DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTO	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
INDICE DE CUADROS	ix
INDICE DE FIGURAS.....	x
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Objetivo.....	3
1.3 Hipótesis.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Origen de la Piña.....	3
2.2 Clasificación taxonómica	3
2.3 Botánica del cultivo.....	4
2.4 Cultivares.....	8
2.5 Requerimientos climáticos y edáficos.....	9
2.5.1 Precipitación pluvial	9
2.5.2 Temperatura.....	9
2.5.3 Pendiente.....	10
2.5.4 Vientos.....	10
2.5.5 Altitudes.....	10
2.5.6 Suelos.....	10
2.6 Plagas y enfermedades.....	12
2.7 Valor nutricional de la piña	12
2.8 Panorama económico de la piña	15
2.8.1 Producción mundial.....	15
2.8.2 Producción nacional.....	19
2.8.3 Producción estatal.....	21
III. MATERIALES Y MÉTODO.....	23

3.1 Sitio de estudio y muestreo.....	23
3.2 Aislamiento	23
3.3 Preparación del inóculo	24
3.4 Pruebas de Patogenicidad	25
3.5 Caracterización morfológica.....	26
3.6 Identificación Molecular	26
IV. RESULTADOS	27
4.1 Aislamiento de microorganismos.....	27
4.2 Pruebas de Patogenicidad	28
4.3 Caracterización morfológica.....	29
4.4 Identificación molecular	32
V. DISCUSIÓN	32
VI. CONCLUSIÓN	34
VII. LITERATURA CITADA	35
ANEXOS.....	42

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Principales cultivares comerciales de piña - - - - -	11
Cuadro 2. Principales plagas presentes en México - - - - -	13
Cuadro 3. Principales enfermedades presentes en México - - - - -	14
Cuadro 4. Composición de la piña - - - - -	15
Cuadro 5. Entidades Federativas productoras de piña, 2012 - - - - -	20
Cuadro 6. Municipios del estado de Veracruz productores de piña, 2012 -	21
Cuadro 7. Microorganismos aislados de plantas de piña (<i>Ananas comosus</i> . L. Merrill) cultivar MD-2 con signos y síntomas de pudrición del cogollo. Isla, Veracruz, México - - - - -	27

INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Clasificación de las hojas de una planta de piña cultivar “Cayena lisa” -----	6
Figura 2.	Esquema de una planta de piña -----	7
Figura 3.	Principales países productores de piña, 2011 -----	16
Figura 4.	Rendimiento de los países productores de piña (toneladas / hectárea), 2011 -----	15
Figura 5.	Países importadores de piña, 2011 -----	17
Figura 6.	Países exportadores de piña, 2011 -----	18
Figura 7.	Exportaciones de México, 2011-----	27
Figura 8.	Producción de piña por Entidad Federativa, 2012 -----	20
Figura 9.	Producción de piña por municipio, 2012 -----	22
Figura 10.	A) y B) Micelio de <i>Phytophthora</i> sp. -----	28
Figura 11.	Síntomas y signos de la pudrición del cogollo de la piña. A) Pruebas in vitro de la pudrición del cogollo de la piña. B) Signos y síntomas en coronas inoculadas. C) Pudrición del cogollo. D) Hoja de corona con pudrición. E) Corona de piña 9 ddi. F) Signos del oomiceto en plantas inoculadas. G) Signos y síntomas en plantas inoculadas en invernadero. H) Cogollo podrido de la planta de piña. I) Cogollo y raíz de planta testigo de prueba in vivo. J) Cogollo y raíz de planta inoculada. K) Planta de piña 16 ddi. -----	30
Figura 12.	Estructuras asexuales de <i>Phytophthora nicotianae</i> . A) Esporangio esférico. B) Esporangio limoniforme. C) Esporangio ovoide. D) Clamidospora intercalar. E) Clamidospora terminal -----	31
Figura 13.	Amplificación del espacio transcrito interno del ADN ribosomal utilizando los iniciadores ITS6/ITS4-----	32

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La piña (*Ananas comosus* L. Merrill) es nativa de las regiones tropicales y subtropicales de América del Sur, pertenece a la familia de las bromeliáceas, del orden Bromeliales y a la especie *Ananas comosus*. La familia Bromeliaceae se caracteriza por tener flores de tres piezas con escamas foliares exclusivas, con la propiedad de retener agua. Las hojas de la planta están dispuestas en espiral, por lo general en capas, que actúan como pendientes de captación del agua, y el depósito como reserva. El embrión de las plantas tiene un solo cotiledón (Ochse *et al.*, 1965; Py y Tisseau, 1969; Hassan *et al.*, 2011).

Según estimaciones de la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (United Nations' Food and Agriculture Organization, FAO), se calcula que para 2014 la producción mundial de frutas tropicales llegará a 82 millones de toneladas; el 78% corresponde a las “frutas principales” (mango, piña, aguacate y papaya) y el 22% a las “frutas secundarias” (litchi, rambután, guayaba y maracuyá). Países en desarrollo representan alrededor del 98% de la producción total, mientras que los países desarrollados representan el 80% del comercio mundial de importaciones (FAOSTAT, 2013).

La producción de piña es de gran importancia económica para las zonas tropicales y subtropicales del mundo, ya que es el segundo fruto tropical producido después del mango. Se prevé que la producción de piña para 2014 alcance aproximadamente 18.7 millones de toneladas, lo que representa 23% de la cosecha mundial de frutas tropicales. Los principales países productores de piña se encuentran en Asia-Pacífico (Tailandia, India, Filipinas, China, Vietnam y Malasia) con el 47% de la producción mundial. En América Latina los principales productores

son Brasil y Costa Rica, ocupando el segundo y tercer lugar a nivel mundial respectivamente; México ocupa el décimo lugar, como productor de piña. Para el año 2012 la superficie total cultivada con piña fue de aproximadamente 17 mil hectáreas, con una producción total aproximada de 760 mil toneladas, siendo los principales productores los estados de Veracruz, Oaxaca, Nayarit y Tabasco (FAOSTAT, 2013; SIAP, 2013).

El cultivar más sembrado en México es ‘Cayena Lisa’ con 80% de la superficie total sembrada (Rebolledo *et al.* 2006); sin embargo, en las últimas dos décadas Del Monte y Dole, las dos principales empresas productoras de piña en el mundo además de que dieron lugar a un nuevo cultivar de piña, el híbrido MD2 (en México conocido como ‘Piña miel’), originado en Hawái; también han realizado campañas para su ingesta en los principales países consumidores como Estados Unidos y la Unión Europea a través de las cadenas de supermercados, incrementando de ésta manera la demanda de éste cultivar. El atractivo del cultivar MD2 es porque los frutos tienen la pulpa más amarilla, más dulce y con menor acidez que otros cultivares, posee de 15 a 17° Brix de sólidos solubles totales, mientras que ‘Cayena Lisa’ tiene de 12 a 15°; también cuenta con un mayor contenido de vitamina A y C, además de que el fruto adquiere una forma más cilíndrica y no con forma de botella, lo que para la agroindustria es muy apreciado debido a existe menor desperdicio al ser peladas para su industrialización (FAOSTAT, 2013; Williams and Fleisch, 1992; Rebolledo *et al.*, 1998; Rebolledo *et al.*, 2011; Fold and Gough, 2008; Chan *et al.*, 2002; Morgan and Thompson, 2000).

El principal problema que enfrenta el cultivar MD2 en las zonas productoras de Veracruz es la pudrición del cogollo. Coppens *et al.* (1997) han reportado que esta enfermedad ha causado graves pérdidas económicas en Australia, Hawái, Filipinas, Sudáfrica y Tailandia. Previo al presente estudio, no se conocía con certeza la etiología de la enfermedad en la zona. Rebolledo *et*

al. (2011) mencionan que es causado por *Erwinia chrysanthemi* y Espinosa and Adam (1972), aluden esta enfermedad a *Phytophthora nicotianae*.

1.2 Objetivo

Identificar al agente causal de la pudrición del cogollo de la piña para la localidad de Isla, Veracruz, México.

1.3 Hipótesis

La pudrición del cogollo de la piña para la localidad de Isla, Veracruz México es causada por un agente patógeno fungoso.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen de la Piña

El origen de la piña es en las tierras altas, secas, de la región de Matto Grosso de Brasil y Paraguay, en donde aún se encuentran varias especies de piñas silvestres. En 1493, durante su segundo viaje, Cristóbal Colon descubrió este fruto en la isla de Guadalupe, donde los indígenas ya tenían domesticado este cultivo. En 1535, la piña fue introducida a España y para 1548 la piña ya era conocida en la India y otros países del Oriente, y a finales del siglo XVII era conocida en prácticamente todas las regiones tropicales del mundo (Baraona y Sancho, 1991; Ochse *et al.*, 1965; Hassan *et al.* 2011).

2.2 Clasificación taxonómica

La piña pertenece a la familia *Bromeliaceae*, una familia muy grande oriunda de América, con solamente una especie originaria de África.

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Subclase	Commelinidae
Orden	Poales
Familia	Bromeliaceae
Subfamilia	Bromelioideae
Género	<i>Ananas</i>
Especie	<i>Comosus</i>

Fuente: Bromeliad Soc. International, 2012; Angiosperm Phylogeny Website, 2012; Royal Botanic Gardens Kew, 2012; Ananas. The plan list, 2012; Haston *et al.*,2009.

2.3 Botánica del cultivo

La piña es una planta monocotiledónea, herbácea y perenne. Tiene un tallo grueso que puede llegar a crecer longitudinalmente hasta 1.5 m, con una roseta basal de hojas que van de los 30 a 100 cm de largo. Las hojas son rígidas, con vainas que abrazan al tallo, sésiles, lanceoladas, estrechamente imbricadas, levemente cóncavas para conducir agua de lluvia hacia la roseta, con la periferia dotadas de espinas de puntas pequeñas y ápice puntiagudo, la superficie superior de la hoja es de color verde, mientras que la inferior es plateada debido a la presencia de estomas y tricomas. El número de estomas para el cultivar ‘Cayena lisa’ es de 180 estomas/mm² y en híbridos triploides y tetraploides 132 y 105 estomas/mm² respectivamente (Collins, 1960); sin embargo, Py and Tisseau (1969) mencionan que existen 70-80 estomas/mm².

La forma de las hojas varía y depende de la posición en el tallo y, por ende, de la edad. Py & Tisseau (1965) las clasifican de la siguiente manera (Figura 1):

- A. Hojas exteriores, completamente desarrolladas cuando el vástago es plantado; tienen un ‘cuello’, una zona de una zona de crecimiento restringido cerca de la base y ocupan una posición prácticamente horizontal.
- B. Hojas presentes pero aún no están desarrolladas al momento de la siembra, el cuello está más alto y por encima de este se presentan algunas espigas (esto, se produce después de cada interrupción del crecimiento).
- C. Hojas viejas desarrolladas después de la siembra, no se aprecia con claridad el cuello.
- D. Hojas jóvenes, pero totalmente desarrolladas en un ángulo de alrededor de 45°; estas hojas son generalmente aceptadas para el análisis de la hoja y la medición. Su peso puede alcanzar hasta 100 g y está estrechamente relacionada con el rendimiento.
- E. Hojas en pleno desarrollo, están fijadas en la espaldilla del tallo, tienen una forma lanceolada típica pero con una base ligeramente convergente cuya anchura no excede la mayor del limbo, no son completamente verdes.
- F. Hojas erectas en el interior de la roseta; son pequeñas y ligeramente coloreadas.

En promedio, una nueva hoja aparece cada semana, con un ritmo lento al principio y posteriormente más rápido. Al igual que en el plátano, la hoja es erecta al principio de su desarrollo y poco a poco tienden a colgarse. La elongación máxima de la hoja es de 9 cm por semana con cuatro meses antes de que una nueva hoja llega a la etapa D (Figura 1). Cada hoja sucesiva es más grande que la anterior, hasta llegar a un peso máximo de 80-100 g de cada hoja.

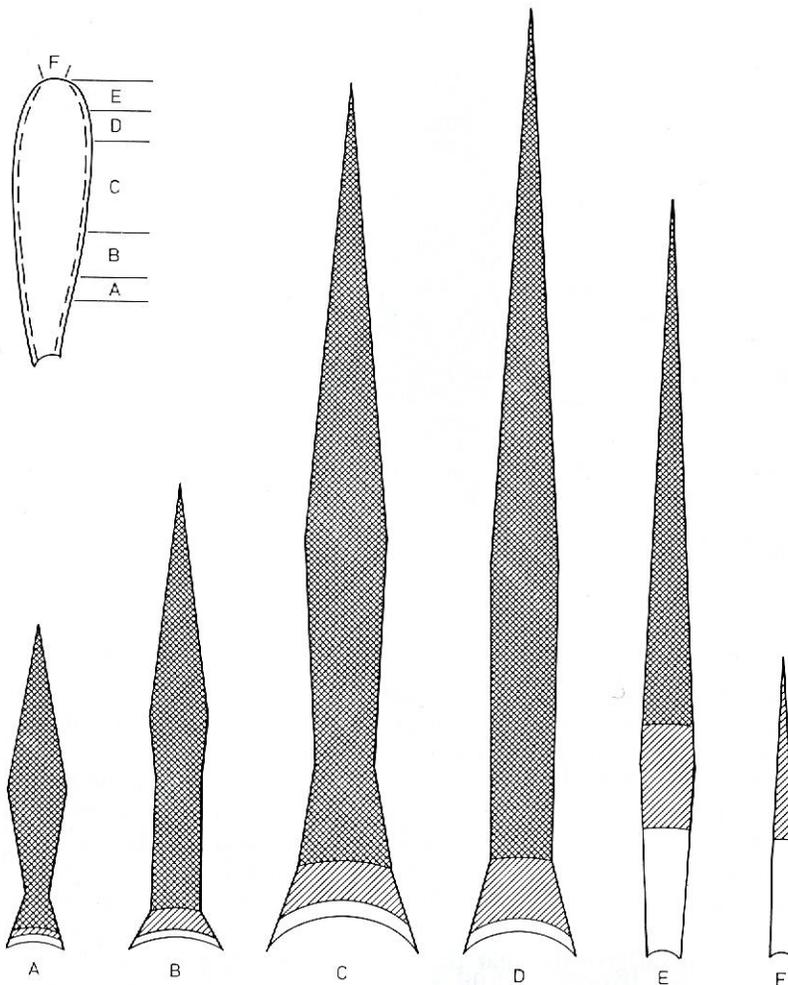


Figura 1. Clasificación de las hojas de una planta de piña cultivar “Cayena lisa”. Fuente: Louvel (1975).

De las axilas foliares crecen vástagos o hijuelos que dependiendo de su ubicación se le denomina ‘gallo’ cuando crecen y desarrollan a partir de yemas localizadas en el pedúnculo y la base del fruto, o ‘clavo’ que crecen y se desarrollan de yemas axilares en todo el tallo, ambos se utilizan para la reproducción vegetativa, así como el meristemo apical o ‘corona’. Existe un solo punto de crecimiento activo en el ápice del tallo, el cual se diferencia formando la inflorescencia (Figura 2) (Ochse *et al.*, 1965; Py & Tisseau, 1969; Samson, 1986).

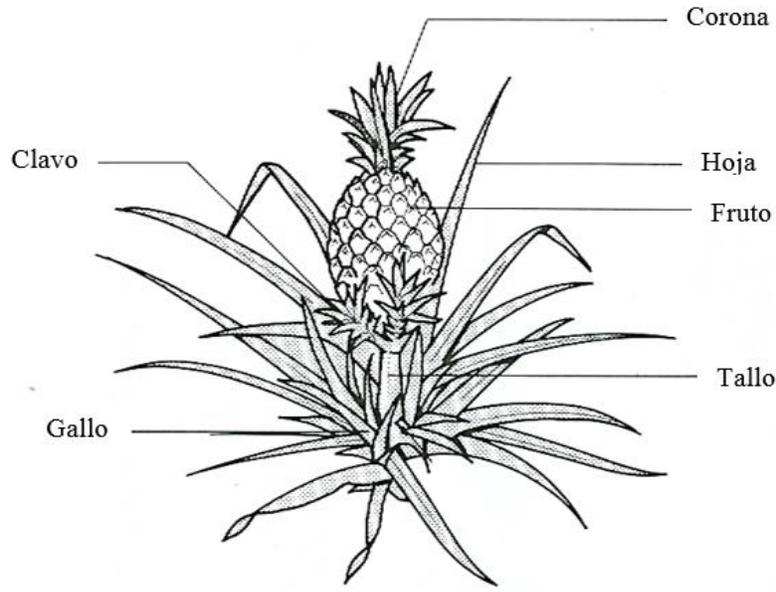


Figura 2. Esquema de una planta de piña. Modificado de Figueroa *et al.* (1970).

La inflorescencia es una espiga formada lateralmente con brácteas muy juntas de color rojo y verde, subteniendo flores de color violáceo o blanco y teniendo un racimo de hojas en la terminal. Las flores son hermafroditas, autoestériles, sésiles, con brácteas inconspicuas, los tépalos externos ligeramente asimétricos y libres, de ovario súpero. Se puede presentar la polinización cruzada entre dos variedades, las flores se fecundan y forman semillas muy pequeñas, de forma amigdaloides y duras; en la polinización intervienen principalmente los colibríes. Empero no es deseable que se presente la polinización cruzada para evitar variabilidad genética, en este caso cada flor da origen por partenocarpia a una baya pequeña que fusionadas forman el sincarpo o sorosis. La flor se transforma en un escudete octogonal de cubierta dura, formada por la fusión del ápice de la bráctea y los tres sépalos, que formará la dura piel cerúlea y espinosa del fruto (Samson, 1986; Py & Tisseau, 1969).

El sincarpo o sorosis, es una infrutescencia grande y de forma ovoide constituida por un eje carnoso que se forma a partir del tallo axial engrosado y las paredes del ovario, sobre el que se desarrollan un agregado de bayas pequeñas y sus correspondientes brácteas que se fusionan tempranamente, formando la pulpa amarilla, poco fibrosa, dulce y ácida (Rebolledo *et al.*, 2011).

Se pueden distinguir tres fases en la vida de una planta de piña: la fase vegetativa de crecimiento de las hojas, la fase generativa del crecimiento del fruto y otra fase vegetativa, la del crecimiento de los brotes o vástagos (Py *et al.*, 1977). Estas fases se traslapan hasta cierto punto, ya que el crecimiento de la hoja continua después de que la floración ha sido inducida y sólo se detiene después de que haya aparecido la inflorescencia; el crecimiento de los brotes puede comenzar antes de que se cosecha la fruta (Samson, 1986).

La planta de piña se asocia a dos tipos de raíces: las del suelo y las axilares (adventicias). El sistema radical del suelo proviene de la base del tallo, con una extensión lateral de 1 a 2 m alcanzando profundidades de hasta 80 cm, aunque la mayoría se encuentra en los primeros 30 cm. Un vástago inicia su enraizamiento 20 días posteriores de haber sido sembrado iniciando con 40 raíces, en función del crecimiento de la parte aérea, alcanzando a llegar hasta 130 previo a la floración. Las raíces son cortas, gruesas, con raíces capilares por toda su longitud y son desarrolladas y regeneradas constantemente de los nudos basales que se encuentran a lo largo del tallo tanto arriba como debajo de la tierra (Py & Tisseau, 1969; Samson, 1986; Rebolledo *et al.*, 2011).

2.4 Cultivares

El origen de los distintos cultivares de piña posiblemente puede atribuirse a mutaciones somáticas. Dado que no se autopolinizan y la polinización cruzada es muy ocasional, los híbridos

naturales no son muy comunes, además de que las semillas no germinan fácilmente. Hoy en día no existen reportes sobre la variabilidad de la piña, ni una clasificación sistemática de los cultivares. La producción comercial de los mercados de exportación se basa en un número limitado de variedades y en algunos pequeños campos en el continente americano siguen produciendo variedades menos conocidas (Collins, 1960; De La Cruz y García, 2005). Los principales cultivares utilizados comercialmente se muestran en el Cuadro 1.

2.5 Requerimientos climáticos y edáficos.

2.5.1 Precipitación pluvial

La precipitación pluvial medial anual que necesita este cultivo es de 1000 a 1800 mm, bien distribuida durante todo el año; cuando no se encuentra bien distribuida la temporada de lluvias, es decir, se presentan más de tres meses con precipitaciones iguales o inferiores a 60 mm es muy probable que se tengan cosechas poco abundantes y la calidad de la fruta merma. Para estos casos se han desarrollado nuevas tecnologías como el riego por goteo, acolchado plástico y la malla-sombra para reducir los efectos negativos de los periodos secos (Uriza, 2011).

2.5.2 Temperatura

La temperatura media anual promedio de 24 a 25°C, con valores extremos absolutos que no bajen de los 20°C, ni excedan los 35°C. Cuando ocurran, como es frecuente en las regiones piñeras de México, se pueden prevenir y así amortiguar sus secuelas mediante tecnologías como la malla-sombra, el acolchado plástico y el riego (De La Cruz y García 2005; Uriza, 2011).

2.5.3 Pendiente

Pendientes preferentemente, menores al 6% o condicionada a la aplicación estricta de prácticas de control de la erosión que incluyen el uso de camas con pendiente controlada, drenes, canales de desagüe y acolchado plástico total (Uriza, 2011).

2.5.4 Vientos

Vientos frecuentes no mayores a 50 km/h, o en su ocurrencia, procurar la protección de las plantaciones con malla-sombra para reducir sus efectos negativos sobre plantas y frutos (Uriza, 2011).

2.5.5 Altitudes

Altitudes de hasta 250 metros, aunque en alturas mayores (hasta de 500 metros), sin excesos de nubosidad, existe la posibilidad de producir frutas de calidad aceptable (Uriza, 2011).

2.5.6 Suelos

Suelos con muy buen drenaje y profundidad de más de 1 metro, con textura arenosa, migajón-arenoso o migajón areno-arcilloso y pH entre 4.5 y 5.5. Valores mayores de pH, resultan en alta incidencia de pudriciones de raíz y cogollo por hongos del género *Phytophthora spp*, especialmente en este híbrido que es doblemente susceptible en comparación con el clásico clon Cayena Lisa (Rebolledo *et al.* 2011; Uriza, 2011).

Cuadro 1. Principales cultivares comerciales de piña

Cayena lisa	Española de Singapur	Verde Selacia	Queen	Roja Española	Perola	Perolera	MD2
<ul style="list-style-type: none"> - Su ciclo de producción es uno de los más largos entre los cultivares - Baja producción de lechones para detener brotes - Tendencia a plagas y enfermedades - Alto contenido de azúcar, 13 a 19 ° Bx - Buena tolerancia al colapso de fruta - Pale color de la pulpa amarilla - Claro jugo de color amarillo con alto contenido de azúcar 	<ul style="list-style-type: none"> - Generalmente se utiliza para la industria conservera - Se Produce en el sureste de Asia - Peso medio, 1 kg - El color de la pulpa es amarillo dorado - El contenido de ácido y el azúcar baja, 10 a 12 ° Bx - Alta calidad para la producción de jugo - Buen productor de los retoños y brotes madre - Muy sensibles a los nematodos y el colapso de la fruta 	<ul style="list-style-type: none"> - La mutación obtenida de española de Singapur - La principal diferencia con el cultivar original son las hojas de flores verdes y espinas amarillas - Conserva las principales cualidades de la española de Singapur 	<ul style="list-style-type: none"> - Destinada para el consumo en fresco. - Peso promedio de 0,5 a 1 kg. - Color de la pulpa es de color amarillo dorado - Alto contenido de azúcar, de 14 a 18 ° Bx - Alta tolerancia al estrés, plagas y patógenos, mejor que Cayena lisa - Altamente susceptibles a oscurecimiento interno por frío. - Por lo general, recolectadas antes de la maduración. 	<ul style="list-style-type: none"> - Cultivada ampliamente en el Caribe - El peso promedio de 1,2 a 2 kg de azúcar - Contenido medio de azúcar 12 ° Bx, con baja acidez - Alta capacidad de producir retoños y brotes del tallo - Alta tolerancia a elevadas temperaturas y sequías. - Desarrolla oscurecimiento interno y descomposición - Sensible a los nematodos y al alto contenido de manganeso en campo. 	<ul style="list-style-type: none"> - El peso medio de 0,9 a 1 kg - Alto contenido de azúcar, de 13 a 16 ° Bx - Alto contenido de ácido ascórbico - Resistente a las sequías, las pulgas de arena y nematodos - Muy sensible a Fusariosis - Cultivado en Brasil 	<ul style="list-style-type: none"> - El peso promedio de 1,5 a 3 kg. - Bajo contenido de azúcar, 12 ° Bx - Buen productor de vástagos, de 4 hasta 11 - Resistente a fusariosis - Sensible al daño mecánico - Sensible a la mosca <i>Melanoloma viatrix</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> - Híbrido desarrollado en Hawaii a partir de Cayena lisa - Peso promedio 1,3 a 2,5 kg - Pulpa fibrosa de color naranja a amarillo - naranja - Alto contenido de azúcar 15 a 17 ° Bx. - Mayor resistencia a la oscurecimiento interno - Menor contenido de ácido ascórbico - Más propenso a la putrefacción - Sensible a <i>Phytophthora</i> spp.

Fuente: COVECA, 2002

2.6 Plagas y enfermedades

La frecuencia e intensidad de cultivo y las condiciones ambientales que se presentan en cada lugar, determinan los incrementos o decrementos de las poblaciones de plagas (Cuadro 2) y enfermedades (Cuadro 3) en los cultivos. La eficiencia del control depende del ingrediente activo, calidad y presentación, edad del cultivo y dosis, humedad, temperatura y viento; equipo y calidad de la aplicación, así como de la oportunidad con que se realice la aplicación. Son considerables los organismos dañinos cuya presencia ha sido confirmada en las principales regiones productoras de piña en México. Entre los más importantes por su orden de aparición en el ciclo, frecuencia, grado de daño e impacto negativo sobre la producción de esta fruta (Uriza 2011).

2.7 Valor nutricional de la piña

Las piñas contienen 81,2 a 86,2% de humedad, y 13-19% de sólidos totales, de los cuales la sacarosa, la glucosa y la fructosa son los componentes principales. Los carbohidratos representan hasta el 85% de total de sólidos mientras que la fibra compensa 2-3%. De los ácidos orgánicos, el ácido cítrico es el más abundante. La pulpa tiene muy bajo contenido de cenizas, compuestos nitrogenados y lípidos (0,1%). De 25 a 30% de los compuestos nitrogenados son ciertas proteínas, tiene actividad proteolítica debido a una proteasa conocida como bromelina. La piña fresca contiene minerales como calcio, cloro, potasio, fósforo y sodio (Cuadro 4) (Dull, 1971).

Cuadro 2. Principales plagas presentes en México.

Nombre común	Nombre científico
Comején	<i>Gnathamitermes tubidormans</i> Buckley
Gallina ciega	<i>Phyllophaga</i> sp.
Sinfilidos	<i>Scutigera sakimurai</i> Scheller
Piojos harinosos	<i>Dysmicoccus brevipes</i> (Cockerell) y <i>Dysmicoccus neobrevipes</i> Beardsley, transmisores de los Virus de la Marchitez PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3
Hormigas	<i>Solenopsis geminata</i> Fabricius y <i>Pheidole megacephala</i> Fabricius, protectores y dispersores de los piojos harinosos entre plantaciones, plantas y entre los diferentes órganos de ellas.
Ácaro rojo o Araña roja	<i>Dolichotetranychus floridanus</i> Banks
Ácaro blanco o del fruto	<i>Steneotarsonemus ananas</i> (Tryon).
Trips	<i>Thrips tabaci</i> (Linderman), transmisor del Virus TSWV
Barrenador del fruto	<i>Thecla basilides</i> Geyer
Picudo negro o mexicano de las bromelias	<i>Metamasius callizona</i> Chevrolat
Elaphria	<i>Elaphria nucicolora</i> Gueneé
Grillo de campo	<i>Acheta assimilis</i> (F.)
Escarabajo del fruto podrido	<i>Carpophilus hemipterus</i> L.
Escama	<i>Diapsis bromelia</i> (Kerner)
Rata café o de campo	<i>Sigmodon hispidus</i> Say and Ord.
Urraca parda	<i>Cyanocorax morio</i> Wagler
Langosta	<i>Schistocerca piceifrons</i> Walker
Nematodos	<i>Pratylenchus</i> sp., <i>Meloidogyne</i> spp., <i>Helicotylenchus</i> sp., <i>Tylenchorhynchus</i> sp. y <i>Criconemoides</i> sp.

Fuente: Uriza, 2011; Rebolledo *et al.*, 2011.

Cuadro 3. Principales enfermedades presentes en México.

Nombre común	Nombre científico
Virus de la marchitez roja	PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3.
Pudrición del cogollo	<i>Phytophthora nicotianae</i> Breda de Haan var. parasitica Dast. Waterh
Pudrición del cogollo y raíz	<i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands
Pudrición de raíz	<i>Pythium arrhenomanes</i> Drechs.
Pudrición negra del tallo	<i>Thielaviopsis paradoxa</i> o <i>Ceratocystis paradoxa</i> (De Seynes) Höhn.
Pudrición bacteriana del cogollo	<i>Erwinia chrysanthemi</i> Burkh.
Mancha blanca de la hoja	<i>Thielaviopsis paradoxa</i> o <i>Ceratocystis paradoxa</i> (De Seynes) Höhn
Pudrición o colapso bacteriana del fruto	<i>Erwinia chrysanthemi</i> Burkh.
Pudrición del “fruto verde”	<i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands.
Corchosis inter-frutillos (IFC)	<i>Penicillium funiculosum</i> Thom.
Frutillos “cuerudos” (LP)	<i>Penicillium funiculosum</i> Thom.
Pudrición del corazón del frutillo (FCR) u “Ojo de gringa”	<i>Penicillium funiculosum</i> Thom y <i>Fusarium moniliforme</i> Sheld.
Pudrición negra o blanda del fruto	<i>Thielaviopsis paradoxa</i> o <i>Ceratocystis paradoxa</i> (De Seynes) Höhn
Pudrición del fruto por levaduras	<i>Saccharomyces</i> spp.
Fruto jaspeado	<i>Erwinia herbicola</i> var. ananas (Serrano) Dye y <i>Acetobacter peroxydans</i> Visser’t Hopft
Virus de la mancha amarilla	TSWV o Virus del Bronceado del Tomate, transmitido por <i>Thrips tabaci</i> (Linderman) y <i>Frankliniella</i> sp.
Mancha café del fruto	Desorden fisiológico.

Fuente: Uriza, 2011; Rebolledo *et al.*, 2011

Cuadro 4. Composición de la piña

Componente	% en Base húmeda
° Brix	10.8 – 17.5
Acidez titulable (como ácido cítrico)	0.6 – 1.62
Cenizas	0.3 – 0.42
Humedad	81.2 – 86.1
Fibra	0.3 – 0.61
Lípidos	0.2
Ésteres (ppm)	1 -250
Pigmentos (carotenos ppm)	0.2 – 2.5
Nitrógeno total	0.045 – 0.115
Proteína	0.181
Nitrógeno soluble	0.079
Amoniaco	0.010
Aminoácidos totales	0.331

Fuente: Dull, 1971

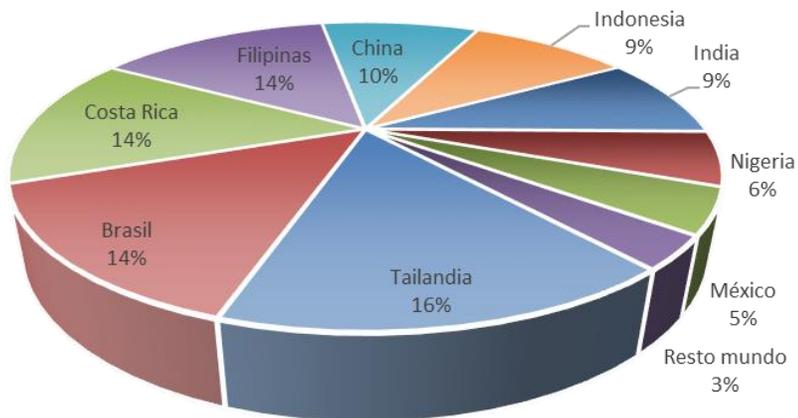
2.8 Panorama económico de la piña

2.8.1 Producción mundial

La producción mundial de piña para el año 2011 fue de aproximadamente 21.5 millones de toneladas. Los principales países productores son Tailandia, Brasil y Costa Rica con el 33% de la producción; México ocupa el noveno lugar con 742,926 toneladas (Figura 3). El rendimiento más alto lo tiene Indonesia con 137.6 t/ha, México tiene un rendimiento de 42.95 t/ha ocupando el octavo lugar (Figura 4) (FAOSTAT, 2013).

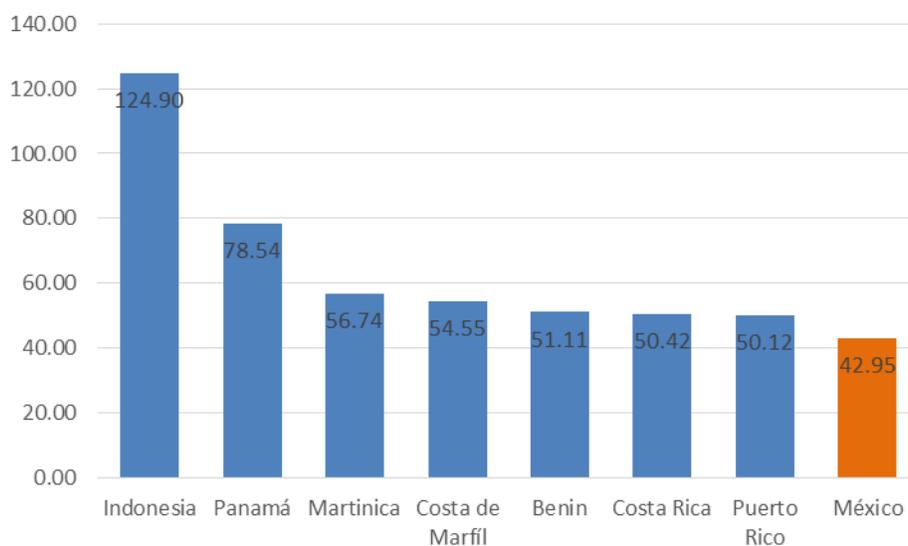
Los países que más importan piña en fresco son Estados Unidos, Bélgica, Países Bajos y Alemania que juntos acaparan el 57 % del total del mercado mundial (Figura 5). El principal exportador de piña en fresco es Costa Rica con aproximadamente el 59% de lo que se comercializa seguido de Bélgica, Países Bajos y Estados Unidos (Figura 6); México ocupa el decimoséptimo lugar (Figura 7) (FAOSTAT, 2013).

País	Toneladas
Tailandia	2,593,210
Brasil	2,318,120
Costa Rica	2,268,960
Filipinas	2,246,810
China	1,551,367
Indonesia	1,540,630
India	1,415,000
Nigeria	920,000
México	742,926
Resto mundo	533,384



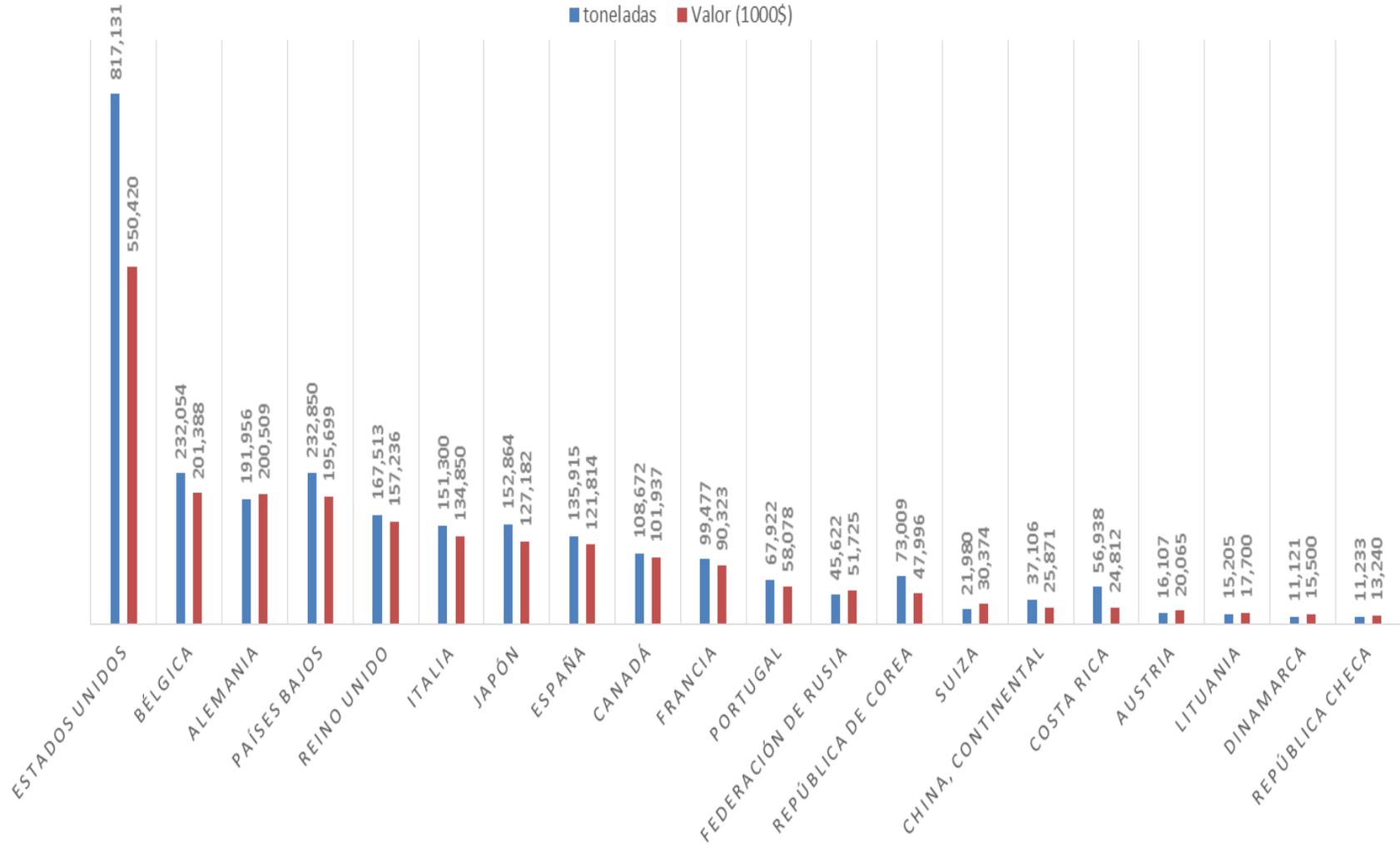
Fuente: FAOSTAT, Julio 2013

Figura 3. Principales países productores de piña, 2011.



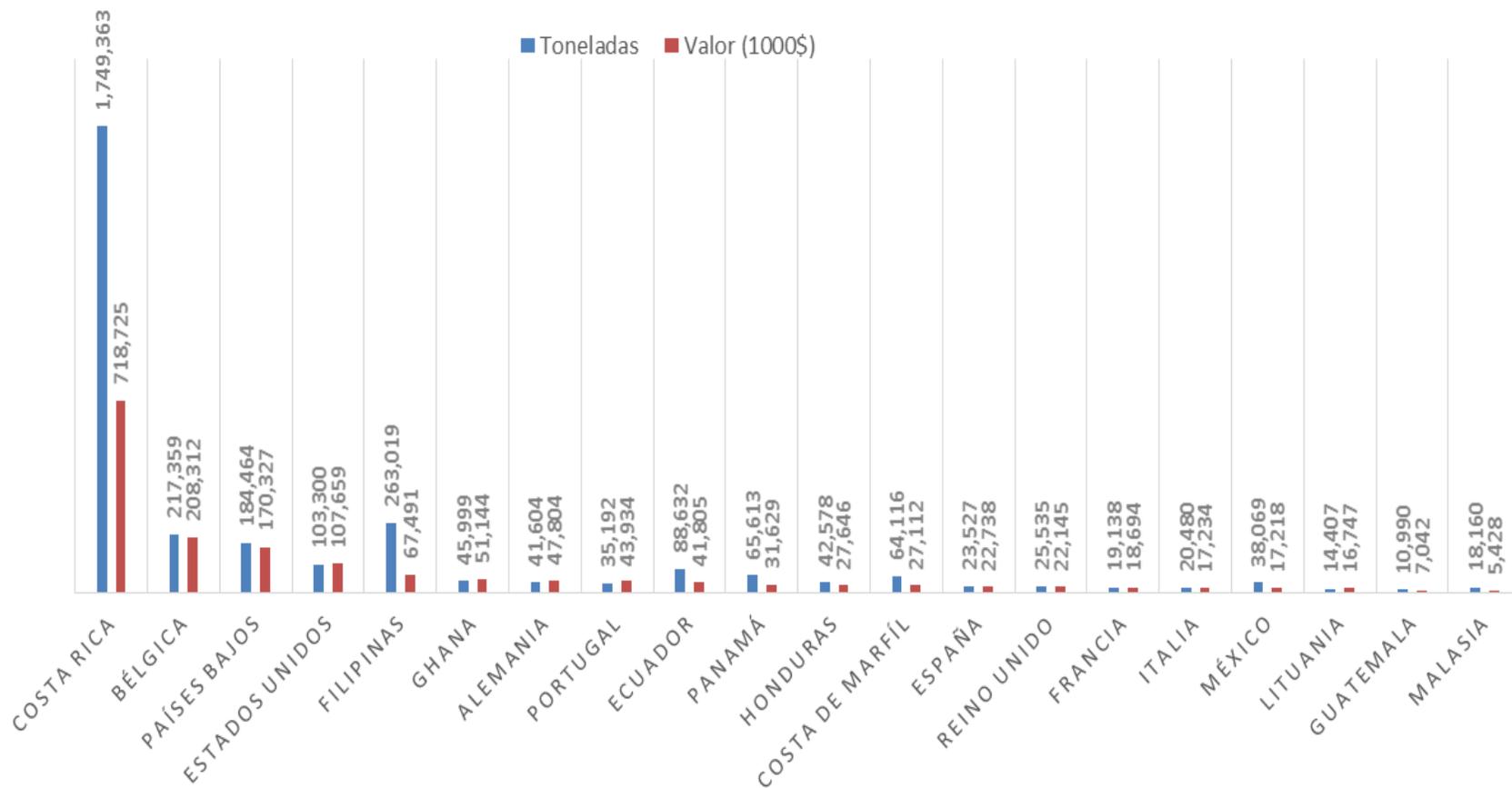
Fuente: FAOSTAT, Julio 2013

Figura 4. Rendimiento de los países productores de piña (toneladas / hectárea), 2011.



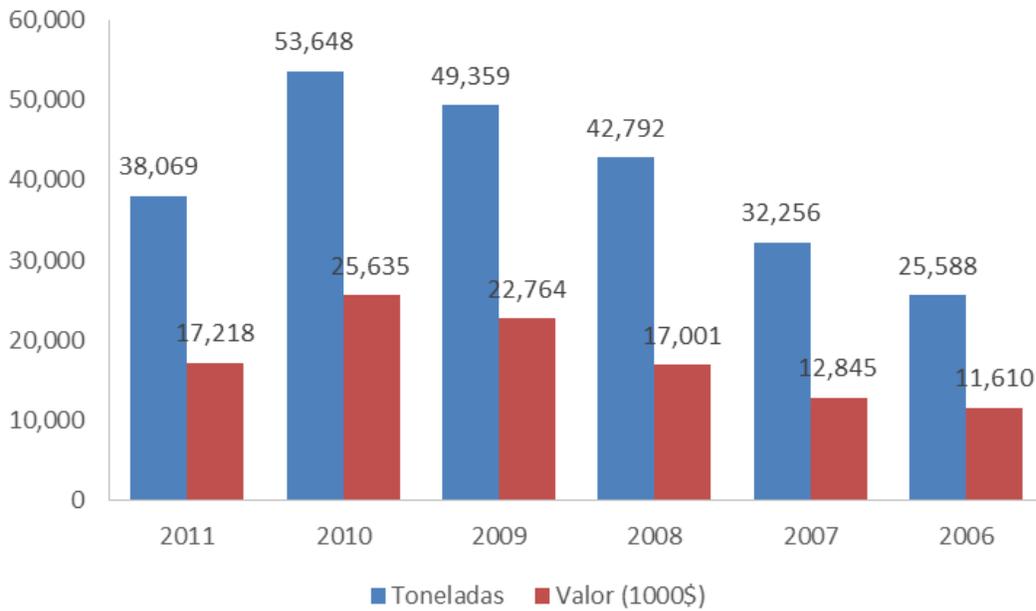
Fuente: FAOSTAT, Julio 2013

Figura 5. Países importadores de piña, 2011.



Fuente: FAOSTAT, Julio 2013

Figura 6. Países exportadores de piña, 2011.



Fuente: FAOSTAT, Julio 2013

Figura 7. Exportaciones de México, 2011

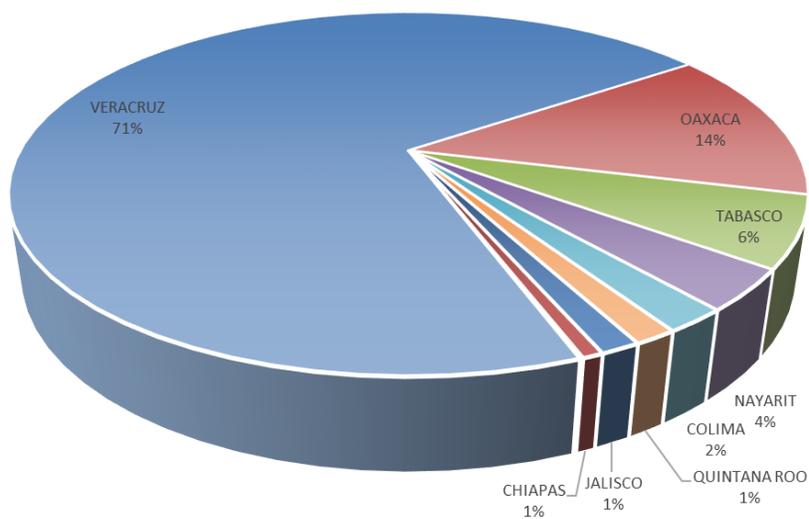
2.8.2 Producción nacional

México produjo 759,976.18 toneladas de piña en fresco en el año 2012 (Cuadro 5). Los principales estados productores de piña fueron Veracruz, Oaxaca y Tabasco, en donde solo el estado de Veracruz aportó el 71% de la producción nacional (Figura 8). La mayor parte de la producción nacional es destinada para el mercado interno, debido a que los frutos no alcanzan los estándares de calidad exigidos por el mercado internacional (SIAP, 2013).

Cuadro 5. Entidades Federativas productoras de piña, 2012.

Ubicación	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	PMR* (\$/Ton)	Valor Producción (Miles de Pesos)
CHIAPAS	346	346	5,332.00	15.41	7,043.04	37,553.50
COLIMA	194	188	16,050.00	85.37	5,921.05	95,032.85
GUERRERO	109	97	762.5	7.86	5,916.65	4,511.45
JALISCO	337	300	10,134.20	33.78	3,538.25	35,857.37
MEXICO	12.5	10.5	31	2.95	5,419.35	168
NAYARIT	1,455.58	1,218.58	27,375.76	22.46	4,191.82	114,754.17
OAXACA	1,828.00	1,816.00	103,115.84	56.78	2,624.98	270,677.13
QUINTANA ROO	294	253	10,920.00	43.16	5,216.26	56,961.55
TABASCO	1,396.00	1,396.00	47,505.50	34.03	2,931.90	139,281.53
VERACRUZ	31,149.00	12,083.00	538,749.38	44.59	2,806.69	1,512,101.28
TOTAL	37,121.08	17,708.08	759,976.18	42.92	2,982.86	2,266,898.83

Fuente: SIAP, Julio 2013



Fuente: SIAP, Julio 2013

Figura 8. Producción de piña por Entidad Federativa, 2012.

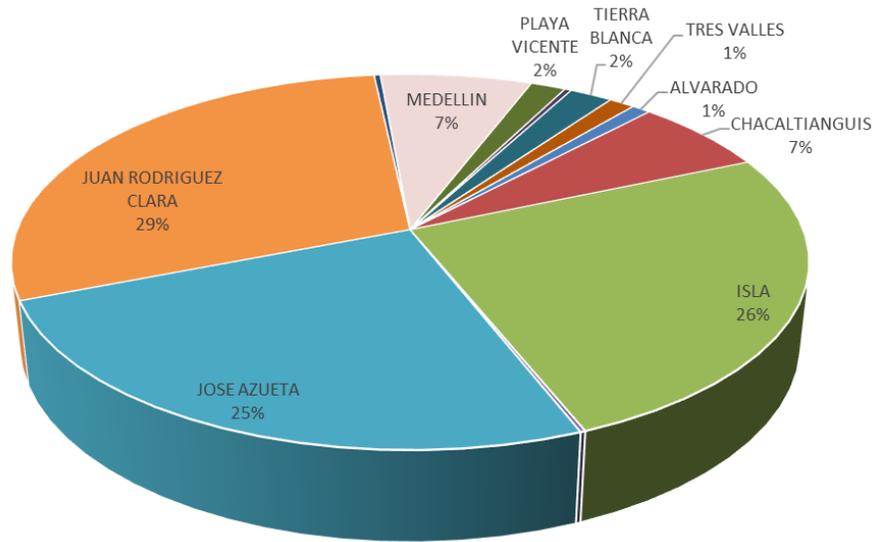
2.8.3 Producción estatal

La producción de piña en el estado de Veracruz se concentra en los municipios de Juan Rodríguez Clara, Isla y José Azueta en la región denominada la cuenca del Papaloapan (Cuadro 6), que también incluye algunos municipios del estado de Oaxaca (INFOASERCA, 2000).

Cuadro 6. Municipios del estado de Veracruz productores de piña, 2012

Municipio	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	PMR (\$/Ton)	Valor Producción (Miles de Pesos)
ALVARADO	114	114	4,845.00	42.5	2,900.00	14,050.50
CHACALTIANGUIS	820	820	35,055.00	42.75	3,026.00	106,076.43
ISLA	9,050.00	2,994.00	136,743.36	45.67	2,726.00	372,762.40
JAMAPA	22	22	935	42.5	3,150.00	2,945.25
JOSE AZUETA	9,010.00	3,006.00	134,459.12	44.73	2,802.00	376,754.45
JUAN RODRIGUEZ CLARA	10,450.00	3,444.00	157,628.40	45.77	2,799.00	441,201.89
MARTINEZ DE LA TORRE	38	38	1,590.00	41.84	5,152.83	8,193.00
MEDELLIN	930	930	39,060.00	42	2,950.00	115,227.00
PLAYA VICENTE	200	200	9,023.50	45.12	2,875.00	25,942.56
TAMPICO ALTO	85	85	1,700.00	20	4,000.00	6,800.00
TIERRA BLANCA	270	270	11,070.00	41	2,307.84	25,547.79
TRES VALLES	160	160	6,640.00	41.5	2,500.00	16,600.00
TOTAL	31,149.00	12,083.00	538,749.38	44.59	2,806.69	1,512,101.28

Fuente: SIAP, Julio 2013



Fuente: SIAP, Julio 2013

Figura 9. Producción de piña por municipio, 2012

El cultivar que tradicionalmente se siembra en Veracruz es ‘Cayena Lisa’, en donde la mayor parte de la producción se destina para consumo nacional (Santoyo y Vinicio, 1992; INFOASERCA, 2000); sin embargo en los últimos años se ha estado cambiando al híbrido MD2 y al cultivar Champaka, los cuales tienen mayor demanda en los mercados internacionales (Rebolledo *et al.*, 2011). Desde un punto de vista social, el cultivo de la piña en las regiones productoras de Veracruz es muy importante ya que genera empleos durante todo el año, además de que ingresan divisas por la exportación de esta fruta (INFOASERCA, 2000; Rebolledo *et al.*, 2011).

III. MATERIALES Y MÉTODO

3.1 Sitio de estudio y muestreo

El área de estudio se localiza en Isla, Veracruz, México a 18° 8' N y 95° 35' O, una altitud de 60 msnm, clima cálido-húmedo con una temperatura promedio de 24.9° C y precipitación pluvial media anual de 2,316 milímetros. De Septiembre de 2011 a Marzo de 2012 se recolectaron 40 plantas con síntomas característicos de pudrición del cogollo. Las muestras colectadas se llevaron al Laboratorio de enfermedades de frutos en postcosecha del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México.

3.2 Aislamiento

Las plantas de piña enfermas se lavaron con agua potable para eliminar exceso de tierra. De las hojas basales, se cortaron trozos de 5 mm² de tejido sano anexo a tejido podrido, que se desinfectó por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio 3% durante 4 min, posteriormente se enjuagaron 4 veces con agua destilada estéril y se secaron con toallas de papel absorbente esterilizadas. Un total de 600 muestras obtenidas se sembraron en 150 cajas de Petri; 4 muestras por cada caja. Previamente se prepararon los medios de cultivo; 50 cajas con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), 50 cajas con medio agar nutritivo y otras 50 cajas con jugo V8 – agar con medio selectivo PARPH (pimaricina 10 µg/L, ampicilina 292 µg/L, rifampicina 10 µg/L, pentacloronitrobenzoceno 0.10 g/L e himexazol 0.25 µg/L), selectivo para *Phytophthora* sp.. Todas las cajas de Petri se incubaron a 28 °C en luz blanca (Jeffers and Martin, 1986; Erwin and Ribeiro, 1996). Las colonias fungosas predominantes se purificaron mediante la técnica de punta de hifa en medio V8 – agar (acidulado con ácido láctico 25%), una vez purificadas se transfirieron a cajas de Petri con medio de cultivo PDA para su caracterización.

Por otra parte, se cortaron 20 hojas basales de las plantas enfermas con pudrición, se lavaron con agua potable para eliminar el exceso de tierra y se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio 3% por 4 min, se enjuagaron 4 veces con agua destilada estéril y se dejaron secar. Cada hoja se introdujo en un frasco esterilizado y se le agregó agua destilada estéril hasta cubrir el material vegetal; se mantuvieron a 28 °C en luz blanca. Después de 2 d se observó crecimiento de micelio de color blanquecino.

Para la identificación del patógeno se utilizó el micelio y las estructuras reproductivas asexuales (esporangios y clamidosporas). Se hicieron preparaciones semi-permanentes y se observaron en un microscopio compuesto (VE-B6, Velab). La identificación del género se realizó con las claves descritas por Erwin and Ribeiro (1996) y para las de especie con las de Gallegly and Hong (2008).

3.3 Preparación del inóculo

El inóculo se preparó a partir del microorganismo que tuvo mayor frecuencia en los aislamientos. Una vez purificado por el método de punta de hifa, se cultivó en cajas de Petri en medio PDA durante 7 d en luz blanca a 28 °C; una vez llenas las cajas Petri con el micelio del oomicete se procedió a cortar el PDA en trozos de 1 cm². Los trozos fueron colocados en recipientes con suficiente agua destilada estéril para cubrir el material, esto para la formación de esporangios y posteriormente la liberación de zoosporas para las pruebas de patogenicidad. Se utilizó la cámara de Neubauer para la cuantificación de zoosporas de la suspensión; se preparó a una concentración de 10⁸ zoosporas ml⁻¹ (Rodríguez *et al.*, 2002).

3.4 Pruebas de Patogenicidad

Se realizaron pruebas de patogenicidad *in vitro* e *in vivo*. Para las pruebas *in vitro* se utilizaron 30 coronas de piña, previamente cicatrizadas expuestas a la luz solar durante 5 d, se desinfectaron con hipoclorito de sodio 3% por 4 min, se enjuagaron 4 veces con agua destilada estéril y se dejaron secar; una vez secas, se les hicieron 4 lesiones con una aguja en el tallo medio de la corona. En 30 recipientes de plástico de 1000 ml previamente desinfectado con alcohol 95%, se agregaron 300 ml de la suspensión de zoosporas, en las coronas de piñas, se cubrieron con una bolsa de plástico con microperforaciones hechas con un alfiler. Como testigos, se utilizaron 30 coronas adicionales, a las cuales se les realizó el mismo procedimiento, y se les adicionó agua destilada estéril como inóculo. Las plantas así tratadas se mantuvieron en luz blanca a 28 °C.

Para las pruebas *in vivo* se utilizaron 40 vástagos (gallos) expuestos a luz solar durante 5 d para cicatrizarlos, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3% por 4 min, se enjuagaron 4 veces con agua destilada estéril, se dejaron secar y se sembraron en bolsas de polietileno en una mezcla de tierra y tezontle (3:2 v/v) previamente esterilizada y se regaron durante 5 meses con agua potable esterilizada. La inoculación de las plantas de piña se hizo removiendo 8 cm de tierra alrededor del cogollo, se les hicieron cuatro lesiones con una aguja esterilizada en el tallo medio y se agregaron 300 ml del inóculo junto con fragmentos de micelio con esporangios y se cubrió de nuevo con la tierra removida. A las plantas así inoculadas se les colocó otra bolsa de polietileno sobre la primera para contener el agua simulando condiciones de inundación como sucede en campo. Los tratamientos testigos consistieron de 40 plantas en las que se realizó la misma técnica, y como inóculo se utilizó agua destilada estéril. Las plantas inoculadas se

mantuvieron en invernadero a una temperatura de 30 ± 2 °C con una humedad relativa del 70% y riego a saturación.

Los primeros signos y síntomas *in vitro* se presentaron 7 a 9 ddi, para las pruebas *in vivo* tardaron de 16 a 20 ddi. El oomicete se reaisló de los tejidos enfermos y las colonias así como las estructuras reproductivas se compararon morfológicamente con los aislamientos iniciales que se obtuvieron de plantas enfermas.

3.5 Caracterización morfológica

Se registró el tipo de crecimiento micelial, pigmentación y formación de estructuras de reproducción de la colonia creciendo en PDA y bajo luz blanca continua a 28 °C. La identificación del género se hizo con las claves de Erwin and Ribeiro (1996), y para especie con las descritas por Gallegly and Hong (2008).

3.6 Identificación Molecular

La extracción, amplificación y secuenciación del ADN se realizó por personal capacitado en el Laboratorio de Biotecnología de Semillas del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. La extracción del ADN se hizo a partir de un cultivo de 6 d de crecimiento en medio líquido V8 a 28 °C, utilizando el protocolo de CTAB (Doyle and Doyle, 1990). El espacio transcrito interno del ADN ribosomal se amplificó utilizando los iniciadores ITS6 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del Banco de Genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2012), USA (www.ncbi.nlm.nih.gov).

IV. RESULTADOS

4.1 Aislamiento de microorganismos

De las muestras de tejido obtenidos de las plantas con síntomas y signos de pudrición del cogollo que se recolectaron en campo, se aislaron en los distintos medios de cultivo hongos, bacterias y oomicetes. En el medio de cultivo V8 – agar con medio selectivo PARPH, se aisló con mayor frecuencia a *Phytophthora* sp., creciendo en 90% de los fragmentos de tejido que se sembraron. En el resto no hubo crecimiento de ningún microorganismo. En el medio agar nutritivo se aisló a *Phytophthora* sp. en 48 de los fragmentos que se sembraron, de 22 trozos se aisló a *Pythium* sp.. En medio PDA, en solamente 5.5% se aisló a *Phytophthora* sp. y en un 22.5% se aisló a *Pythium* sp., en el resto crecieron hongos y bacterias que por las características morfológicas de las colonias se clasificaron como saprófitos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Microorganismos aislados de plantas de piña (*Ananas comosus*. L. Merrill) cultivar MD-2 con signos y síntomas de pudrición del cogollo. Isla, Veracruz, México.

Microorganismo	Frecuencia de aislamientos		
	V8 + PARPH	Agar Nutritivo	PDA
<i>Phytophthora</i> spp.	180/200 (90%)	48/200 (24%)	11/200 (5.5%)
<i>Pythium</i> spp.	0/200 (0%)	22/200 (11%)	45/200 (22.5%)
bacterias y hongos saprofitos	0/200 (0%)	10/200 (5%)	22/200 (11%)

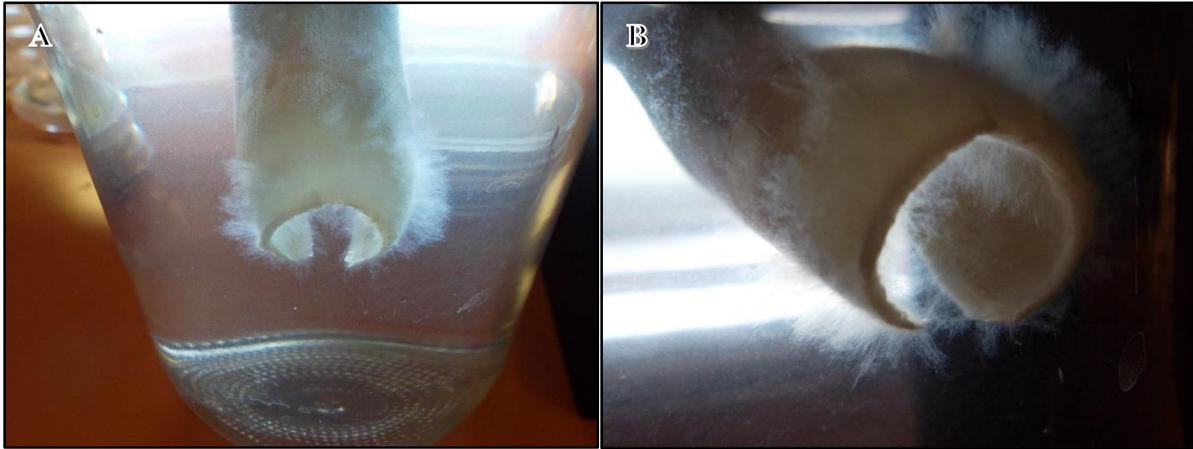


Figura 10. A) y B) Micelio de *Phytophthora* sp.

De las 20 hojas colocadas en frascos con agua destilada estéril, a los 2 días se observó el crecimiento de micelio de color blanquecino en las 20 muestras; de cada muestra se transfirió un fragmento del micelio en 10 cajas con PDA y otras 10 cajas con medio V8 – Agar (ambos medios acidulados con ácido láctico 25%); en todas las muestras se identificó a *Phytophthora* sp. (Figura 10).

4.2 Pruebas de Patogenicidad

En las pruebas *in vitro*, los primeros síntomas y signos de la enfermedad se presentaron a los 7 - 9 ddi. Las hojas mostraron un color verde pálido, la punta de las hojas se necrosaron, la base de las hojas centrales se encontraban podridas y en el centro de la roseta había una coloración café tenue y signos del oomicete (Figura 11), con un olor fétido característico; el 100% de las coronas inoculadas se enfermaron. Los testigos no presentaron síntomas ni signos y desarrollaron un sistema radical abundante. A partir del tejido necrosado, se realizaron nuevamente aislamientos en medio V8 – Agar (acidulado con ácido láctico 25%) de donde se aisló a *Phytophthora nicotianae*.

Para las pruebas *in vivo* los síntomas y signos tardaron 16 días en manifestarse, iniciando con un cambio en la coloración de las hojas a verde más claro, las puntas de estas se necrosaron y aparecieron signos del oomicete alrededor del cogollo. A los 20 días la pudrición del cogollo era evidente, el centro de la roseta mostró una coloración café y micelio, la base de las hojas centrales se encontraban podridas y el olor putrefacto era penetrante; 38 (95%) de las 40 plantas inoculadas mostraron síntomas de la enfermedad. Los testigos no presentaron síntomas ni signos de la enfermedad. De las hojas necrosadas se hicieron aislamientos en medio V8 – Agar (acidulado con ácido láctico 25%), donde se corroboró la presencia de *Phytophthora nicotianae*.

4.3 Caracterización morfológica

De los aislamientos obtenidos y purificados en medio V8 – Agar (acidulado con ácido láctico 25%), se transfirieron a medio PDA para su caracterización. El oomicete presentó un crecimiento micelial hialino, esporangios no caducos, esféricos a limoniforme con una papila prominente, el tamaño promedio de 100 esporangios fue de $44.6 \times 36.8 \mu\text{m}$; se presentaron clamidosporas esféricas, no papiladas, hialinas terminales e intercalares de $30.2 \mu\text{m}$ (promedio de 100 clamidosporas) (Figura 12). La formación de esponrangios en agua destilada estéril se presentó a las 48 hs. en exposición continua bajo luz blanca. El oomicete mostró las mismas características reportadas por Erwin and Ribeiro (1996) y Gallegly and Hong (2008) para *Phytophthora nicotianae*.



Figura 11. Síntomas y signos de la pudrición del cogollo de la piña. A) Pruebas *in vitro* de la pudrición del cogollo de la piña. B) Signos y síntomas en coronas inoculadas. C) Pudrición

del cogollo. D) Hoja de corona con pudrición. E) Corona de piña 9 ddi. F) Signos del oomiceto en plantas inoculadas. G) Signos y síntomas en plantas inoculadas en invernadero. H) Cogollo podrido de la planta de piña. I) Cogollo y raíz de planta testigo de prueba *in vivo*. J) Cogollo y raíz de planta inoculada. K) Planta de piña 16 ddi.

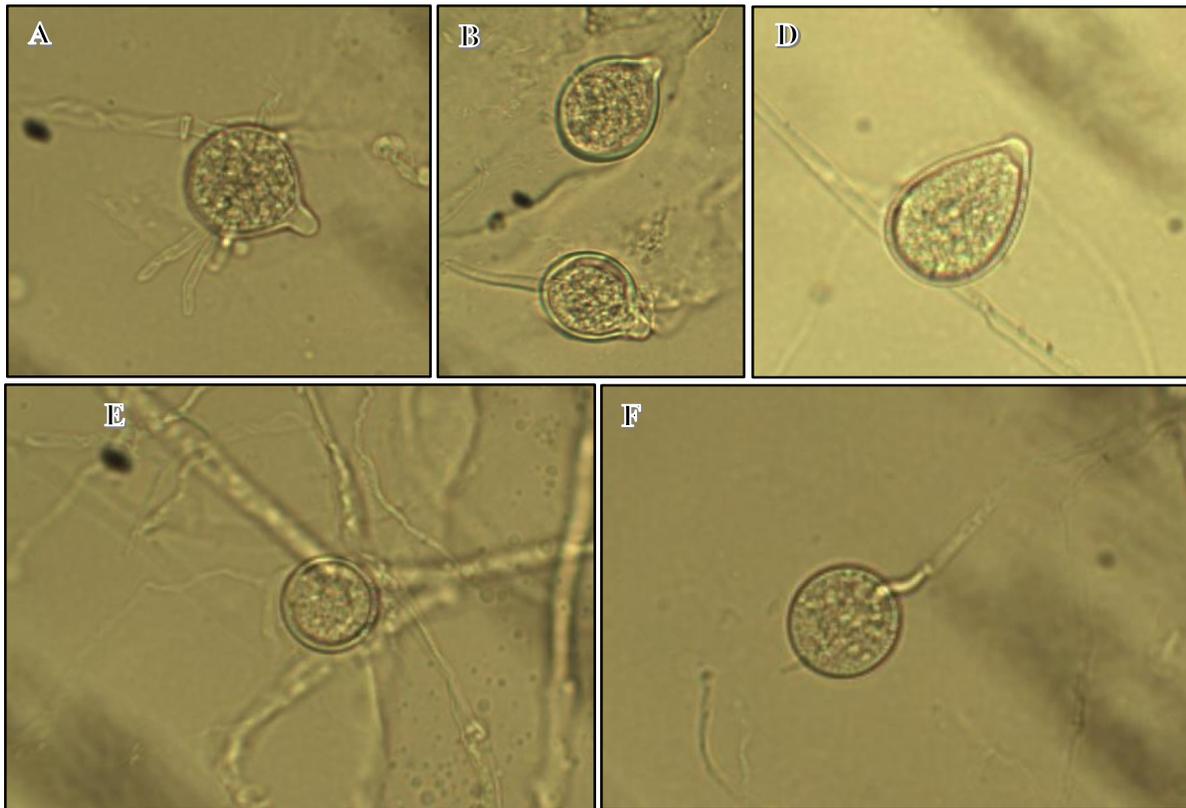


Figura 12. Estructuras asexuales de *Phytophthora nicotianae*. A) Esporangio esférico. B) Esporangio limoniforme. C) Esporangio ovoide. D) Clamidospora intercalar. E) Clamidospora terminal.

4.4 Identificación molecular

El producto de amplificación que se obtuvo con los iniciadores ITS4 e ITS6 fue de 850 bp (Figura 13); la comparación de la secuencia de nucleótidos del aislamiento mostró 100% de similitud con la secuencia de *Phytophthora nicotianae* reportada por el Banco de Genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2012). La secuencia obtenida se registró en el Banco de Genes con la accesión JN699566.

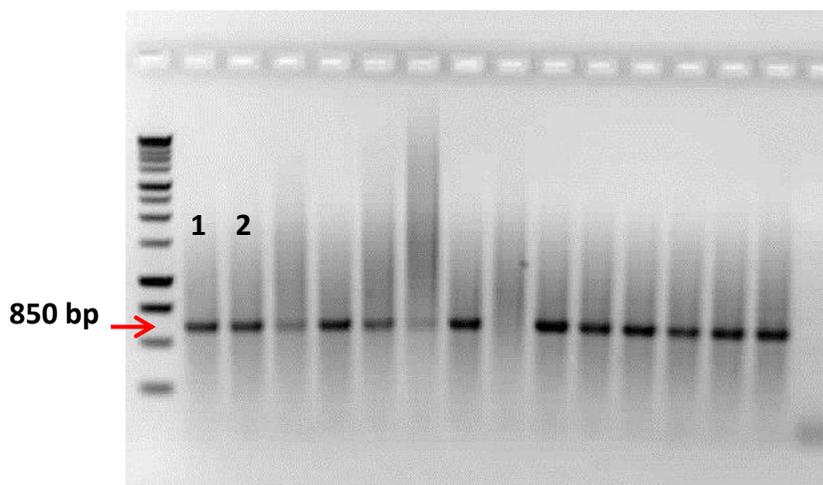


Figura 13. Amplificación del espacio transcrito interno del ADN ribosomal utilizando los iniciadores ITS6/ITS4.

V. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos demuestran que la pudrición del cogollo de la planta de piña es causado por *Phytophthora nicotianae* para el área de estudio como lo describen Espinosa and Adam (1972) y Joy and Sindhu (2012) para México y la India respectivamente aun cuando otros autores reportan síntomas de plantas enfermas causados por *Erwinia* sp. (Kaneshiro *et al.*, 2008; Peckham *et al.*, 2010; Rebolledo *et al.*, 2011). Los síntomas descritos por Espinosa and Adam (1972), así como los descritos por Joy and Sindhu (2012), coinciden con los observados en los

campos de cultivo de Isla, Veracruz, que se inician con lesiones acuosas en la base de las hojas (tejido sin clorofila) y el cogollo, las hojas se tornan a un verde más claro, las puntas de estas se necrosan y desarrollan un olor fétido característico.

Es más complejo aislar *Phytophthora* spp. de tejido sintomático que otros patógenos ya que los síntomas en las hojas y el olor putrefacto son evidentes una vez que la enfermedad está muy avanzada en el cogollo; en tales condiciones, tanto la parte radical como el cogollo es invadido por patógenos secundarios o facultativos como hongos y bacterias que encubren el crecimiento de *Phytophthora* spp. (Mircetich and Browne, 1987).

Conforme a las claves taxonómicas de Erwin and Ribeiro (1996), se aisló a *Phytophthora nicotianae* en el 90% de fragmentos de tejido que se sembraron en V8 – agar adicionado con PARPH y en 24% en agar nutritivo; en ninguno de los medios utilizados se aisló a *Erwinia* sp.. Respecto a la identificación morfológica de especie utilizando las claves de Gallegly and Hong (2008) aunado al análisis molecular, mostraron que la especie corresponde *Phytophthora nicotianae*. Debido a que *Phytophthora nicotianae* es heterotálico, se necesitan de los dos talos con compatibilidad sexual para formar las oósporas. Los resultados de las pruebas de patogenicidad, indicaron que *Phytophthora nicotianae* es el agente primario de la pudrición del cogollo de la piña.

El cambio en la coloración a un verde tenue, así como la necrosis en las puntas de las hojas se observó tanto en las plantas infectadas en campo, como en las inoculadas artificialmente. Estos síntomas probablemente se deban a la obstrucción física del sistema vascular causado por el crecimiento de hifas y a la penetración de otros organismos secundarios (hongos y bacterias), aumentando la formación de gomas que se originan por la oxidación y acumulación de los

residuos de la degradación celular, como sucede en plantas ornamentales (Arévalo-Galarza, 2012; Agrios, 2005). Posterior a la inoculación y a la formación de zoosporas, éstas son atraídas a la zona de elongación y diferenciación de la raíz, en donde forman quistes, e inclusive invaden a las raíces secundarias y no a las puntas (Galiana *et al.*, 2005; Attard *et al.*, 2010).

La severidad del marchitamiento de las plantas varía entre localidades; sin embargo, se considera proporcional al grado y velocidad de la infección de la raíces (Zitter *et al.*, 2004).

La mayor incidencia de pudrición del cogollo de la piña en el área de muestreo se observó en la temporada de lluvia, con temperaturas que oscilan entre 24 - 26 °C y una humedad relativa del 90 - 100%; la alta humedad relativa induce el desarrollo de las enfermedades causadas por *Phytophthora* sp. en el cultivo de piña (Duniway, 1983).

Diversas condiciones del cultivo, como producir en áreas con pendiente, labores culturales (fertilización, control de malezas, remoción del suelo, etc.) y lesiones causadas por otros organismos (nematodos y roedores) al sistema radical, facilitan la dispersión y el riesgo de infección por *Phytophthora* sp. (Erwin y Ribeiro, 1996; Elliott, 1989; Jung y Blaschke, 2004; Galiana *et al.*, 2005).

VI. CONCLUSIÓN

Las pruebas de patogenicidad, así como la identificación morfológica y caracterización molecular, confirmaron que *Phytophthora nicotianae* es el agente causal de la pudrición del cogollo de la piña en la localidad de Isla, Veracruz, México.

VII. LITERATURA CITADA

Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Elsevier Academic Press. New York. 922 p.

Ananas comosus. Royal Botanic Gardens, Kew. Consultado 21 abril 2012.
http://apps.kew.org/wcsp/namedetail.do?name_id=219647

Ananas. The Plant list. Consultado 21 abril 2012.
<http://www.theplantlist.org/browse/A/Bromeliaceae/Ananas/>

Angiosperm Phylogeny Website. Consultado 20 abril 2012.
<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/welcome.html>

Arévalo-Galarza, L., García-Osorio, C. y Rosas-Saíto, G.H. 2012. Factores que afectan la vida de florero en flores de corte. *Agroproductividad* 5 (3):28-35.

Attard, A., Gourgues, M., Callemeyn-Torre N., and Keller, H.. 2010. The immediate activation of defense responses in *Arabidopsis* roots is not sufficient to prevent *Phytophthora parasitica* infection. *New Phytologist* 187 (2): 449–460

Baraona, M. y Sancho E. 1991. Fruticultura especial. Fascículo III. Piña y papaya. Editorial Universidad Estatal a distancia. San José, Costa Rica. pp. 17-21

Bromeliad Society International. Consultado 21 abril 2012.
http://www.bsi.org/brom_info/taxonomy.html

Chan, Y. K., Coppens, d'Eeckenbrugge G, Sanewski, G. M. 2002. Breeding and variety improvement. P. 33-35 In: Bartholomew, D.P., Paull, R.E., Rohrbach. K.G. (eds.) *The pineapple, botany, production and uses*. CABI Publishing, New York.

Collins, J. L.. 1960. The pineapple. Leonard Hill. London. 294 p.

Coppens, G., Leal, F., Duval, M. F.. Germplasm resources of pineapple. 1997. Hort. Rev., 21:133-175.

COVECA. 2002. Comisión veracruzana de Comercialización Agropecuaria. Gobierno del Estado de Veracruz, México. Consultado Enero 2012. <http://www.coveca.gob.mx/>

De La Cruz Medina J. and García H.S. 2005. PINEAPPLE: Post-harvest Operations. FAO. Consultado Septiembre 2013.

http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compendium_-_Pineapple.pdf

Doyle, J. J. and Doyle J. L. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. Focus 12:13-15.

Dull, G. G. 1971. The pineapple: general. In: A. C. Hulme (ed.). The biochemistry of fruits and their products, Academic Press, New York. vol. 2: p. 303-324.

Duniway, J. M. 1983. Role of physical factors in the development of *Phytophthora* diseases. p. 175-187 In: *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, and P. H. Tsao (eds.) American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

Elliott, C. G. 1989. Some aspects or nitrogen nutrition and reproduction in *Phytophthora*. Mycol. Res. 92 (1): 34-44

Erwin, D and Ribeiro, O. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathol. Soc., MN., p. 9-14

Espinosa, R. G. and Adam, A. V. 1972. Major diseases of pineapple in Oaxaca, México, and their control. FAO Plant Protect. Bull. 20 (4): 79-87

Études sur Ananas. 1977. Fruits 32, 447-522

FAOSTAT, 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Consultado Julio 2013. <http://faostat.fao.org>

FAOSTAT, 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Consultado Enero 2013. <http://faostat.fao.org>

Figuerola, R. 1970. El cultivo de la piña en el Perú. Volumen 75. Estación Experimental Agrícola de la Molina. Boletín Técnico Ministerio de Agricultura, Boletín técnico 75. 32 p.

Fold N. and Gough K. V. 2008. From smallholders to transnationals: The impact of changing consumer preferences in the EU on Ghana's pineapple sector. Geoforum. 39 (5): 1687–1697

Galiana, E., Rivière, M.-P., Pagnotta, S., Baudouin, E., Panabières, F., Gounon, P., and Boudier, L. 2005. Plant-induced cell death in the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. Cellular Microbiol. 7 (9), 1365–1378

Gallegly, E. M. and Hong, C. 2008. Identifying species by morphology and DNA fingerprints. The American Phytopathol. Soc. St. Paul MN. U.S.A. 108 p.

Hassan, A., Othman, Z., and Siriphanich, J. 2011. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) p. 194-212 In: Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits. Vol. 4 Mangosteen to white sopote. Elhadi M. Yahia (ed.) Woodhead Publishing. UK.

Haston, E., J. E. Richardson, P. F. Stevens, M. W. Chase, D. J. Harris. 2009. The linear angiosperm phylogeny group (LAPG) III: a linear sequence of the families in APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, 128–131. Consultado 20 abril 2012. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1095-8339.2009.01000.x/pdf>

INFOASERCA. 2000. Información Económica y Comercial para el Sector Agropecuario. La producción de piña en México, historia de un patrimonio regional. Consultado 15 mayo 2013. <http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/revistas/086/ca086.pdf>

Jeffers, S. N. and Martin, S. B. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Dis.* 70:1038-1043.

Joy P. P. and Sindhu G. 2012. Diseases of pineapple (*Ananas comosus*): Pathogen, symptoms, infection, spread & management. Consultado Agosto 2013. <http://www.kau.edu/prsvkm/Docs/DiseasesofPineapple.pdf>

Jung, T. and Blaschke, M. 2004. *Phytophthora* root and collar of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. *Plan Pathol.* 53: 193-208

Kaneshiro, W. S., Burger, M., Vine, B., de Silva, A. S. and Alvarez, M. 2008. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* from a bacterial heart rot of pineapple outbreak in Hawaii. 2008. *Plant Dis.*, 92 (10): 1444-1450.

Louvel, D. 1975. 'Étude des relations entre l'ananas et le *Phytophthora parasitica*', *Fruits* 30, 669-80.

Mircetich S. M., and Browne G. T. 1987. *Phytophthora* root and crown rot of deciduous fruit trees: Progress and problems in etiology, epidemiology and control. Commemorative Symp. 111 p.

Morgan, T., and Thompson, T. 2000. Del Monte mixes and matches Costa Rican products. *Americafruit* 3: 45-47

NCBI. 2012. National Center for Biotechnology Information. Gen Bank. Consultado Julio 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Ochse, J. J., Soule, M. J., JR., Dijkman, M. J. y Wehlburg, C.. 1965. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. Editorial Limusa – Willey S. A., México, D. F. pp. 639-643

Peckham G. D., Kaneshiro, W. S., Luu V., Berestecky, J. M., and Alvarez A. M.. 2010. Specificity of monoclonal antibodies to strains of *Dickeya* sp. that cause bacterial heart rot of pineapple. *Hybridoma* 29(5): 383-389.

Py, C. & Institut de recherches sur les fruits et agrumes. 1977. Etudes sur ananas. L'Institut de Recherches sur les Fruits et Agrumes (IRFA). Paris, France. 71 p.

Py, C. and Tisseau, M.. 1969. La piña tropical. Ed. Blumé. Barcelona, España. 278 p

Rebolledo, M. A., A. D. E. Uriza, A. del A. Pérez, L. M. Rebolledo, L. R. Zetina. 2011. La piña y su cultivo en México: Cayena Lisa y MD2. Campo Experimental Cotaxtla, Veracruz, México. Libro Técnico No. 27 306 p.

Rebolledo, M. A., Del Ángel P. A. L., Rebolledo, M. L. y Becerril, R. A. E., Uriza, A. D. 2006. Rendimiento y calidad de fruto de cultivares de piña en densidades de plantación. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 29 (1): 55-62

Rebolledo, M. L., Uriza, A. D. E., Rodríguez, J. G. y Rebolledo, M. A. 1998. Tecnología para la producción de piña en México. Libro técnico No. 20. SAGARPA. INIFAP. CIRGOC. Campo Experimental. Papaloapan. Veracruz, México 159 p.

Rodríguez, Y., Mosqueda, M., Companioni, B., Arzola, M., Borrás, O., Pérez, M. C., Lorenzo, J. C., and Santos, R. 2002. Bioassay for *in vitro* differentiation of pineapple cultivar resistance levels to heart rot disease. *In vitro Cell. Dev. Boil.-Plant* 38:613-616.

Samson, J. A.. 1986. Tropical fruits. 2nd ed.. Longman Group. UK. 336 p.

Santoyo C. y Vinicio H. 1992. Cofrinsa y las organizaciones de productores piñeros en la cuenca del Bajo Papaloapan: lineamientos para su transferencia. Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial de la Universidad Autónoma de Chapingo, México, 1992

SIAP, 2013. Servicio de Información Agroalimentario y Pesquero. Consultado Enero 2013. <http://www.siap.gob.mx>

Uriza A. D. Programa Estratégico para el Desarrollo Rural Sustentable de la Región Sur- Sureste de México: Trópico Húmedo 2011. Paquete Tecnológico Piña MD2 (*Ananas comosus* var. *comosus*). Centro de Investigación Regional Golfo Centro. Campo Experimental Cotaxtla / Papaloapan. Isla, Veracruz. Consultado Enero 2012. www.inifap.gob.mx

White, T. J., Lee, B. S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p. 315 – 322. In: Innis, M. A., Gelfand, D. A., Sninsky, J. J., White, T. J. (eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, CA, U.S.A.

Williams, D. D. F., and Fleisch H. 1992. Historical review of pineapple breeding in Hawaii. *Acta Horticulturae*. 334: 67-76

Zitter, A. T., Hopkins, L. D., and Thomas, E. C. 2004. *Compendium of cucurbit diseases*. American Phytopathol. Soc. St. Paul, MN. U. S. A. 88 p.

ANEXOS



Figura 1. A) y B) Inoculación de las plantas de piña.



Figura 2. A) y B) Cogollo de piña enfermo.



Figura 3. A) y B) Síntomas y signos en el tallo.

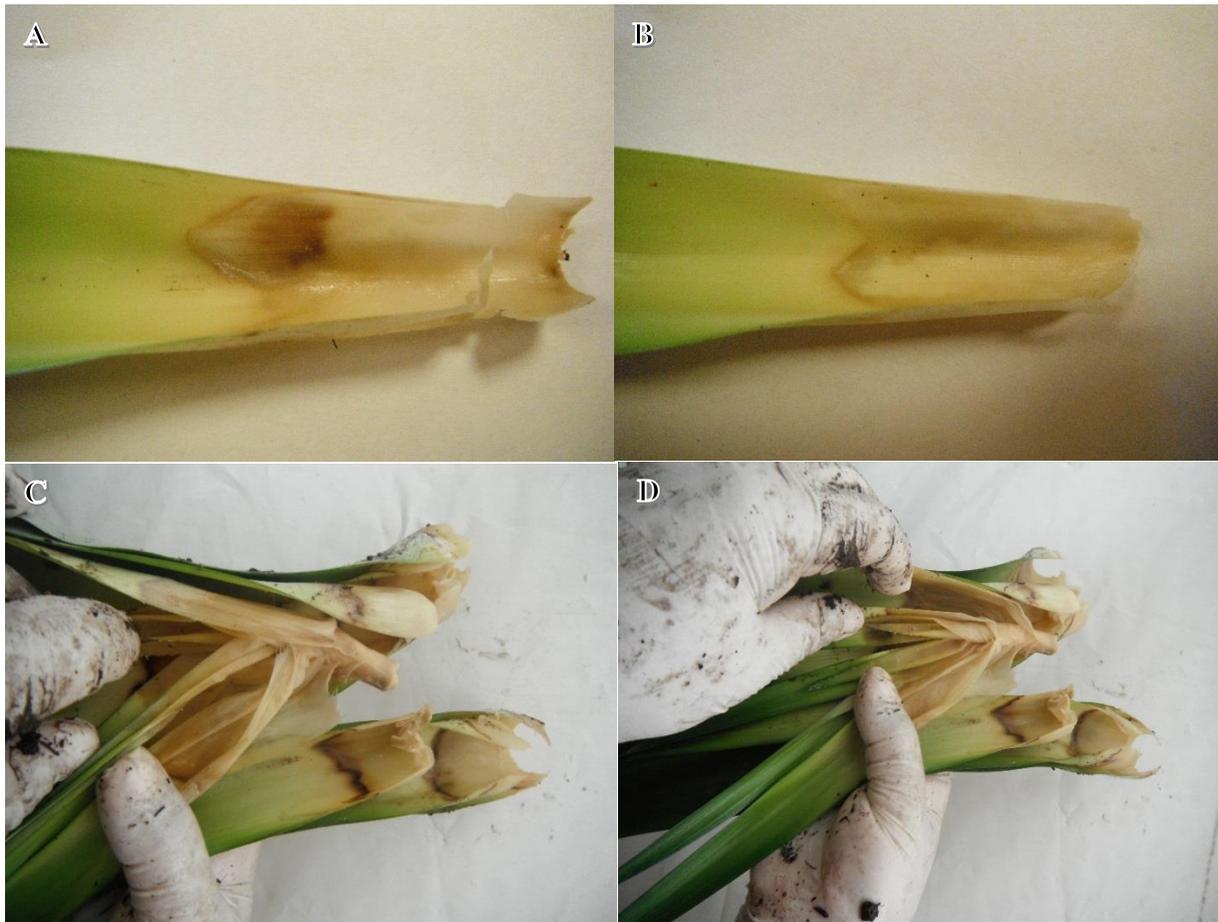


Figura 4. A), B), C) y D) Hojas son síntomas de pudrición.