



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO  
POSTGRADO EN FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA**

**ETIOLOGÍA, HISTOPATOLOGÍA Y CONTROL  
DE LA MUERTE DESCENDENTE DE INJERTOS  
DE ZAPOTE MAMEY (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E.  
Moore & Stearn) EN GUERRERO, MÉXICO**

**JUAN MANUEL TOVAR PEDRAZA**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

**2010**

La presente tesis, titulada: **Etiología, histopatología y control de la muerte descendente de injertos de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn) en Guerrero, México**, realizada por el alumno: **JUAN MANUEL TOVAR PEDRAZA**, 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**

**FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

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

**DR. JOSÉ ANTONIO MORA AGUILERA**

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

**DR. ÁNGEL VILLEGAS MONTER**

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

**DR. JAVIER HERNÁNDEZ MORALES**

**Montecillo, Texcoco, Estado de México, Abril 2010.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento de mis estudios de Maestría.

A la Fundación Produce de Guerrero (Proyecto PM 1731), por el financiamiento de esta investigación.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT), por el financiamiento parcial de este proyecto de investigación.

Al Dr. José Antonio Mora Aguilera por su amistad, apoyo e invaluable dirección en la planeación, ejecución y culminación de esta investigación.

Al Dr. Cristian Nava Díaz por su apoyo, orientación e innumerables muestras de sencillez y amistad.

Al Dr. Daniel Téliz Ortiz, Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce, Dr. Ángel Villegas Monter y Dr. Javier Hernández Morales, con todo mi respeto y agradecimiento por sus acertadas aportaciones y sugerencias que enriquecieron este trabajo de investigación.

Al Ing. Wenceslao Maldonado Avilés por el apoyo brindado en la fase de campo; a Greta Hanako Rosas Saito por su asistencia técnica con el MEB y a Elvia Rosas por la ayuda y facilidades brindadas en laboratorio.

A mis compañeros: José G. Florencio, Juan Pereyda, Misael Martínez, Luciano Martínez, Elvis García, Andrés Quezada, Lauro Soto R., Leticia Robles, Moisés Vallejo y Alfonso Vásquez, que de alguna manera participaron en la realización de esta tesis.

A mis compañeros y amigos del Postgrado en Fitopatología que hicieron de mi estancia en el Colegio de Postgraduados una agradable experiencia.

## **DEDICATORIA**

**A mi madre: Leonarda Pedraza Portuguez**

**y**

**A mi hermana: Denise Lara Pedraza**

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS.....</b>	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>ii</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vi</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>1</b>
Objetivos.....	<b>13</b>
Referencias.....	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO I. IDENTIFICACIÓN, PATOGENICIDAD E HISTOPATOLOGÍA DE <i>Lasiodiplodia theobromae</i> EN INJERTOS DE ZAPOTE MAMEY EN GUERRERO MÉXICO</b>	
Resumen.....	<b>22</b>
Abstract.....	<b>23</b>
Introducción.....	<b>24</b>
Materiales y Métodos.....	<b>26</b>
Resultados y Discusión.....	<b>33</b>
Referencias.....	<b>46</b>
<b>CAPÍTULO II. CONTROL DE <i>Lasiodiplodia theobromae</i>, AGENTE CAUSAL DE LA MUERTE DESCENDENTE DE INJERTOS DE ZAPOTE MAMEY EN GUERRERO, MÉXICO</b>	
Resumen.....	<b>51</b>
Abstract.....	<b>52</b>
Introducción.....	<b>53</b>
Materiales y Métodos.....	<b>55</b>
Resultados y Discusión.....	<b>61</b>
Referencias.....	<b>70</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>76</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>CAPITULO 1</b>	
<b>Cuadro 1.</b> Volumen de pudrición de pulpa de frutos de zapote mamey ( <i>Pouteria sapota</i> ) inducido por 10 aislamientos de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> a 10 días de inoculados por heridas en condiciones de laboratorio. 2008.....	<b>35</b>
<b>CAPITULO 2</b>	
<b>Cuadro 1.</b> Fungicidas probados para inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento micelial de <i>L. theobromae</i> aislado de varetas injertadas de zapote mamey ( <i>P. sapota</i> ) con muerte descendente en Alpoyecá, Gro, México. 2009.....	<b>59</b>
<b>Cuadro 2.</b> Incidencia promedio de muerte descendente de varetas de zapote mamey ( <i>P. sapota</i> ) con infección natural por <i>L. theobromae</i> y tratadas profilácticamente con fungicida durante los periodos de injertación de primavera y otoño en condiciones de vivero en Alpoyecá, Gro. México. 2008.....	<b>61</b>
<b>Cuadro 3.</b> Incidencia de muerte descendente de varetas injertadas de zapote mamey ( <i>P. sapota</i> ) con infección natural por <i>L. theobromae</i> y tratadas profilácticamente con lavado durante los periodos de injertación de primavera y otoño en Alpoyecá, Gro, México. 2008.....	<b>62</b>
<b>Cuadro 4.</b> Significancia de las fuentes de variación para efectos de periodo de injertación y tratamientos físico y químico sobre la incidencia de muerte descendente de varetas injertadas de zapote mamey ( <i>P. sapota</i> ) causada por <i>L. theobromae</i> en Alpoyecá, Gro, México. 2008.....	<b>64</b>
<b>Cuadro 5.</b> Incidencia de muerte descendente de varetas injertadas de zapote mamey ( <i>P. sapota</i> ) con infección natural por <i>L. theobromae</i> y con tratamientos profilácticos físico (lavado) y químico (fungicidas) durante los periodos de injertación de primavera y otoño en Alpoyecá, Gro, México. 2008.....	<b>65</b>
<b>Cuadro 6.</b> Valores de EC <sub>50</sub> y EC <sub>90</sub> calculados para la inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento micelial de <i>L. theobromae</i> en medio PDA mediante fungicidas de diferentes grupos químicos. 2009.....	<b>67</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	
<b>Figura 1.</b> Varetas de zapote mamey ( <i>Pouteria sapota</i> ) aptas para injertar. (A) Vareta con defoliación natural y (B) manual. Alpayeca, Gro. (GIIM, 2006).....	7
<b>Figura 2.</b> Principales tipos de injertos en zapote mamey ( <i>Pouteria sapota</i> ). (A) Enchapado lateral. (B) Hendidura o incrustación. Alpayeca, Gro. (GIIM, 2006).....	9
<b>CAPITULO 1</b>	
<b>Figura 1.</b> Síntomas y signos de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> en plantas injertadas y frutos de zapote mamey ( <i>Pouteria sapota</i> ). A) Muerte descendente de vareta infectada naturalmente. B) Necrosis del tejido vascular en vareta infectada naturalmente. C) Corte transversal de una vareta infectada mostrando tejido muerto con apariencia corchosa y grisácea. D) Picnidios desarrollados en cicatrices foliares. E) Crecimiento micelial en la unión del injerto. F) Fruto a 10 días de inoculado y mostrando abundante crecimiento micelial sobre la superficie. G-H) Picnidios semi-inmersos con cuello ostiolar erumpiendo en peridermis y con extrusión de conidios. I) Corte longitudinal de picnidio. J) Amerosporas (conidios inmaduros). K) Didimosporas (Conidios maduros). Barras I=50 µm, J-K=10 µm.....	39
<b>Figura 2.</b> Estructuras fructíferas de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> en varetas de zapote mamey ( <i>Pouteria sapota</i> ) con infección artificial vistas en MEB. A) Corte longitudinal de picnidio (Pic) mostrando conidios maduros. B) Picnidios sub-inmersos presentando ostiolo con extrusión de conidios. C) Conidios (Co) agrupados en masas. D) Conidios maduros con estriaciones longitudinales irregulares. E) Corte longitudinal de conidio maduro exhibiendo septo interno (Sep) y contenido granular. F) Conidio maduro mostrando tubo germinativo (Tg).....	40
<b>Figura 3.</b> Fotomicrografías de cortes transversales de injertos (vareta y portainjerto) de zapote mamey ( <i>Pouteria sapota</i> ) asintomáticos e inoculados con <i>Lasiodiplodia theobromae</i> , 30 días después de la injertación e inoculación. A) Portainjerto y B) vareta asintomática mostrando peridermis (P); corteza (Ct); floema (Fl); xilema (X); medula (M). C) Injerto asintomático. D) Injerto infectado mostrando micelio inoculado (Mic) y picnidios (Pic) desarrollados. E) Picnidios desarrollados en peridermis de vareta infectada	

artificialmente. F) Vasos del xilema (Vx) en vareta asintomática. G) Vasos del xilema en vareta infectada artificialmente mostrando acumulación de polifenoles (Pol). H) Células parenquimatosas del tejido medular de vareta asintomática. I) Células parenquimatosas del tejido medular de vareta infectada artificialmente mostrando abundantes hifas (Hi) y acumulación de polifenoles. J) Células parenquimatosas del tejido medular de portainjerto asintomático mostrando gránulos de almidón (Ga). K) Células parenquimatosas del tejido medular de portainjerto infectado artificialmente mostrando acumulación polifenoles. Barras A-D= 500  $\mu\text{m}$ , E-G= 100  $\mu\text{m}$ , H-K= 50  $\mu\text{m}$ .....

45

## CAPITULO 2

**Figura 1.** Tratamiento profiláctico físico en material propagativo de zapote mamey de la selección “El Mexicano”. (A) y (B) Varetas sin lavar mostrando abundante cantidad de contaminantes (polvo, residuos de tejido foliar y epidérmico, fumaginas). (C) y (D) Varetas lavadas. Alpoyeca, Gro., México. 2008.....

57

**Figura 2.** Crecimiento micelial *in vitro* de *Lasiodiplodia theobromae* en medio de cultivo PDA + fungicida a diferentes concentraciones, 72 h después de la deposición del disco micelial. (A) Testigo (PDA sin fungicida) (B) Ciprodinil + fludioxinil (C) Pyraclostrobin + boscalid. (D) Prochloraz (E) Tebuconazol (F) Mancozeb (G) Clorotalonil (H) Captan. (0.1, 1, 10, 100=  $\mu\text{g i.a mL}^{-1}$ ).....

69

## ANEXOS

**Figura 1.** Portainjertos de zapote mamey (*Pouteria sapota*) en vivero de Alpoyeca, Gro. 2008. (A) Plántulas de 3 semanas de edad en charolas germinadoras conteniendo agrolita. (B) Plantas de 3 meses de edad trasplantadas en bolsas de polietileno. (C) Plantas de 10 meses de edad con grosor adecuado (10-12 mm) para ser injertadas.....

76

**Figura 2.** Proceso de injertación por enchapado lateral de plantas de zapote mamey (*Pouteria sapota*) en Alpoyeca, Gro. 2008. (A) y (B) Corte superficial en portainjerto. (C) Corte tangencial (4 - 5 cm) y (D) Corte opuesto en vareta. (E) Amarre de la vareta con el portainjerto, usando cinta plástica. (F) Corte del portainjerto arriba de la unión del injerto.....

77

<b>Figura 3.</b> Proceso de injertación por enchapado lateral y manejo de plantas de injertadas de zapote mamey ( <i>Pouteria sapota</i> ) en Alpayeca, Gro. 2008. (A) Vista lateral de la unión del injerto amarrada con cinta plástica. (B) Vista lateral de una planta recién injertada. (C) Injerto cubierto con bolsa de plástico. (D) Plantas injertadas colocadas bajo malla sombra al 70%.....	<b>78</b>
<b>Figura 4.</b> (A) y (B) Injertos de zapote mamey ( <i>Pouteria sapota</i> ), 30 días después del proceso de injertación por enchapado lateral en vivero de Alpayeca, Gro. 2008.....	<b>79</b>
<b>Figura 5.</b> Cultivo de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> aislado de varetas injertadas de zapote mamey ( <i>Pouteria sapota</i> ) con muerte descendente en Alpayeca, Gro. 2008. (A) Crecimiento de 1 d, (B) 3 d, (C) 5 d, (D) y 20 días con presencia de picnidios (Pic).....	<b>80</b>

**ETIOLOGÍA, HISTOPATOLOGÍA Y CONTROL DE LA MUERTE  
DESCENDENTE DE INJERTOS DE ZAPOTE MAMEY (*Pouteria sapota* (Jacq.)  
H.E. Moore & Stearn) EN GUERRERO, MÉXICO**

**Juan Manuel Tovar Pedraza, MC.**

**Colegio de Postgraduados, 2010**

La muerte descendente de varetas injertadas de zapote mamey es el principal problema durante la propagación vegetativa de este frutal en viveros comerciales en Guerrero, México. *Lasiodiplodia theobromae*, identificado cultural, morfológica y molecularmente, se asoció con este problema en 97 % de los aislamientos obtenidos de varetas necrosadas. Se realizaron pruebas de patogenicidad en varetas injertadas de la selección “El Mexicano”. Las varetas mostraron muerte descendente, caracterizada por secamiento gradual con agrietamiento de la corteza del ápice a la base y crecimiento micelial externo y en la unión del injerto. Picnidios abundantes se observaron en peridermis y cicatrices foliares. El estudio de patogenicidad confirmó a *L. theobromae* como el agente causal de la muerte descendente de varetas injertadas de zapote mamey en viveros de Guerrero, México. Secciones anatómicas transversales de varetas infectadas artificialmente mostraron picnidios en peridermis. Las células parenquimatosas de la corteza y floema colapsaron y necrosaron. El hongo creció intracelularmente en vasos del xilema y en tejido parenquimatoso medular. El control de este patógeno se realizó mediante pruebas en vivero semi-comercial durante dos épocas de injertación para evaluar la efectividad de tratamientos profilácticos físicos (lavado) y químicos (inmersión en fungicida) en varetas de la selección “El Mexicano”. El lavado de varetas disminuyó la incidencia de la enfermedad hasta 25 %, mientras que el tiabendazol fue el tratamiento químico más efectivo al reducirla en 52 %. La combinación de ambos tratamientos abatió la incidencia hasta 82 %, por lo que se recomienda para el manejo profiláctico de este patógeno en viveros de zapote mamey. Adicionalmente, se realizaron pruebas *in vitro* de doce fungicidas para la inhibición del crecimiento micelial de *L. theobromae*. Ciprodinil + fludioxinil, pyraclostrobin + boscalid, prochloraz y tebuconazol fueron los más efectivos con valores de  $EC_{50} < 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , seguidos de iprodiona y tiabendazol con valores  $EC_{50} < 1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

**Palabras clave:** Propagación, vivero, fungicidas, *Lasiodiplodia theobromae*, *Pouteria sapota*.

**ETIOLOGY, HISTOPATHOLOGY AND CONTROL OF DIEBACK OF MAMEY  
SAPOTE (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn) GRAFTS IN GUERRERO,  
MEXICO**

**Juan Manuel Tovar Pedraza, MC.**

**Colegio de Postgraduados, 2010**

Dieback of mamey sapote grafts is the most important disease during vegetative propagation in commercial nurseries in Guerrero, Mexico. *Lasiodiplodia theobromae*, identified by cultural, morphological and molecular characterization, was associated with this problem in 97 % of evaluated necrotic rootstocks and scions. Pathogenicity tests were realized with grafted scions of "El Mexicano" selection. Scions developed dieback symptoms and gradual drying with cracking of the bark from the apex to the base. Abundant mycelia and pycnidia were found on inoculated scions. Pathogenicity test confirmed that *L. theobromae* is the causal agent of the dieback of mamey sapote grafts in nurseries of Guerrero, Mexico. Transverse sections of inoculated scions tissues showed pycnidia in periderm. Parenchymal cells of cortex and phloem collapsed and died. Semi-commercial tests were conducted in mamey sapote nursery during two grafting seasons to evaluate the effectiveness of physical prophylaxis (washing) and chemical treatments (fungicide dip) on scions collected from "El Mexicano" selection. The physical prophylaxis reduced the incidence of the disease up to 25 %, whereas thiabendazole was the most effective chemical treatment to reduce it by 52 %. Combination of physical and chemical prophylactic treatments resulted on an incidence decrease of 82 %, so the combination of both treatments is recommended for the management of *L. theobromae* in mamey sapote nurseries. Additionally, twelve selected fungicides were tested for *in vitro* control of this fungus by inhibiting mycelial growth. Cyprodinil + fludioxinil, pyraclostrobin + boscalid, prochloraz and tebuconazole were the most effective fungicides with EC<sub>50</sub> values < 0.1 µg mL<sup>-1</sup>, followed by iprodione and thiabendazole with EC<sub>50</sub> values < 1.0 µg mL<sup>-1</sup>.

**Key words:** Propagation, nursery, fungicides, *Lasiodiplodia theobromae*, *Pouteria sapota*.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### Propagación de zapote mamey

Las plantas de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore y Stearn) se pueden reproducir en forma sexual (semilla) o asexual (vegetativamente) por injertos, acodos y estacas (Villegas y Mora, 2008). Sin embargo, las especies de la familia Sapotaceae son difíciles de propagar vegetativamente por injerto y el zapote mamey es particularmente considerado como una de las plantas más difíciles (Malo, 1970; Ogden *et al.*, 1986; Rodríguez y Gurdian, 1986; Morera, 1992; Balerdi *et al.*, 1996). Por esta razón, en América, la mayoría de los árboles son originados a partir de semillas (Ogden *et al.*, 1986). Estas especies presentan variación en forma, peso, tamaño y sabor de la fruta, así como variabilidad en la productividad y periodo de juvenilidad (Malo, 1970; Campbell y Lara, 1982; Ogden *et al.*, 1986; Salcedo *et al.*, 1987; Morera, 1992; Villegas *et al.*, 2007).

Los árboles de zapote mamey propagados por semilla pueden tardar de siete a diez años en comenzar a producir de acuerdo con lo mencionado por Campbell (1967), Morera (1992), Balerdi *et al.* (1996), CENTA (2003). Mientras que Villegas *et al.* (2007) reportaron que el periodo de juvenilidad puede durar de 10 a 16 años. En contraste, los árboles propagados vegetativamente a partir de árboles adultos, tardan de 3 a 4 años en llegar al periodo productivo (Campbell, 1967; Morera, 1992; Azurdia, 2006).

En México, la mayoría de las plantaciones que se tienen son de semilla (pié franco) esto ocasiona que los rendimientos sean bajos, los frutos tengan calidad heterogénea y que la producción no sea uniforme, debido a la segregación que presenta esta especie. En

nuestro país predominan plantaciones de traspatio, manejadas con técnicas agronómicas de baja eficiencia. La existencia de variedades o selecciones comerciales es limitada en el ámbito nacional; excepto en el sur de Yucatán, donde existen huertos con buen nivel tecnológico con plantas injertadas de las selecciones Magaña 1, Magaña 2, Dany, Sangre de Cristo, Lorito y Akil. De igual forma en Alpoyecá, Gro., se han generado selecciones experimentales: Regalo, Risueño, Mexicano, Pardo 2 y Cid 1, entre otras. En México, la superficie cultivada con materiales injertados no supera el 10% del total nacional (Villegas y Mora, 2008). Aún cuando el zapote mamey es un frutal promisorio debido a su valor nutritivo, excelente sabor para consumo en fresco; la dificultad para propagar vegetativamente árboles que muestran características agronómicas deseables y de calidad, ha limitado la expansión de este frutal (Umaña, 2000).

### **Propagación por injerto**

La propagación de zapote mamey por injerto, tiene ventajas importantes como son: inducir precocidad y obtención de plantas con características deseables, tanto en estructura como en época de producción uniforme. Sin embargo, algunos autores como Ogden *et al.* (1984a); Rodríguez y Gurdian (1986); Salcedo *et al.* (1987); Granados (1990); Campbell (1992); Romero y Flores (2003) señalaron que el zapote mamey es una especie de difícil propagación por este método, atribuyendo los bajos porcentajes de prendimiento, a la irregularidad del cambium, emisión de látex y condición fisiológica de la varetá.

Las perspectivas para incrementar las plantaciones de zapote mamey con materiales injertados son amplias, y permitirán la reconversión del cultivo, de sistemas poco rentables

(de traspatio o policultivos en zonas de montaña) a otras con mayor eficiencia productiva (altas densidades, fertirrigación, producción forzada, etc.). Por otro lado, a la gran variabilidad de patrones nativos que se adaptan a diversos tipos de suelo, puede agregarse una especie más que es compatible con el zapote mamey, el canistel (*Pouteria campechiana* Baekni), árbol de origen tropical en México, que se adapta perfectamente a los suelos calcáreos (Ogden y Campbell, 1980).

### **Épocas de injertación**

Diego (1974) determinó que en Actopan, Veracruz, la mejor época de injertación es el periodo de enero a marzo, cuando el árbol ha tirado las hojas y con el fin de evitar la deshidratación. Mientras que Salcedo *et al.* (1986) reportaron que la mejor época en Teapa, Tabasco, se ubica cuando la planta madre inicia el proceso de defoliación (febrero y marzo). Por otra parte, Campbell y Lara (1992), mencionaron que en Florida, EEUU. las mejores épocas ocurren de finales de octubre a inicio de diciembre, y de finales de marzo a inicio de mayo. Sin embargo, en recientes investigaciones, la época de injertación no es un factor limitante en el éxito del prendimiento de injertos zapote mamey.

### **Factores que afectan la propagación por injerto**

Ogden *et al.* (1984a) mencionaron que las varetas maduras contienen mayor concentración de sílice que de almidón en la región cortical, lo cual dificulta el transporte de agua en la zona del injerto. Salcedo *et al.*, (1986), indicaron que el cambium vascular del tallo de zapote mamey es irregular y rodeado de bandas fibrosas tanto externas como internas, lo cual dificulta hacer coincidir el cambium de la vareta con el del portainjerto,

además mencionaron que el estado fisiológico de la vareta, es un factor importante en el porcentaje de prendimiento.

La nueva formación de tejidos a partir de las heridas y callos es muy lenta. Además, la presencia abundante de látex es otro factor en los problemas de injertación (Quilantan, 1979; Salcedo *et al.*, 1986; CENTA, 2003). En contraste Malo (1970), Diego (1974) y Ogden *et al.* (1986), concluyeron que la gran cantidad de látex que está presente en todas las épocas de año en zapote mamey no es un factor en el éxito o fracaso en el prendimiento, debido a que se ha logrado tener prendimientos , aún cuando el sitio de unión del injerto, ha sido cubierto por los exudados de látex en plantas sin envolver. Por otra parte, el porcentaje de prendimiento de injertos, varía de 10 a 100% dependiendo de la selección (Umaña, 2000; Villegas y Mora, 2008). Aún con lo mencionado anteriormente, hasta la fecha no se conocen con exactitud, las causas por la cual, se tiene bajos porcentajes de prendimiento en plantas injertadas de zapote mamey.

### **Manejo de portainjertos**

Para garantizar buenos portainjertos o patrones se deben seleccionar semillas que provengan de árboles con buenas características, tales como vigor, estado sanitario, estructura y resistencia a plagas y enfermedades (Umaña, 2000). El zapote mamey se ha injertado en especies como canistel (*Pouteria campechiana*) y zapote verde (*Calocarpum viride*) (Ogden y Campbell, 1980; Campbell y Lara, 1992). Además se han probado portainjertos de chicozapote (*Achras sapota* L.), aunque en este caso, hubo

incompatibilidad, debido a la gran cantidad de catequinas que se produjeron (Gonzales, 2004).

Umaña (2000) indicó que los patrones pueden injertarse cuando estos presentan 2 cm de diámetro y 20 cm de altura. Mientras que, Villegas y Mora (2008) señalaron que los portainjertos deben tener de 0.8 a 1.2 cm de diámetro de tallo y entre los 30 a 40 cm de altura, que es en donde se lleva a cabo el injerto. Además recomendaron, que el tiempo para lograr las características anteriores, está en función del manejo (riego, fertilización) y de las condiciones climáticas del lugar, ya que ellos obtuvieron plantas adecuadas para la injertación de 8 a 12 meses en las condiciones de la montaña baja de Guerrero, México. Mientras que Campbell y Lara (1992) indicaron que los portainjertos presentan las características adecuadas para el proceso de injertación, cuando estos tienen de 4 a 12 meses bajo las condiciones de Florida, EEUU.

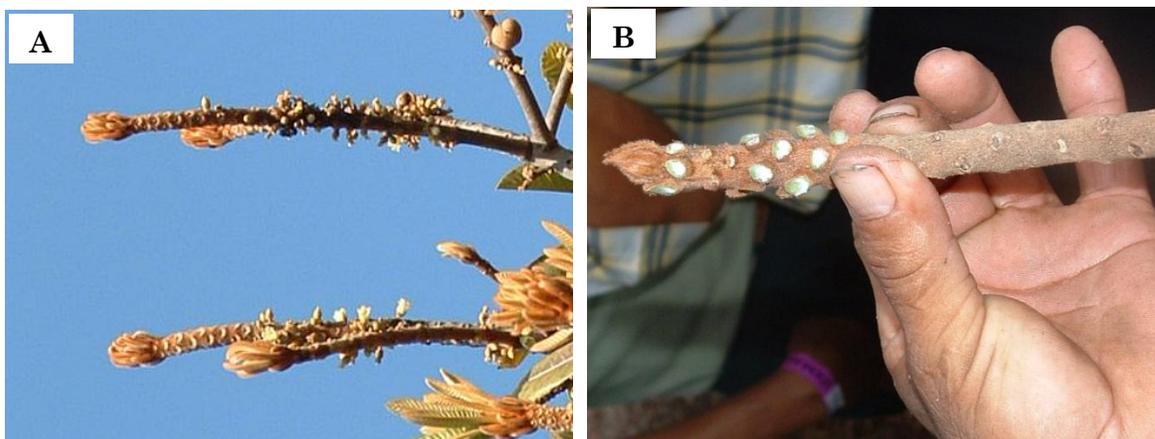
En el Salvador, un patrón de zapote mamey puede injertarse cuando su altura es de 20 cm y tiene 0.80 – 1.50 cm de diámetro (CENTA, 2003), además se ha observado, que el anillamiento de las varetas practicado tres semanas antes de la injertación (Rodríguez y Gurdian, 1986; Salcedo *et al.*, 1986) y la eliminación de látex practicado en los patrones, 20 minutos antes de injertarlos, favorece el prendimiento de los injertos (Rodríguez y Gurdian, 1986). Por otra parte, Ogden *et al.* (1984b) señalaron que la remoción de yemas terminales en plantas jóvenes, rompe el mecanismo de dominancia apical y produce mayor porcentaje de prendimiento.

## **Estado fisiológico de varetas**

Durante la injertación del zapote mamey, es importante tomar en cuenta la etapa fenológica del árbol que suministrará las varetas (Figura 1). En dicho frutal son característicos tres estados fisiológicos respecto al componente foliar: a) defoliado y con yemas apicales cerradas e hinchadas; b) follaje nuevo y con yemas apicales abiertas, y c) follaje maduro y con yemas apicales cerradas (Lobato, 1998; CENTA, 2003). Considerando estas etapas fenológicas, Campbell (1967) recomendó que la yema apical esté hinchada y a punto de abrirse. Mientras que Quilantan (1979) sugiere que para mejorar el porcentaje de prendimiento de plantas injertadas de zapote mamey, deben seleccionarse varetas de árboles totalmente defoliados en la época seca. Adicionalmente, Umaña (2000) indicó que las varetas por utilizar deben ser de ramas terminales, con un diámetro de 1.4 a 1.8 cm y una longitud de 12 a 15 cm. Una vareta de este tipo posee de 10 a 20 yemas laterales que normalmente no se desarrollan para favorecer el crecimiento de la yema apical. Por otra parte, en Gro., México se utilizan varetas con yemas cerradas y latentes, y que presenten hojas completamente maduras (Villegas *et al.*, 2007).

Para injertar plantas de zapote mamey, regularmente se utilizan brotes terminales, pero cuando la disponibilidad de material vegetativo es limitada o en función de la técnica de injertación, también se emplea la parte sub-apical central de la vareta con sus yemas axilares.

Debido a que no todos los genotipos de zapote mamey se defolian en el mismo mes, evento que depende de las condiciones climáticas de cada región o estado, además de que no en todos los casos la defoliación es total y la época en que las varetas están aptas para ser injertadas es diferente para cada genotipo (Villegas y Mora, 2008).



**Figura 1. Varetas de zapote mamey (*Pouteria sapota*) aptas para injertar. (A) Vareta con defoliación natural y (B) manual. Alpayeca, Gro. (GIIM, 2006).**

Algunos autores señalan que las características a considerar para seleccionar las varetas que se van a injertar son:

Las varetas tienen que provenir de plantas en etapa reproductiva y deben tener entrenudos cortos; esta es una evidencia de que está madura, también se puede comprobar con la presencia de flores (no siempre es posible). Las varetas con entrenudos largos (2 a 3 cm) y el tallo rojizo, evidencian su condición juvenil, por lo cual no se deben utilizar, ya que se alargara el tiempo para producción (Villegas y Mora, 2008).

Según Umaña (2000), los mejores resultados en prendimiento se han obtenido cuando las varetas se toman de árboles defoliados, de manera natural (invierno) o de varetas preparadas (defoliación manual) en árboles con follaje maduro. En estos casos se aumenta

el porcentaje de prendimiento, en comparación cuando las varetas provienen de árboles con hojas en proceso de formación.

Si se emplean varetas con defoliación natural, el periodo para injertar es breve (dos a tres semanas), para ampliarlo, una vez que las hojas han madurado (tres a cuatro meses después de la brotación), se deben eliminar manualmente las hojas (limbo) de las varetas maduras seleccionadas, dejando de 1 a 1.5 cm de la base del peciolo. Mientras que, cuando se decide hacer anillado, se efectúa una incisión del grosor de la hoja de la navaja entre los 25 y 30 cm del ápice, con lo que se interrumpe el flujo basipetalo de fotoasimilados almacenados en los peciolos antes de que presenten abscisión. En ambos casos (defoliación manual o natural), es aconsejable cortar las varetas el mismo día en que se van a injertar, así como desinfectarlas con fungicidas como benomilo o mancozeb (Umaña, 2000; Villegas y Mora, 2008). Si las varetas provienen de lugares distantes al lugar donde se injertaran, estas se deben transportar protegidas con mantas o papel húmedo dentro de bolsas de plástico y en hileras que mantengan la temperatura entre 8 y 12°C; al llegar a su destino se deben mantener en refrigeración y utilizarse antes de cinco días (Villegas y Mora, 2008).

### **Tipos de injerto**

Existen tres principales tipos de injerto: enchapado lateral (Figura 2A), hendidura (Figura 2B) e injerto de yema en T, mediante los cuales se propaga el zapote mamey (Umaña, 2000; Villegas y Mora, 2008); de los cuales, el injerto de enchapado lateral ha sido el más usado por diversos investigadores (Diego, 1974; Ogden *et al.*, 1986; Salcedo *et al.*, 1986; Morera, 1992; Lobato, 1998; Umaña, 2000; CENTA, 2003; Ramírez, 2007;

Villegas y Mora, 2008). Por otra parte, algunos autores consideran que el injerto de aproximación es la mejor técnica para propagar al zapote mamey, sin embargo, este método es tedioso si se realiza a escala comercial, y requiere de mucho tiempo para que se lleve a cabo la unión del injerto (Malo, 1970; Ogden y Campbell, 1980; Ogden *et al.*, 1986; Rodríguez y Gurdian, 1986).

El injerto inglés simple (Quilantan, 1979), el injerto de cuatro lóbulos (Marler, 1991) y el injerto de semilla invertida (Wasielewski y Campbell, 2000) son otras técnicas de injertación que se han realizado en zapote mamey.



**Figura 2. Principales tipos de injertos en zapote mamey (*Pouteria sapota*). (A) Enchapado lateral. (B) Hendidura o incrustación. Alpoyeca, Gro. (GIIM, 2006).**

### **Injerto de enchapado lateral**

Para este tipo de injerto, es preferible que el portainjerto y la vareta tengan el mismo diámetro, que debe ser entre 0.8 y 1.2 cm, en caso de que no sean del mismo grosor, se debe procurar que una de las partes del cambium de la vareta, quede en contacto con una del portainjerto para que exista unión entre las dos partes. En el portainjerto a una altura de 30 cm debe realizarse un corte epidérmico (únicamente separando la corteza) de 4 a 5 cm de longitud y en la parte final se deja de 1 a 1.5 cm para favorecer la inserción de la cuña de la vareta. Mientras que en la parte cóncava externa de la vareta se hace un corte tangencial de 4 a 5 cm, que inicia en la parte superficial, con el fin de que la parte final llegue hasta la mitad del diámetro aproximadamente y en la parte posterior de la vareta se hace otro corte opuesto de 1 a 1.5 cm, para formar la cuña en la parte de la vareta. Una vez realizado el injerto, se amarran en portainjerto y la vareta con cinta de plástico, y debe despuntarse el portainjerto 10 cm arriba del injerto para acelerar la velocidad de brotación e incrementar el prendimiento de los injertos. Finalmente el injerto se cubre con una bolsa de plástico transparente con el fin de evitar la deshidratación de la vareta. Después de 30 días, debe retirarse la bolsa de manera gradual, con esta práctica, el porcentaje de prendimiento se incrementa de 10 hasta 40% (Villegas y Mora, 2008).

### **Injerto de hendidura o incrustación**

Al igual que en el caso anterior, es preferible que ambas partes tengan el mismo diámetro y que las varetas sean rectas. El portainjerto debe decapitarse a 60 cm de altura (zona suave del tallo, no lignificada) y anillarse con un corte de aproximadamente 1 mm de

profundidad. En el centro del portainjerto se realiza un corte vertical del grosor de la navaja para separar el tallo en dos partes, exponiendo la médula. Mientras que, en la varetas se deben realizar dos cortes a bisel de 3-4 cm hasta llegar a la médula, en cada lado, de tal manera que se forme una cuña. Posteriormente se introduce la varetas procurando que el cambium de ambas partes esté en contacto. Se amarra fuertemente con una cinta plástica y se cubre el injerto con una bolsa durante 30 días (Villegas y Mora, 2008).

En Costa Rica y El Salvador, también se utiliza el injerto de enchapado lateral, solo que después de amarrar, se aplica parafina en la varetas (principalmente en lugares lluviosos). Mientras que, en Guatemala se anilla la rama de donde se tomaran las varetas 30 días antes de cortarlas, en este caso la varetas no se cubre una vez injertada. Cabe señalar que en México y Costa Rica se aconseja eliminar con tijera las hojas de las varetas, tres semanas antes de injertar (Villegas y Mora, 2008).

### **Manejo post-injertación**

Inmediatamente después de realizar cualquier injerto, se debe colocar una bolsa de plástico de 25 x 15 cm, para cubrir las varetas y para crear un microambiente y evitar la deshidratación de las varetas, con este manejo, aumentan las posibilidades de prendimiento (Balerdi *et al.*1996; Villegas y Mora, 2008). La bolsa se retira hasta que el injerto ha brotado (entre 3 y 4 semanas) y debe ser en forma gradual para evitar problemas de deshidratación; con esta práctica el porcentaje de prendimiento se aumenta de un 10 hasta 40%, dependiendo del genotipo utilizado (Villegas y Mora, 2008).

Otro factor importante es el uso de sombra, ya que después de realizado el injerto, las plantas se deben colocar en un espacio cubierto con malla sombra al 75-80%, durante un tiempo mínimo de 3 semanas, posteriormente se pueden mantener bajo malla sombra al 50%, siempre procurando mantener el sustrato con buena humedad (Villegas y Mora, 2008).

### **Patógenos inductores de muerte descendente de ramas**

Existen diversos patógenos fungosos reportados como inductores de muerte descendente de ramas en cultivos frutales, algunos de los más importantes son: *Eutypa* spp. (Téliz y Valle, 1979), *Botryosphaeria* spp. y sus anamorfos (*Diplodia* spp., *Fusicoccum* spp., *Neofusicoccum* spp., *Lasiodiplodia* spp., *Sphaeropsis* spp., *Dothiorella* spp.) (Jacobs y Rhener, 1998; Slippers *et al.*, 2007). En el caso del cultivo del zapote mamey, se ha reportado a *Botryosphaeria* sp., *Hypoxylon* sp. y a *Lasiodiplodia theobromae* provocando el síndrome de muerte descendente, rajadura de corteza y cancro del tallo (Álvarez, 1997; Vásquez-López *et al.*, 2009).

Estudios histopatológicos del síntoma de muerte descendente en ramas con infecciones causadas por *Botryosphaeria* spp. y sus anamorfos, han sido descritos en arándano, guayabo, manzano, durazno y pistacho (Milholland, 1972; Brown y Hendrix, 1981; Brown y Britton, 1986; Biggs y Britton, 1988; Michailides, 1991; Pandit y Samajpati, 2005; Vásquez-López *et al.*, 2009).

Algunos de los hongos patógenos presentes durante la propagación por injerto, en distintas especies frutales son: *L. theobromae* (Davis *et al.*, 1987; Friere *et al.*, 2002; Cardoso *et al.*, 2002, Aroca *et al.*, 2008), *Phaeomoniella chlamydospora* (Whiteman *et al.*, 2004; Aroca *et al.*, 2008) *Phaeoacremonium aleophilum* (Fourie *et al.*, 2004; Gramaje *et al.*, 2009). Además, se han realizado diversas pruebas con fungicidas para el control *in vitro* de patógenos de la madera en vid, cítricos, manzano, durazno, mango y aguacate (Li *et al.*, 1995; Mahmood *et al.*, 2002; Khanzada *et al.*, 2005; Bester *et al.*, 2007; Zhang y Timmer, 2007; Hallen *et al.*, 2007; Gud y Raut, 2008; Gramaje *et al.*, 2009).

Recientemente en la Cañada de Huamuxtitlan, Guerrero, México se ha observado un severo problema durante la propagación por injerto, que consiste en la muerte descendente de varetas injertadas y cuya etiología, histopatología y control se desconoce. Por lo cual, los objetivos planteados en este estudio son:

### **Objetivos generales**

- 1) Determinar la causa de la muerte descendente de varetas en plantas injertadas de zapote mamey (*P. sapota*) en Alpoyeca, Guerrero, México.
- 2) Evaluar el control *in vitro* e *in vivo* de los patógenos que afectan el prendimiento de injertos de zapote mamey a diferentes fungicidas, así como evaluar el efecto de medidas profilácticas físicas para control de la enfermedad en vivero.

### **Objetivos específicos**

- 1) Determinar el agente causal de la muerte descendente de varetas injertadas de zapote mamey.
- 2) Determinar los daños histológicos inducidos por el organismo causal de la muerte descendente de varetas injertadas de zapote mamey.
- 3) Evaluar la efectividad del lavado de varetas como una medida profiláctica física, para disminuir la incidencia y severidad de muerte descendente de varetas injertadas.
- 4) Evaluar la efectividad de la inmersión de varetas en solución fungicida como una medida profiláctica química, para disminuir la incidencia y severidad de muerte descendente de varetas injertadas.
- 5) Evaluar la sensibilidad *in vitro* de los patógenos del injerto de zapote mamey al captan, clorotalonil, ciprodinil + fludioxinil, hidróxido cúprico, iprodiona, kresoxim-metil, mancozeb, pirimetanil, prochloraz, pyraclostrobin + boscalid, tebuconazole y tiabendazol.

## REFERENCIAS

- Álvarez, V.G. (1997). La muerte descendente y el cáncer del tallo en el zapote. *Tikalía* 15, 37-46.
- Aroca, A.; Raposo, R.; Gramaje, D.; Armengol, J.; Martos, S.; Luque, J. (2008). First report of *Lasiodiplodia theobromae* on rootstock mother grapevines in Spain. *Plant Disease* 92(5), 832.
- Azurdia, C. (2006). Tres especies de zapote en América Central (*Pouteria campechiana*, *Pouteria sapota* y *Pouteria viridis*) Fruits for the future 6. Southampton Center for Underutilised Crops. Southampton University. Southampton, UK.
- Balerdi, C.F.; Crane, J.H.; Maguire, I. (1996). Mamey sapote growing in the Florida home landscape. Horticultural Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Florida, USA.
- Bester, W.; Crous, P.W.; Fourie, P.H. (2007). Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants against *Botryosphaeria* species. *Australasian Plant Pathology* 36, 73–77.
- Biggs, A.R.; Britton, K.O. (1988). Presymptom histopathology of peach trees inoculated with *Botryosphaeria obtusa* y *B. dothidea*. *Phytopathology* 78, 1109-1118.
- Brown, E.A.II.; Britton, K.O. (1986). Botryosphaeria diseases of apple and peach in the southeastern United States. *Plant Disease* 70, 480-484.

- Brown, E.A.II.; Hendrix, F.F. (1981). Pathogenicity and histopathology of *Botryosphaeria dothidea* on apple stems. *Phytopathology* 71, 375-379.
- Campbell, C.W. (1967). The mamey sapote in southern Florida. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 80, 318-320.
- Campbell, C.W.; Lara, S.P. (1992). Propagation of the mamey sapote. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 105, 276-278.
- Cardoso, J.E.; Maia, C.M.; Pessoa, M.N.G. (2002). Occurrence of *Pestalotiopsis psidii* and *Lasiodiplodia theobromae* causing stem rot of guava plants in the State of Ceará, Brazil. *Fitopatologia brasileira* 27(3), 320.
- CENTA. (2003). Guía Técnica del Cultivo del Zapote. El Salvador.
- Davis, R.M.; Farrald, C.J.; Davila, D. (1987). Botryodiplodia trunk lesions in Texas citrus. *Plant Disease* 71, 848-849.
- Diego, Q.R. (1974). Propagación del mamey (*Calocarpum* sp.) Tesis profesional. Escuela Nacional de Agricultura. Chapingo, México.
- Fourie, P.H.; Halleen, F. (2004). Occurrence of grapevine trunk disease pathogens in rootstock mother plants in South Africa. *Australasian Plant Pathology* 33, 313–315.
- Friere, F.C.O.; Cardoso, J.E.; dos Santos, A.A.; Viana, F.M.P. (2002). Diseases of cashew nut plants (*Anacardium occidentale* L.) in Brazil. *Crop Protection* 21(6), 489-494.

- Gonzales, G.J.M. (2004). Catequinas y compatibilidad en homoinjertos de *Calocarpum sapota* (Jacq.) Merr. y heteroinjertos de *Calocarpum sapota/Achras sapota* L. en dos etapas fenológicas. Tesis Doctoral. Universidad de Colima. Tecoman, Colima, México.
- Gramaje, D.; Aroca, A.; Raposo, R.; García-Jiménez, J.; Armengol, J. (2009). Evaluation of fungicides to control Petri disease pathogens in the grapevine propagation process. *Crop Protection* 28, 1091-1097.
- Granados, F.J.C. (1990). Efecto de reguladores de crecimiento en la injertación de zapote (*Calacarpum sapota*). *Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture* 36, 4042.
- Gud, M.A.; Raut, S.P. (2008). Control of mango anthracnose and stem end rot fungi by fungicides and bio-agents. *Journal of Maharashtra Agricultural Universities* 33(1), 120-122.
- Halleen, F.; Fourie, P.H.; Crous, P.W. (2007). Control of black foot disease in grapevine nurseries. *Plant Pathology* 56, 637–645.
- Jacobs, K.A.; Rhener, S.A. (1998). Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. *Mycologia* 90(4), 601-610.

- Khazada, A.M.; Lodhi, A.M.; Shaazad, S. (2005). Chemical control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of mango decline in Sidh. *Pakistan Journal of Botany* 37(4), 1023-1030.
- Li, H.Y.; Cao, R.B.; Mu, Y.T. (1995). *In vitro* inhibition of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasiodiplodia theobromae*, and chemical control of gummosis disease of Japanese apricot and peach trees in Zhejiang Province, China. *Crop Protection* 14(3), 187-191.
- Lobato, A.S.D. (1998). Desarrollo de métodos de propagación para la conservación y propagación de *Pouteria sapota* (Jacq.). Thesis de Magister Scientiae. CATIE. Turrialba, Costa Rica.
- Malo, S.E. (1970). Propagation of the mamey sapote. *Proceedings of Tropical Region American Society for Horticultural Science* 18, 165-174.
- Mahmood, A.; Saleem, A.; Akhtar, K.M. (2002). Mango decline in Pakistan and its management. *Pakistan Journal of Phytopathology* 14(1), 40-43.
- Marler, T. (1991). Four-flap grafting of the mamey. *In: Fairchild Tropical Garden (ed.). Tropical World* 2(1), 20.
- Michailides, T.J. (1991). Pathogenicity, distribution, sources of inoculums, and infection courts of *Botryosphaeria dothidea* on pistachio. *Phytopathology* 81, 566-573.
- Milholland, R.D. (1972). Histopathology and pathogenicity of *Botryosphaeria dothidea* on blueberry stems. *Phytopathology* 62, 654-660.

- Morera, J.A. (1992). El Zapote *Pouteria sapota* (Jacq) Merr. Área de Recursos Genéticos. CATIE. No 193. Turrialba, Costa Rica.
- Ogden, M.A.H.; Campbell, C.W. (1980). Canistel as a rootstock for mamey sapote. *Proceedings of Tropical Region American Society for Horticultural Science* 93, 133-136.
- Ogden, M.A.H.; Campbell, C.W.; Lara, S.P. (1984a). Juvenile interstocks for topworking mamey sapote (*Calocarpum sapota* [Jacq.] Merr.). *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 97, 357-358.
- Ogden, M.A.H.; Campbell, C.W.; Lara, S.P. (1984b). Removal of apical dominance in rootstocks to enhance grafting success in mamey sapote (*Calocarpum sapota* [Jacq.] Merr.). *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 33, 1-8.
- Ogden, M.A.H.; Campbell, C.W.; Lara, S.P. (1986). Grafting techniques for mamey sapote (*Calocarpum sapota* [Jacq.] Merr.) under Florida conditions. *Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture* 30, 215-221.
- Pandit, P.K.; Samajpati N. (2005). Wilt disease of guava caused by *Botryodiplodia theobromae* Pat. *Journal of Mycopathology Research* 43(1), 41-43.
- Quilantan, C.J. (1979). Propagación vegetativa del mamey zapote. *Proceedings of Tropical Region American Society for Horticultural Science* 23, 180-182.
- Ramírez, A. (2007). Respuesta del injerto en el mamey colorado (*Pouteria sapota* Jacq) al uso de BIOBRAS-16. Comunicación corta. *Cultivos Tropicales* 28(1), 37-39.

- Rodríguez, A.E.; Gurdian, R.J. (1986). Pruebas de injertación en zapote (*Calocarpum sapota* (Jack) Merr). *Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture* 30, 121-134.
- Romero, G.E.; Flores, S.R. (2003). Propagación asexual en mamey (*Calocarpum sapota* Jac) Tecnología Produce, Serie Frutícola. Fundación Produce de Guerrero, México.
- Salcedo, G. (1986). Propagación vegetativa del mamey [*Calocarpum sapota* (Jacq.) Merr.]. *Agrociencia* 68, 33-40.
- Slippers, B.; Smit, W.A.; Crous, P.W.; Coutinho, T.A.; Wingfield, B.D.; Wingfield, M.J. (2007). Taxonomy, phylogeny and identification of Botryosphaeriaceae associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world. *Plant Pathology* 56, 128–139.
- Téliz, O.D.; Valle, P. (1979). Eutypa dieback in Mexican vineyards. *Plant Disease Reporter* 63(4), 312-314.
- Umaña, C. (2000). Injertación del zapote (*Pouteria sapota* Jacq) H. E. Moore Stearn. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Área de Agricultura Ecológica, Unidad de Recursos Filogenéticos. Serie Técnica, Manual Técnico No. 45. CATIE Turrialba, Costa Rica.
- Vásquez-López, A.; Mora-Aguilera, J.A.; Cárdenas-Soriano, E.; Téliz-Ortiz, D. (2009). Etiología e histopatología de la muerte descendente de árboles de mamey

- (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore and Stearn) en el estado de Guerrero, México. *Agrociencia* 43, 717-728.
- Villegas-Monter, A.; Mora-Aguilera, J.A.; Chan-Azul, M.; Colinas-León, M.T. (2007). El manejo de viveros de mamey. En: El Cultivo del Mamey. Téliz-Ortiz, D. y Mora-Aguilera J.A. (eds.). Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México.
- Villegas-Monter, A.; Mora-Aguilera, J.A. (2008). Propagación vegetativa del zapote mamey. El zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore y Stearn) en México. En: El Zapote Mamey en México: Avances de Investigación. Alia T.I., Villegas M.A., López M.V., Andrade R.M., Acosta D.C.M., Villegas T.O.G., Guillen S.D., (Eds.). Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.
- Wasielewski, J.; Campbell, R.J. (2000). The potential of inverted seed grafts for dwarfing and precocity in members of the Sapotaceae grown in south Florida. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 113, 12-13.
- Zhang, J.; Timmer, L.W. (2007). Preharvest application of fungicides for postharvest disease control on early season tangerine hybrids in Florida. *Crop Protection* 26, 886–893.

## **IDENTIFICACIÓN, PATOGENICIDAD E HISTOPATOLOGÍA DE *Lasiodiplodia theobromae* EN INJERTOS DE ZAPOTE MAMEY EN GUERRERO, MÉXICO**

**J. M. Tovar-Pedraza<sup>1</sup>, J. A. Mora-Aguilera<sup>1</sup>, C. Nava-Díaz<sup>1</sup>, D. Téliz-Ortiz<sup>1</sup>, A. Villegas-Monter<sup>2</sup>, G. Valdovinos-Ponce<sup>1</sup> y J. Hernández-Morales<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Instituto de Fitosanidad, especialidad de Fitopatología e* <sup>2</sup>*Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, especialidad de Fruticultura, Colegio de Postgraduados.*

### **RESUMEN**

La muerte descendente de varetas injertadas es el principal problema durante la propagación vegetativa del zapote mamey en viveros comerciales en Guerrero, México. *Lasiodiplodia theobromae* identificado cultural, morfológica y molecularmente, se asoció con este problema en 97% de los aislamientos obtenidos de portainjertos y varetas necrosadas. Se inocularon frutos de zapote mamey y se seleccionó el aislamiento más agresivo con base en el volumen de pudrición de pulpa y en el porcentaje del área exterior del fruto colonizada por micelio. El aislamiento seleccionado se inoculó en el sitio de unión en varetas injertadas de la selección “El Mexicano”. Veintidós días después de la inoculación se observó muerte descendente, caracterizada por secamiento gradual con agrietamiento de la corteza del ápice a la base de la vareta. Treinta días después de la inoculación se encontró crecimiento micelial externo en la vareta y en la zona de la unión del injerto, así como abundantes picnidios en la peridermis y en cicatrices foliares. Este estudio de patogenicidad confirmó a *L. theobromae* como el agente causal de la muerte descendente de varetas injertadas de zapote mamey en viveros de Guerrero, México. Cortes transversales de varetas y portainjertos infectados artificialmente mostraron cuerpos fructíferos del hongo. Las células parenquimatosas de la corteza y floema colapsaron y necrosaron. Inclusiones de color rojo, de probable naturaleza fenólica, se observaron en el 10% de los vasos del xilema y en las células parenquimatosas de la médula. Además, hifas de *L. theobromae*, crecieron intracelularmente en vasos del xilema y en tejido parenquimatoso medular.

**Palabras clave:** muerte descendente, propagación, vivero, *Pouteria sapota*, *Lasiodiplodia theobromae*.

## ABSTRACT

Dieback of mamey sapote grafts is the most important disease during vegetative propagation in commercial nurseries in Guerrero, Mexico. *Lasiodiplodia theobromae*; identified by cultural, morphological and molecular characterization was associated with this problem in 97% of evaluated necrotic rootstocks and scions. Isolates of the fungus were inoculated on mamey sapote fruits. The most aggressive isolate was chosen after evaluating the volume of rotting pulp of fruit and percentage of the area colonized by mycelia. This aggressive isolate was inoculated onto the binding site of "El Mexicano" grafted plants. Dieback symptoms and gradual drying with cracking of the bark from the apex to the base of the scion were observed 30 days after inoculation. Abundant mycelia and pycnidia were found on inoculated scions and graft union areas, in the periderm, and on leaf scars. Transverse sections of inoculated scion and rootstock tissues showed pycnidia. Parenchymal cells of cortex and phloem collapsed and died. *L. theobromae* mycelia and red inclusions, probably of phenolic nature, were observed in both xylem vessels and pith parenchyma cells. Pathogenicity test confirmed that *L. theobromae* is the causal agent of the dieback of mamey sapote grafts in nurseries of Guerrero, Mexico.

**Key words:** dieback, propagation disease, nursery, *Pouteria sapota*, *Lasiodiplodia theobromae*.

## INTRODUCCIÓN

El zapote mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E Moore y Stearn] es un frutal tropical nativo de México y América Central (Popenoe, 1974). En 2008, la superficie total cultivada en México fue de 1,516 ha, distribuidas principalmente en los estados de Guerrero, Yucatán, Chiapas, Michoacán, Puebla, Oaxaca, Morelos y Veracruz (SIAP, 2009). Las plantas de zapote mamey se pueden reproducir en forma sexual (semilla) o asexual (vegetativamente) por injertos, acodos y estacas (Villegas y Mora, 2008). Sin embargo, las especies de la familia Sapotaceae son difíciles de propagar por injerto y el zapote mamey es particularmente considerado como una de las plantas más difíciles (Ogden *et al.*, 1986). Además de la dificultad para propagar este frutal, el éxito en el prendimiento del injerto se ve limitado por la presencia de enfermedades.

Poca información existe a nivel mundial acerca de las enfermedades del zapote mamey (*P. sapota*). En Florida, EE.UU se ha reportado manchas foliares por *Phyllosticta* sp. y *Phyllachora* sp., antracnosis por *Glomerella cingulata* (anamorfo *Colletotrichum gloeosporioides*) y una pudrición radical por *Pythium* sp. (Farr *et al.*, 1989). En Cuba y las Bahamas, *Phyllosticta sapotae* induce manchas foliares. En El Salvador, *Uredo sapotae* causa enrollamiento de las hojas (Azurdia, 2006). En Guatemala, se asoció a *Botryosphaeria* sp. e *Hypoxyylon* sp. con el síndrome de muerte descendente, rajadura de corteza y cancro del tallo (Álvarez, 1997). Mientras que en México se ha reportado la agalla o proliferación vegetativa y floral inducida por *Uredo baruensis* (Pereyda *et al.*, 2008); muerte descendente por *Lasiodiplodia theobromae* (Vásquez-López *et al.*, 2009), necrosis floral por *Alternaria alternata*, *Pestalotiopsis paeoniicola* y *Penicillium olsonii*

(Mora *et al.*, 2008); y pudrición de frutos por *L. theobromae* y *P. paeoniicola* (Bautista-Baños *et al.*, 2002; Gómez-Jaimes *et al.*, 2009).

Recientemente, en la Cañada de Huamuxtitlan, Guerrero, México, se ha observado un severo problema durante la propagación por injerto del zapote mamey que consiste en la muerte de varetas injertadas. Aún cuando Vásquez-López *et al.* (2009) determinaron que *L. theobromae* es el agente causal de la muerte descendente de ramas de este frutal, se desconoce si este mismo patógeno induce los síntomas y daños histológicos asociados que se observan durante la propagación vegetativa. *L. theobromae* se ha encontrado asociado a síntomas de muerte descendente y necrosis en sitio de unión de injertos en material propagativo de marañón (*Anacardium occidentale* L.) (Friere *et al.*, 2002), guayaba (*Psidium guajava* L.) (Cardoso *et al.*, 2002), cítricos (Davis *et al.*, 1987) y vid (Aroca *et al.*, 2008); sin embargo, no se tienen bases experimentales que determinen su papel como agente causal de la enfermedad, por lo que este trabajo representa el primer estudio específico de una enfermedad inducida por *L. theobromae* durante el proceso de propagación por injerto. Con base en lo expuesto anteriormente, los objetivos de este estudio fueron determinar la etiología y describir las alteraciones anatómicas asociadas con la muerte descendente de varetas injertadas de zapote mamey en Alpoyecá, Gro. México.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Sitio de estudio**

Alpoyeca, Gro. México, se ubica en la Cañada de Huamuxtitlán en las coordenadas geográficas 17°40' N y 98°31' O, a 960 m de altitud, con temperatura promedio de 25.5°C y precipitación anual de 780 mm.

### **Muestreo en vivero**

En marzo de 2008 se muestreó un vivero comercial de zapote mamey. Se colectaron 10 injertos (varetas y portainjertos) asintomáticos y 20 injertos con el síntomas de muerte descendente de varetas y necrosis en el área de unión del injerto.

### **Muestreo en campo**

Con el objetivo de conocer la diversidad de especies de hongos presentes en varetas asintomáticas de campo, se colectaron 30 varetas rectas con la yema apical cerrada y latente en tres huertos comerciales de zapote mamey.

### **Aislamiento**

Se cortaron trozos de 5 mm<sup>3</sup> de la zona de avance de la necrosis en el sitio de unión de injertos sintomáticos. Las muestras se desinfectaron por inmersión en hipoclorito de sodio al 3% por 4 min, se lavaron por 3 min en agua destilada estéril, se secaron y en condiciones asépticas se colocaron 4 piezas por caja Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). Las cajas se incubaron durante 48 h bajo luz negra continua a 30 ± 2°C. Las colonias fungosas predominantes fueron transferidas a nuevas cajas con PDA y se purificaron mediante cultivos monospóricos para realizar pruebas de patogenicidad e identificación.

## **Prueba de patogenicidad**

**Fase de laboratorio.** Para seleccionar el aislamiento más agresivo, se verificó la patogenicidad y agresividad de 10 aislamientos monospóricos de *L. theobromae* en frutos de zapote mamey de tamaño uniforme, sin daños físicos y en inicio de madurez fisiológica. Los frutos se lavaron con agua y jabón, y se desinfectaron por aspersion con alcohol al 96% y por inmersión en hipoclorito de sodio al 2% durante 7 min. Se inoculó un fruto por cada uno de los 10 aislamientos y se incluyeron cuatro frutos testigos (no inoculados). En condiciones asépticas, se realizaron en cada fruto tres heridas por punción de aproximadamente 8 mm de profundidad usando una aguja estéril. Sobre cada herida se colocaron tres discos de PDA de 5 mm diámetro con crecimiento micelial de 4 días de edad. Y se cubrieron con un trozo de algodón humedecido con agua destilada estéril. Discos de PDA sin inóculo, se colocaron en los tres sitios de punción en los frutos testigos. Los frutos se colocaron en charolas de unicel con papel humedecido con agua destilada estéril. Las charolas se cubrieron con bolsas de plástico y se mantuvieron a temperatura de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Los frutos se observaron diariamente, registrando las lesiones que se desarrollaron alrededor del sitio de inoculación y la severidad de los daños se evaluó 10 días después de la inoculación de acuerdo al volumen del área necrótica en la pulpa y en el porcentaje del área exterior del fruto colonizada por micelio.

**Fase de vivero.** En octubre del 2008 se verificó la patogenicidad del aislamiento L-8 de *L. theobromae* en plantas injertadas en vivero. El procedimiento de la prueba de patogenicidad fue el siguiente:

**a) Preparación del inóculo:** Para preparar el inóculo se usaron cultivos de 6 días de edad creciendo en PDA. El micelio desarrollado en 10 cajas Petri se raspó con una espátula estéril y se colocó en un matraz con 30 mL de agua destilada estéril, agitado manualmente y de manera constante durante 2 min. Con el fin de conocer el número de fragmentos hifales (propágulos formadores de colonias) que se encontraba en la suspensión, se realizaron tres diluciones seriales (1:9) en tubos de ensayo estériles. De cada dilución se colocaron 100  $\mu$ L en el centro de una caja Petri con medio PDA y fueron esparcidos uniformemente con una varilla de vidrio estéril. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y después de 24 h se contaron las colonias que se desarrollaron en cada una de las cajas. La concentración final de propágulos formadores de colonias en 100  $\mu$ L de inóculo fue 19.

**b) Colecta de varetas y características de portainjertos:** se utilizaron 45 varetas (rectas, con la yema terminal cerrada y latente) de la selección “El Mexicano” y 45 portainjertos de 10 meses de edad y con un tallo de 10 - 12 mm de diámetro.

**c) Tratamientos:** Se establecieron tres tratamientos (15 varetas por tratamiento). Los tratamientos 1 (T1) y 2 (T2) con profilaxis física (lavado manual con fibra natural y agua) y química (inmersión por 10 min en una solución de mancozeb a una dosis de  $1\text{mL L}^{-1}$ ). Las varetas del tratamiento 3 (T3) no tuvieron medidas profilácticas, ni fueron inoculadas, con el fin de conocer el porcentaje de varetas con infección natural.

**d) Proceso de injerto:** Los injertos de enchapado lateral se realizaron de acuerdo a la metodología descrita por Villegas y Mora (2008).

**e) Inoculación:** La inoculación en el T1 fue realizada durante el proceso de injertación por enchapado lateral, colocando 100  $\mu$ L del inóculo en la parte superior de la unión

del injerto. Las varetas del T2 (testigo) recibieron 100  $\mu$ L de agua destilada estéril. Mientras que las varetas del T3 no fueron desinfectadas, ni inoculadas.

**f) Cubrimiento:** Todos los injertos fueron cubiertos con bolsas de plástico transparente de 30 x 40 cm, con el fin de evitar la deshidratación del injerto.

**g) Manejo de plantas pos injerto:** Las plantas injertadas se mantuvieron bajo sombra del 75–80% y realizando riegos continuos para mantener el sustrato con buena humedad.

**h) Evaluación:** Los injertos se descubrieron 30 días después de la injertación para evaluar los signos y síntomas.

**i) Recolección de tejidos y verificación de patógenos en laboratorio:** Se realizó al hongo en cultivo puro a partir de los tejidos infectados del T1. La colonia y sus estructuras reproductivas se compararon morfológicamente con las características de la colonia inoculada originalmente.

La incidencia de la enfermedad en varetas con infección natural se estimó 30 días después de realizado el injerto en dos épocas de injertación (primavera y otoño) y se calculó con la ecuación  $I_i = \sum ni/Ni$ ; donde:  $I_i$  = incidencia de varetas enfermas en el momento  $i$ ;  $ni$  = número de varetas enfermas en el momento  $i$ ;  $Ni$  = población total de varetas injertadas. La incidencia de varetas muertas en las pruebas de patogenicidad se evaluó 30 días después de la inoculación y se estimó con la ecuación  $I_i = \sum ni/Ni$ ; donde:  $I_i$  = incidencia de varetas enfermas en el momento  $i$ ;  $ni$  = número de varetas enfermas en el momento  $i$ ;  $Ni$  = población total de varetas inoculadas.

## **Caracterización morfológica**

***In vitro.*** En colonias del hongo en 10 cajas Petri, incubadas bajo luz negra continua a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ . El tipo de crecimiento micelial, pigmentación y formación de estructuras de reproducción, se registraron cada 24 h.

***In vivo.*** Con un microscopio estereoscópico (Nikon Eclipse E400<sup>®</sup>) se observaron los síntomas y signos que presentaron las varetas infectadas natural y experimentalmente. Con un microscopio compuesto (Nikon SMZ800<sup>®</sup>) se examinaron a 40x las características morfológicas de 10 picnidios, tubos germinativos, conidióforos y de 100 conidios (50 inmaduros y 50 maduros), para su descripción cualitativa y cuantitativa. La identificación del género se realizó de acuerdo a las claves de Sutton (1980) y Barnett y Hunter (2006), y para especie se usaron las de Punithalingam (1976) y Burgess *et al.* (2006).

**Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).** Se seleccionaron tres varetas con picnidios inmersos en la peridermis que resultaron de varetas infectadas artificialmente. Los picnidios se cortaron longitudinal y transversalmente, se fijaron en glutaraldehído al 3% en amortiguador de fosfatos Sorensen's 0.1M, pH 7.2 por 24 h, se lavaron tres veces con el amortiguador de fosfatos durante 20 min en cada cambio y se deshidrataron en una serie gradual de etanol (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 96%) por inmersión durante 20 min en cada concentración. Posteriormente, las muestras pasaron por 2 cambios de alcohol absoluto (30 min cada uno) y se desecaron a punto crítico (Sandri-780A<sup>®</sup>) con CO<sub>2</sub>. El material desecado se colocó sobre portamuestras metálicos usando una cinta adhesiva doble de cobre y se cubrieron con una capa de oro de 500Å de grosor por 4 min en una ionizadora (Ion Sputter

JFC-1100, Jeol, Fine Coat<sup>®</sup>). Las características morfológicas de picnidios y conidios fueron examinadas en un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-6390<sup>®</sup>) operado a 10 kV.

### **Identificación molecular**

El ADN de *Lasiodiplodia* sp. se extrajo a partir de un cultivo monosporico según la técnica descrita por Ahrens y Seemüller (1992), su calidad se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Agarose Ultra Pure, Invitrogen<sup>®</sup>) y se cuantificó en un espectrofotómetro Perkin Elmer<sup>®</sup> (Lambda BIO 10<sup>®</sup>). Las regiones internas ITS1 e ITS2 de los genes ribosomales (rRNA), localizadas entre la subunidad pequeña 18S rRNA-5.8S y la subunidad larga 5.8S-28S rRNA, fueron amplificadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la combinación de los iniciadores universales ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) e ITS5 (GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G) (White *et al.*, 1990). La amplificación y visualización de los productos finales se realizó según el protocolo de Ahrens y Seemüller (1992), con las siguientes modificaciones en las reacciones de PCR: agua ultra pura estéril (13.22 µL), solución amortiguadora TBE 1X (2.5 µL), MgCl<sub>2</sub> a 2.5 mM (2.08 µL), dNTPs a 0.2 mM (2 µL), iniciadores ITS4 e ITS5 a 20 pmol (2µL de cada uno), DNA polimerasa (Biogenica<sup>®</sup>) a 1U (0.2 µL) y muestra problema de ADN a 80 ng (1 µL). El producto amplificado se purificó con el kit Wizard (Promega<sup>®</sup>) y secuenció con el Genetic Analyzer modelo 3100<sup>®</sup>, Applied Biosystem<sup>®</sup>. Las secuencias obtenidas se analizaron con el software Lasergene<sup>®</sup> 2001, V5 (DNASTAR<sup>®</sup>, Inc.) y alinearon con la base de datos del banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2009) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). De los valores generados, se

consideraron las secuencias con el valor más alto para su comparación con la secuencia obtenida en este estudio.

## **Histopatología**

**Preparación de muestras para microscopía de luz.** Se cortaron segmentos transversales de 10 mm longitud x 20 mm de ancho (peridermis-corteza-floema-xilema-médula) de tres injertos de cada tratamiento (T1, T2 y T3). Los segmentos se fijaron en FAA [etanol absoluto (500 mL), ácido acético glacial (50 mL), formaldehído (100 mL) y agua destilada (350 mL)] a una temperatura de  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por un tiempo mínimo de 24 h, se lavaron con agua de la llave por 20 min y se infiltraron en un procesador automático de tejidos (Tissue-Tek<sup>®</sup> II, modelo 4640-B<sup>®</sup>, Sakura Finetechnical Co., LTD.) como se describe a continuación. La deshidratación se realizó gradualmente en soluciones de alcohol etílico (50, 70, 96 y 100%). Posteriormente, las muestras pasaron por una mezcla de etanol absoluto-xileno (1:1) y por tres cambios en xileno puro. En cada solución los tejidos se mantuvieron por 6 h. Después del último cambio en xileno, las muestras se colocaron en paraplast (SIGMA<sup>®</sup> Chemical Co.) por 48 h. Para la inclusión del tejido, las muestras se retiraron del procesador automático, se colocaron en moldes cúbicos de papel con paraplast fundido y se dejaron solidificar por 24 h. Los cubos se fijaron en piezas de madera (2 x 1 x 3 cm) y se montaron en un micrótomos de rotación modelo Spencer 820<sup>®</sup> (American Optical Company) para obtener cortes transversales de 10  $\mu\text{m}$  de grosor. Los cortes se colocaron en un baño de flotación a  $65^{\circ}\text{C}$  con 3.0 g de grenetina por 1 min y se montaron en portaobjetos de vidrio. La técnica de tinción diferencial safranina-verde rápido se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Johansen (1940) y Curtis (1986). Los cortes se desparafinaron en 3 cambios de xileno (3 min en cada uno) y se hidrataron en una serie gradual de alcohol

etílico al 100, 96, 70 y 50% (3 min en cada uno). La tinción con safranina (Técnica Química<sup>®</sup>) al 1% (preparada en alcohol etílico al 50%) se realizó por un tiempo mínimo de 4 h. Posteriormente, los cortes se deshidrataron en una serie gradual de alcohol etílico al 50, 70 y 96% (3 min en cada uno) y se agregaron de 3 - 4 gotas de colorante verde rápido (Técnica Química<sup>®</sup>) al 1% (en alcohol etílico al 96%) por 30 segundos. El exceso de colorante se decantó, los cortes se lavaron en alcohol etílico al 96%, se deshidrataron por 3 min en alcohol absoluto y pasaron por tres cambios de xileno de 3 min cada uno. Finalmente, los cortes se montaron en resina, se observaron y se tomaron las fotografías correspondientes en un microscopio compuesto marca Nikon SMZ800<sup>®</sup>.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Síntomas en plantas en vivero**

La necrosis se manifestó en plantas de zapote mamey recién injertadas. El síndrome se presentó a partir de los 22 días posteriores a la injertación, y consistió inicialmente en marchitez de la yema apical seguida de muerte descendente, la cual se observó como un secamiento gradual con agrietamiento de la corteza que inicio en el ápice y desplazó hacia la base de la varetta (Figura 1A). La unión del injerto presentó necrosis extendida longitudinalmente (Figura 1B). El tejido vascular de las varetas enfermas presentó consistencia corchosa (momificación con pudrición total del corteza, floema, xilema y medula) y coloración gris oscura a negro (Figura 1C). Treinta días después de la injertación, se observó abundante crecimiento micelial de color gris claro cubriendo gran parte de la varetta y la zona de la unión del injerto (Figura 1E).

## **Aislamientos**

A partir del material vegetal con síntoma de necrosis en la unión de injerto de muestras colectadas en vivero, se aisló a *Lasiodiplodia* sp. (97%) y *Pestalotiopsis* sp. (3%) del número total de colonias aisladas (200). En varetas asintomáticas colectadas en vivero se aisló a *Pestalotiopsis* sp. (82%) y *Lasiodiplodia* sp. (18%) del número total de colonias aisladas (200). Mientras que en varetas asintomáticas colectadas en campo se aisló a *Pestalotiopsis* sp. (94%) y *Lasiodiplodia* sp. (6%) del número total de colonias aisladas (300). Las características morfológicas de *Pestalotiopsis* sp. coincidieron con las reportadas por Gómez-Jaimes *et al.* (2009) para *P. paeoniicola*, quienes reportaron a esta especie como un organismo endófito del tejido vegetal de zapote mamey en Guerrero, México.

## **Prueba de patogenicidad**

**Prueba en Laboratorio.** *Lasiodiplodia* sp. causó necrosis de pulpa en los 10 frutos inoculados experimentalmente. El volumen de la pulpa necrosada varió de 0.52 a 3.52 cm<sup>3</sup> en los 10 aislamientos de *Lasiodiplodia* sp.; además, el hongo fue capaz de cubrir de 15 a 95% de la superficie del fruto (Figura 1F) (Cuadro 1). Se seleccionó el aislamiento L-08 para las pruebas de patogenicidad en plantas de zapote mamey recién injertadas debido a su mayor agresividad.

**Prueba en vivero.** El 60% de las plantas inoculadas del T1 mostraron síntomas de marchitez de yema apical, muerte descendente de varetas y abundante crecimiento micelial en la unión del injerto a los 30 días después de la inoculación. La rápida aparición de muerte descendente probablemente se debió a que la infección del hongo se llevó a cabo

durante la formación de nuevos tejidos vasculares del portainjerto y de la varetta, previo a la lignificación, lo cual facilitó el desarrollo de este patógeno. Por otro lado, es posible que los cortes profundos y extensivos realizados en las varetas con fines de propagación hayan facilitado la penetración adecuada del patógeno al tejido vascular (Ploetz *et al.* 1996; Pavlic *et al.* 2004). Otra posible razón, es que se creó un microambiente permanente con las condiciones favorables de temperatura (> 30°C) y humedad (100%) para *L. theobromae*, al cubrir el sitio de inoculación con una bolsa de plástico durante 30 días. La presencia de picnidios sub-inmersos y errumpentes se observaron en el área de unión del injerto, en cicatrices foliares (Figura 1D) y en peridermis (Figuras 1G-1H), así como una necrosis que se extendió a lo largo del tejido vascular de las varetas y portainjertos del T1, coincidiendo con los síntomas reportados en plantas injertadas de guayaba y marañón infectadas con *L. theobromae* (Cardoso *et al.*, 2002; Freire *et al.*, 2002).

**Cuadro 1.** Volumen de pudrición de pulpa de frutos de zapote mamey inducido por 10 aislamientos de *Lasiodiplodia theobromae* a 10 días de inoculados por heridas en condiciones de laboratorio. 2008.

Aislamiento	Volumen de la pudrición (cm <sup>3</sup> )			Área exterior (%) fruto invadida con micelio
	Punción del ápice	Punción en parte media	Punción en parte basal (pedúnculo)	
L-01	-----	-----	0.68	15
L-02	-----	-----	0.56	20
L-03	-----	-----	0.72	15
L-04	-----	-----	0.77	20
L-05	-----	-----	0.45	25
L-06	-----	1.2	1.26	20
L-07	-----	-----	0.52	40
L-08	1.34	2.26	3.52	95
L-09	-----	-----	1.65	25
L-10	1.14	2.04	2.84	45
Testigos 1 - 4	-----	-----	-----	-----

Las varetas injertadas del tratamiento 2 (varetas tratadas con fungicida e inoculadas con agua) no presentaron síntomas, mientras que, el 66.6% de varetas del tratamiento 3 (infección natural) presentaron síntomas. Estos datos, sugieren que *L. theobromae* es un patógeno natural de este frutal, el cual penetra al tejido vascular a través de heridas o cortes realizados por el propagador o injertador, coincidiendo con Freire *et al.* (2002), Fourie y Halleen (2002), Halleen *et al.* (2003), Fourie y Halleen (2004) y Retief *et al.* (2006) quienes señalaron que los portainjertos y las varetas contaminadas son la fuente de inóculo primario de los patógenos que causan enfermedades durante la propagación vegetativa de plantas de vid. En el caso del zapote mamey, el método de propagación asegura la supervivencia y dispersión de los patógenos en huertos y en distintas regiones productoras. La fuente más probable de inóculo primario son varetas de zapote mamey que provienen de huertos con manejo agronómico deficiente y alta incidencia de muerte descendente de ramas causada por *L. theobromae*. La presión de inóculo por este fitopatógeno es mayor en el periodo de injertación de otoño (septiembre-noviembre), con una incidencia de 87%, mientras que en el periodo de primavera (febrero-marzo) la incidencia fue de 69%, en varetas infectadas naturalmente, coincidiendo con el periodo (junio a noviembre), en el cual se ha encontrado la mayor cantidad de conidios de *L. theobromae* capturados en trampas volumétricas en huertos de zapote mamey (Vásquez-López *et al.*, 2009).

En este estudio no se verificó la patogenicidad de *Pestalotiopsis paeoniicola* debido a su hábito endofítico en los árboles de zapote mamey en la zona de estudio (Gómez-Jaimes *et al.*, 2009; Vásquez-López *et al.* 2009).

## Caracterización morfológica

**Características culturales.** La colonia del hongo exhibió rápido y abundante crecimiento micelial aéreo algodonoso; al inicio (1-3 días) grisáceo, posteriormente gris oliváceo y más denso en el centro de la caja, mientras que al reverso de la caja, fue al inicio grisáceo (1-4 días) y a partir de los 5 días se observó de color negro. La formación de conidiomas picnidiales se observó a partir de los 14 días y éstos fueron producidos en estroma, semi-inmersos, dispersos, simples o frecuentemente compuestos y en agregados.

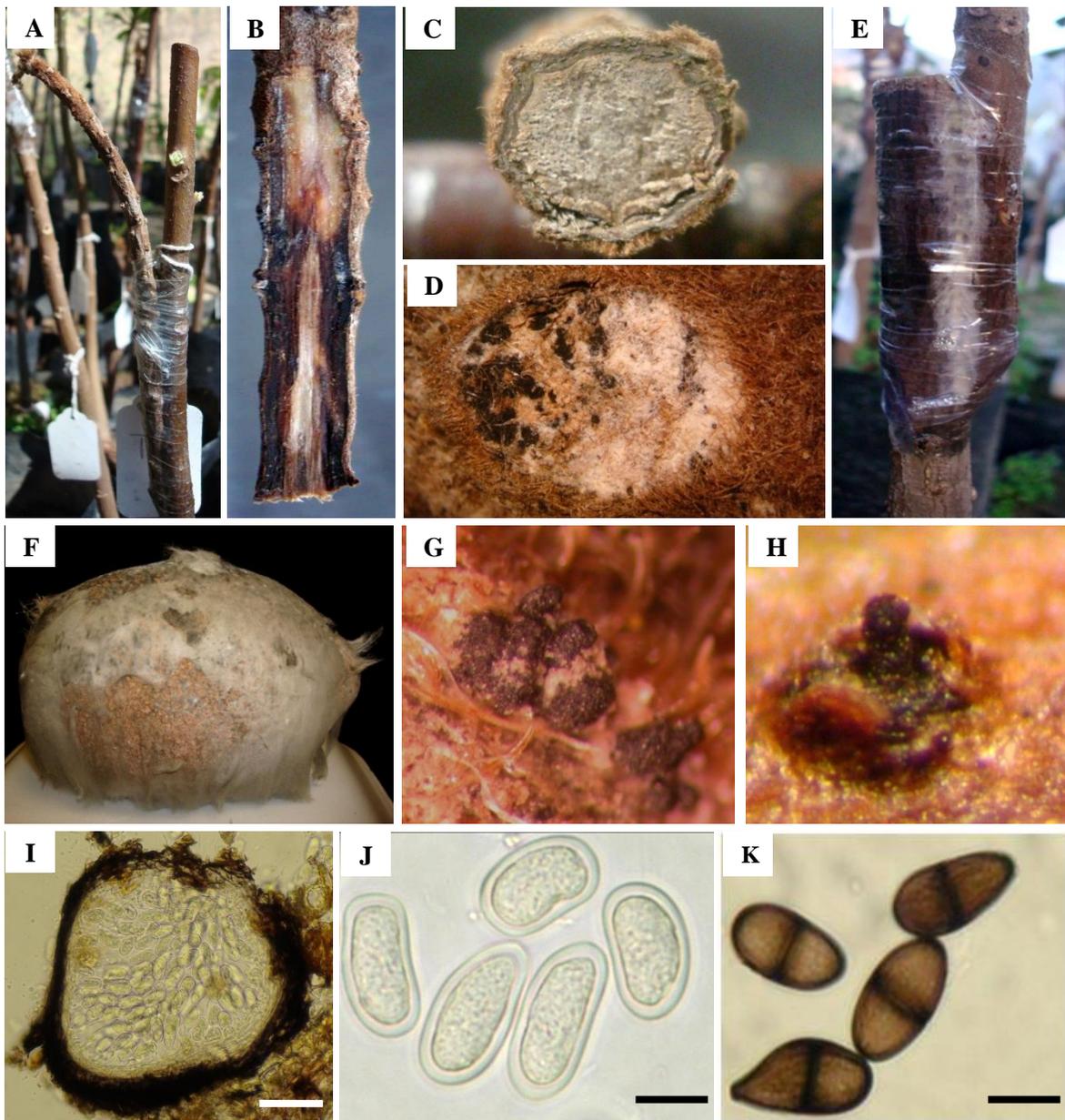
***In vitro.*** Picnidios negros, obpiriformes, ostiolados. Conidios inmaduros se observaron a partir de los 18 días y fueron hialinos, subovoides a elipsoidales, amerosporas, de 22.73 - 27.04 x 11.88 – 15.84  $\mu\text{m}$  (promedio de 50 conidios inmaduros, 24.97 x 13.42  $\mu\text{m}$ ), pared densa y citoplasma granulado. Los conidios maduros se observaron a partir de los 23 días de edad; éstos fueron café oscuro, elipsoidales a ovoides, didimosporas, de 19.66 – 26.35 x 11.3 – 14.17  $\mu\text{m}$  (promedio de 50 conidios maduros, 23.27 x 12.51  $\mu\text{m}$ ), y con estriaciones longitudinales irregulares.

***In vivo.*** Las varetas infectadas (natural y experimentalmente) mostraron picnidios principalmente globosos e inmersos (Figura 1I); además se observaron algunos errumpentes, simples y agrupados, café oscuro a negros, de 235 - 380 x 190 - 335  $\mu\text{m}$  (promedio de 10 picnidios, 325.5 x 270.5  $\mu\text{m}$ ) con cuello ostiolar largo. Conidióforos hialinos, cilíndricos, simples y algunas veces septados, surgiendo de la capa interior de células que recubren la cavidad picnidial. Paráfisis hialinos, cilíndricos y aseptados. Conidios inmaduros hialinos, subovoides a elipsoidales, aseptados, granulados (Figura 1J),

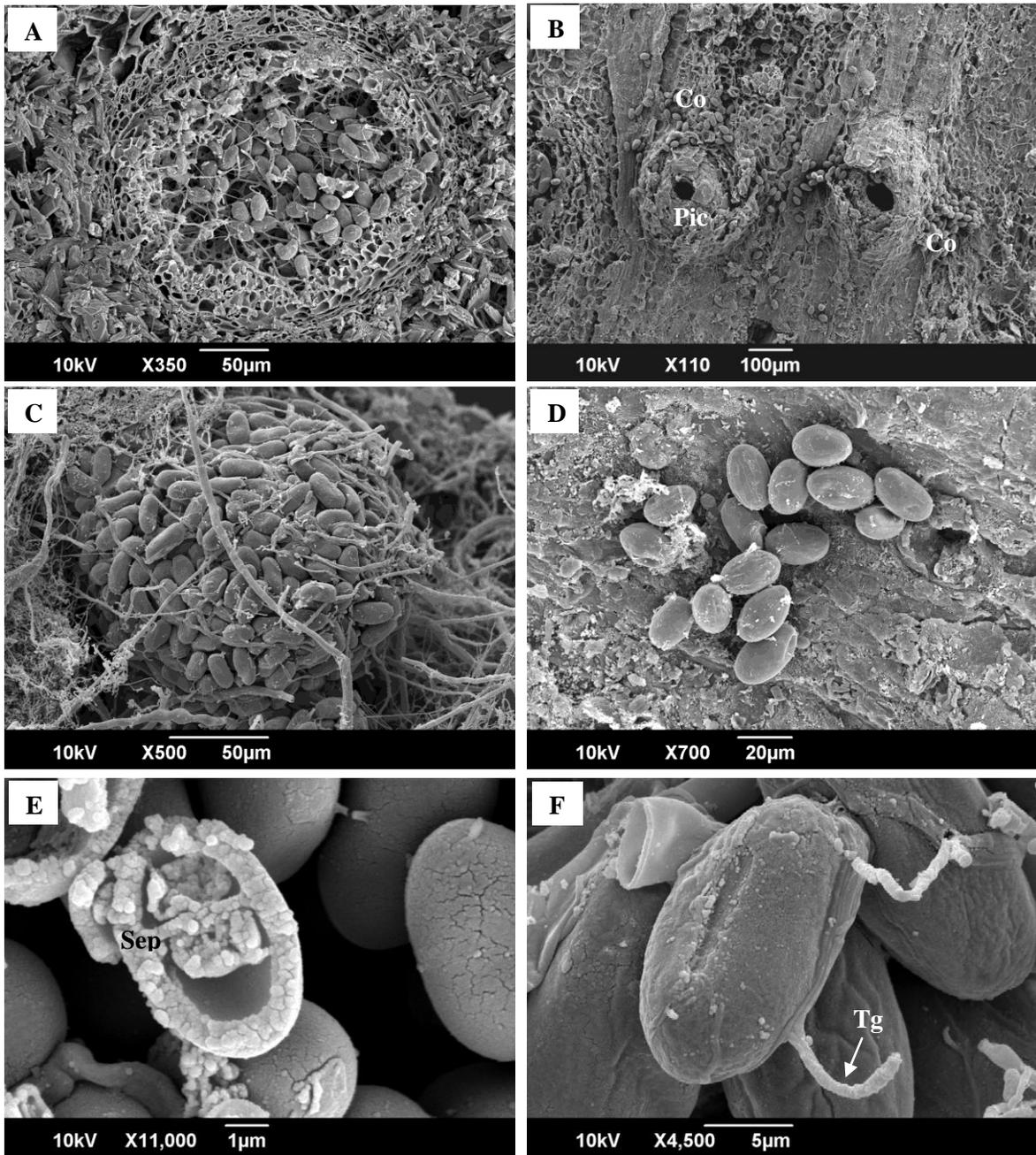
de 23.4 - 27.32 x 12.26 - 15.61  $\mu\text{m}$  (promedio de 50 conidios inmaduros, 25.72 x 13.71  $\mu\text{m}$ ). Conidios maduros café oscuro, ovoides a elipsoidales, uniseptados, de 21.19 – 26.76 x 11.15 – 13.38  $\mu\text{m}$  (promedio de 50 conidios maduros, 24.12 x 12.48  $\mu\text{m}$ ), y mostrando estrías longitudinales irregulares (Figura 1K).

La morfología del hongo sobre el tejido vegetal fue muy similar a la observada en medio PDA. En microscopia electrónica de barrido (MEB), se observaron picnidios globosos a piriformes, uniloculares (Figura 2A) y multiloculares, algunos con cuello ostiolar alargado, errumpente (Figura 2B) y con extrusión de conidios en masas (Figura 2C). Conidios maduros con estriaciones longitudinales irregulares que van del ápice a la base (Figura 2D), y un septo interno (Figura 2E), además, se observó la germinación de conidios a través de uno o dos tubos de germinativos simples (Figura 2F).

Las características culturales, estructuras de reproducción asexual en PDA y en microscopia de luz coincidieron con las reportadas por Punithalingam (1976), Sutton (1980), y Burgess *et al.* (2006) para *Lasiodiplodia theobromae*. Este aislamiento con numero CB007, es mantenido en la colección de cultivos del herbario (CMPH) del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Orientación Fitopatología, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México.



**Figura 1.** Síntomas y signos de *Lasiodiplodia theobromae* en plantas injertadas y frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota*). **A)** Muerte descendente de varetas infectadas naturalmente. **B)** Necrosis del tejido vascular en varetas infectadas naturalmente. **C)** Corte transversal de una vareta infectada mostrando tejido muerto con apariencia corchosa y grisácea. **D)** Picnidios desarrollados en cicatrices foliares **E)** Crecimiento micelial en la unión del injerto. **F)** Fruto a 10 días de inoculado y mostrando abundante crecimiento micelial sobre la superficie. **G-H)** Picnidios semi-inmersos con cuello ostiolar erumpiendo en peridermis y con extrusión de conidios. **I)** Corte longitudinal de picnidio. **J)** Amerosporas (conidios inmaduros). **K)** Didimosporas (Conidios maduros). Barras I=50  $\mu$ m, J-K=10  $\mu$ m.



**Figura 2.** Estructuras fructíferas de *Lasiodiplodia theobromae* en varetas de zapote mamey (*Pouteria sapota*) con infección artificial vistas en MEB. **A)** Corte longitudinal de picnidio (Pic) mostrando conidios maduros. **B)** Picnidios sub-inmersos presentando ostiolo con extrusión de conidios. **C)** Conidios (Co) agrupados en masas. **D)** Conidios maduros con estriaciones longitudinales irregulares. **E)** Corte longitudinal de conidio maduro exhibiendo septo interno (Sep) y contenido granular. **F)** Conidio maduro mostrando tubo germinativo (Tg).

## **Identificación molecular**

El análisis molecular confirmó que el hongo causante de la muerte de varetas injertadas de zapote mamey en Alpoyecá, Gro. fue *Lasiodiplodia theobromae*. La homologación con *L. theobromae* depositado en el banco de genes (NCBI) con número de acceso FJ904912 fue de 99%.

## **Histopatología**

**Descripción anatómica de varetas y portainjertos infectados artificialmente.** A los 30 días después de la inoculación se observaron cuerpos fructíferos del hongo en distintas etapas de desarrollo (Figura 3D-E), lo que coincide con Milholland (1972), Brown y Hendrix (1981), Biggs y Briton (1988), Michailides (1991) y Rayachhetry *et al.* (1996), quienes registraron la presencia de estructuras de reproducción de diversos anamorfos de *Botryosphaeria* spp en un rango de 12 - 56 días después de la inoculación. Los resultados obtenidos en la presente investigación, contrastan con lo reportado por Vásquez-López *et al.* (2009), quienes no encontraron picnidios en las muestras evaluadas. Es importante señalar que estos autores realizaron los estudios histológicos al momento de observar los síntomas de muerte descendente, 24 meses después de la inoculación, lo que podría explicar la ausencia de estas estructuras, debido al colapso, necrosis y pérdida de la estructura normal de los tejidos de las ramas analizadas. Por otro lado, en el presente estudio se brindaron las condiciones necesarias para lograr un rápido proceso infeccioso, el cual fue favorecido por los cortes profundos y extensivos (vía de penetración) realizados durante el proceso de injertación y por una mayor susceptibilidad del tejido del hospedante, debido a que la infección del hongo se llevó a cabo durante la formación de nuevos tejidos

vasculares del portainjerto y de la vareta, previo a la lignificación, lo cual facilitó el desarrollo de este patógeno.

El tejido de protección de ramas y tallos con crecimiento secundario se agrieta o se fractura de manera natural debido a diferentes factores, por lo que las alteraciones observadas en varetas asintomáticas (Figuras 3B-C) y en las infectadas artificialmente (Figura 3D) podrían atribuirse a causas naturales; sin embargo, el daño mecánico generado durante el proceso de injertación y la presencia y naturaleza errumpente de los picnidios del hongo pudieron haber contribuido con las alteraciones en la estructura y organización de las células que conforman la peridermis.

Las células parenquimatosas de la corteza y del floema colapsaron y necrosaron. Inclusiones de color rojo probablemente de naturaleza fenólica, fueron observadas en el 10% de los vasos del xilema (Figura 3G) y en el 13% (porcentaje con respecto al asintomático) de las células parenquimatosas de la médula (Figura 3I), lo que podría tratarse de compuestos fenólicos. La presencia de estos compuestos se relaciona con una respuesta de la planta a la colonización no solo de patógenos fungosos, sino también de bacterias y oomicetos.

*Lasiodiplodia theobromae* penetró y colonizó rápidamente todos los tejidos de la vareta. El micelio, caracterizado por desarrollar hifas largas y ramificadas creció intracelularmente, en vasos del xilema y tejido parenquimatoso de la medula (Figura 3I). La presencia de inclusiones y signos del patógeno en los vasos del xilema explicaría la restricción del flujo de agua, sales minerales y otros solutos al resto de la vareta, lo que se traduce en los síntomas de marchitamiento y muerte descendente de ramas, dichas

observaciones coinciden con los datos reportados por Rayachhetry *et al.* (1996) y Pandit y Samajpati (2005).

Aún cuando en este trabajo no se observaron tilides en los lúmenes de los vasos del xilema, estas estructuras se han registrado en otras interacciones con *Botryosphaeria* spp. (Millholland, 1972; Brown y Hendrix, 1981) y *L. theobromae* (Atia *et al.*, 2003) como una causa importante de la obstrucción del flujo de agua, lo cual estaría contribuyendo, como se mencionó anteriormente, al síntoma de muerte descendente.

En otros trabajos se han encontrado hifas de *Botryosphaeria* spp. y sus anamorfos, no solamente en la corteza, vasos del xilema y médula, sino también en la floema y parénquima radial del xilema (Brown y Hendrix, 1981; Biggs y Briton, 1988; Rayachhetry *et al.*, 1996), lo que confirma que estas especies de patógenos se han especializado para poder colonizar todos los tejidos de ramas y tallos de diversas plantas leñosas. Vázquez-López *et al.* (2009) no reportaron la presencia de hifas creciendo en alguno de los tejidos de las ramas infectadas con *L. theobromae*, posiblemente esto se deba a que estos autores documentaron los daños 24 meses después de la inoculación, y observaron que los tejidos presentaban colapso, necrosis y pérdida de la estructura normal de las ramas, lo que indica que la infección estaba en un nivel terminal y el hongo se encontraba en estado latente, en baja proporción y confinado a ciertas partes del tejido.

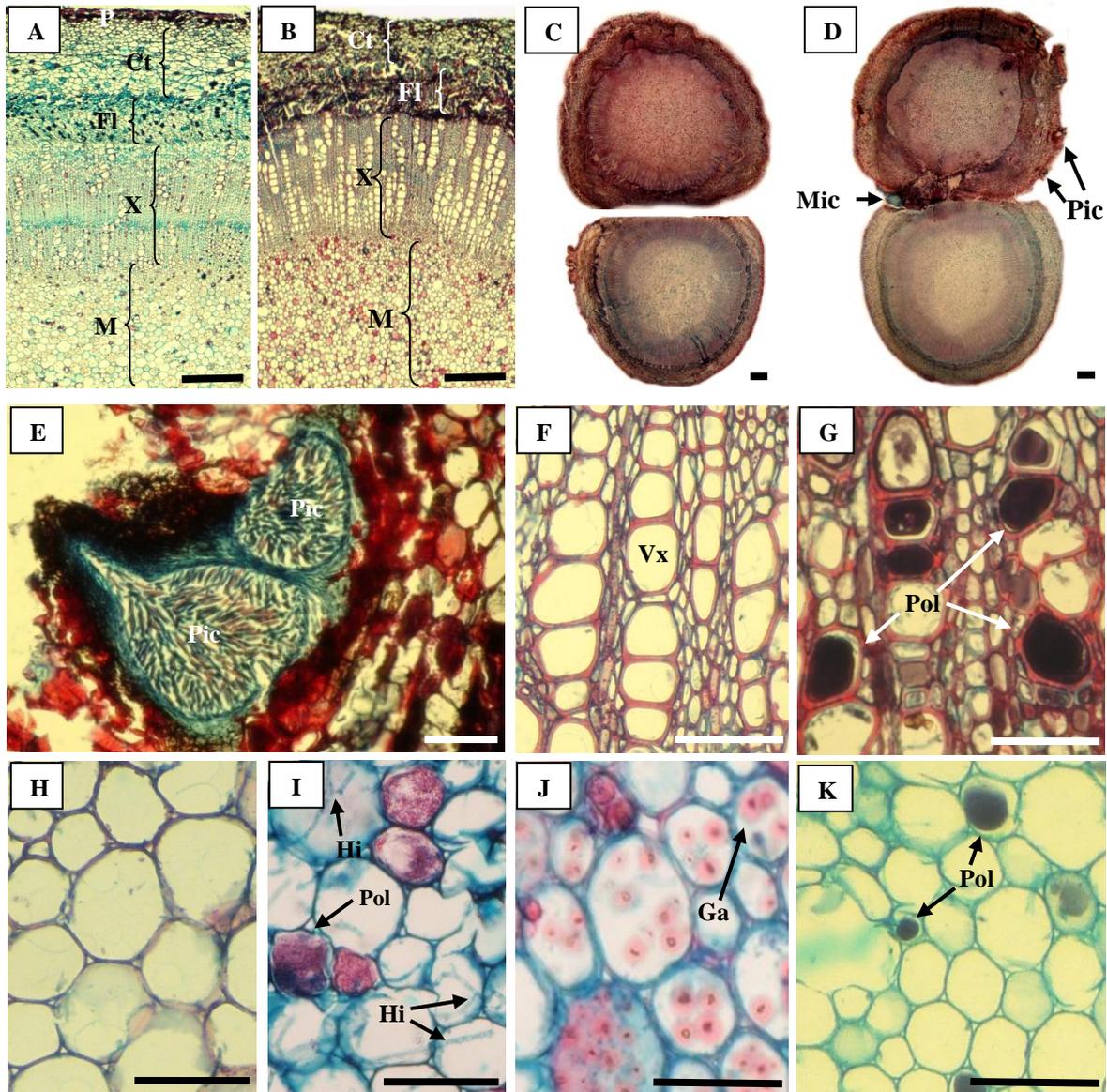
Al igual que las células parenquimatosas del tejido medular de la vareta, en los portainjertos se observaron depósitos de polifenoles (7%) (Figura 3K). Las células parenquimatosas de la medula del portainjerto asintomático se caracterizaron por presentar gránulos de almidón (Figura 3J), los cuales no se observaron en los portainjertos infectados artificialmente. Dicha respuesta podría deberse a que el hongo utiliza este carbohidrato

como fuente de carbono a partir de la cual obtiene la energía necesaria para sustentar su desarrollo y crecimiento, ya que se ha registrado que algunos hongos pueden utilizar el almidón mediante la producción de amilasas (Griffin, 1994; Deacon, 2006).

**Descripción anatómica de varetas y portainjertos infectados naturalmente.** Las hifas de *L. theobromae* presentaron un patrón de crecimiento similar a lo observado en el tejido infectado artificialmente. Sin embargo, no se observó la presencia picnidios en la peridermis. La ausencia de estas estructuras podría explicarse a que el proceso de penetración e infección ocurrieron de manera lenta y a que la presión de inóculo fue menor comparada con las varetas que fueron inoculadas con la suspensión de hifas sobre los cortes (heridas).

A diferencia de lo observado en los injertos infectados artificialmente, la acumulación de polifenoles (5%, porcentaje con respecto al asintomático) fue menor en las células parenquimatosas del tejido medular, lo que pudo haberse debido a un menor alcance de la colonización del hongo en los tejidos.

Es importante señalar que la posterior formación de picnidios en varetas que sobrevivieron a la infección natural y que se establecieron en campo representan la principal fuente de inóculo para la diseminación de la enfermedad en huertos comerciales de zapote mamey en Guerrero, México.



**Figura 3. Fotomicrografías de cortes transversales de injertos (vareta y portainjerto) de zapote mamey (*Pouteria sapota*) asintomáticos e inoculados con *Lasiodiplodia theobromae*, 30 días después de la injertación e inoculación. A) Portainjerto y B) vareta asintomática mostrando peridermis (P); corteza (Ct); floema (Fl); xilema (X); medula (M). C) Injerto asintomático. D) Injerto infectado mostrando micelio inoculado (Mic) y picnidios (Pic) desarrollados. E) Picnidios desarrollados en peridermis de vareta infectada artificialmente. F) Vasos del xilema (Vx) en vareta asintomática. G) Vasos del xilema en vareta infectada artificialmente mostrando acumulación de polifenoles (Pol). H) Células parenquimatosas del tejido medular de vareta asintomática. I) Células parenquimatosas del tejido medular de vareta infectada artificialmente mostrando abundantes hifas (Hi) y acumulación de polifenoles. J) Células parenquimatosas del tejido medular de portainjerto asintomático mostrando gránulos de almidón (Ga). K) Células parenquimatosas del tejido medular de portainjerto infectado artificialmente mostrando acumulación polifenoles. Barras A-D = 500  $\mu$ m, E-G = 100  $\mu$ m, H-K = 50  $\mu$ m.**

## REFERENCIAS

- Ahrens, U.; Seemüller, E. (1992). Detection de DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82, 828-832.
- Álvarez, V.G. (1997). La muerte descendente y el cáncer del tallo en el zapote. *Tikalía* 15, 37-46.
- Aroca, A.; Raposo, R.; Gramaje, D.; Armengol, J.; Martos, S.; Luque, J. (2008). First report of *Lasiodiplodia theobromae* on rootstock mother grapevines in Spain. *Plant Disease* 92, 832.
- Atia, M.M.M.; Aly, A.Z.; Tohamy, M.R.A.; El-Shimy, H.; Kamhawy, M.A. (2003). Histopathological studies on grapevine die-back. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 110, 131-142.
- Azurdía, C. (2006). Tres Especies de Zapote en América Tropical. Southampton Centre for Under utilised Crops, Southampton University, Southampton, UK.
- Barnett, L.H.; Hunter, B.B. (2006). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA.
- Bautista-Baños, S.; Díaz-Pérez, J.C.; Barrera-Necha, L.L. (2002). Postharvest fungal rots of sapote mamey *Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn. *Postharvest Biology and Technology* 24, 197–200.
- Biggs, A.R.; Britton, K.O. (1988). Presymptom histopathology of peach trees inoculated with *Botryosphaeria obtusa* and *B. dothidea*. *Phytopathology* 78, 1109-1118.
- Brown, E.A.II.; Hendrix, F.F.; (1981). Pathogenicity and histopathology of *Botryosphaeria dothidea* on apple stems. *Phytopathology* 71, 375-379.

- Burgess, T.I.; Barber, P.A.; Mohali, S.; Pegg, G.; de Beer, W.; Wingfield, M.J. (2006). Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia* 98, 423-435.
- Cardoso, J.E.; Maia, C.M.; Pessô, M.N.G. (2002). Occurrence of *Pestalotiopsis psidii* and *Lasiodiplodia theobromae* causing stem rot of guava plants in the State of Ceará, Brazil. *Fitopatologia brasileira* 27, 320.
- Curtis, P. J. (1986). *Microtécnica Vegetal*. Ed. Trillas, México.
- Davis, R.M.; Farrald, C.J.; Davila, D. (1987). Botryodiplodia trunk lesions in Texas citrus. *Plant Disease* 71, 848-849.
- Deacon, J. (2006). *Fungal Biology*. Fourth Edition. Blackwell Publishing. Cornwall, England.
- Farr, D.F.; Bill, G.F.; Chamuris, G.P.; Rossman, A.Y. (1989). *Fungi on Plants and Plant Products in the United States*. APS Press. St. Paul, Minnesota, USA.
- Fourie, P.H.; Halleen, F. (2002). Investigation on the occurrence of *Phaeoconiella chlamydospora* in canes of rootstock mother vines. *Australasian Plant Pathology* 31, 425–426.
- Fourie, P.H.; Halleen, F. (2004). Occurrence of grapevine trunk disease pathogens in rootstock mother plants in South Africa. *Australasian Plant Pathology* 33, 313–315.
- Freire, F.C.O.; Cardoso, J.E.; dos Santos, A.A.; Viana, F.M.P. (2002). Diseases of cashew nut plants (*Anacardium occidentale* L.) in Brazil. *Crop Protection* 21, 489-494.
- Gómez-Jaimes, R.; Nieto-Ángel, D.; Téliz-Ortiz, D.; Mora-Aguilera, A.; Martínez-Damián, M.T.; Vargas-Hernández, M. (2009). Evaluation of refrigerated sapote mamey

- (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn) quality and incidence of fungi. *Agrociencia* 43, 37-48.
- Griffin, D.H. (1994). *Fungal Physiology*. Second Edition. Wiley-Liss, Inc. New York, USA.
- Halleen, F.; Crous, P.W.; Petrini, O. (2003). Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. *Australasian Plant Pathology* 32, 47–52.
- Johansen, D.A. (1940). *Plant Microtechnique*. McGraw Hill, New York, USA.
- Michailides, T.J. (1991). Pathogenicity, distribution, sources of inoculum, and infection courts of *Botryosphaeria dothidea* on pistachio. *Phytopathology* 81, 566-573.
- Milholland, R.D. (1972). Histopathology and pathogenicity of *Botryosphaeria dothidea* on blueberry stems. *Phytopathology* 62, 654-660.
- Mora, A.J.A.; Vásquez, L.A.; Pereyda, H.J.; Téliz, O.D. (2008). Algunas enfermedades del zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore y Stearn) en México. In: Alia, T.I., Villegas, M.A., López, M.V., Andrade, R.M., Acosta, D.C.M., Villegas, T.O.G., Guillen, S.D. (eds). *El Zapote Mamey en México: Avances de Investigación*. Morelos, México, p. 103-114.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2009. Gen Bank. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Consultado el 15 Julio de 2009.
- Ogden, M.A.H.; Campbell, C.W.; Lara, S.P. (1986). Grafting techniques for mamey sapote (*Calocarpum sapota* [Jacq.] Merr.) under Florida conditions. *Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture* 30, 215-221.

- Pandit, P.K.; Samajpati, N. (2005). Wilt disease of guava caused by *Botryodiplodia theobromae* Pat. *Journal of Mycopathological Research* 43, 41-43.
- Pavlic, D.; Slippers, B.; Coutinho, T.A.; Gryenhout, M.; Wingfield, M.J. (2004). *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. *Studies in Mycology* 50, 313-322.
- Pereyda, H.J.; Mora, A.J.A.; Florencio, A.J.G.; Nava, D.C.; Téliz, O.D.; Sandoval, I.S.; Villegas, M.A. (2008). Proliferación vegetativa y floral del zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore y Stearn) en México. In: Alia, T.I., Villegas, M.A., López, M.V., Andrade, R.M., Acosta, D.C.M., Villegas, T.O.G., Guillen, S.D. (eds). *El Zapote Mamey en México: Avances de Investigación*. Morelos, México, p. 115-130.
- Ploetz, R.C.; Bensch, D.; Vazquez, A.; Colls, A.; Nagel, J.; Schaffer B. (1996). A reexamination of mango decline in Florida. *Plant Disease* 80, 664-668.
- Popenoe, W. (1974). *Manual of Tropical and Sub-tropical Fruits, Excluding the Banana, Coconut, Pineapple, Citrus Fruit, Olive and Fig*. Hafner Press XIX, New York, USA.
- Punithalingam, E. (1976). *Botryodiplodia theobromae*. CMI description of pathogenic fungi and bacteria. No. 519. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England.
- Rayachhetry, M.B.; Blankslee, G.M.; Miller, T. (1996). Histopathology of *Botryosphaeria ribis* in *Melaleuca quinquenervia*: Pathogen invasion and host response. *International Journal of Plant Science* 157, 219-227.

- Retief, E.; McLeod, A.; Fourie, P.H. (2006). Potential inoculum sources of *Phaeoconiella chlamydospora* in South African grapevine nurseries. *Eur. J. Plant Patho.* 115, 331–339.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), 2009. Disponible en: <http://siap.sagarpa.gob.mx>. Consultado el 26 Septiembre 2009.
- Sutton, B.C. (1980). The Coleomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Vásquez-López, A.; Mora-Aguilera, J.A.; Cárdenas-Soriano, E.; Téliz-Ortiz, D. (2009). Etiología e histopatología de la muerte descendente de árboles de mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore and Stearn) en el estado de Guerrero, México. *Agrociencia* 43, 717-728.
- Villegas-Monter, A.; Mora-Aguilera, J.A. (2008). Propagación vegetativa del zapote mamey. In: Alia, T.I., Villegas, M.A., López, M.V., Acosta, D.M., Villegas, T.O.G., Guillen, S.D. (eds). *El Zapote Mamey en México: Avances de Investigación*. Morelos, México, p 1-16.
- White, T.J.; Lee, B.S.; Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 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, p. 315-322.

**CONTROL DE *Lasiodiplodia theobromae*, AGENTE CAUSAL DE LA MUERTE  
DESCENDENTE DE INJERTOS DE ZAPOTE MAMEY EN GUERRERO,  
MÉXICO**

**J. M. Tovar-Pedraza<sup>1</sup>, J.A. Mora-Aguilera<sup>1</sup>, C. Nava-Díaz<sup>1</sup>, D. Téliz-Ortiz<sup>1</sup>, A.  
Villegas-Monter<sup>2</sup> y Javier Hernández Morales<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Instituto de Fitosanidad, especialidad de Fitopatología e* <sup>2</sup>*Instituto de Recursos Genéticos  
y Productividad, especialidad de Fruticultura, Colegio de Postgraduados.*

**RESUMEN**

La muerte descendente de varetas injertadas de zapote mamey causada por *Lasiodiplodia theobromae* reduce significativamente el prendimiento de injertos en vivero en Alpoyecá, Guerrero, México. El control de este patógeno se realizó mediante pruebas en un vivero semi-comercial durante dos épocas de injertación para evaluar la efectividad de tratamientos profilácticos físicos (lavado) y químicos (inmersión en fungicida) en varetas de la selección “El Mexicano”. El lavado de varetas disminuyó la incidencia de la enfermedad hasta 25 %, mientras que tiabendazol fue el tratamiento químico más efectivo al reducirla en un 52 %. La combinación de ambos tratamientos abatió la incidencia hasta 82 %, por lo que se recomienda para el manejo profiláctico de este patógeno en viveros de zapote mamey. Adicionalmente, se realizaron pruebas *in vitro* de doce fungicidas para la inhibición del crecimiento micelial de *L. theobromae*. Ciprodinil + fludioxinil, pyraclostrobin + boscalid, prochloraz y tebuconazol fueron los más efectivos con valores de  $EC_{50} < 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , seguidos de iprodiona y tiabendazol con valores  $EC_{50} < 1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Los fungicidas con buena efectividad *in vitro* deberán ser evaluados en pruebas adicionales en vivero para el control de *L. theobromae* en plantas injertadas de zapote mamey.

**Palabras clave:** Fungicidas, propagación, *in vitro*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Pouteria sapota*.

## ABSTRACT

Dieback of mamey sapote grafts caused by *Lasiodiplodia theobromae* significantly reduced the success of grafts in a nursery in Alpoyecá, Guerrero, Mexico. Semi-commercial tests were conducted in mamey sapote nursery during two grafting seasons to evaluate the effectiveness of physical prophylaxis (washing) and chemical treatments (fungicide dip) on scions collected from "El Mexicano" selection. The physical prophylaxis reduced the incidence of the disease up to 25 %, whereas thiabendazole was the most effective chemical treatment to reduce it by 52 %. Combination of physical and chemical prophylactic treatments resulted on an incidence decrease of 82 %, so the combination of both treatments is recommended for the management of *L. theobromae* in mamey sapote nurseries. Additionally, twelve selected fungicides were tested for *in vitro* control of this fungus by inhibiting mycelial growth. Cyprodinil + fludioxinil, pyraclostrobin + boscalid, prochloraz and tebuconazole were the most effective fungicides with EC<sub>50</sub> values < 0.1 µg mL<sup>-1</sup>, followed by iprodione and thiabendazole with EC<sub>50</sub> values < 1.0 µg mL<sup>-1</sup>. These fungicides should be evaluated in additional trials against *L. theobromae* in mamey sapote nurseries.

**Key words:** Fungicides, propagation, *in vitro*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Pouteria sapota*.

## INTRODUCCIÓN

*Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. (sin. *Botryodiplodia theobromae* Pat.) representa la fase anamórfica de *Botryosphaeria rhodina* (Berk. & M.A. Curtis) Arx. Este hongo de distribución mundial y más común en regiones tropicales y subtropicales, ha sido reportado como patógeno oportunista en aproximadamente 500 hospedantes, al inducir enfermedades como: muerte descendente, pudrición de raíces, frutos y semillas, necrosis de tallo, manchas y tizones foliares, y escobas de bruja (Punithalingam, 1980). Los cultivos frutales o industriales importantes en los que se ha encontrado causando enfermedades precosecha (muerte descendente y gomosis en ramas) y/o postcosecha (pudrición de fruto y de pedúnculo) son: aguacate (*Persea americana* Mill.) (Darvas y Kotze, 1987; Alama *et al.*, 2006), guanábana (*Annona muricata*) (Ponte, 1985), cacao (*Theobroma cacao* L.) (Holliday, 1980; Mbenoun *et al.*, 2008), cítricos (*Citrus* spp.) (Adisa y Obinyereokwu, 1988; Zhang y Timer, 2007), cocotero (*Cocos nucifera* L.) (Correia y Costa, 2005), guayaba (*Psidium guajava* L.) (Cardoso *et al.*, 2002), mango (*Mangifera indica* L.) (Meah *et al.*, 1991; Sangchote 1991), papaya (*Carica papaya* L.) (Wang *et al.*, 2007) y vid (*Vitis vinifera* L.) (Bester *et al.*, 2007). En zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E Moore y Stearn), se ha reportado a *L. theobromae* como causante de muerte descendente de ramas (Vásquez-López *et al.*, 2009) y pudrición de frutos en postcosecha (Bautista-Baños *et al.*, 2002; Gómez-Jaimes *et al.*, 2009). Además, este hongo ha sido encontrado como endófito en diversas especies arbóreas (Jhonson *et al.*, 1992; Mohali *et al.*, 2005; Crous *et al.*, 2006; Slippers y Wingfield, 2007).

El control *in vitro* de *L. theobromae* se ha logrado con tiofanato-metil en aislamientos obtenidos de ramas de durazno, albaricoquero japonés (Li *et al.*, 1995) y mango (Mahmood *et al.*, 2002; Khanzada *et al.*, 2005; Gud y Raut, 2008). Otros fungicidas efectivos contra este hongo incluyen hexoconazol, propiconazol y carbendazim (Khanzada *et al.*, 2005; Gud y Raut, 2008). Por su parte, Wang *et al.* (2007) establecieron que ciprodinil + fludioxinil, flusilazole, tebuconazole, prochloraz e iprodiona tuvieron los mejores resultados contra aislamientos obtenidos de papaya, mientras que Zhang (2007), confirmó el efecto del fludioxinil sobre aislamientos obtenidos de frutos cítricos. Bester *et al.* (2007) reportaron que el flusilazol y tebuconazol fueron efectivos en cuatro aislamientos obtenidos de plantas de vid. En campo, Khanzada *et al.* (2005), Zhang y Swingle (2005) y Zhang y Timmer (2007) demostraron que benomil, carbendazim y tiofanato-metil fueron los mejores tratamientos para el control del declinamiento del mango, y pudrición de frutos y tallos de cítricos causadas por *L. theobromae*.

La incidencia de muerte descendente de varetas de zapote mamey inducida por *L. theobromae* durante la propagación por injerto, cuando no se aplican medidas profilácticas, es muy alta (> 70%) en Guerrero, México (Tovar-Pedraza *et al.*, 2010). Existen pocos reportes relacionados con el tratamiento profiláctico químico del material propagativo por injerto para este frutal (Umaña, 2000), y son ausentes respecto al uso de tratamientos profilácticos físicos, por lo cual, en este estudio se planteó: Evaluar la efectividad en vivero de dos fungicidas (profilaxis química) y el efecto del lavado de varetas (profilaxis física), para prevenir infecciones causadas por este patógeno durante la propagación por injerto del

zapote mamey en Alpoyeca, Gro., México. Además de evaluar la efectividad *in vitro* de 12 fungicidas contra *L. theobromae*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento

Se utilizó el aislamiento CBOO7 de *L. theobromae*, de la colección del Herbario “CMPH” del Colegio de Postgraduados, Instituto de Fitosanidad, Orientación en Fitopatología, Campus Montecillo, Texcoco Edo. de Méx., México. Este aislamiento utilizado para pruebas con fungicidas en vivero e *in vitro*, se obtuvo a partir de varetas injertadas de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore y Stearn) con síntomas de muerte descendente y necrosis en el área de unión del injerto en Alpoyeca, Gro., México, 2008.

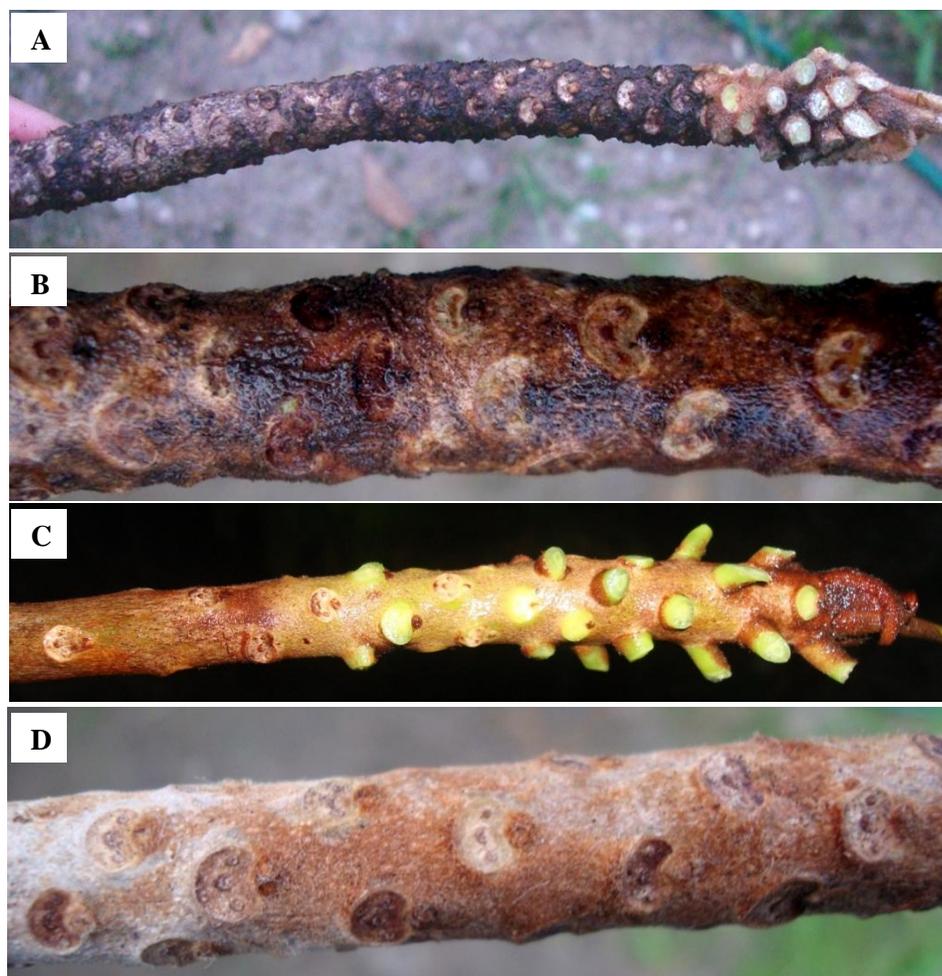
### Pruebas en vivero

Las pruebas se realizaron en un vivero comercial de zapote mamey (*P. sapota*) ubicado en Alpoyeca, Gro. México, durante las épocas de injertación de primavera (febrero- marzo) y otoño (octubre-noviembre) de 2008. Varetas con infección natural se usaron en las pruebas experimentales. Para cada periodo, los portainjertos se obtuvieron a partir de semillas de frutos maduros recién cosechados. Prácticas convencionales de nutrición y riego se aplicaron durante la etapa de desarrollo, hasta que las plantas alcanzaron 80 cm de altura y un mínimo de 2 cm de diámetro, en un periodo de 10-12 meses. Las varetas experimentales (reproductivas, rectas, de 25 cm de longitud, sin daños físicos, con yema latente y follaje maduro) se colectaron de un árbol de zapote mamey (*P. sapota*) de la

selección “El Mexicano” de aproximadamente 20 años de edad y con un porcentaje de prendimiento de 74% (Villegas y Mora, 2008). Las varetas colectadas en los meses de febrero y octubre se defoliaron manualmente (cortando el peciolo con tijera mecánica lo más cercano a la cicatriz foliar) y transportaron al vivero para su injertación. El experimento del tratamiento químico y físico fue llevado a cabo usando un diseño factorial.

**Profilaxis química.** Los tratamientos químicos ensayados fueron: tiabendazol (T1), mancozeb (T2), tiabendazol + mancozeb (T3) a dosis de 1 g de producto comercial por 1 L de agua. Un total de 16 varetas por tratamiento se trataron por inmersión en solución fungicida por 15 min. El tratamiento control o testigo (T4) constó de varetas inmersas en agua destilada estéril. Las varetas tratadas se escurrieron en un lugar sombreado por 15 min y el exceso de fungicida se eliminó usando papel absorbente. Una vez secas, se injertaron por la técnica de enchapado lateral, de acuerdo al procedimiento recomendado por Villegas y Mora (2008). Las plantas del experimento fueron inspeccionadas semanalmente y el efecto del control químico se evaluó 30 d posteriores al proceso de injertación en las dos épocas probadas.

**Profilaxis física.** El tratamiento profiláctico físico, consistió del lavado de 16 varetas experimentales usando una fibra natural y agua, para eliminar tejido muerto (pubescencia) y residuos orgánicos (Figura 1), previo al proceso de injerto por enchapado lateral. El tratamiento control constó de 16 varetas sin tratamiento de lavado. El experimento se realizó en dos épocas de injertación (primavera y otoño) de 2008 y en cada una el efecto del tratamiento físico se evaluó 30 d posteriores a la injertación.



**Figura 1. Tratamiento profiláctico físico en material propagativo de zapote mamey (*Pouteria sapota*) de la selección “El Mexicano”. (A) y (B) Varetas sin lavar mostrando abundante cantidad de contaminantes (polvo, residuos de tejido foliar y epidérmico, fumaginas). (C) y (D) Varetas lavadas. Alpoyeca, Gro., México. 2008.**

**Interacción entre tratamientos físico y químico.** Se utilizaron los tratamientos químicos T1, T2 y T3 (16 varetas por tratamiento). Posteriormente, los tratamientos químicos T1, T2 y T3 fueron repetidos, excepto que en este caso, las varetas fueron lavadas previamente a la inmersión en la solución fungicida. El experimento se realizó en las épocas de primavera y otoño de 2008, y en cada una, la evaluación se realizó 30 d posteriores a la injertación.

## **Prueba *in vitro***

**Fungicidas.** Formulaciones comerciales de 12 fungicidas (7 sistémicos y 5 de contacto), representando 10 grupos químicos se seleccionaron para pruebas *in vitro* de inhibición del crecimiento micelial de *L. theobromae* (Cuadro 1).

**Inhibición del crecimiento micelial.** Soluciones madre de 11 fungicidas se prepararon a una concentración de  $1000 \mu\text{g i.a.mL}^{-1}$  en agua destilada estéril, en contraste, la solución madre de tiabendazol se preparó en etanol al 95%. El volumen apropiado de cada solución madre se añadió a un matraz con medio papa-dextrosa-agar (PDA) (BD Bioxon<sup>®</sup>, Becton Dickinson) fundido a  $45\text{-}50^{\circ}\text{C}$  para proveer el rango final de concentraciones de 0.1, 1, 10 y  $100 \mu\text{g i.a mL}^{-1}$ . PDA sin fungicida se uso como control o testigo. Aproximadamente 20 mL de medio de cultivo + fungicida se vertieron dentro de cajas Petri (90 mm diámetro). Después de la solidificación, cada caja se incubó con un disco micelial de 5 mm de diámetro removido de los márgenes de un cultivo con crecimiento activo de *L. theobromae* en PDA de 4 días (d). Se usaron cuatro repeticiones por tratamiento. Las cajas Petri se incubaron a  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y el diámetro del crecimiento micelial se midió perpendicularmente cada 24 h hasta que la superficie de la caja control se cubrió completamente con el crecimiento micelial del hongo. El experimento completo fue realizado dos veces.

**Cuadro 1.** Fungicidas probados para inhibición *in vitro* del crecimiento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* aislado de varetas de zapote mamey (*Pouteria sapota*) con muerte descendente en Alpoyecá, Gro, México. 2009.

<b>Grupo químico</b>	<b>Ingrediente activo</b>	<b>Acción</b>	<b>i.a %</b>	<b>Formulación</b>
Anilino pirimidinas	Pirimetanil	Sistémica	54.6	SC <sup>a</sup>
Anilino pirimidinas/ Fenilpirroles	Ciprodinil + Fludioxinil	Sistémica	37.5 +25	WG <sup>b</sup>
Benzimidazoles	Tiabendazol	Sistémica	60	WP <sup>c</sup>
Cloronitrilos	Clorotalonil	Contacto	75	WP
Dicarboxamidas	Iprodiona	Contacto	50	WP
Ditiocarbamatos	Mancozeb	Contacto	80	WP
DMI <sup>d</sup> - Imidazoles	Prochloraz	Sistémica	42.1	EC <sup>e</sup>
DMI <sup>d</sup> - Triazoles	Tebuconazole	Sistémica	25	EW <sup>f</sup>
Ftalamidas	Captan	Contacto	50	WP
Inorganicos (Cupricos)	Hidróxido cúprico	Contacto	37.5	SC
Estrobirulinas /carboxamidas	Pyraclostrobin + Boscalid	Sistémica	25.2 +12.8	WG
Estrobirulinas (oximinoacetatos)	Kresoxim-metil	Sistémica	50	WG

<sup>a</sup> SC = Suspensión concentrada; <sup>b</sup> WG = Gránulos dispersables en agua; <sup>c</sup> WP = Polvo humectable ;  
<sup>d</sup> Inhibidores de la demetilación; <sup>e</sup> EC= Concentrado emulsificable; <sup>f</sup> EW=Emulsión aceite en agua.

## **Análisis estadísticos**

**Inhibición del crecimiento micelial.** En cada concentración se calculó la inhibición del crecimiento micelial en porcentaje respecto al crecimiento micelial de la colonia en el tratamiento control (PDA sin fungicida). Los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial se convirtieron a valores a Probit y trazaron contra los valores de  $\log_{10}$  de la concentración del fungicida. Con base en un análisis de regresión Probit, se calcularon los valores de las concentraciones efectivas  $EC_{50}$  y  $EC_{90}$ , que inhiben el 50% y 90% del crecimiento micelial, respectivamente. Los valores de  $EC_{50}$  y  $EC_{90}$  se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un diseño completamente aleatorio con el Modelo Lineal General (GLM) y las medias de los tratamientos se compararon utilizando la prueba (LSD) ( $P \leq 0.05$ ).

**Pruebas en vivero.** Los datos de incidencia fueron transformados al arcoseno [raíz cuadrada (incidencia)] para normalizar las varianzas antes del análisis. Las medias de los tratamientos se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando un diseño factorial y la prueba LSD ( $P \leq 0.05$ ).

Los análisis estadísticos de la evaluación en *in vitro* y en vivero, se realizaron con el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, version 9.1.3 SAS Institute Inc. 2007).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Prueba en vivero

**Profilaxis química.** El análisis de varianza (Cuadro 2) demostró que la inmersión de varetas en la solución de tiabendazol redujo significativamente la incidencia de la enfermedad, presentando la menor muerte de varetas (26.56%) comparado con el control (78.12%), coincidiendo con lo mencionado por Retief *et al.* (2006) y Gramaje *et al.* (2009), los cuales señalaron que las estrategias convencionales de control químico realizadas en viveros con plantas de vid, generalmente involucran la inmersión del material propagativo en soluciones fungicidas, con el fin de eliminar la fuente de inóculo presente sobre la superficie de este y/o limitar el crecimiento superficial fungoso durante el proceso de unión del injerto.

**Cuadro 2.** Incidencia promedio de muerte descendente de varetas de zapote mamey (*Pouteria sapota*) con infección natural por *Lasiodiplodia theobromae* y tratadas profilácticamente con fungicida durante los periodos de injertación de primavera y otoño en condiciones de vivero en Alpoyecá, Gro. México. 2008.

Tratamiento	Incidencia (%)
Mancozeb	39.06 bc
Tiabendazol	26.56 c
Mancozeb + tiabendazol	50.00 b
Agua (control)	78.12 a

\*Diferencia significativa mínima: Medias que presentan la misma letra, no difieren significativamente ( $P=0.05$ ).

**Profilaxis física.** El tratamiento de lavado redujo la incidencia de muerte descendente de injertos en 25 y 12.5%, respecto a las varetas sin este tratamiento, independientemente del periodo de injertación (Cuadro 3). Sin embargo, la reducción fue mayor (25%) en la injertación de primavera. Esta diferencia pudo deberse a que las varetas de otoño presentaron una mayor cantidad de contaminantes (polvo, residuos de tejido foliar y epidérmico, fumaginas, etc.), además de que la fuente de inóculo es más alta en este periodo, ya que Vásquez-López *et al.* (2009) reportaron que la mayor cantidad de conidios de *L. theobromae* capturados en trampas volumétricas en huertos de zapote mamey de Alpoyeca, Gro. México, se encontró en los meses de junio a noviembre. Una vez lavadas, las varetas perdieron el color negro superficial y mostraron el color natural (corteza café claro). Por lo que el lavado, como medida profiláctica, contribuye a reducir la cantidad de inóculo de hongos que se encuentra acumulado en los tricomas de las varetas de zapote mamey y que se incuban una vez que las varetas recién injertadas son cubiertas con una bolsa plástica que incrementa la humedad relativa hasta 100% por 3 o 4 semanas.

**Cuadro 3.** Incidencia de muerte descendente de varetas de zapote mamey (*Pouteria sapota*) con infección natural por *Lasiodiplodia theobromae* y tratadas profilácticamente con lavado durante los periodos de injertación de primavera y otoño en Alpoyeca, Gro, México. 2008.

<b>Periodo</b>	<b>Lavado</b>	<b>Incidencia (%)</b>
<b>Otoño</b>	<b>No</b>	93.75
	<b>Si</b>	81.25
<b>Primavera</b>	<b>No</b>	81.25
	<b>Si</b>	56.25

Los resultados anteriores coincidieron con Fourie y Halleen (2004, 2005 y 2006), quienes mencionaron que un programa de manejo integrado que incluya diferentes medidas de control, es más efectivo en reducir la incidencia de enfermedades causadas por patógenos fungosos que se incuban y penetran durante el proceso de propagación. En el caso del material propagativo de vid, se ha comprobado que los tratamientos en agua caliente antes del proceso de injertación, son efectivos en reducir la fuente de inóculo superficial de patógenos fungosos que causan enfermedades en plantas de viveros (Edwards *et al.*, 2004; Halleen *et al.*, 2007).

**Interacción entre tratamiento químico y físico.** Los resultados obtenidos a partir de la combinación de las medidas profilácticas físicas y químicas (Cuadro 4), mostraron que no hay interacción ( $P= 0.5609$ ) entre el periodo y el lavado de las varetas, por lo cual, la efectividad del lavado no depende del periodo en que este se realice. De igual manera, no se encontró interacción ( $P= 0.0731$ ) entre el periodo y el tratamiento químico, lo cual indicó que el tratamiento químico es efectivo sin importar el periodo en que se realice la injertación, como lo documentaron Fourie y Halleen (2004, 2005 y 2006) para el caso de material propagativo de vid. En contraste, se encontró interacción ( $P= 0.0197$ ) entre el tratamiento químico y el lavado, por lo que, la efectividad del tratamiento químico varía, dependiendo de si se lavó o no la vareta.

**Cuadro 4.** Significancia de las fuentes de variación para efectos de periodo de injertación y tratamientos físico y químico sobre la incidencia de muerte descendente de varetas de zapote mamey (*Pouteria sapota*) causada por *L. theobromae* en Alpayeca, Gro, México.

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Model</b>	18	0.50070014	<.0001
<b>Error</b>	45	0.07423260	
<b>Periodo (P)</b>	1	1.84877883	<.0001
<b>Lavado (L)</b>	1	0.76626832	0.0024
<b>Tratamiento (T)</b>	3	1.63549288	<.0001
<b>P X L</b>	1	0.02547623	0.5609
<b>P X T</b>	3	0.18416936	0.0731
<b>L X T</b>	3	0.26977946	0.0197
<b>Total</b>	63		

El lavado de varetas combinado con la inmersión en solución fungicida de tiabendazol, mostró una reducción de 34% en la incidencia de la enfermedad, con respecto a las varetas que únicamente recibieron el tratamiento de tiabendazol (Cuadro 5). Mientras que, la combinación de ambos tratamientos abatió la incidencia hasta 82% comparado con las varetas que no recibieron ningún tratamiento profiláctico, coincidiendo con lo reportado por Halleen *et al.* (2007) en material propagativo de vid, en el cual, la reducción en la incidencia de la enfermedades fue más consistente y notoria en el material propagativo que recibió la combinación de tratamiento físico y químico.

**Cuadro 5.** Incidencia de muerte descendente de varetas de zapote mamey (*Pouteria sapota*) con infección natural por *Lasiodiplodia theobromae* y con tratamientos profilácticos físico (lavado) y químico (fungicidas) durante los periodos de injertación de primavera y otoño en Alpayeca, Gro, México. 2008.

<b>Tratamiento físico (lavado)</b>	<b>Tratamiento químico (fungicida)</b>	<b>Incidencia</b>	<b>Pr &gt; F</b>
No	Mancozeb	44.4310897	<.0001
No	Tiabendazol	43.7500000	<.0001
No	Mancozeb + tiabendazol	46.8750000	<.0001
Si	Mancozeb	32.1981838	<.0001
Si	Tiabendazol	9.3750000	0.1582
Si	Mancozeb + tiabendazol	43.1250000	<.0001

De acuerdo a lo observado en las pruebas con plantas injertadas de zapote mamey, *L. theobromae* es un hongo que penetra a través los cortes (heridas) profundos y extensivos realizados en el material propagativo y en el portainjerto, lo cual coincidió con lo mencionado por Mohali *et al.* (2005); por esta razón, es de suma importancia, realizar medidas profilácticas para evitar la entrada de este patógeno durante la propagación vegetativa por injerto, ya que los efectos negativos de la enfermedad serán evidentes en los bajos prendimientos y muerte temprana de plantas jóvenes establecidas en los huertos nuevos.

### **Inhibición *in vitro* del crecimiento micelial (Figura 2)**

Con base en los valores calculados de EC<sub>50</sub> y EC<sub>90</sub> de los fungicidas probados (Cuadro 6), se observó que la mezcla preformulada de ciprodinil + fludioxinil fue el fungicida más efectivo. Sin embargo, la EC<sub>50</sub> y EC<sub>90</sub> no pudo calcularse, debido a que esta mezcla inhibió el 100% del crecimiento micelial de *L. theobromae* a la concentración probada más baja (0.1 µg i.a mL<sup>-1</sup>) (Figura 2B), razón por la cual, los datos de este tratamiento no se incluyeron en el ANOVA. El efecto de estas dos moléculas sobre *L. theobromae*, ha sido documentado en investigaciones previas. Por ejemplo, Wang *et al.* (2007) encontraron que la preformulación de ciprodinil + fludioxinil inhibió el crecimiento micelial de este hongo a una EC<sub>50</sub> de 0.0073 µg i.a mL<sup>-1</sup>. Mientras que Zhang (2007) concluyó que el fludioxinil tuvo buen control contra aislamientos del hongo obtenidos de frutos cítricos a una EC<sub>50</sub> de 0.012 µg i.a mL<sup>-1</sup>.

De manera similar, pyraclostrobin + boscalid, prochloraz y tebuconazol (Figuras 2C-2F) con valores EC<sub>50</sub> menores a 0.1 µg i.a mL<sup>-1</sup>, e iprodiona y tiabendazol, con EC<sub>50</sub> menores a 1 µg i.a mL<sup>-1</sup>, fueron los ingredientes activos más efectivos en reducir el crecimiento micelial de *L. theobromae*. Estos resultados coincidieron con los reportados por Wang *et al.* (2007), quienes reportaron que prochloraz, iprodiona y tebuconazol fueron los tratamientos más efectivos en inhibir el crecimiento micelial de dicho patógeno con EC<sub>50</sub> < 1 µg i.a mL<sup>-1</sup>.

Por otra parte, Bester *et al.* (2007), reportaron que prochloraz y tebuconazol a bajas concentraciones (EC<sub>50</sub> < 0.6 µg i.a mL<sup>-1</sup>) inhibieron el crecimiento micelial de aislamientos

de *L. theobromae* obtenidos de plantas de vid, mientras que kresoxim-metil, iprodiona y pirimetanil fueron inefectivos. Los resultados anteriores coincidieron con lo encontrado en el presente trabajo, excepto para el caso de iprodiona, el cual fue efectivo con un valor de EC<sub>50</sub> de 0.335 µg i.a mL<sup>-1</sup>. El resto de los fungicidas utilizados en esta prueba, tuvieron menor efectividad, con valores de EC<sub>50</sub> que fluctuaron de 1.8 a 12.34 µg i.a mL<sup>-1</sup>. En la mayoría de los fungicidas de contacto probados (captan, clorotalonil, hidróxido cúprico y mancozeb) la inhibición ocurrió a muy altas concentraciones (>7 µg i.a mL<sup>-1</sup>), tal y como lo mencionaron Khanzada *et al.* (2005) y Gud y Raut (2008) para el caso de aislamientos de *L. theobromae* obtenidos de tejidos infectados de mango.

**Cuadro 6.** Valores de EC<sub>50</sub> y EC<sub>90</sub> calculados para la inhibición *in vitro* del crecimiento micelial de *L. theobromae* en medio PDA mediante fungicidas.

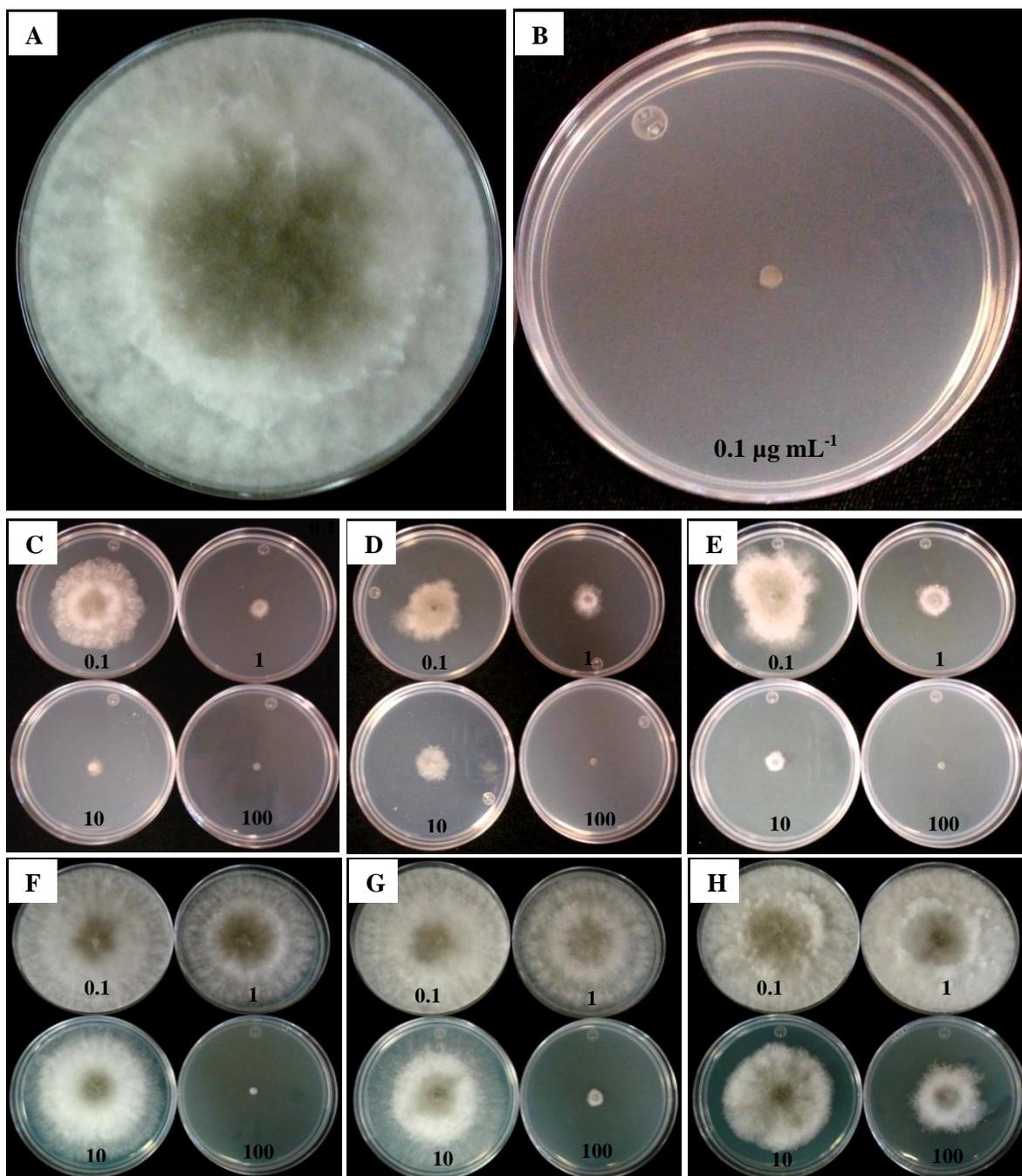
Tratamiento (i.a)	EC <sub>50</sub> (µg i.a mL <sup>-1</sup> )		EC <sub>90</sub> (µg i.a mL <sup>-1</sup> )	
	Rango	Media	Rango	Media
<b>Captan</b>	(9.2500 -16.955)	12.340a *	(235.68 – 922.27)	427.4b
<b>Ciprodinil/fludioxinil</b>	( nc )	< 0.1 (nc)	( nc )	< 0.1 ( nc )
<b>Clorotalonil</b>	(5.0625 - 12.033)	7.598b	(410.20 – 4922.02)	1109.5a
<b>Hidróxido cúprico</b>	(7.5325 -12.285)	9.590b	(75.43 – 162.74)	106.0b
<b>Iprodiona</b>	(0.2450 - 0.448)	0.335d	(4.90 – 11.18)	6.9b
<b>Kresoxim-metil</b>	(2.4925 - 5.140)	3.413c	(6.11 – 13.52)	8.5b
<b>Mancozeb</b>	(6.0350 - 9.143)	7.448b	(45.07 – 77.91)	57.3b
<b>Pirimetanil</b>	(1.4000 - 2.318)	1.800cd	(26.81 – 67.55)	40.5b
<b>Prochloraz</b>	(0.0050 - 0.035)	0.015d	(3.59 - 14.80)	6.4b
<b>Pyraclostrobin/boscalid</b>	(0.0019 - 0.045)	0.014d	(13.65 – 137.09)	33.7b
<b>Tebuconazole</b>	(0.0175 - 0.090)	0.048d	(4.57 – 15.14)	7.7b
<b>Tiabendazol</b>	(0.3275 - 0.558)	0.430d	(5.47 – 11.01)	7.6b

nc = no calculado.

\*Diferencia significativa mínima: medias con la misma letra no difieren significativamente en *P*=0.05.

Es importante indicar que se seleccionaron fungicidas de contacto y sistémicos pertenecientes a diferentes grupos químicos, debido a que los programas de aplicación que previenen poblaciones de patógenos resistentes a fungicidas, se basan en la rotación de ambos modos de acción, tal y como señalaron Denman *et al.* (2004).

Los fungicidas cyprodinil + fludioxinil, pyraclostrobin + boscalid, prochloraz y tebuconazol fueron los mejores fungicidas en inhibir el crecimiento micelial *in vitro* de *L. theobromae*, por lo cual, estos fungicidas pueden ser evaluados en pruebas adicionales para el control de este patógeno en viveros de zapote mamey.



**Figura 2.** Crecimiento micelial *in vitro* de *Lasiodiplodia theobromae* en medio de cultivo PDA + fungicida a diferentes concentraciones, 72 h después de la deposición del disco micelial. (A) Testigo (PDA sin fungicida) (B) Ciprodinil + fludioxinil (C) Pyraclostrobin + boscalid. (D) Prochloraz (E) Tebuconazol (F) Mancozeb (G) Clorotalonil (H) Captan (0.1, 1, 10, 100=  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

## REFERENCIAS

- Adisa, V.A.; Obinyereokwu, O.A. (1998). Studies on the latent infection of *Botryodiplodia theobromae* Pat. on *Citrus sinensis* (Li.) Osbeck fruit. *Mycopathologia* 102, 165-167.
- Alama, I.; Maldonado, E.; Rodríguez, G.E. (2006). *Lasiodiplodia theobromae* afectando el cultivo del Palto (*Persea americana*) en las condiciones de Piura-Peru. *Universalia* 11, 4-13.
- Bautista-Baños, S.; Díaz-Pérez, J.C.; Barrera-Nencha, L.L. (2002). Postharvest fungal rots of sapote mamey *Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn. *Postharvest Biology and Technology* 24, 197–200.
- Bester, W.; Crous, P.W.; Fourie, P.H. (2007). Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants against *Botryosphaeria* species. *Australasian Plant Pathology* 36, 73–77.
- Cardoso, J.E.; Maia, C.M.; Pessoa, M.N.G. (2002). Occurrence of *Pestalotiopsis psidii* and *Lasiodiplodia theobromae* causing stem rot of guava plants in the State of Ceará, Brazil. *Fitopatologia brasileira* 27, 320.
- Correia, M.S.; Costa, J.L.S. (2005). Dispersão anemófila do fungo *Lasiodiplodia theobromae* em plantações de coqueiro. *Fitopatologia Brasileira* 30, 150-154.
- Crous, P.W.; Slippers, B.; Wingfield, M.J.; Rheeder, J.; Marasas, W.F.O.; Philips, A.J.L.; Alves, A.; Burgess, T.; Barber P.; Groenewald J.Z. (2006). Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology* 55, 235–253.

- Darvas, J.M.; Kotze, J.M. (1987). Fungi associated with pre- and postharvest diseases of avocado fruit at Westfalia Estate, South Africa. *Phytophylactica* 19, 83–85.
- Denman, S.; Crous, P.W.; Sadie, A.; Wingfield, M.J. (2004). Evaluation of fungicides for the control of *Botryosphaeria protearum* on *Protea magnifica* in the Western Cape Province of South Africa. *Australasian Plant Pathology* 33, 97-102.
- Edwards, J.; Pascoe, I.G.; Salib, S.; Laukart, N. (2004). Hot treatment of grapevine cuttings reduces incidence of *Phaeomoniella chlamydospora* in young vines. *Phytopathologia Mediterranea* 43, 158–159.
- Fourie, P.H.; Halleen, F. (2004). Proactive control of Petri disease of grapevine through treatment of propagation material. *Plant Disease* 88, 1241–1245.
- Fourie, P.H.; Halleen, F. (2005). Integrated strategies for proactive management of grapevine trunk diseases in nurseries. *Phytopathologia Mediterranea* 44, 111.
- Fourie, P.H.; Halleen, F. (2006). Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 116, 255–265.
- Gómez-Jaimes, R.; Nieto-Ángel, D.; Téliz-Ortiz, D.; Mora-Aguilera A.; Martínez-Damián, M.T.; Vargas-Hernández, M. (2009). Manejo postcosecha y hongos asociados a la pudrición del fruto de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore y Stearn) en Guerrero, México. *Agrociencia* 43, 37-48.
- Gramaje, D.; Aroca, A.; Raposo, R.; García-Jiménez, J.; Armengol, J. (2009). Evaluation of fungicides to control Petri disease pathogens in the grapevine propagation process, *Crop Protection*. 28, 1091-1097.

- Gud, M.A.; Raut, S.P. (2008). Control of mango anthracnose and stem end rot fungi by fungicides and bio-agents. *Journal of Maharashtra Agricultural Universities* 33, 10-122.
- Halleen, F.; Fourie, P.H.; Crous, P.W. (2007). Control of black foot disease in grapevine nurseries. *Plant Pathology* 56, 637–645.
- Holliday, P. (1980). *Fungus Diseases of Tropical Crops*. Cambridge University Press. New York, USA.
- Johnson, G.I.; Mead, A.J.; Cooke, A.W.; Dean, J.R. (1992). Mango stem end rot pathogens–fruit infection by endophytic colonization of the inflorescence and pedicel. *Annals of Applied Biology* 120, 225–234.
- Khanzada, A.M.; Lodhi, A.M.; Shaazad, S. (2005). Chemical control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of mango decline in Sidh. *Pakistan Journal of Botany* 37, 1023-1030.
- Li, H.Y.; Cao, R.B.; Mu, Y.T. (1995). *In vitro* inhibition of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasiodiplodia theobromae*, and chemical control of gummosis disease of Japanese apricot and peach trees in Zhejiang Province, China. *Crop protection* 14, 187-191.
- Mahmood, A.; Saleem, A.; Akhtar, K.M. (2002). Mango decline in Pakistan and its management. *Pakistan Journal of Phytopathology* 14, 40-43.
- Mbenoun, M.; Momo, Z.E.H.; Samuels, G.; Nsougua, A.F.; Nyasse, S. (2008). Dieback due to *Lasiodiplodia theobromae*, a new constraint to cocoa production in Cameroon. *Plant Pathology* 57, 381.
- Meah, M.B.; Plumbley, R.A.; Jeger, M.J. (1991). Growth and infectivity of *Botryodiplodia theobromae* causing stem-end rot of mango. *Mycological Research* 95, 405-408.

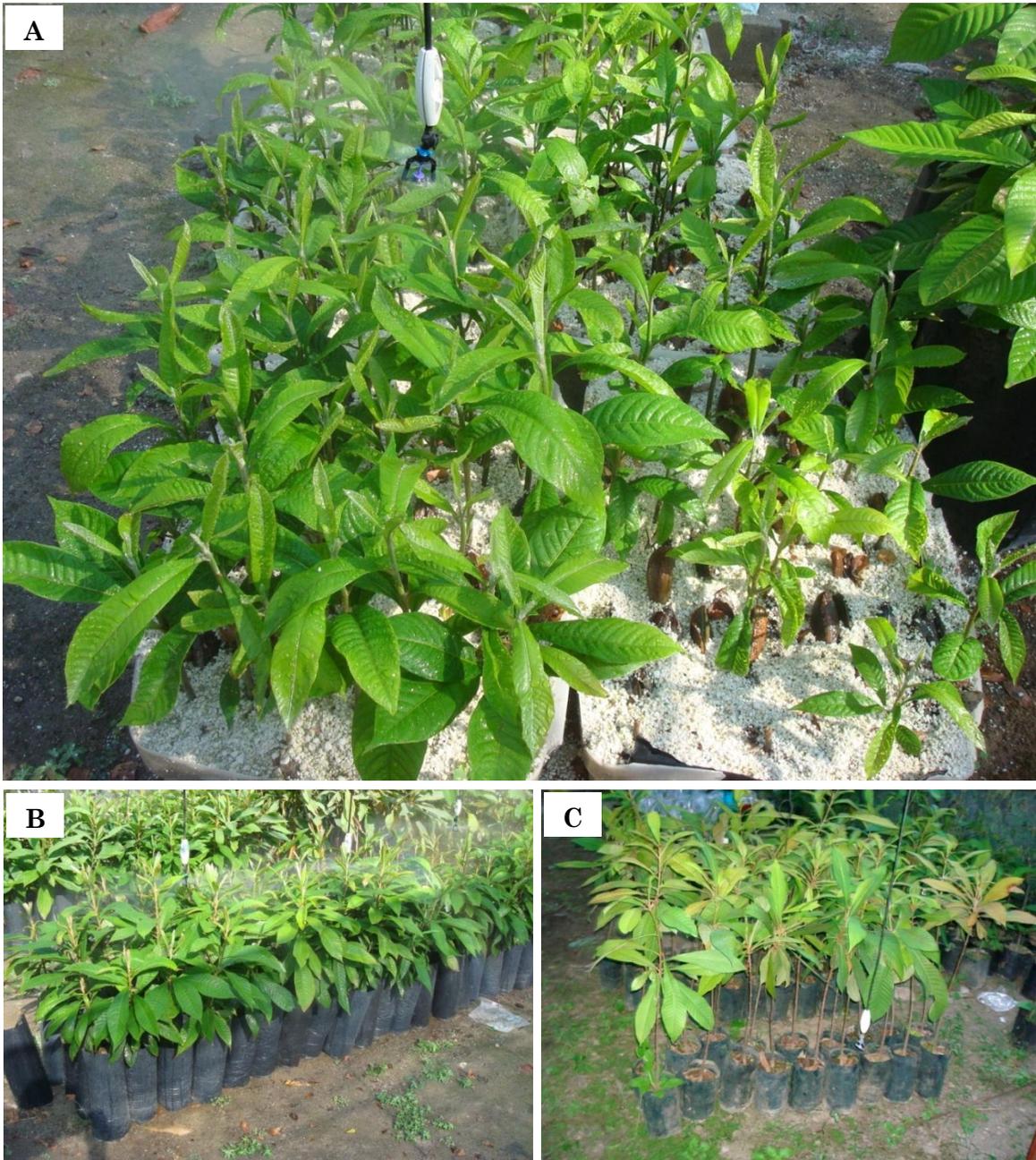
- Mohali, S.; Burgess, T.I.; Wingfield, M.J. (2005). Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *Forest Pathology* 35, 385–396.
- Ponte, J.J. (1985). Uma nova doença da ateira (*Annona squamosa*) e da gravioleira (*A. muricata*), causada por *Botryodiplodia theobromae*. *Fitopatologia Brasileira* 10: 689–691.
- Punithalingam, E. (1980). Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae* Pat. J. Cramer, Vaduz. *Bibliotheca Mycologica* 71, 1-123.
- Retief, E.; McLeod, A.; Fourie, P.H. (2006). Potential inoculum sources of *Phaeoconiella chlamydospora* in South African grapevine nurseries. *European Journal of Plant Pathology* 115, 331–339.
- Sangchote, S. (1991). Botryodiplodia stem end rot of mango and its control. *Acta Horticulturae* 291, 293–303.
- Sleppers, B.; Wingfield, M.J. (2007). Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 21, 90-106.
- Tovar-Pedraza, J.M., Mora-Aguilera, J.A.; Nava-Díaz, C.; Téliz-Ortiz, D.; Villegas-Monter, A.; Valdovinos-Ponce, G.; Hernández-Morales, J. (2010). Identification, pathogenicity and histopathology of *Lasiodiplodia theobromae* on mamey sapote grafts in Guerrero, Mexico. Enviado para publicación a *Brazilian Journal of Microbiology*.
- Vásquez-López, A.; Mora-Aguilera, J.A.; Cárdenas-Soriano, E.; Téliz-Ortiz, D. (2009). Etiología e histopatología de la muerte descendente de árboles de mamey

- (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore and Stearn) en el estado de Guerrero, México. *Agrociencia* 43, 717-728.
- Villegas, M.A.; Mora, A.J.A. (2008). Propagación vegetativa del zapote mamey. *In*: Alia T.I.; Villegas, M.A.; López, M.V.; Andrade, R.M.; Acosta, D.C.M.; Villegas, T.O.G.; Guillen, S.D. (eds). *El Zapote Mamey en México: Avances de Investigación*. Morelos, México 2008, 1-16.
- Wang, H.L.; Chen, P.H.; Ni, H.F.; Chen, R.S. (2007). Physiological characterization and screen of control chemicals for *Lasiodiplodia theobromae* of papaya. *Plant Pathology Bulletin* 16, 71-77.
- Zhang, J.; Swingle, P.P. (2005). Effects of curing on green mold and stem-end rot of citrus fruit and its potential application under Florida packing system. *Plant Disease* 89, 834–840.
- Zhang, J. (2007). The potential of a new fungicide fludioxonil for stem-end rot and green mold control on Florida citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 46, 262–270.
- Zhang, J.; Timmer, L.W. (2007). Preharvest application of fungicides for postharvest disease control on early season tangerine hybrids in Florida. *Crop Protection* 26, 886–893.

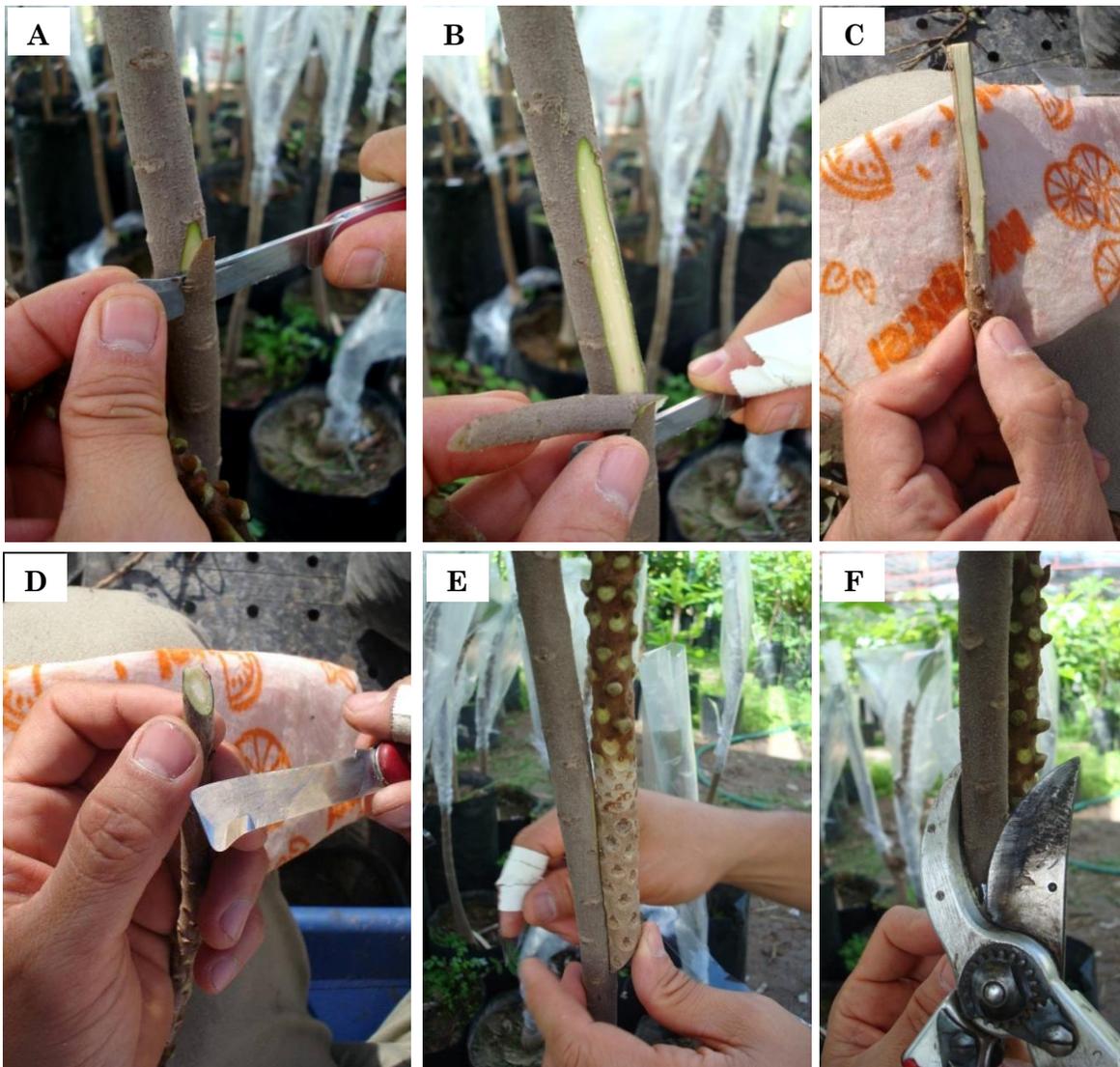
## CONCLUSIONES GENERALES

- Las pruebas de patogenicidad e identificación morfológica y molecular confirmaron que *Lasiodiplodia theobromae* es el agente causal de la muerte descendente de varetas injertadas de zapote mamey en vivero de Alpayeca, Gro. México.
- Los cortes histológicos de varetas infectadas artificialmente con *L. theobromae* mostraron picnidios en la peridermis; largas hifas ramificadas creciendo intracelularmente, principalmente en vasos del xilema y tejido parenquimatoso de la medula; células parenquimatosas de la corteza y floema colapsadas y necrosadas; células laticíferas, gran parte de los vasos del xilema y tejido parenquimatoso de la medula presentaron inclusiones rojas (posiblemente de naturaleza fenólica).
- Los cortes histológicos en varetas infectadas naturalmente mostraron inclusiones rojas (posiblemente de naturaleza fenólica) y presencia de hifas creciendo intracelularmente, principalmente en vasos del xilema y tejido parenquimatoso de la medula.
- La combinación de medidas profilácticas físicas (lavado de varetas) y químicas (tiabendazol  $1\text{ g L}^{-1}$ ) durante la propagación por injerto del zapote mamey, son necesarias para disminuir significativamente la incidencia de enfermedades en varetas, y por consiguiente, se aumenta el porcentaje de prendimiento de los injertos.
- Cyprodinil + fludioxinil, pyraclostrobin + boscalid, prochloraz y tebuconazol fueron los mejores fungicidas, al inhibir el crecimiento micelial *in vitro* de *L. theobromae* con valores de  $EC_{50} < 0.1\ \mu\text{g i.a mL}^{-1}$ , por lo cual, estos fungicidas pueden ser evaluados en pruebas adicionales para el control de este patógeno en injertos de zapote mamey.

## ANEXOS



**Anexo 1. Portainjertos de zapote mamey (*Pouteria sapota*) en vivero de Alpayeca, Gro. 2008. (A)** Plántulas de 3 semanas de edad en charolas germinadoras conteniendo agrolita. **(B)** Plantas de 3 meses de edad trasplantadas en bolsas de polietileno. **(C)** Plantas de 10 meses de edad con grosor adecuado (10-12 mm) para ser injertadas.



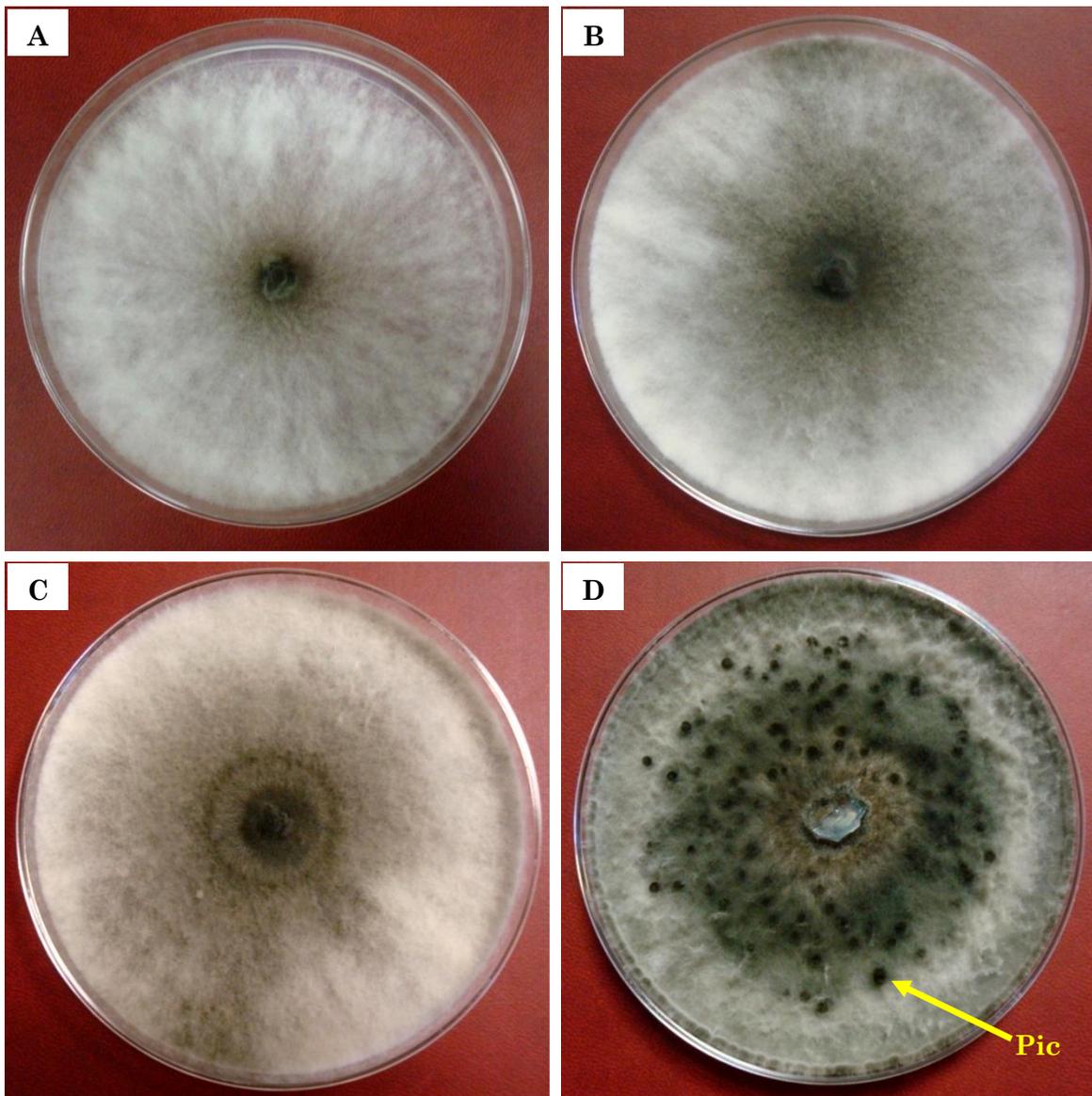
**Anexo 2. Proceso de injertación por enchapado lateral de plantas de zapote mamey (*Pouteria sapota*) en Alpoyecá, Gro. 2008. (A) y (B) Corte superficial en portainjerto. (C) Corte tangencial (4 - 5 cm) y (D) Corte opuesto en vareta. (E) Amarre de la vareta con el portainjerto, usando cinta plástica. (F) Corte del portainjerto arriba de la unión del injerto.**



**Anexo 3. Proceso de injertación por enchapado lateral y manejo de plantas de injertadas de zapote mamey (*Pouteria sapota*) en Alpoyecá, Gro. 2008. (A) Vista lateral de la unión del injerto amarrada con cinta plástica. (B) Vista lateral de una planta recién injertada. (C) Injerto cubierto con bolsa de plástico. (D) Plantas injertadas colocadas bajo malla sombra al 70%.**



**Anexo 4. (A) y (B)** Injertos de zapote mamey (*Pouteria sapota*), 30 días después del proceso de injertación por enchapado lateral en vivero de Alpoyeca, Gro. 2008.



**Anexo 5. Cultivo de *Lasiodiplodia theobromae* aislado de varetas injertadas de zapote mamey (*Pouteria sapota*) con muerte descendente en Alpoyecá, Gro. 2008. (A) Crecimiento de 1 d, (B) 3 d, (C) 5 d, (D) y 20 días con presencia de picnidios (Pic).**