



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA “PRESIDENTE JUÁREZ”

“IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DEL CÁNCER DEL TALLO DEL ARÁNDANO (*Vaccinium* sp.) Y BÚSQUEDA DE FUENTES DE RESISTENCIA GENÉTICA”

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ALEJANDRA MONDRAGÓN FLORES

TUTOR: DR. JOSÉ LÓPEZ MEDINA

CO-TUTOR: DRA. MARIBEL GUTIÉRREZ CONTRERAS

Uruapan Michoacán, Mayo del 2011



El presente trabajo de investigación forma parte de los proyectos titulados: “***Diagnóstico de las enfermedades fungosas del arándano en Michoacán y búsqueda de fuentes de resistencia genética al patógeno de mayor importancia económica***” y “***Caracterización morfológica y molecular del agente causal del cáncer del tallo en arándano en Michoacán***”, los cuales fueron financiados por la Coordinación de La Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), así como del proyecto P/PIFI 2008-2009-16MSU0014T-03 DES 196 Ciencias Agropecuarias-Uruapan y desarrollado en las instalaciones de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, dependiente de la UMSNH y bajo la dirección del Dr. José López Medina y la Dra. Maribel Contreras Gutiérrez.

DEDICATORIA

Con todo mi amor a mis hijos Fernando y Luz Paulina, los seres más importantes de mi vida quienes me dan la fuerza necesaria para perseguir y cumplir mis objetivos.

A mi madre Ma. Guadalupe Flores M. quién me ha demostrado con su ejemplo la importancia del trabajo, la constancia y la honestidad para lograr las metas.

Con nostalgia a mi padre Antonio Mondragón S. (q.e.p.d.) quien a pesar de su ausencia física, me brinda la compañía de su energía.

A mis hermanos José Antonio, Carlos, Gabriel, Javier y Cristián, por brindarme siempre su apoyo y compartir con entusiasmo mis logros, aliviando de esta forma el peso de la distancia que nos separa y de la soledad que suele ser mi compañera.

A todos mis sobrinos, en especial a mis dos nuevas sobrinas: Crystal de Mar y Dayana Giselle, bienvenidas a la familia.

A mis tíos Ma. de la Luz Flores y Vicente Guerrero O., de quienes siempre he recibido afecto, y permanecen presentes en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme vida y salud y de esta forma permitirme cumplir uno más de mis objetivos.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por el apoyo institucional que siempre me ha brindado.

A la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” por facilitar el uso de instalaciones e infraestructura para el desarrollo de esta investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca de manutención otorgada, que permitió dedicar tiempo completo a la investigación.

A la Coordinación de Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por el apoyo financiero otorgado.

Mi sincero agradecimiento a mi tutor el Dr. José López Medina por brindarme su tiempo, apoyo, consejos y confianza, que permitieron llevar a cabo este trabajo de una manera agradable.

Asimismo agradezco sinceramente a la Dra. Maribel Gutiérrez Contreras, por su dedicación constante al desarrollo del proyecto quien compartió conmigo experiencias laborales y personales.

Al Dr. Salvador Ochoa Ascencio, por permitir desarrollar la investigación en el laboratorio que tiene a su cargo, así como por participar de forma activa en todo el proyecto, siendo clave en la parte molecular y estadística de la investigación.

A la Dra. Sylvia Fernández Pavía, quién me ha brindado su confianza y apoyo incondicional desde el inicio del proyecto así como por su buena disposición a participar siempre que se le solicitó.

De igual forma a la Dra. Tztzqui Chávez Bárcenas por sus excelentes observaciones y aportaciones que permitieron mejorar el trabajo.

Al Ingeniero. Avimael Campos Velázquez, quien puso a mi disposición su habilidad para la fotografía, siendo el autor de gran parte de las fotografías expuestas en este trabajo.

A los académicos que durante el curso de la maestría participaron impartiendo materias, ayudando así a mi formación.

A mis compañeros de generación, Judith Lúa Aldama, Julieth Pantoja y Antonio Rodríguez, que me permitieron compartir con ellos la experiencia de cursar un posgrado.

A los Ingenieros Luis Antonio Escalera Villanueva, Leopoldo Escalera Villanueva, Luis García Escalera y Saúl Medina Villanueva, propietarios de las huertas de arándano donde se llevaron a cabo los muestreos, por permitirme el acceso a su propiedad y facilitando de esta manera la investigación.

A los Ingenieros (as). Gloria Cruz Francisco, Marcelino Cortez Rojas, Ana Gabriela Fernández Meraz, José Ramón Saucedo Cárabes y a los estudiantes que prestaron su servicio social Carlos Velázquez Piña, Carlos Guillermo Vélez Vázquez, Fernando Torres Mondragón, Miriam Mariel Talavera Reyes, Marisol y Alma Amezcua, por su valiosa ayuda en actividades de laboratorio, campo e invernadero.

Gracias a todas la personas que estuvieron pendientes de mí y me brindaron apoyo moral durante el desarrollo de la investigación.

.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT.....	3
III. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
IV. HIPÓTESIS.....	11
V. OBJETIVOS.....	12
VI. RESULTADOS.....	13
 CAPÍTULO I	
IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS ASOCIADOS A LA FILOSFERA DEL ARÁNDANO EN LOS REYES MICHOACÁN	13
Resumen.....	13
1.1. Introducción.....	16
1.2. Materiales y métodos.....	20
1.3. Resultados.....	22
1.4. Discusión.....	34
1.5. Conclusiones.....	37
1.6. Literatura citada.....	38
 CAPÍTULO II	
IDENTIFICACIÓN DE <i>Botryosphaeria parva</i> CAUSANTE DEL CÁNCER DEL TALLO EN ARÁNDANO EN LOS REYES, MICHOACÁN	43
Resumen.....	43
2.1. Introducción.....	45
2.2. Materiales y métodos.....	50

2.3.	Resultados.....	55
2.4.	Discusión.....	62
2.5.	Conclusiones.....	65
2.6.	Literatura citada.....	66
 CAPÍTULO III		
	RESPUESTA DE 24 FAMILIAS DE SEGREGANTES DE ARÁNDANO	71
	(<i>Vaccinium</i> sp.) A INOCULACIONES ARTIFICIALES DE	
	<i>Botryosphaeria parva</i>	
	Resumen.....	71
3.1.	Introducción.....	73
3.2.	Materiales y métodos.....	80
3.3.	Resultados.....	83
3.4.	Discusión.....	89
3.5.	Conclusiones.....	91
3.6.	Literatura citada.....	93
VII	DISCUSIÓN GENERAL.....	96
VIII	PERSPECTIVAS.....	101
IX	BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA.....	102
X	ANEXOS.....	106

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO I

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS ASOCIADOS A LA FILOSFERA DEL ARÁNDANO EN LOS REYES MICHOACÁN

Cuadro 1.	Hongos aislados de la filósfera de plantas colectadas en Los Reyes, Michoacán. Órgano y síntoma al que se encontraron asociados y características morfológicas usadas para su identificación	23
Cuadro 2.	Incidencia estacional de las enfermedades fungosas de la filósfera del arándano durante el período 2009- 2010 en Los Reyes Michoacán	25

CAPÍTULO II

IDENTIFICACIÓN DE *Botryosphaeria parva* AGENTE CAUSAL DEL CÁNCER DEL TALLO EN ARÁNDANO EN LOS REYES, MICHOACÁN

Cuadro 1.	Diámetro de crecimiento y número de picnidios de <i>Botryosphaeria parva</i> desarrollados en 0.8 cm ² en cada uno de los medios evaluados	59
Cuadro 2.	Accesiones de secuencias de <i>Botryosphaeria</i> utilizadas para el alineamiento múltiple y su identidad con las secuencias de los aislados B1097 y B1098	61

CAPÍTULO III

RESPUESTA DE 24 FAMILIAS DE SEGREGANTES DE ARÁNDANO (*Vaccinium* sp.) A INOCULACIONES ARTIFICIALES DE *Botryosphaeria parva*

Cuadro 1.	Familias de segregantes de arándano utilizadas en la prueba de resistencia y su respuesta a la infección de <i>Botryosphaeria parva</i>	85
Cuadro 2.	Respuesta de los tipos de arándano a inoculaciones artificiales de <i>Botryosphaeria parva</i>	88

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS ASOCIADOS A LA FILOSFERA DEL ARÁNDANO EN LOS REYES MICHOACÁN

Figura 1.	Pudrición de fruto. A. Pudrición seca B. Colonia y C. Conidios de <i>Alternaria</i> sp.; D. Pudrición suave E. Colonia y F. Conidios de <i>Colletotrichum</i> sp.	22
Figura 2.	Mancha plateada. A. Síntoma foliar B. Colonia y C. Conidios de <i>Alternaria</i> sp.; D. Colonia y E. Conidios de <i>Colletotrichum</i> sp.; F. Colonia y G. Conidios de <i>Neofusicoccum</i> sp.; H. Colonia y I. Conidios de <i>Stemphyllium</i> sp.	26
Figura 3.	Síntomas foliares. A. Mancha marrón B. Colonia y C. Conidios de <i>Colletotrichum</i> sp.; D. Síntoma peca de la hoja E. Colonia y F. Conidios de <i>Alternaria</i> sp.; G. Roya H. Uredio y I. Urediosporas de <i>Pucciniastrum</i> sp.	27
Figura 4.	Síntoma mancha cobriza. A. Daño foliar B. Colonia y D. Picnidios de <i>Phyllosticta</i> sp.; C. Colonia y E. Conidios de <i>Colletotrichum</i> sp.	28
Figura 5.	Tizón foliar. A. Daño foliar B. Colonia y D. Conidios de <i>Pestalotiopsis</i> sp.; C. Colonia y E. Conidios de <i>Colletotrichum</i> sp.	29
Figura 6.	Tizón del tallo. A. Síntoma B. Colonia y C. Conidios de <i>Colletotrichum</i> sp.; D. Colonia y E. Conidios de <i>Pestalotiopsis</i> sp.	30
Figura 7.	Costra del tallo. A. Síntoma B. Colonia y C. Conidios de <i>Colletotrichum</i> sp.; D. Colonia y E. Conidios de <i>Curvularia</i> sp.	30
Figura 8.	Cáncer del tallo del arándano. A. Síntoma B. Colonia y C. Conidios de <i>Colletotrichum</i> sp.; D. Colonia y G. Conidios de <i>Alternaria</i> sp.; E. Colonia y F. Picnidio de <i>Phoma</i> sp.; H. Colonia I. Conidios y J. Picnidio de <i>Neofusicoccum</i> sp.; K. Colonia L. Conidios y M. Picnidio de <i>Phomopsis</i> sp.	31

Figura 9.	Tizón de yemas. A. Yemas dañadas B. Colonia y E. Picnidio de <i>Phoma</i> sp.; C. Colonia y D. Conidios de <i>Bipolaris</i> sp.; F. Peritecio de <i>Chaetomium</i> sp.	32
Figura 10.	Cáncer de yemas. A. Síntoma B. Colonia y C. Conidios de <i>Colletotrichum</i> sp. D. Ascas de <i>Glomerella</i> sp.	33

CAPÍTULO II

IDENTIFICACIÓN DE *Botryosphaeria parva* AGENTE CAUSAL DEL CÁNCER DEL TALLO EN ARÁNDANO EN LOS REYES, MICHOACÁN

Figura 1.	Síntomas de cáncer en arándano. A. Necrosis de la corona B. Defoliación C. Abanderamiento, síntoma típico del cáncer del tallo D. Tizón de punta E. Cáncer en ramas	51
Figura 2.	Morfología de la colonia y estructuras reproductivas asexuales de <i>Botryosphaeria parva</i> desarrolladas en PDA. A. Colonia a los cinco B. Nueve y C. 14 días de edad D. Picnidio E. Células conidiógenas F. Conidios	56
Figura 3.	Crecimiento radial de la colonia de <i>Botryosphaeria parva</i> incubada a seis temperaturas. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha = 0.05$)	57
Figura 4.	Desarrollo de picnidios de <i>Botryosphaeria parva</i> en tallos de arándano. A. Tallos inoculados con <i>B. parva</i> B. Picnidios parcialmente inmersos en el tejido y C. Corte transversal de un picnidio D. Conidios	58
Figura 5.	Producción de picnidios de <i>Botryosphaeria parva</i> en medios de cultivo. A. PDA, B. Agar-agua C. V8 D. Infusión de fruto de arándano E. Pulpa de fruto F. Infusión de tallo G. Infusión de tallo dextrosa y H. Extracto de malta	59
Figura 6.	Producto de amplificación del gen 5.8S del rDNA y de los espaciadores internos transcritos ITS1 e ITS2, del aislado 1098 de <i>Botryosphaeria</i>	60

obtenidos con los primers ITS1/ITS4

Figura 7.	Cladograma, basado en máxima parsimonia, análisis del espacio interno transcrito ITS 1/ ITS4	61
-----------	--	----

CAPÍTULO III

RESPUESTA DE 24 FAMILIAS DE SEGREGANTES DE ARÁNDANO (*Vaccinium* sp.) A INOCULACIONES ARTIFICIALES DE *Botryosphaeria parva*

Figura 1.	Respuesta de 24 familias de arándano a infecciones de <i>Botryosphaeria parva</i> cinco semanas después de la inoculación	83
Figura 2.	Respuesta de 24 familias de arándano a infecciones artificiales de <i>Botryosphaeria parva</i> cinco semanas después de la inoculación. Media de longitud de lesión. Familias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey=0.05). Las barras representan el error estándar de la media	84
Figura 3.	Respuesta de 24 familias de arándano a infecciones de <i>Botryosphaeria parva</i> cinco semanas después de la inoculación. Los círculos representan la media de longitud de lesión; las líneas representan los intervalos de confianza al 95 %. Familias con círculos negros son diferentes del promedio (P=0.05)	86

I. RESUMEN GENERAL

IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DEL CÁNCER DEL TALLO DEL ARÁNDANO (*Vaccinium* spp.) Y BÚSQUEDA DE FUENTES DE RESISTENCIA GENÉTICA

El arándano (*Vaccinium* spp.), por su elevado valor nutricional y propiedades nutraceuticas, ha logrado posicionarse como uno de los frutales de mayor importancia en el mundo. Los principales países productores de arándano son Estados Unidos y Canadá; contribuyen también de manera importante Chile, Argentina, Australia y Nueva Zelanda. Se predice que para 2013 la superficie mundial cultivada se duplicará. México figura como uno de los países jóvenes en la producción de arándano, con plantaciones en los estados de Jalisco, Michoacán, y Puebla, entidades en las que se estima una superficie aproximada de 500, 200 y 60 ha, respectivamente. Este cultivo se ve afectado en su producción por la presencia de plagas y enfermedades de diversa índole, entre las que destacan las de origen fungoso. En esta investigación se planteó el objetivo general de identificar al agente causal de la enfermedad fungosa de mayor importancia económica para el arándano en Los Reyes, Michoacán y determinar la respuesta de segregantes de tipo arbustivo a inoculaciones artificiales del patógeno.

Durante el período 2009-2010 se colectaron órganos de la filósfera de la planta con síntomas atribuidos a patógenos de origen fungoso. Para la identificación a nivel de género de los hongos aislados, se consideró el tipo de micelio y forma de esporas, así como forma, apariencia y color de las colonias desarrolladas en PDA. La incidencia de cada enfermedad se determinó con un muestreo simple aleatorio en el 5 % de la población. Las enfermedades observadas presentaron incidencia variable de 1 al 100 %. Se aislaron e identificaron 12 hongos asociados a 13 patologías, incluyendo pudrición de fruto (*Alternaria* y *Colletotrichum*), manchas foliares (*Alternaria*, *Colletotrichum*, *Neofusicoccum*, *Pestalotiopsis*, *Phyllosticta*, *Stemphyllium*), roya (*Pucciniastrum*), atizonamiento y cáncer del tallo (*Alternaria*, *Bipolaris*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Neofusicoccum*, *Phomopsis*,

Pestalotiopsis, *Phoma*) y tizón de yemas (*Chaetomium*, *Phoma*). La roya fue el síntoma con la mayor incidencia promedio (84.39 %), mientras que *Colletotrichum* fue el hongo aislado con mayor frecuencia, seguido de *Alternaria*. Con base en la afectación del cultivo, el cáncer del tallo destacó como la enfermedad de mayor impacto.

La identificación de la especie causante del cáncer del tallo se basó en morfología de la colonia y conidios y la amplificación por PCR del rDNA (ITS1, gen 5.8S, ITS2). Los resultados de la secuenciación del DNA confirmaron a *Botryosphaeria parva* como agente causal del cáncer del tallo. Plantas sanas de 24 familias de segregantes fueron inoculadas con discos de micelio de colonias monospóricas de *B. parva* y mantenidas en cámara húmeda. La resistencia relativa de las familias se determinó cinco semanas después de la inoculación mediante la longitud de lesión (LL). Las familias fueron categorizadas como resistentes, susceptibles o muy susceptibles mediante una prueba de *t* con base en la longitud de lesión. Se determinaron componentes de varianza para calcular la heredabilidad de la resistencia a la infección por *B. parva*

La longitud de lesión varió de 0 a 257 mm, observándose gran variación entre y dentro de familias. Las familias T-451, Climax, F-105 y Austín se agruparon como muy susceptibles (LL >50 mm); Alapha, Onslow, MS-635, Tifblue, Ira, T-431, T- 584, Montgomery, MS- 250, Premier y Summit como susceptibles (LL de 30.25 a 49.72 mm). Las familias A-494, A-272, Ozarkblue, Duke, Early Dawn, A4, A-265, G-615 y Puru se comportaron como resistentes (LL de 17.80 a 29.67 mm). La heredabilidad de la resistencia relativa al cáncer del tallo resultó alta (76 %), sugiriendo mayormente efectos aditivos.

Los resultados de esta investigación permitieron identificar las enfermedades presentes en la filósfera del arándano en Los Reyes, Michoacán así como materiales resistentes al cáncer del tallo. Este conocimiento, junto con el hallazgo de altos valores de heredabilidad, puede servir como base para la implementación de un programa de mejoramiento genético tendiente a obtener variedades de arándano resistentes a *B. parva*.

IDENTIFICATION OF THE BLUEBERRY (*Vaccinium* spp.) STEM CANKER CAUSING AGENT AND SEARCH FOR SOURCES OF GENETIC RESISTANCE

II. GENERAL ABSTRACT

Due to its high nutritional value and nutraceutical properties, blueberry (*Vaccinium* spp.) has become one of the most important fruit crops worldwide. The main blueberry producing countries are the United States of America and Canada; Chile, Argentina, Australia and New Zealand also have an important contribution to blueberry production. It is forecasted that in 2013 world total blueberry acreage will be duplicated. Mexico stands as one of newest blueberry producing countries, with plantings taking place in the States of Jalisco, Michoacan, and Puebla, where approximately 500, 200 and 60 ha are respectively established. Blueberry is afflicted by pests and diseases of different kinds; fungal diseases are among the main threats this crop face. The general objective of this research was to identify the causing agent of the economically most important disease of blueberry in Los Reyes, Michoacan and to evaluate the response of blueberry seedling of different types to artificial inoculations with that pathogen.

During 2009 and 2010, different phyllosphere blueberry tissues showing fungal-causing symptoms were collected. For identification of the isolated fungi at the genera level, mycelia type, spore shape, as well as colony shape, appearance and color developed on PDA were taken into consideration. Each symptom's incidence was determined by randomly sampling 5% plant population of production fields. Observed diseases showed an incidence varying from 1% to 100 %. Twelve fungi associated to 13 different diseases were isolated and identified, including fruit rots (*Alternaria* and *Colletotrichum*), leaf spots (*Alternaria*, *Colletotrichum*, *Neofusicoccum*, *Pestalotiopsis*, *Phyllosticta*, and *Stemphyllium*), leaf rust (*Pucciniastrum*), stem canker and smut (*Alternaria*, *Bipolaris*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Neofusicoccum*, *Phomopsis*, *Pestalotiopsis*, and *Phoma*), and bud blight (*Chaetomium* and *Phoma*). Leaf rust showed the highest average incidence (84.39 %), while *Colletotrichum* was the most frequently isolated fungus followed by *Alternaria*. Based on the degree of damage caused on blueberry plantings, stem canker was the most impacting disease.

The identification the fungal species causing stem canker, was based on colony and conidia morphology along with rDNA ((ITS1, gen 5.8S, ITS2) amplification by PCR were used. Both morphological traits and DNA sequencing confirmed *Botryosphaeria parva* as the blueberry stem canker causing agent. Healthy plants of 24 seedling families of different blueberry types were inoculated with monosporic *B. parva* mycelium discs followed by incubation in moist chamber. Relative resistance of seedling families was determined by measuring lesion length (LL) five weeks after inoculation; LL was transformed to a logarithmic scale in order to perform variance analysis and mean separations; 95 % confidence intervals were established for means; a *t* test was performed to categorize families. Variance components were calculated in order to estimate heritability of lesion response. LL varied from 0 to 257 mm, with much variation among and within families. T-451, Climax, F-105 and Austin were grouped as very susceptible families (LL >50 mm); Alapha, Onslow, MS-635, Tifblue, Ira, T-431, T- 584, Montgomery, MS- 250, Premier and Summit were grouped as susceptible (LL = 30.25 to 49.72 mm); A-494, A-272, Ozarkblue, Duke, Early Dawn, A4, A-265, G-615 and Puru were classed as resistant (LL = 17.80 to 29.67 mm). Heritability estimates for relative resistance to stem canker was high (76 %), with additive effects playing a major role.

A major result of this research was the identification of genotypes showing resistance to the most important disease affecting blueberry production in Los Reyes, Michoacan. This result, along with the finding of high heritability estimates (76 %) for relative resistance, may enhance the implementing of a breeding program aimed at obtaining resistant blueberry varieties to *B. parva* in the near future.

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

El arándano pertenece al género *Vaccinium* dentro de la familia de las Ericáceas; es una especie arbustiva, leñosa y perenne originaria del hemisferio Norte, donde crece asociada a bosques de coníferas (Galletta y Ballington 1996). Esta frutilla, por su elevado valor nutricional y propiedades nutraceuticas, ha logrado posicionarse como uno de los frutales de mayor importancia en el mundo. Para 2008 la superficie cultivada con esta especie fue de 74,015 ha y se cosecharon 329,147 t de fruta (FAO 2010), lo que representó un aumento del 12.4 % en superficie establecida y 47.2 % en volumen de producción con respecto a lo reportado para 2007 por Lehnert (2008). Los principales países productores de arándano son Estados Unidos y Canadá; contribuyen de manera importante Chile, Argentina, Australia y Nueva Zelanda (FAO 2010). Se predice que la superficie global cultivada con arándano se duplicará para los años 2012-2013 (Strik y Yarborough 2005).

México es uno de los países donde el arándano ha sido introducido, principalmente en los estados de Jalisco, Michoacán y Puebla, entidades en las que se estima una superficie aproximada de 500, 200 y 60 ha, respectivamente (J. López Medina, comunicación personal). En Jalisco y Michoacán las plantaciones fueron establecidas a partir del año 2003, y dadas las condiciones agroclimáticas propicias para la producción de fruta fresca, el interés en estas entidades por este frutal va en constante aumento (J. López Medina, comunicación personal).

El género *Vaccinium* presenta más de 26 especies descritas, pero solamente tres de ellas son consideradas de importancia comercial: *V. corymbosum* (arándano alto o arbusto del norte), *V. angustifolium* (arándano bajo o de matorral) y *V. ashei* (arándano “ojo de conejo”). Dos nuevos tipos de arándano, desarrollados por hibridación entre *V. corymbosum*, *V. angustifolium* y *V. ashei* o por hibridación de éstas con especies silvestres, son el arándano medio-alto y el arándano alto del sur o arbusto del sur, resultado de cruces entre *V. corimbosum*, *V. ashei*, *V. darrowi* y *V. tenellum* (Galletta y Ballington 1996).

El arándano alto o arándano arbustivo del norte (*Vaccinium corymbosum* L.), se caracteriza por desarrollar una coloración rojiza de sus hojas durante el otoño; posee tallos erectos no rizomatosos y una raíz fibrosa incapaz de penetrar suelos pesados; el periodo de desarrollo del fruto es corto, en promedio 90 días desde la floración a la maduración (Galletta

y Ballington 1996). Las plantas varían en altura desde 1.5 hasta 7.0 m; pero las formas cultivadas no rebasan los 2.5 m (Gough 1994). Esta especie es tetraploide ($2n = 4x = 48$) (Luby *et al.*, 1990). Normalmente, las plantas de este tipo de arándanos requieren al menos 800 horas de frío para el rompimiento de sus yemas durante la primavera (Eck *et al.* 1990).

Arándano bajo o arándano de matorral (*Vaccinium angustifolium* Ait.). Esta especie es también tetraploide ($2n = 4x = 48$), los tallos alcanzan alturas menores de 0.5 m y las plantas son típicamente rizomatozas (Galletta y Ballington 1996). Los rizomas alcanzan generalmente de 3 a 6 mm de diámetro, su hábito de crecimiento es sigmoidal y la mayor parte se localiza entre 5 y 25 mm bajo la superficie del suelo; la mayoría de los brotes se desarrollan a partir de yemas en dormancia localizadas cerca de la punta del rizoma (Eck *et al.* 1990). Un rasgo particular de este tipo de arándanos es que su producción se basa principalmente en el manejo de campos silvestres (no plantados por el hombre), los cuales se queman o podan a ras del suelo en ciclos bianuales (Galletta y Ballington 1996). La producción comercial está confinada mayormente a las áreas de Maine, Quebec y las provincias marítimas de Canadá (Luby *et al.* 1990).

El arándano “ojo de conejo” (*Vaccinium ashei* Reade), es una especie hexaploide ($2n = 6x = 72$). Las plantas pueden variar en altura de 2 a 4 m, aunque en algunos casos pueden alcanzar hasta 10 m; se caracterizan por formar principalmente coronas, aunque pueden también emitir chupones en cierto grado (Luby *et al.* 1990). Esta especie ha alcanzado popularidad como frutal debido a que presenta varias ventajas sobre los arándanos altos; entre algunas de estas ventajas están: tolerancia a temperaturas altas, a la sequía, a varias enfermedades fungosas y a variaciones en pH y tipos de suelo; bajo requerimiento de frío; frutos firmes, de vida duradera y cicatriz pequeña al desprenderse del pedúnculo. Sin embargo, algunas de sus desventajas son: susceptibilidad al frío, tendencia del fruto a partirse durante periodos húmedos y a no desarrollar pleno color antes de su total maduración; además de que sus flores no son autofértiles, lo que implica la necesidad de intercalar dos o más cultivares para lograr polinización cruzada (Galletta y Ballington 1996). En cuanto a requerimientos de frío, existen cultivares de este tipo capaces de romper la dormancia con tan solo 25 horas de exposición a temperaturas por debajo de 7 °C (Eck *et al.* 1990).

Arándanos medio-altos (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). Este grupo es el resultado ya sea de la hibridación interespecífica, o de retrocruzas entre arándanos altos y arándanos de matorral; sus tallos alcanzan de 0.5 a 1.0 m de altura y forman coronas, por lo que su cultivo es muy similar al de los arándanos altos (Galletta y Ballington 1996).

Arándanos arbustivos del sur (*Vaccinium* sp.). Este es un grupo de origen relativamente reciente cuya base genética la integra predominantemente *V. corymbosum*, pero con bajos requerimientos de frío por la incorporación de *V. darrowi* y *V. ashei* (Lyrene 1990). El hábito de crecimiento de las plantas, su conducción y manejo en general son similares a los observados en los arándanos altos del norte, pero los arándanos altos del sur se adaptan a las mismas áreas con clima moderado que los arándanos “ojo de conejo”, por lo que la explotación de los arándanos altos del sur se realiza principalmente en el sur de los Estados Unidos y en regiones subtropicales de Australia y Nueva Zelanda (Lyrene 1990). Los cultivares que actualmente están adquiriendo importancia en México son de este tipo (J. López Medina, comunicación personal).

El arándano se ve afectado por diversos agentes infecciosos y por otros factores químicos y físicos del medio como daños por temperatura, estrés hídrico, desórdenes nutricionales y toxicidad por sales (Hanson 1995). Las condiciones climáticas que dominan en la región del estado de Michoacán donde se cultiva el arándano particularmente las temperaturas cálidas observadas durante primavera y los veranos lluviosos favorecen el desarrollo de enfermedades fungosas (Agrios, 2005). Se han reportado pudriciones de fruto tanto en cosecha como en pos cosecha atribuidas a: *Alternaria* sp., *Phomopsis vaccinii*, *Monilia* sp., *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides*, (Milholland 1995). Diversas enfermedades foliares causadas por *Septoria* sp. (Milholland 1995), *Dothichiza caroliniana* (Milholland 1995), *Stemphyllium* sp. (Wright et al. 2006), *Gloeocercospora inconspicua*, (Caruso y Ramsdell 1995), *Exobasidium vaccinii* (Nickerson 1995) y *Phyllosticta vaccinii*, (Milholland 1995); además de la roya de la hoja causada por *Pucciniastrum vaccinii* (Bristow y Strech 1995, Dal Bello y Perellò 1998, Wright et al. 2006).

Las enfermedades de tipo vascular, como el cáncer o tizón del tallo y la muerte descendente de cañas, se consideran de importancia económica en la producción comercial del arándano. Los patógenos causantes de estas enfermedades entran a través de las yemas

florales, lenticelas, estomas y heridas y colonizan el sistema vascular (Demaree y Wilcox 1942, Michailides 1991, Milholland 1972, Witcher y Clayton 1963), causando muerte prematura en plantas, reduciendo severamente la productividad de las mismas (Caruso y Ramsdell 1995, Milholland 1972). La prevalencia y dispersión de este tipo de enfermedades han sido favorecidas por el uso de material vegetativo infectado, durante la propagación, (Demaree y Morrow 1951, Demaree y Wilcox 1942, Polashock y Kramer 2006, Ramsdell 1995). El cáncer del tallo se ha detectado tanto en arándanos cultivados como en silvestres, existiendo evidencias de que fue a partir de estos últimos que el problema pasó a los arándanos cultivados (Demaree y Morrow 1951).

Asociados al cáncer se han reportado diversos hongos, entre ellos *Phoma* sp. (Wright 2006), *Gloeosporium minus* (Milholland 1973,1995), *Alternaria* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* (EPPO 2009, Wright 2006), *Godronia cassandrae* (EPPO 2009, Ramsdell 1995, Stromeng y Stensvand 2001, Weingartner y Klos 1974), *Pestalotiopsis* spp. (Espinoza *et al.* 2009, Wright 2006), *Phomopsis vaccinii* (Baker *et al.* 1995, EPPO 2009, Espinoza *et al.* 2009, Farr *et al.* 2002, Polashock y Kramer 2006, Ramsdell 1995, Weingartner y Klos 1974, Wilcox 1939, Wright 2006) y *Botryosphaeria* spp. (Demaree y Wilcox 1942, EPPO 2009, Espinoza *et al.* 2009, Espinoza y Briseño 2009, Polashock y Kramer 2006, Ramsdell 1995, Witcher y Clayton 1963, Wright y Harmon 2010). El diagnóstico de la enfermedad en campo es difícil de lograr, ya que los síntomas causados por *Pestalotiopsis*, *Phomopsis* y *Botryosphaeria* son similares (Espinoza y Briseño 2009, Witcher y Clayton 1963) estos tres patógenos se pueden encontrar coexistiendo en una misma planta enferma (Espinoza *et al.* 2009, Michailides 1991, Wright y Harmon 2010). Los síntomas consisten en lesiones rojizas a café oscuras en puntas y tallos, tejidos necróticos debajo de la corteza y decoloración vascular (Espinoza *et al.* 2009, Ramsdell 1995), además de amarillamiento, enrojecimiento o secamiento de las hojas en uno o más brotes, los cuales posteriormente mueren (Witcher y Clayton 1963). En casos severos la infección progresa hacia la corona de la planta, lo que resulta en una muerte descendente sistémica de la rama en un período de semanas o meses y que eventualmente causa la muerte de la planta (Cline y Schilder 2006, Milholland 1972). Condiciones climáticas húmedas y cálidas son un prerrequisito para la infección por estas especies (Denman *et al.* 2003). El cáncer del tallo es la primera limitante en el establecimiento de

plantaciones de arándano en las principales zonas productoras; su presencia es especialmente severa en plantaciones de 1 y 2 años de edad (Cline y Schilder 2006).

Las especies de *Botryosphaeria* se asocian con cáncer y muerte descendente en árboles y arbustos (Espinoza *et al.* 2009, Gezahgne *et al.* 2004, Inderbitzin 2009, McDonald *et al.* 2009, Milholland 1972, Ramsdell 1995, Smith *et al.* 2001, Urbez-Torres y Gubler 2006, Wright y Harmon, 2010, Zea-Bonilla *et al.* 2007). Se ha demostrado que múltiples especies de este género están involucradas en la enfermedad del cáncer (Espinoza *et al.* 2009, McDonald *et al.* 2009, Wright y Harmon 2010).

Algunas características morfológicas, tales como color, textura, número de septos, tamaño y forma de conidios así como el crecimiento del micelio bajo diferentes temperaturas son útiles para la diferenciación de especies de *Botryosphaeria*; sin embargo, estas características no son del todo confiables debido a la plasticidad de algunas de ellas (Jacobs y Rehner 1998). Los recientes avances en técnicas moleculares han provisto de herramientas confiables para la correcta identificación de las especies de *Botryosphaeria*; procedimientos como la secuenciación de rDNA (ITS1, gen 5.8S, ITS2) (Jacobs y Rehner 1998, Zhonghua y Michailides 2002, Wright y Harmon 2010), el análisis del gen beta-tubulina y el factor de elongación 1-alfa (Gezahgne *et al.* 2003; Wright y Harmon 2010) y los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) son algunas de las técnicas más utilizadas (Gezahgne *et al.* 2003).

El control del cáncer del tallo esta basado en el uso de plantas libres de la enfermedad y en el uso de variedades resistentes (Cline y Schilder 2006, Demaree y Wilcox 1942, Polashock y Kramer 2006). Las actuales variedades de arándano exhiben una amplia variación en la respuesta a esta enfermedad, existen variedades casi inmunes y otras completamente susceptibles, siendo los brotes primarios los que mayor susceptibilidad exhiben; sin embargo, no se han encontrado variedades que sean totalmente inmunes (Creswell y Milholland 1987, Demaree y Morrow 1951, Espinoza *et al.* 2009, Polashock y Kramer 2006, Witcher y Clayton 1963). Tanto las variedades del tipo “arbustos altos” como los “ojos de conejo” son susceptibles a la enfermedad (Cline y Schilder 2006).

La resistencia al tizón del tallo fue evaluada con base en la longitud de lesión después de practicar inoculaciones artificiales con *Botryosphaeria* destacando los arbustos medio altos y

bajos. que mostraron mayor resistencia con respecto a otros tipos de arándanos (Polashock y Kramer, 2006). Entre los arbustos altos, la variedad Weymouth fue la mas resistente con una lesión de 20 mm de longitud, en tanto que las variedades Bluecrop y Duke fueron las más susceptibles desarrollando lesiones de 55 mm (Polashock y Kramer, 2006). De acuerdo a Cline y Schilder (2006), las variedades resistentes al tizón del tallo han sido Murphy, O'Neal y Cape Fear, las cuales, aunque pueden llegar a infectarse, raramente mueren.

Para determinar la resistencia o susceptibilidad de una planta a una enfermedad es crítico considerar el desarrollo del patógeno después de establecerse la infección; también se debe tomar en cuenta el tipo de lesión que se desarrolla mas que el número de lesiones (Milholland 1969, 1972). Otros factores a considerar son el material vegetal, el clima y las prácticas culturales (Stromeng y Stensvand 2001). Algunas variedades que presenten un intervalo medio de resistencia pueden llegar a funcionar bien bajo condiciones de campo, donde la presión del inóculo es presumiblemente más bajo (Ehlenfeldt y Polashock 2009).

Debido a la importancia que al arándano está teniendo en México, se hace necesario conocer las principales enfermedades que afectan al cultivo, determinar la estacionalidad de cada uno de esos patógenos e identificar al de mayor importancia económica. Por otro lado, la identificación de germoplasma resistente permitiría la implementación de un programa de mejoramiento genético orientado a desarrollar variedades resistentes y productivas totalmente adaptadas a las condiciones de Michoacán, que contribuyan a un manejo eficaz de la enfermedad.

IV. HIPÓTESIS

En plantaciones comerciales establecidas en Los Reyes, Michoacán se presentan diversas enfermedades fungosas potencialmente epidémicas que afectan la productividad del cultivo; sin embargo, en el germoplasma de arándano de tipo arbustivo (*Vaccinium* spp.) existen genotipos con resistencia genética a la enfermedad de mayor impacto económico en Michoacán.

V. OBJETIVOS

Objetivo general:

Identificar al agente causal de la enfermedad fungosa del arándano de mayor importancia económica en Los Reyes, Michoacán y determinar la respuesta de segregantes de tipo arbustivo a inoculaciones artificiales del patógeno.

Objetivos específicos:

1. Identificar las enfermedades fungosas y los hongos asociados presentes en la filósfera del arándano a en Los Reyes, Michoacán.
2. Determinar la incidencia estacional de las enfermedades presentes en la filósfera del arándano y determinar la enfermedad de mayor importancia económica.
3. Identificar, mediante características morfológicas y análisis de DNA, la especie causante del cáncer del tallo en arándano en la principal zona productora de Michoacán.
4. Determinar la respuesta de 24 familias de segregantes de arándano a inoculaciones artificiales del agente causal del cáncer del tallo.

IV. RESULTADOS

CAPITULO I

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS ASOCIADOS A LA FILÓSFERA DEL ARÁNDANO EN LOS REYES, MICHOACÁN.

RESUMEN

El arándano (*Vaccinium* spp.) ha adquirido una gran importancia por su alta demanda a nivel mundial, lo que ha propiciado el establecimiento de plantaciones en nuevas áreas. Este cultivo se ve afectado por la presencia de plagas y enfermedades de diversa índole, entre las que destacan las de origen fungoso. El objetivo de este trabajo fue identificar morfológicamente los hongos asociados a enfermedades que afectan la filósfera del arándano y determinar su incidencia estacional, así como la enfermedad de mayor importancia económica en Los Reyes, Michoacán. Durante el período 2009-2010 se tomaron al azar en el 5 % de la población, muestras de órganos de la filósfera de la planta con síntomas atribuidos a patógenos fungosos para determinar la incidencia de cada síntoma en huertos comerciales. A partir de tejido enfermo se realizaron seimbras en PDA y se obtuvieron aislados puros. Para la identificación de los hongos a nivel de género se emplearon las claves de Barnett y Hunter (1998) y Hanlin (2001); las estructuras consideradas fueron el tipo de micelio; forma de esporas; forma, apariencia y color de la colonia. Los síntomas observados presentaron de en una incidencia variable. Se aislaron e identificaron 12 hongos asociados a 13 enfermedades, pudrición del fruto (*Alternaria*, *Colletotrichum*), manchas foliares (*Alternaria*, *Colletotrichum*, *Neofusicoccum*, *Pestalotiopsis*, *Phyllosticta*, *Stemphyllium*) roya (*Pucciniastrum*) atizonamiento y cáncer del tallo (*Alternaria*, *Bipolaris*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Neofusicoccum* *Phomopsis*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*) y tizón de yemas (*Chaetomium*, *Phoma*). La incidencia de los síntomas varió de 1 al 100 %. La roya fue la enfermedad con la mayor incidencia (84.39 %), el hongo aislado con mayor frecuencia fue *Colletotrichum*, seguido de *Alternaria*. La enfermedad de mayor impacto económico en el cultivo del arándano fue el cáncer del tallo.

CHAPTER I

MORPHOLOGICAL IDENTIFICATION OF FUNGI ASSOCIATED TO THE PHYLLOSPHERE OF BLUEBERRY IN LOS REYES, MICHOACAN, MEXICO

ABSTRACT

Blueberry (*Vaccinium* spp.) has become a highly demanded horticultural crop worldwide, causing blueberry plantings have expanded to new areas. This crop is afflicted by pests and diseases of different kinds; fungal diseases are among the main threats that blueberry faces. The objective of this work was to identify, by means of morphological characteristics, the disease-causing fungi associated to the phyllosphere of blueberry and to determine their season of occurrence in Los Reyes, the main blueberry production area of Michoacan, Mexico. During 2009 and 2010 and by randomly sampling 5 % population of commercial production fields, different phyllosphere blueberry tissues showing fungal-causing symptoms were collected; each symptom incidence was determined. Infected tissue cuts were sterilized in 2 % NaOCl for 90 sec, rinsed in sterilized distilled water followed by drying out, and finally cultured in PDA-containing petri dishes. Fungal identification at the genera level was performed according to Barnett and Hunter (1998) and Hanlin (2001). Mycelia type, spore shape along with shape, appearance and color of the colony were the main features taken into consideration. The symptoms observed showed variation among both developmental stages and incidence. Twelve fungi associated to 13 different symptoms were isolated and identified; among the main symptoms were fruit rots (*Alternaria* and *Colletotrichum*), leaf spots (*Alternaria*, *Colletotrichum*, *Neofusicoccum*, *Pestalotiopsis*, *Phyllosticta*, and *Stemphyllium*), leaf rust (*Pucciniastrum*), stem canker and blight (*Alternaria*, *Bipolaris*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Neofusicoccum*, *Phomopsis*, *Pestalotiopsis*, and *Phoma*), and bud blight (*Chaetomium* and *Phoma*). Symptoms incidence varied from 0 to 100 %. Leaf rust showed highest incidence (84.39 %) and the most frequently isolated fungus was *Colletotrichum* followed by *Alternaria*. Based on the degree of damage caused on the crop, stem canker associated to *Neofusicoccum* sp. was the most impacting disease.

1.1. INTRODUCCIÓN

El arándano (*Vaccinium* spp.) es una frutilla que en la última década ha adquirido una gran importancia por su alta demanda a nivel mundial, que ha propiciado el establecimiento de grandes plantaciones en nuevas áreas. Para 2008, la superficie cultivada con arándano fue de 74,015 ha y se cosecharon 329,147 t de fruta (FAO 2010), lo que representó un aumento del 12.4 % y 47.2 % en superficie establecida y volumen de producción, con respecto a lo reportado para 2007 por Lehnert (2008). En México el arándano es de reciente introducción, teniendo registrada para finales de la temporada 2009 una superficie de 196 ha, distribuidas éstas en los Estados de Jalisco, Puebla y México (SAGARPA 2010). No obstante, observaciones minuciosas han permitido estimar que existen cerca de 500 ha en Jalisco y 200 ha en Michoacán (J. López Medina, comunicación personal). Los arándanos son fuente de vitamina C y compuestos antioxidantes fenólicos. Diversos estudios sugieren que el alto nivel de compuestos fenólicos, favorece la actividad del cerebro, ya que estimulan la producción de nuevas células, además de reducir la inflamación que deteriora y afecta su funcionamiento (Kalt 2006).

Sin embargo, el arándano es afectado en su producción por la presencia de plagas y enfermedades y por factores no infecciosos, como daños por temperatura, estrés hídrico, desórdenes nutricionales y toxicidad por sales entre otros (Caruso y Ramsdell 1995)

Diversos hongos han sido reportados causando daños en arándano en todos los órganos de la planta en diferentes zonas productoras (Caruso y Ramsdell 1995).

Las flores se ven afectadas por *Botrytis cinerea* (Bristow y Milholland 1995; Cline y Schilder 2006) y *Monilinia vaccinni-corymbosi* (Cline y Schilder 2006; Hildebrand *et al.* 1995), que causan tizón y traen como consecuencia la caída de las flores; ambos patógenos son considerados de menor importancia.

Entre los hongos que se reportan ocasionando pudrición de frutos de arándano tanto en cosecha como pos cosecha se encuentran: *Alternaria* sp. (Milholland 1995, Szmagara 2009), *Botrytis cinerea* (Bristow y Milholland 1995), *Monilia* sp. (Hildebrand *et al.*, 1995), *Phomopsis vaccinii*, (Milholland 1995), *Phyllosticta vaccinii* (Milholland 1995, Szmagara,

2009). A excepción de *Phyllosticta* que ocasiona lesiones duras debido a la presencia de picnidios (Milholland 1995), estos organismos causan lesiones de consistencia suave, de forma circular a irregular de coloración variada y deshidratación; sin embargo, *Alternaria* ha sido considerado como un invasor secundario (Milholland 1995), ya que en varias investigaciones su patogenicidad no ha sido bien determinada (Oudemans *et al.* 1998), así mismo *Botrytis cinerea* aunque se considera un patógeno de menor importancia en las regiones productoras de arándano, bajo condiciones de períodos largos de humedad puede causar serios daños en los frutos (Cline y Schilder 2006).

Colletotrichum gloeosporioides y *C. acutatum* se reportan causando antracnosis en el fruto (Polashock *et al.* 2005, Wharton y Schilder 2008, Wright *et al.* 2006), y son un serio problema para el cultivo, (Cline y Schilder 2006) principalmente en la etapa de pos cosecha (Polashock *et al.* 2005).

En el área foliar, se presentan ataques por *Alternaria* sp. (Milholland 1995, Szmagara 2009) *Septoria* sp., *Dothichiza caroliniana*, *Gloeocercospora inconspicua* (Milholland 1995), *Phyllosticta vaccinii*, (Milholland 1995, Szmagara 2009), que causan manchas de coloración y forma variada sin llegar a causar defoliación en los arbustos (Milholland 1995); *Exobasidium vaccinii* se presenta en los brotes induciendo que las hojas se tornen rojas brillantes, que se marchitan y caen una vez que el hongo ha esporulado (Nickerson 1995). *Microsphaera vaccinii*, se presenta causando cenicilla (Cline y Schilder 2006, Milholland y Stretch 1995). *Pucciniastrum vaccinii*, se reporta con frecuencia causando roya de la hoja (Bristow y Strech 1995, Dal Bello y Perellò 1998, Wright *et al.* 2006), el primer síntoma de roya son manchas cloróticas que se expanden y se desarrollan como puntos necróticos con varios uredios. Las típicas pústulas naranjas se desarrollan mayormente en el lado abaxial de las hojas, sin embargo, la roya es considerada una enfermedad de menor importancia (Bristow y Strech 1995).

En los tallos se presenta tizón, que se manifiesta en forma de lesiones hundidas de coloración que varían de rojo a marrón que se expanden y coalescen, dando paso a la formación de fisuras de la corteza, defoliación y algunas veces la muerte del tallo, dependiendo de las condiciones ambientales y la variedad, se reporta a *Cercospora* sp., (Milholland 1995), *Colletotrichum gloeosporioides* (OEPP/EPPO 2009, Wright *et al.* 2006),

Curvularia sp. (Wright *et al.* 2006), *Godronia cassandrae* (Cline y Schilder 2006, EPPO 2009, Ramsdell 1995, Weingartner y Klos 1974), *Gloeosporium minus* (Milholland 1973, 1995), *Pestalotiopsis* sp. (Espinoza *et al.* 2009, Wright *et al.* 2006), *Phoma* sp. (Szmagara 2009, Wright *et al.* 2006), *Septoria albopunctata* (Milholland 1995) y *Stemphyllium* sp. (Wright *et al.* 2006).

Otro patógeno importante que se ha reportado asociado a cáncer del tallo y tizón de puntas en arándano es *Phomopsis vaccinii* (Farr *et al.* 2001, Ramsdell 1995, Weingartner y Klos 1974, Wilcox 1939, Wright *et al.* 2006). *Phomopsis vaccinii* puede matar a la planta en pocos meses (Wilcox 1939) y es considerado potencialmente devastador para el arándano cuando las condiciones son favorables para su dispersión y desarrollo (Weingartner y Klos 1974). Bajo condiciones de campo, de una misma planta enferma es posible aislar diferentes especies de *Phomopsis* y todas pueden ser igualmente patogénicas (Webster y Weber 2008).

Botryosphaeria spp., se reporta atacando las cañas del arándano (Demaree y Wilcox 1942, EPPO 2009, Espinoza y Briseño 2009, Espinoza *et al.* 2009, Milholland 1995, Polashock y Kramer 2006, Witcher y Clayton 1963, Wright y Harmon 2010). Los primeros síntomas se presentan como pequeñas lesiones rojas, tornándose posteriormente cafés y ligeramente hundidas, variando de acuerdo a la susceptibilidad de la planta (Demaree y Wilcox 1942, Witcher y Clayton 1963). El tizón del tallo es más agresivo en cultivos jóvenes, las plantas que llegan a ser infectadas generalmente mueren en los dos primeros años (Cline y Schilder 2006, Milholland 1972).

Dado que el arándano es una planta de reciente introducción a México, poco se sabe de las enfermedades que se presentan durante su ciclo de producción, y del impacto que llegan a tener en el rendimiento y calidad de la fruta, así como en la vida útil de la planta, bajo las condiciones en que se cultiva en Michoacán. Un avance significativo en el desarrollo de un paquete tecnológico que permita la explotación comercial competitiva del arándano en el estado de Michoacán, lo representa la generación de la base de conocimientos sobre la etiología, patogénesis y epidemiología de las diferentes enfermedades presentes en los huertos comerciales, como eje para el diseño de prácticas adecuadas de prevención y manejo que mitiguen su impacto potencial y que contribuyan al mejoramiento de la productividad. El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de identificar los hongos asociados a las

enfermedades que afectan la filósfera del arándano en los Reyes Michoacán y determinar su incidencia estacional.

1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de material enfermo

De marzo de 2009 a febrero del 2010, durante las estaciones de primavera, verano e invierno se hicieron colectas de material enfermo en plantaciones comerciales de arándano del tipo arbustivo de las variedades Biloxi y Sharpblue, en los huertos La Loma, El Barreno y La Alameda ubicados en Los Reyes, Michoacán. Se colectaron órganos de la filósfera (tallos, hojas, flores y frutos) de plantas con síntomas de enfermedades fungosas; cada muestra colectada se identificó determinando origen y fecha de colecta, para su procesamiento en el laboratorio.

Incidencia

Cada uno de los síntomas observados en campo, fue identificado de acuerdo a su característica más notable y se determinó su incidencia estacional (primavera, otoño e invierno) en huertos comerciales, mediante un muestreo simple aleatorio. Se realizaron cuatro evaluaciones por estación y se consideró un tamaño de muestra del 5 % de las plantas de la población.

Aislamiento de hongos

Las muestras se lavaron con agua corriente y jabón. Se obtuvieron cortes de tejido enfermo de 2 a 3 mm de diámetro que fueron desinfectados con una solución de NaOCl al 2 %, durante 90 segundos y después lavados doblemente con agua destilada estéril; posteriormente fueron secados con papel estéril y sembrados en cajas Petri con PDA (Bioxon®); las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente. A partir de las colonias fungosas desarrolladas, se procedió a la purificación de aislados, tomando un disco de micelio de los márgenes de la colonia que se transfirió a cajas Petri con PDA.

Identificación de hongos

La identificación de los hongos obtenidos se llevó a cabo mediante la caracterización de la forma, color y apariencia de colonias, y del tipo de micelio y esporas. En los casos en donde no resultó evidente la presencia de esporas, se promovió la formación de las mismas colocando muestras de tejido enfermo en cámara húmeda. La caracterización microscópica se realizó en preparaciones semi permanentes observadas a 40x. La identificación a nivel de género estuvo basada en las claves de Barnett y Hunter (1998) para hongos conidiales y las claves de Hanlin (2001) para hongos ascostrómicos.

1.3. RESULTADOS

De las muestras colectadas, se logró identificar 12 hongos asociados a diversos síntomas presentes en hojas, tallos y frutos de arándano (Cuadro 1). La incidencia estacional de cada uno de los síntomas observados se indica en el Cuadro 2.

En los frutos se observaron dos tipos de síntomas de pudrición: pudrición seca, caracterizada por lesiones irregulares, hundidas, oscuras y deshidratadas, y pudrición suave, caracterizada por la formación de lesiones oscuras, hundidas, irregulares, con masas de esporas de color salmón. La pudrición seca se presentó con una incidencia de 2.17 % en tanto la incidencia de la pudrición suave fue de 1.29 %. De la pudrición seca se aisló e identificó *Alternaria* sp. (Agrios 2005, Barnett y Hunter 1999) y de la pudrición suave a *Colletotrichum* sp. (Agrios 2005, Barnett y Hunter 1999, Sutton 1992) (Fig. 1).

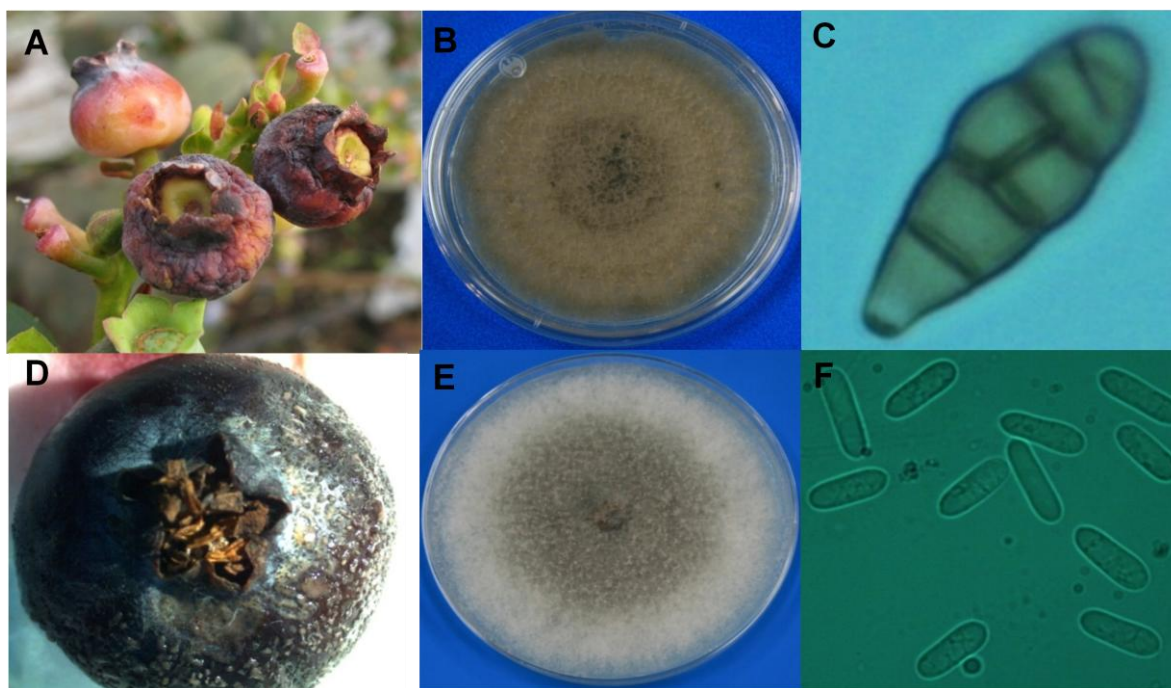


Figura 1. Pudrición de fruto. A. Pudrición seca B. Colonia y C. Conidios de *Alternaria* sp.; D). Pudrición suave E. Colonia y F. Conidios de *Colletotrichum* sp.

Cuadro 1. Hongos aislados de la filósfera de plantas de arándano colectadas en Los Reyes, Michoacán. Órgano y síntomas al que se encontraron asociados y características morfológicas usadas en su identificación.

Hongo identificado	Órgano	Enfermedad	Referencia	Características de colonia y estructuras reproductivas en PDA ^(*)		Referencia
<i>Alternaria</i> sp.	Fruto	Pudrición seca	Milholland 1995	Micelio postrado, algodonoso, café oscuro	Conidios oscuros, obclavados a ovoides, con septos longitudinales y transversales	Agrios 2005, Barnett y Hunter 1999
	Hoja	Mancha plateada, peca de la hoja				
	Tallo	Cáncer	OEPP/EPPO 2009; Szmagara 2009			
<i>Bipolaris</i> sp.	Tallo	Tizón de yemas		Colonia de micelio denso, café, con zonas concéntricas y borde ligeramente ondulado	Conidios color marrón, multicelulares, elípticos, con septas transversales desarrollados en forma lateral	Barnett y Hunter 1999, Finch y Finch 1997
<i>Chaetomium</i> sp.	Tallo	Tizón de yemas	-----	Colonia con micelio postrado, blanco al inicio, tornándose a pardo oscuro	Peritecios negros de forma redonda y proliferación de largas setas	Hanlin 2001
<i>Colletotrichum</i> sp.	Fruto	Pudrición blanda	Lambert 1990, Milholland 1995, Polashock <i>et al.</i> 2005.	Micelio algodonoso, abundante, de color gris tanto al anverso como al reverso de la colonia	Estromas miceliales en forma de cojín, con abundantes conidios hialinos, unicelulares, cilíndricos y formación de setas oscuras	Agrios 2005, Barnett y Hunter 1999, Sutton 1992
	Hoja	Mancha plateada, tizón foliar, mancha marrón, mancha cobriza	-----			
	Tallo	Cáncer del tallo y yemas, tizón y costra del tallo			Ascas clíndricas, ligeramente clavadas o elipsoides, con apices redondeados con ocho ascosporas.	Hanlin 2001
<i>Curvularia</i> sp.	Tallo	Costra del tallo	-----	Colonia micelial café oscuro, de apariencia aterciopelada	Conidios oscuros, fusiformes, curvados, con la célula central mas grande que las de los extremos	Barnett y Hunter 1999
<i>Neofusicoccum</i> sp.	Hoja	Mancha plateada	-----	Colonias con micelio aéreo, algodonoso, elevado, blancas en un inicio, con el centro gris olivo y tornándose a gris oscuro y negro con la edad, márgenes ligeramente lobulados	*Picnidios aislados subepidérmicos, ostiolados, oscuros, globosos, con conidióforos simples, conidios fusiformes, hialinos y granulados	
	Tallo	Cáncer del tallo	Espinoza <i>et al.</i> 2009, Milholland 1995, Witcher y Clayton 1963, Wright y Harmon 2010			

Cuadro 1 (Cont.)

Organismo identificado	Órgano	Enfermedad	Referencia	Características de colonia y estructuras reproductivas en PDA (*)		Referencia
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Hoja	Tizón foliar	-----	Colonias de micelio blanco, algodonoso, márgenes lobulados, con abundante esporulación concentrada en masas oscuras	Conidios oscuros, septados, con las celdas de los extremos hialinos y puntiagudos, con tres apéndices apicales	Barnett y Hunter 1999, Finch y Finch 1997, Romero 1988
	Tallo	Tizón del tallo	Espinoza <i>et al.</i> 2009, Wright <i>et al.</i> 2006			
<i>Phoma</i> sp.	Tallo	Cáncer y tizón de yemas	Szmagara 2009, Wright <i>et al.</i> 2006	Colonia micelial, blanca al inicio, de micelio denso, tomándose rojizo con la edad	*Picnidios oscuros, globosos, uniloculares, ostiolados, semimmersos en el tejido, eruptivos; conidios hialinos, unicelulares, elipsoidales y expulsados en un cirro mucilaginoso	Aveskamp <i>et al.</i> 2008, Barnett y Hunter 1999, Finch y Finch 1997, Herrera y Ulloa 1990
<i>Phomopsis</i> sp.	Tallo	Cáncer del tallo	Cline y Schilder 2006, OEPP/EPPO 2009, Ramsdell 1995	Colonias de micelio algodonoso, escaso, blanco al inicio, tornándose a pardo con la edad	Picnidios de color oscuro, globosos, ostiolados, con conidios (α) hialinos, bigutelados y fusiformes.	OEPP/EPPO 2009, Barnett y Hunter 1999, Romero 1988, Ulloa y Herrera 1990
<i>Phyllosticta</i> sp.	Hoja	Mancha cobriza	Milholland 1995	Colonias con micelio café oscuro al anverso y negro en el reverso, de crecimiento lento	Picnidios oscuros, ostiolados, globosos, conidios pequeños, unicelulares, hialinos de ovoides a elongados	Barnett y Hunter 1999, Finch y Finch 1997, Milholland 1995
<i>Pucciniastrum</i> sp.	Hoja	Roya	Bristow y Strech 1995, Dal Bello y Perelló 1998, Wright <i>et al.</i> 2006	-----	Uredosporas, obovadas a elípticas, de coloración naranja pálido.	Bristow y Strech 1995, Dal Bello y Perelló 1998
<i>Stemphyllium</i> sp.	Hoja	Mancha plateada	Wright <i>et al.</i> 2006	Colonias con micelio aterciopelado, amarillo al centro y blanco en los márgenes	Conidios oscuros con septas longitudinales y transversales, de forma globosa	Barnett y Hunter 1999

*Estructuras desarrolladas en tallos de arándano en cámara húmeda.

Cuadro 2. Incidencia estacional de las enfermedades fungosas de la filósfera del arándano durante el período 2009-2010, en Los Reyes, Michoacán.

Enfermedad	Incidencia (%)		
	Primavera	Otoño	Invierno
Pudrición seca de fruto	1.03	3.4	2.08
Pudrición de fruto	0.00	1.94	1.95
Mancha plateada	90.00	54.00	55.48
Mancha marrón	9.80	7.60	10.62
Mancha cobriza	11.58	4.86	3.96
Tizón foliar	0	25.74	8.62
Peca de la hoja	1.6	5.43	7.46
Roya	100	88.62	64.57
Tizón del tallo	24.72	18.40	36.13
Costra del tallo	32.97	13.00	6.76
Cáncer del tallo	36.72	41.26	37.06
Tizón de yemas	1.78	4.75	3.96
Cáncer de yemas	0.86	1.44	1.63

En hojas se observaron cinco tipos de enfermedad: “mancha plateada”, “mancha marrón”, “mancha cobriza”, “tizón foliar” y “peca de la hoja”. La “mancha plateada” se mostró como una lesión de forma circular y tamaño pequeño (1-3 mm), de coloración gris plateada en el centro y en ocasiones delimitada por un ligero margen café (Fig. 2); esta enfermedad se presentó con una incidencia promedio de 66.49 % y asociados al mismo se aislaron *Alternaria* sp. (Agrios 2005, Barnett y Hunter 1999), *Colletotrichum* sp. (Agrios 2005, Barnett y Hunter 1999), *Neofusicoccum* sp. (Espinoza *et al.* 2009, Shen *et al.* 2010, Úrbez-Torres *et al.* 2006) y *Stemphyllium* sp. (Barnett y Hunter 1999).

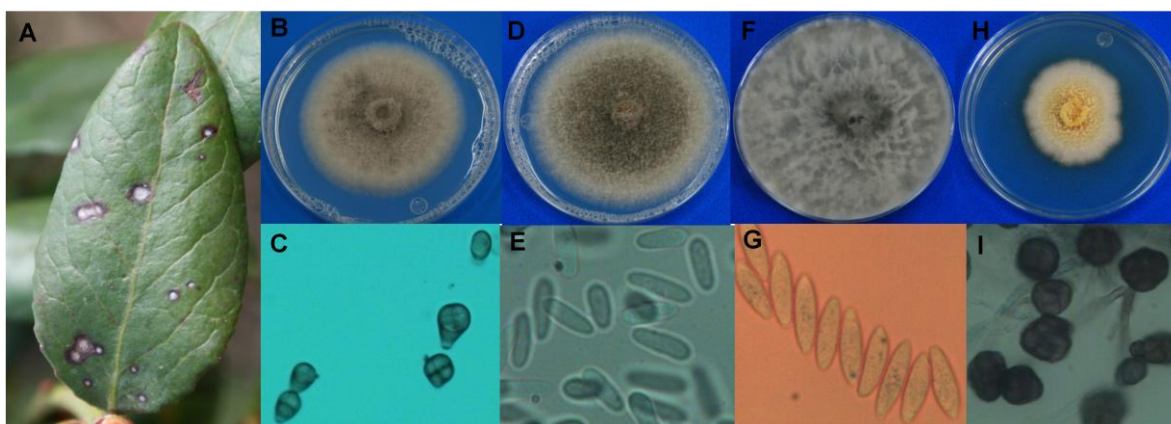


Figura 2. Mancha plateada. A. Síntoma B. Colonia y C. Conidios de *Alternaria* sp. ;D. Colonia y E. Conidios de *Colletotrichum* sp.; F. Colonia y G. Conidios de *Neofusicoccum* sp.; H. Colonia y I. Conidios de *Stemphyllium* sp.

La “mancha marrón” forma manchas circulares o irregulares, cafés con margen más oscuro. Se presentó con una incidencia de 9.2 % y se identificó a *Colletotrichum* sp. (Agrios 2005, Barnett y Hunter 1999) (Fig. 3A).

De la “mancha cobriza” se aisló a *Phyllosticta* sp. (Barnett y Hunter 1999, Finch y Finch 1997, Milholland 1995) y *Colletotrichum* sp. (Agrios 2005, Barnett y Hunter 1999, Sutton 1992). Este tipo de mancha se caracterizó por la formación de lesiones aspecto seco, café rojizo claro, que se presentaron principalmente en los márgenes de las hojas (Fig. 4). La incidencia de la mancha cobriza fue de 6.8 %.

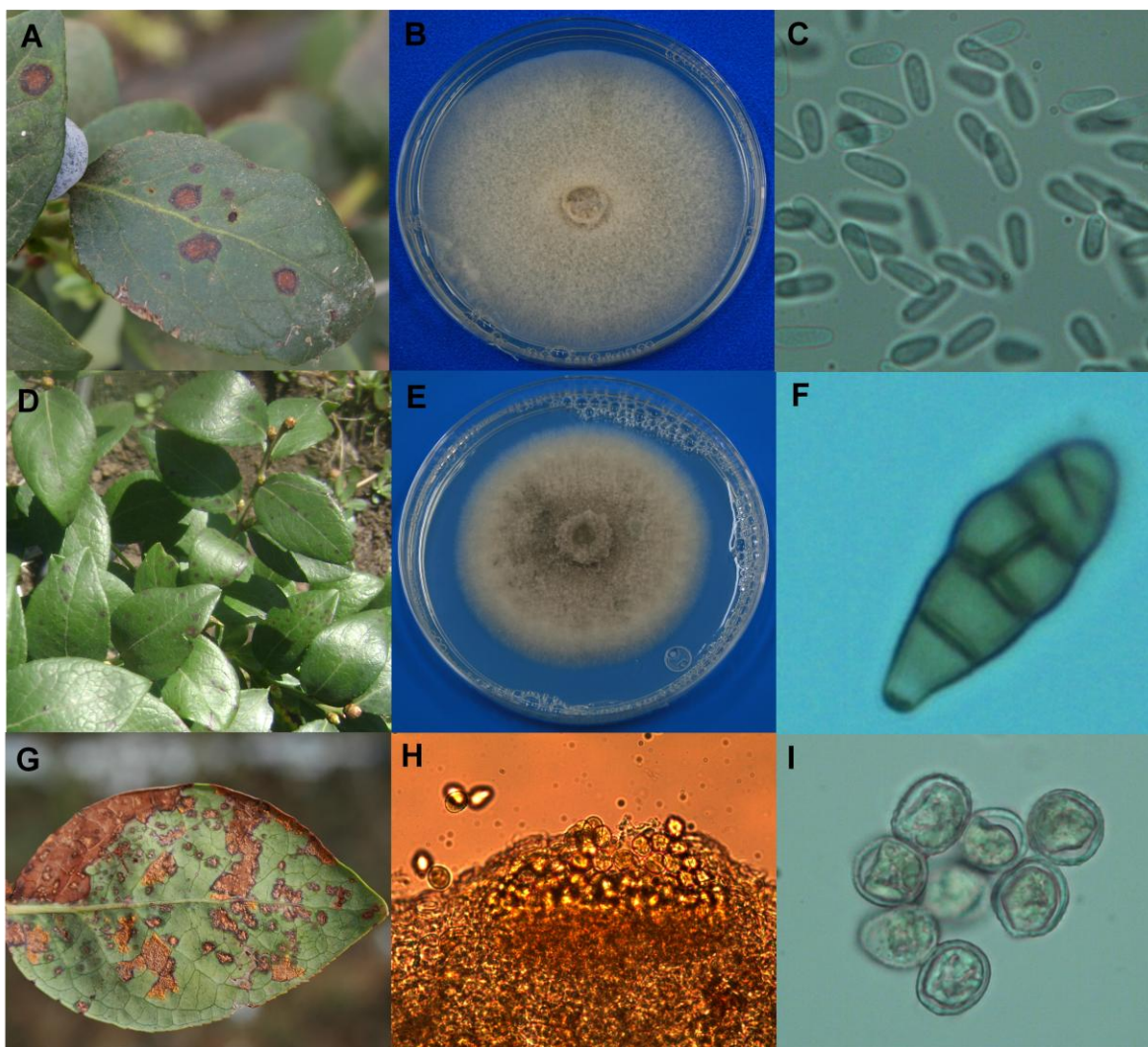


Figura 3. Síntomas foliares. A. Mancha marrón B. Colonia y C. Conidios de *Colletotrichum* sp.; D. Síntoma peca de la hoja E. Colonia y F. Conidios de *Alternaria* sp. ;G. Roya H. Uredio y I. Urediosporas de *Pucciniastrum* sp.

El “tizón foliar” se presentó en forma de lesiones irregulares, café oscuro con margen clorótico, a partir del ápice y margen de la hoja, avanzando en forma progresiva hacia el centro de la hoja (Fig. 5). Los hongos asociados a esta enfermedad fueron *Pestalotiopsis* sp. (Barnett y Hunter 1999, Finch y Finch 1997, Romero 1988) y *Colletotrichum* sp. (Agrios 2005, Barnett y Hunter 1999, Sutton 1992); el “tizón foliar” se presentó con una incidencia de 11.45 %.

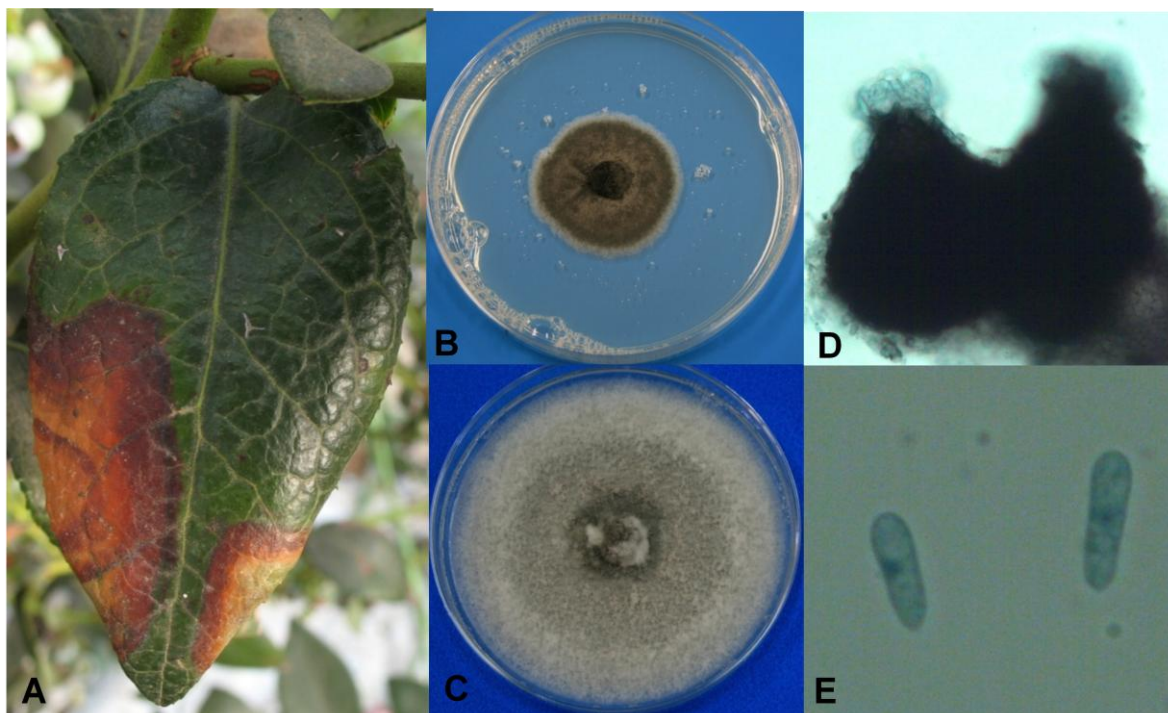


Figura 4. Mancha cobriza. A. Daño foliar B. Colonia y D. Picnidios de *Phyllosticta* sp.; C. Colonia y E. Conidios de *Colletotrichum* sp.

La “peca de la hoja” se caracterizó por formar manchas pequeñas, oscuras y circulares distribuidas en toda la hoja (Fig. 3). Asociado a la peca de la hoja se identificó a *Alternaria* sp. (Agrios 2005, Barnett y Hunter 1999), con una incidencia de 4.83 %.

La roya de la hoja detectó principalmente en el envés de las hojas, con una incidencia de 84.39 %. Se observaron pequeñas manchas oscuras que posteriormente desarrollaron pústulas naranjas de aspecto polvoso, con un margen café oscuro y un halo clorótico, (Fig. 3); las plantas afectadas mostraron defoliación. Con base en las características de las urediosporas, se identificó a *Pucciniastrum* sp., como el agente causal (Bristow y Strech 1995, Dal Bello y Perellò 1998).

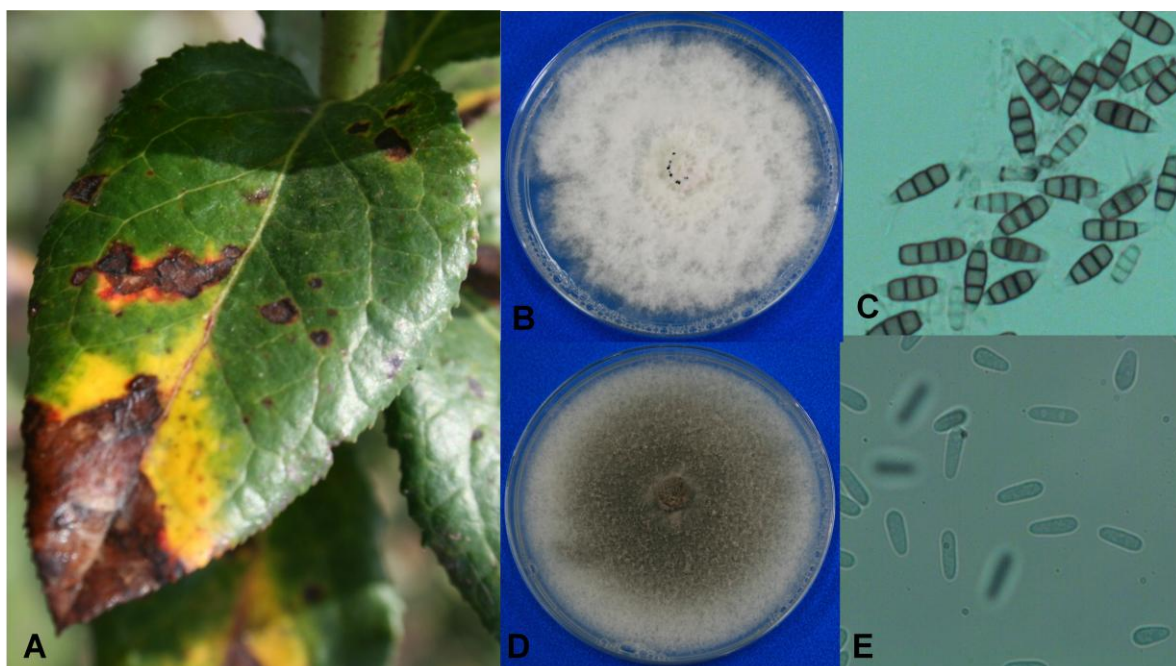


Figura 5. Tizón foliar. A. Daño foliar B. Colonia y D. Conidios de *Pestalotiopsis* sp.; C. Colonia y E. Conidios de *Colletotrichum* sp.

En los tallos, se detectaron cinco enfermedades; “tizón del tallo”, “costra del tallo”, “cáncer del tallo”, tizón de yemas” y “cáncer de yemas” de los que se aislaron *Neofusicoccum* sp., *Phomopsis* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp. *Curvularia* sp., *Phoma* sp., *Bipolaris* sp. y *Chaetomium* sp.

El “tizón del tallo”, se caracterizó por la presencia de manchas irregulares hundidas, café rojizo, con oscuro. Esta enfermedad se presentó con una incidencia de 26. 41 % y se identificó a *Pestalotiopsis* sp. (Barnett y Hunter 1999, Finch y Finch 1997, Romero 1988) y *Colletotrichum* sp. (Agrios 2005, Barnett y Hunter 1999, Sutton 1992) (Fig. 6).

Otro tipo de lesiones detectada en los tallos, estuvo caracterizada por su aspecto costroso; las lesiones inicialmente son circulares, pequeñas que crecen y coalescen formando amplias zonas necróticas. La enfermedad fue designada como “costra del tallo” y se presentó

con una incidencia de 19.82 %. De éstas lesiones se aislaron *Colletotrichum* sp. (Agrios 2005, Barnett y Hunter 1999, Sutton 1992) y *Curvularia* sp., (Barnett y Hunter 1999).

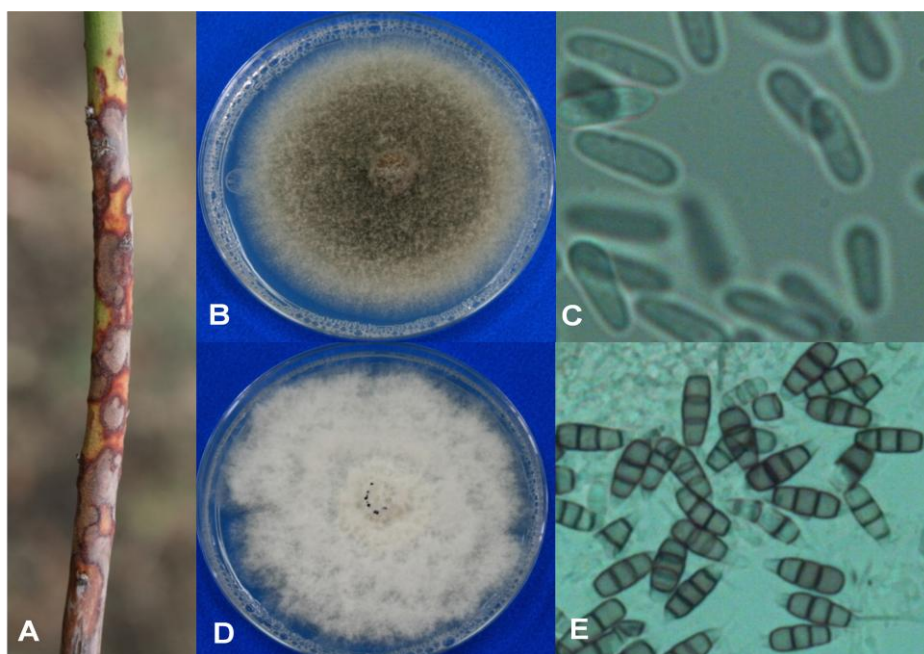


Figura 6. Tizón del tallo. A. Síntoma B. Colonia y C. Conidios de *Colletotrichum* sp.; D. Colonia y E. Conidios de *Pestalotiopsis* sp.

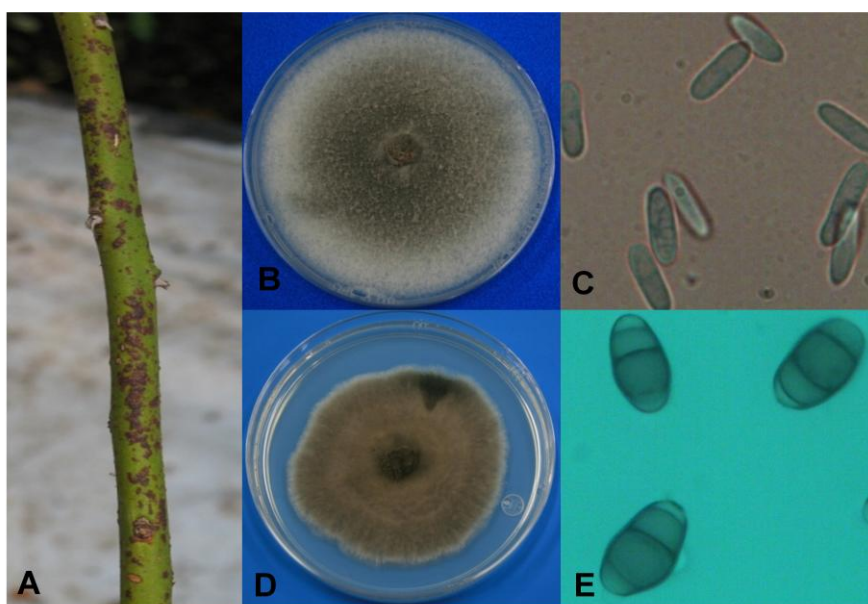


Figura 7. Costra del tallo. A. Síntoma B. Colonia y C. Conidios de *Colletotrichum* sp. ;D. Colonia y E. Conidios de *Curvularia* sp.

El “cáncer” de tallos, se presentó con una incidencia de 38.34 % y estuvo caracterizado por la presencia de manchas café hundidas, generalmente de aspecto seco en la base de las ramas y asociado con muerte descendente de ramillas y tizón de puntas (Fig. 8). Asociados a esta enfermedad se encontró a *Neofusicoccum* sp. (Espinoza *et al.* 2009, Shen *et al.* 2010, Úrbez-Torres *et al.* 2006), *Colletotrichum* sp. (Agrios 2005, Barnett y Hunter 1999, Sutton 1992), *Alternaria* sp. (Agrios 2005, Barnett y Hunter 1999) *Phoma* sp. (Aveskamp *et al.* 2008, Barnett y Hunter 1999, Finch y Finch 1997, Herrera y Ulloa 1990) y *Phomopsis* sp. (OEPP/EPPO 2009, Barnett y Hunter 1999, Romero 1988, Ulloa y Herrera 1990).

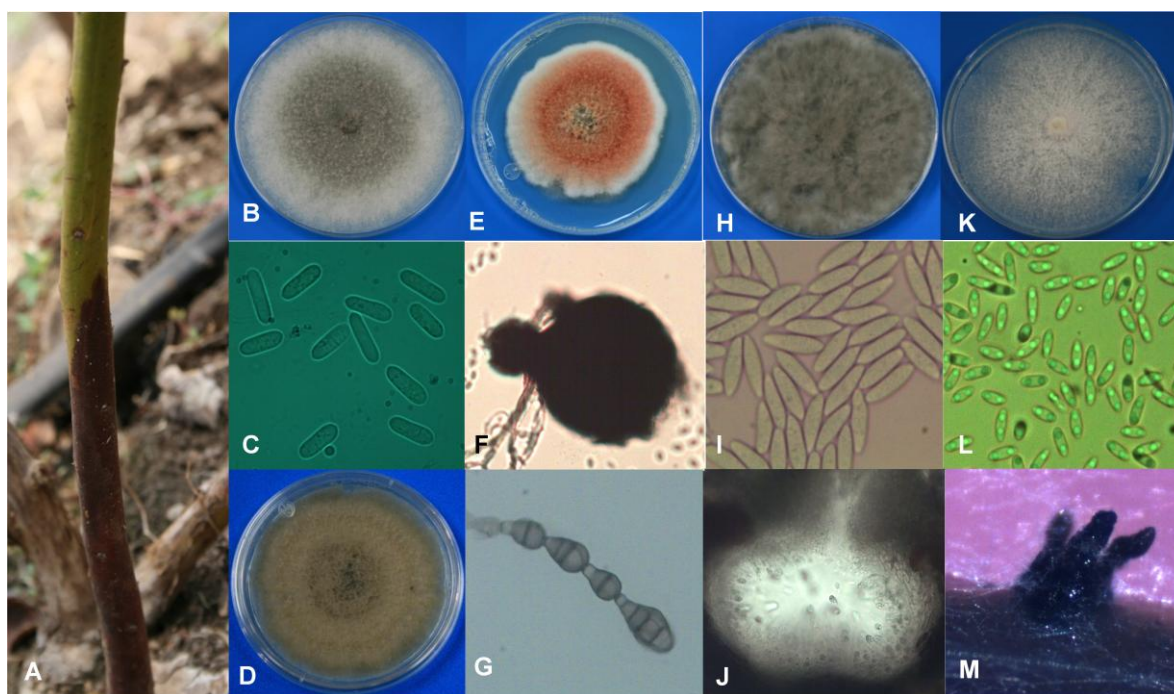


Figura 8. Cáncer del tallo. A. Síntoma B. Colonia y C. Conidios de *Colletotrichum* sp. D. Colonia y G. Conidios de *Alternaria* sp.; E. Colonia y F. Picnidio de *Phoma* sp.; H. Colonia, I. Conidios y J. Picnidio de *Neofusicoccum* sp.; K. Colonia, L. Conidios y M. Picnidio de *Phomopsis* sp.

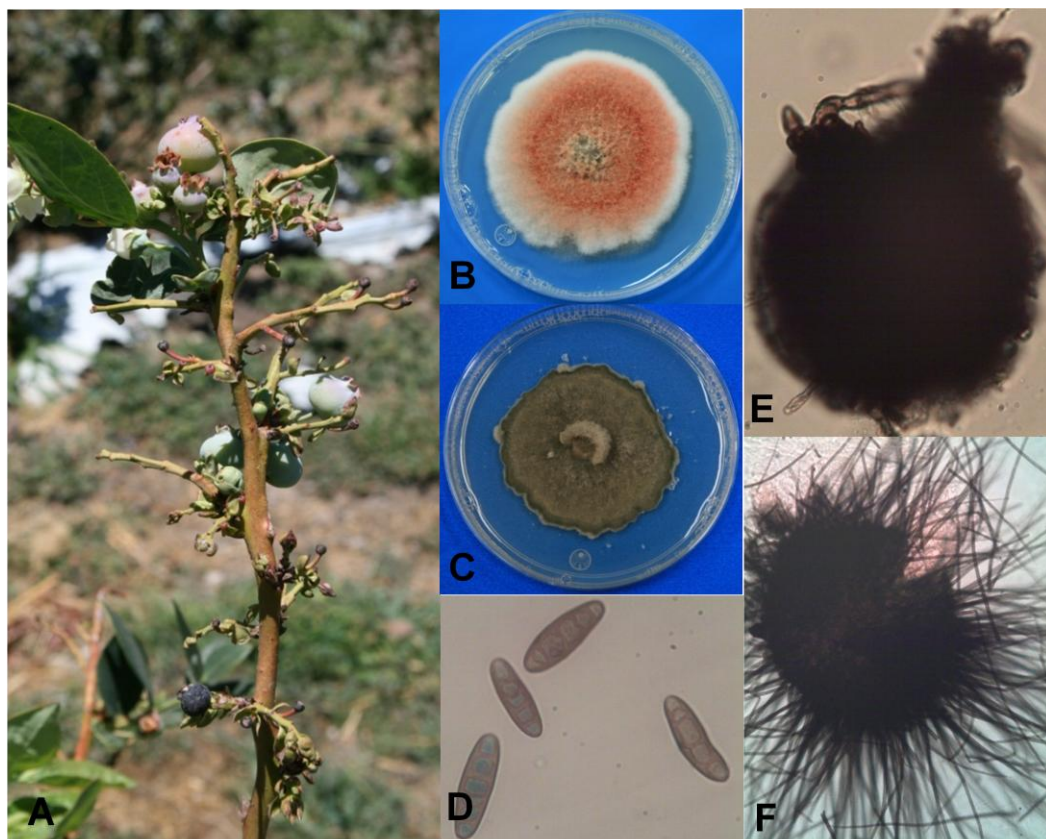


Figura 9. Tizón de yemas. A. Yemas dañadas, B. Colonia y E. Picnidio de *Phoma* sp.; C. Colonia y D. Conidios de *Bipolaris* sp.; F. Peritecio de *Chaetomium* sp.

En algunas plantas se observó tizón de yemas; las yemas afectadas presentaron necrosis y muerte de tejido. La enfermedad fue registrada con una incidencia de 3.49 %. De este tipo de lesiones se aisló a *Bipolaris* sp. (Sisterna 2009), *Phoma* sp. (Aveskamp *et al.* 2008, Barnett y Hunter 1999, Finch y Finch 1997, Herrera y Ulloa 1990) y *Chaetomium* sp. (Hanlin 2001) (Fig. 9).

Otra enfermedad observada fue el cáncer de yemas, caracterizado por el desarrollo de lesiones necróticas en la base de la yema, de aspecto húmedo, irregular o alargada que avanzan hacia las yemas ocasionando su muerte. De estas lesiones se aisló *Colletotrichum* sp. (Fig. 10); El cáncer de yemas se detectó con una incidencia de 1.31 %.



Figura 10. Cáncer de yemas. A. Síntoma, B. Colonia y C. Conidios de *Colletotrichum* sp. D. Ascas de *Glomerella* sp.

1.4. DISCUSIÓN

En los muestreos de los huertos La Loma, El Barreno y La Alameda en los Reyes Michoacán, fue posible confirmar la presencia de diversas enfermedades fungosas en la filósfera del arándano, las cuales en su mayoría han sido reportadas ya por otros autores (Caruso y Ramsdell 1995, Cline y Schilder 2006, Wright *et al.* 2007). Las enfermedades aquí reportadas se presentaron con diferente intensidad, destacándose el cáncer del tallo por nivel de daño a la planta; y la roya de la hoja por registrar la mayor incidencia estacional. La roya está considerada como una enfermedad de importancia secundaria, sin embargo, en ocasiones puede provocar defoliaciones intensas que reducen la producción del cultivo en el año siguiente (Bristow y Streh1995). En este estudio, la roya presentó la mayor incidencia durante las tres estaciones, pero el daño al cultivo solo se observó como una parcial defoliación de los arbustos, con mayor efecto en la variedad Sharpblue.

El hongo aislado con mayor frecuencia fue *Colletotrichum* sp., que se encontró asociado a nueve enfermedades observadas. *Alternaria* sp. estuvo asociado a cuatro enfermedades. La frecuente presencia de *Colletotrichum* y *Alternaria* en la filósfera del arándano, es un factor que debe seriamente considerarse como un riesgo para la producción, debido a la plasticidad que muestran para adaptarse a diversas condiciones climáticas y su conocido potencial biótico y patogénico. Las enfermedades que causan impactan la producción y calidad del cultivo y son responsables de pérdidas significativas durante el almacenamiento del fruto (Polashock *et al.* 2005). Es importante determinar en trabajos futuros las especies de *Colletotrichum* y *Alternaria* presentes en las plantaciones de arándano así como el rol que estos hongos juegan en la patogénesis de las enfermedades observadas.

El cáncer o tizón del tallo se presentó con una incidencia de hasta el 41 %, y resulta significativa la frecuente presencia de *Neofusicoccum*. La patogenicidad de este hongo como agente causal de cáncer del tallo está bien documentada (Demaree y Wilcox 1942, Espinoza *et al.* 2009, Milholland 1995, Witcher y Clayton 1963, Wright y Harmon 2010), y es reconocido como uno de los patógenos más perjudiciales en las zonas productoras de arándano (Cline y Schilder 1996, Demaree y Wilcox 1942, Witcher y Clayton 1963, Wright y Harmon 2010).

Phomopsis es considerado un patógeno de importancia, que se reporta causando pudrición de fruto (Milholland 1995) y cáncer del tallo (Farr *et al.* 2001, Ramsdell 1995, Weingartner y Klos 1974, Wilcox 1939, Wright *et al.* 2006), sin embargo, en esta investigación no se detectó en frutos, sólo ocasionalmente en cáncer de tallo; sin embargo-su presencia no debe ser ignorada, ya que se considera potencialmente devastador en el cultivo del arándano cuando las condiciones son favorables para su dispersión y desarrollo (Weingartner y Klos 1974).

De igual forma *Pestalotiopsis* (Espinoza *et al.* 2009; Wright *et al.* 2006) y *Phoma* son reportados causando tizón del tallo del arándano (Szmagara 2009, Wright *et al.* 2006), por lo que su presencia en la zona productora de Michoacán debe ser considerada a fin de determinar su importancia en el desarrollo de esta enfermedad.

Otros hongos aislados de la filósfera del arándano fueron *Phyllosticta*, *Stemphyllium*, *Curvularia* y *Bipolaris*. *Phyllosticta* se reporta atacando otras especies de *Vaccinium* (Szmagara 2009) y ocasionando pudrición de fruto (Oudemans *et al.* 1998). En este trabajo este hongo fue aislado de la “mancha cobriza”. *Stemphyllium*, *Curvularia* y *Bipolaris* ya han sido reportados causando síntomas similares (Caruso y Ramsdell 1995, Cline y Schilder 2006, Wright *et al.* 2007) a los aquí descritos; sin embargo, la incidencia de las enfermedades a que se asociaron y la frecuencia de aislamiento fue baja. El cáncer de yemas es descrito por Milholland (1995), quien lo atribuye a *Gloeosporium minus*. En el presente estudio, del cáncer de yemas se aisló *Colletotrichum*. Algunos autores consideran el género *Gloeosporium* como sinónimo de *Colletotrichum*, debido a que morfológicamente ambos hongos se diferencian por la presencia de setas en los acérvulos y esta característica es variable, particularmente en condiciones de cultivo (Herrera y Ulloa 2004).

A *Chaetomium* se le ha reportado causando pudriciones de madera en cultivos ornamentales (Alexopoulos *et al.* 1996); no existen reportes que señalen a *Chaetomium* como causante de enfermedades en arándano. Es reconocida su condición de saprófito (Crous *et al.* 2009) que se demuestra en este trabajo por su asociación a tejido de yemas muertas. Los resultados de este trabajo aportan evidencia de que el arándano en Michoacán está expuesto al ataque de diferentes enfermedades que en menor o mayor grado demeritan el volumen y la

calidad del producto cosechado. La detección de enfermedades y patógenos reconocidos en otras latitudes como sumamente agresivos para el arándano, debe considerarse como un riesgo potencial de epifitas, por lo que deberán tomarse las medidas de prevención adecuadas a fin de evitar su dispersión hacia otras regiones productoras.

Futuros trabajos sobre aspectos fitopatológicos en arándano deberán orientar su esfuerzo en la verificación de patogenicidad, en la identificación de especies y en la epidemiología de las diversas enfermedades reportadas, como base para el desarrollo e implementación de programas y estrategias eficientes de manejo.

1.5. CONCLUSIONES

Los hongos asociados a diversas enfermedades de la filósfera de arándano arbustivo en plantaciones comerciales establecidas en Los Reyes, Michoacán, pertenecen al menos a 12 géneros: *Alternaria*, *Bipolaris*, *Chaetomium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Neofusicoccum*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Phyllosticta*, *Pucciniastrum* y *Stemphyllium*.

La roya es la enfermedad que presentó la mayor incidencia, mientras que el cáncer del tallo se destacó por su agresividad durante el período evaluado independientemente de la época del año.

De los 13 enfermedades identificadas en la filósfera del arándano, *Colletotrichum* se encuentra asociado a nueve y *Alternaria* a cuatro de ellas.

Asociados al del cáncer del tallo se encuentran, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Neofusicoccum*, *Pestalotiopsis*, *Phoma* y *Phomopsis*. Ya se ha reconocido su participación de estos hongos en la enfermedad.

1.6. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. **Plant pathology**. Fifth edition. Elsevier Academic Press. 921 p.
- Alexopoulos, C. J., C.W. Mims y M. Blackwell. 1996. **Introductory mycology**. John Wiley & Sons. Inc. 869 p.
- Aveskamp, M. M., J. De Gruyter y P.W. Crous. 2008. **Biology and recent developments in the systematic of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance**. *Fungal Diversity* 31: 1-18.
- Barnett, H. L. y B. B. Hunter. 1999. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Fourth Edition. Second printing. Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minn. 218 p.
- Bristow, P. R. y R. D. Milholland. 1995. **Botrytis blight**. En: Caruso, F. y D. C. Ramsdell (Eds.). **Compendium of blueberry and cranberry diseases**. APS Press, The American Phytopathological Society. p.16.
- Caruso, F y D. C. Ramsdell. 1995. **Compendium of blueberry and cranberry diseases**. APS Press. The American Phytopathological Society. 87 p.
- Cline, W. O., P. M. Brannen, y H. Sherm, 2006. **Blueberry disease management in the southeastern United States**. *Acta Hort.* 715: 489-492.
- Cline, W. O y A. Schilder. 2006. **Identification and control of blueberry diseases**. En: N.F Childers y P.M. Lyrene (Eds.) **Blueberries for growers, gardeners, and promoters**. Dr. Norman F. Childers Publications, Melrose Florida. pp.115-138.
- Crous, P. W., G. J. M. Verkley, J. Z. Groenewald, y R. A. Samson. 2009. **Fungal biodiversity**. CBS Laboratory Manual Series. The Netherlands. 269 p.
- Dal Bello, G. y A. Perellò. 1998. **First report of leaf rust of blueberry caused by *Pucciniastrum vaccinii* in Argentina**. *Plant Dis.* 82: 1062.
- Demaree, J. B. y M. S. Wilcox. 1942. **Blueberry cane canker**. *Phytopathology* 32: 136-141.

- Espinoza, J. G., E. X. Briseño, E. R. Chávez, J. R. Úrbez-Torres y B.A. Latorre. 2009. ***Neofusicoccum* spp. associated with stem canker and dieback of blueberry in Chile.** *Plant Dis.* 93: 1187-1194.
- Espinoza, J. G., E. X. Briseño, y B. A. La Torre. 2009. **Identification of species of *Botryosphaeria*, *Pestalotiopsis* and *Phomopsis* in blueberry in Chile.** *Phytopathology* 98: S53.
- FAO. 2010. FAO Statistics Division 2010 (<http://faostat.fao.org>; accesada: 8 Feb. 2010).
- Finch, H. C. y A. N. Finch. 1997. **Los hongos comunes que atacan cultivos en América Latina.** Editorial trillas. México. 188 p.
- OEPP/EPPO. 2009. ***Diaporthe vaccini*.** OEPP/EPPO Bulletin 39:18-24.
- Galletta, G. J. y J. R. Ballington. 1996. **Blueberries, cranberries, and lingonberries.** En: J. Janick y J. N. Moore (eds.). **Fruit breeding**, Vol. II: Vine and small fruits. Wiley, New York. pp 1-107.
- Hancock, J. F. 1995. Introduction: **The taxonomy, botany and culture of *Vaccinium*** En: Caruso, F y D. C. Ramsdell (Eds.). **Compendium of blueberry and cranberry diseases.** APS Press, The American Phytopathological Society. pp 1-5.
- Hanlin, R. T. 2001. **Combined keys to illustrated genera of Ascomycetes 1 and 2.**The American Phytopathological Society. Fifth edition. 113 p.
- Herrera, T. y M. Ulloa. 2004. **El reino de los hongos. Micología básica y aplicada.** 1ra. Reimpresión. UNAM. Fondo de Cultura Económica, México D. F. 551 p.
- Hildebrand, P. D., R. D. Milholland y A. W. Stretch. 1995. **Mummy berry.** En: F. Caruso y D. C. Ramsdell (Eds.). **Compendium of blueberry and cranberry diseases.** APS Press, The American Phytopathological Society. pp 12-13.
- Hyde, K. D., L. Cai, E. H. C. McKenzie, Y. L. Yang, J. Z. Zhang y Prihastuti. 2009. ***Colletotrichum*: a catalogue of confusion.** *Fungal Diversity* 39:1-17.
- Kalt, W. 2006. **Health benefits of blueberries.** En: N. F Childers y P.M. Lyrene (Eds.) **Blueberries for growers, gardeners, and promoters.** Dr. Norman F. Childers Publications, Melrose Florida. pp.182-183.

- Lambert, D. H. 1995. **Anthraco nose**. En: Caruso F. y D.C. Ramsdell (Eds.). **Compendium of blueberry and cranberry diseases**. APS Press, The American Phytopathological Society. p. 17.
- Lane, Ch. y G. Marris. 2007. **Phomopsis canker and dieback of *Vaccinium-Diaporthe vaccinii* (*Phomopsis vaccinii*)**. Scientific Publications of NBU staff. *Plant Dis* Notice. No. 96.
- Lehnert, D. 2008. **Blueberry production is skyrocketing worldwide**. The Fruit Growers News (www.fruitgrowersnews.com/pages/arts.php?ns=908; accesada: 2 dic. 2008).
- Milholland, R.D. 1995. **Anthraco nose fruit rot (ripe rot)**. En: Caruso F. y D. C. Ramsdell (Eds.). **Compendium of blueberry and cranberry diseases**. APS Press, The American Phytopathological Society. p. 16.
- Milholland, R. D. 1995. ***Alternaria* leaf spot and fruit rot**. En: Caruso F. y D.C. Ramsdell (Eds.). **Compendium of blueberry and cranberry diseases**. APS Press, The American Phytopathological Society. p. 18.
- Milholland, R. D. 1995. **Double spot**. En: Caruso F. y D.C. Ramsdell (Eds.). **Compendium of blueberry and cranberry diseases**. APS Press, The American Phytopathological Society. pp. 17-18.
- Milholland, R. D. 1995. ***Gloeosporium* leaf spot and stem canker**. En: Caruso F. y D.C. Ramsdell (Eds.). **Compendium of blueberry and cranberry diseases**. APS Press, The American Phytopathological Society. p. 16.
- Milholland, R. D. 1973. **Blueberry stem canker and dieback caused by *Gloeosporium minus***. *Phytopathology* 64: 727-730.
- Milholland, R. D. 1995. ***Phyllosticta* leaf spot, fruit rot, and berry speckle**. En: Caruso F. y D.C. Ramsdell (Eds.). **Compendium of blueberry and cranberry diseases**. APS Press, The American Phytopathological Society. p. 19.
- Milholland, R. D. 1995. ***Septoria* leaf spot and stem canker**. En: Caruso F. y D.C. Ramsdell (Eds.). **Compendium of blueberry and cranberry diseases**. APS Press, The American Phytopathological Society. p. 16.

- Milholland, R. D. y A.W. Stretch. 1995. **Powdery mildew**. En: Caruso F. y D. C. Ramsdell (Eds.). **Compendium of blueberry and cranberry diseases**. APS Press, The American Phytopathological Society. p. 19.
- Nickerson, N. L. 1995. **Leaf rust**. En: Caruso F. y D.C. Ramsdell (Eds.). **Compendium of blueberry and cranberry diseases**. APS Press, The American Phytopathological Society. p. 27.
- Oudemans, P. V., F. L. Caruso y A. W. Stretch. 1998. **Cranberry fruit rot in the Northeast a complex disease**. *Plant Dis.* 82: 1176- 1184.
- Ploashock, J. J., M. K. Ehlenfeldt, A. W. Stretch y M. Kramer. 2005. **Anthrachnose fruit rot resistance in blueberry cultivars**. *Plant Dis.* 89: 33-38.
- Polashock, J. J. y M. Kramer. 2006. **Screening for resistance to *Botryosphaeria* stem blight and *Phomopsis* twig blight in blueberry**. *Acta Hort.* 715: 493-496.
- Ramsdell, D. C. 1995. ***Phomopsis* canker**. En: Caruso, F. y D. C. Ramsdell (Eds.). **Compendium of blueberry and cranberry diseases**. APS Press, The American Phytopathological Society. p 14.
- Ramsdell, D. C. 1995. ***Fusicoccum* canker (*Godronia* canker)**. En: Caruso, F. y Ramsdell, D. C. 1995. **Compendium of blueberry and cranberry diseases**. The American Phytopathological Society. p 15 .
- Romero, C. S. 1988. **Hongos fitopatógenos**. Primera edición. Universidad Autónoma de Chapingo. 347 pp.
- SAGARPA. 2010. **Servicio de información estadística agroalimentaria y pesquera (SIAP)**. Agricultura. Producción anual. Cierre de la producción agrícola por cultivo. Disponible en <http://www.sagarpa.gob.mx> (accesada: Diciembre de 2010).
- Sisterna, M., B.A. Pérez, M. Divo de Sesar y E. Wright. 2009. **Blueberry blight caused by *Bipolaris cynodontis* in Argentina**. *Plant Pathology* 58: 399.
- Shen, Y. M., C. H. Chao y H. L. Lúu. 2010. **First report of *Neofusicoccum parvum* associated with stem canker and dieback of asian pear trees in Taiwan**. *Plant Dis.* 94: 1062.

- Sutton, B. C. 1992. **The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum***. En: Bailey, J. y M. Jeger (Eds.). ***Colletotrichum: biology, epidemiology and control***. CAB International, Wallingford, UK. pp. 1-26.
- Szmagara, M. 2009. **Biodiversity of fungi inhabiting de highbush blueberry stems**. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus* 8:37-50.
- Úrbez-Torres, J. R., W. D. Gubler, H. Peláez, Y. Santiago, C. Martín y C. Moreno. 2006. **Ocurrence of *Botryosphaeria obtusa*, *B. dothidea*, and *B. parva* associated with grapevine trunk diseases in Castilla y León región, Spain**. *Plant Dis.* 90: 835.
- Webster, J. y R. W. S. Weber. 2008. **Introduction to fungi**. 3rd. Ed. Cambridge University Press. 841 p.
- Weingartner, D. P. y E. J. Klos. 1974. **Etiology and symptomatology of canker and dieback diseases on highbush blueberry caused by *Godronia (Fusicoccum) cassandre* and *Diaporthe (Phomopsis) vaccinii***. *Phytopathology* 65:105-110.
- Wharton, P. S. y A. C. Schilder. 2008. **Novel infection strategies of *Colletotrichum acutatum* on ripe blueberry fruit**. *Plant Pathology* 57: 122-134.
- Witcher, W. y C. N. Clayton. 1963. **Blueberry stem blight caused by *Botryosphaeria dothidea (B. ribis)***. *Phytopathology* 53: 705-712.
- Wilcox, M. S. 1939. ***Phomopsis* twig blight of blueberry**. *Phytopathology* 29: 136-142.
- Wright, E. R., B. A. Pérez, R. L. Fernández, K. Ascitutto, M. C. Rivera, F. Murillo, P. Vásquez, M. Divo de Sesar, A. Pérez, H. L. Aguilar, M. F. Rosato, A. Crelier, y J. Baldoma, 2006. **Conocimiento actual sobre enfermedades del arándano**. En: Primer Congreso Latinoamericano de Arándano y otros Berries. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires.

CAPÍTULO II

IDENTIFICACIÓN DE *Botryosphaeria parva* CAUSANTE DEL CÁNCER DEL TALLO DEL ARÁNDANO EN LOS REYES, MICHOACÁN

RESUMEN

El cáncer del tallo causado por *Botryosphaeria* es una enfermedad que limita el establecimiento de plantaciones de arándano (*Vaccinium* spp.) en el mundo. En Michoacán las plantaciones de arándano establecidas se ven afectadas por la presencia de cáncer, por lo que el objetivo de esta investigación fue identificar, mediante características morfológicas y análisis de DNA, la especie causante del cáncer del tallo del arándano en Los Reyes, Michoacán. En el período 2009 – 2010 se colectaron plantas con síntomas de cáncer y tizón de puntas; la incidencia de la enfermedad se determinó en el 5 % de la población; la patogenicidad del hongo aislado se comprobó en plantas de la variedad Biloxi. La identificación de la especie estuvo basada en la morfología de la colonia y de los conidios y en la mplificación por PCR del rDNA (ITS1-5.8S-ITS2). Las pruebas de patogenicidad resultaron positivas. El mayor crecimiento y producción de picnidios se presentó en medio de cultivo a base de frutos de arándano, mientras que el menor crecimiento se observó en medio con extracto de malta. La colonia presentó micelio aéreo, algodonoso y elevado, blanca en un inicio, con un centro de gris olivo a gris oscuro, márgenes ligeramente lobulados. En tallos sanos inoculados se desarrollaron picnidios globosos, uniostiolados, café oscuro a negro, con una longitud y amplitud de 259.33 y 252.18 μm , respectivamente; los conidios fueron unicelulares, hialinos, granulares, de fusiformes a elipsoides, con una longitud promedio de 18.25 μm y amplitud de 7.58 μm . Las características morfológicas descritas y los resultados de la secuenciación del rDNA amplificado, confirman a *Botryosphaeria parva* como agente causal del cáncer del tallo en Los Reyes, Michoacán.

CHAPTER II

IDENTIFICATION OF *Botryosphaeria parva*, CAUSING AGENT OF BLUEBERRY STEM CANCER IN LOS REYES, MICHOACAN, MEXICO

ABSTRACT

Stem canker caused by *Botryosphaeria* is one of the main fungal diseases that limit blueberry (*Vaccinium* spp.) production worldwide. Since this disease has been observed in production fields, the main objective of this research was to identify, by morphological traits and DNA analysis, the species causing stem canker at Los Reyes, the main blueberry production area of Michoacan, Mexico. During the 2009-2010 season, blueberry plants showing canker, descending death and tip blight symptoms were sampled; disease incidence was determined by randomly sampling 5% total plant population. Pathogenicity of isolated fungus was checked on healthy ‘Biloxi’ plants. Colony and conidia morphology altogether with rDNA (ITS1-5.8S-ITS4) amplification by PCR were used as tools to identify the right *Botryosphaeria* species. Along with other fungi (*Alternaria*, *Colletotrichum*, *Phomopsis* and *Phoma*), *Botryosphaeria* spp. colonies were isolated; average stem canker incidence was 38.35%. Pathogenicity test turned out to be positive. Largest and lowest picnidia growth and production were observed on culture medium composed of blueberry fruit and malt extract, respectively. Colony presented aerial, cotton-like and elevated mycelium; colony was initially white, with its center presenting an olive gray to dark gray color, and slightly lobbed margins. Inoculated healthy blueberry stem sections developed globular, single-ostiole, dark-brown to black, 259.33 μm long and 252.18 μm wide picnidia. Conidia were unicellular, hyaline, granular, from fusiform to ellipsoid, 18.25 μm long and 7.58 μm wide. In addition to the former morphological traits, DNA sequencing confirmed *Botryosphaeria parva* as the blueberry stem canker causing agent in Los Reyes, Michoacan.

2.1 INTRODUCCIÓN

El cáncer o tizón del tallo causado por *Botryosphaeria* spp. es una enfermedad importante del arándano (*Vaccinium* spp.) que limita de manera significativa el establecimiento de nuevas plantaciones (Cline y Schilder 2006); tanto cultivares del tipo arbustos altos como ojos de conejo son susceptibles a la enfermedad (Cline y Schilder 2006, Polashock y Kramer 2006, Smith 2009).

El cáncer del tallo era una enfermedad desconocida antes de 1938, pero Demaree y Wilcox describen por primera vez en 1942 a *Physalospora corticis* como agente causal del cáncer del tallo, posteriormente en 1954 el nombre del patógeno fue cambiado por *Botryosphaeria corticis*. En 1951 Demaree y Morrow confirman a *B. corticis*, como agente causal de la enfermedad y agregan, que las plantaciones cultivadas de arándano son infectadas con inóculo proveniente de arbustos silvestres, reportándose para 1987 ocho razas patogénicas de esta especie en arándano (Milholland 1987).

Taylor, (1958) indica que el cáncer del tallo es causado por otra especie de *Botryosphaeria* no descrita y relativa, pero distinta a *B. corticis*, y que posteriormente fue identificada como *B. dothidea* (Witcher y Clayton 1963). El taxón de *B. dothidea* es aceptado como un complejo de especies y por lo tanto su identidad sigue sin ser clara (Slippers *et al.* 2004). En estudios recientes otras especies de *Botryosphaeria* se reportan relacionadas a esta enfermedad incluyendo a *B. lutea*, *B. parva*, *B. australis* (Sammonds *et al.* 2009), *B. ribis* (Wright y Harmon 2010), *Neofusicoccum arbuti* y *N. australe* (Espinoza *et al.* 2009) y *N. vitifusiforme* (Kong *et al.* 2010)

Anteriormente *B. dothidea* y *B. ribis* fueron considerados sinónimos (Witcher y Clayton 1963, Brown y Britton 1986, Smith *et al.* 1999) de igual forma que *Neofusicoccum ribis* y *N. parvum*, son consideradas especies relativas próximas y su identidad es confusa (Pavlic *et al.* 2009). Basados en características morfológicas y genealogías múltiples de genes, Slippers (*et al.* 2004) indica que *B. dothidea*, *B. ribis* y *B. parva* son especies distintas, y separan a *B. parva* de *B. ribis* usando la septación de los conidios para distinguir a *B. parva*; además señalan que *B. parva* y *B. ribis* probablemente se separaron recientemente, sin embargo, en

2009 Pavlic *et al.* indican que la presencia de septos en los conidios no es una característica constante en las especies de *Neofusicoccum* por lo que no puede ser usada como una característica confiable en la separación e identificación de estas especies.

N. parvum estado anamórfico de *B. parva*, desarrolla en PDA colonias con micelio copioso aéreo, blanco en un inicio, que se torna gris oscuro a negro con la edad (Shen *et al.* 2010, Úrbez-Torres *et al.* 2006, Zea-Bonilla *et al.* 2007); conidios hialinos, unicelulares, elipsoides con un ápice obtuso y subtruncado en la base; la longitud promedio del conidio es de 16.2 μm x 5.8 μm de amplitud, con un rango de 12.0 a 20.0 por 4.0 a 8.0 μm , tornándose café y con una o dos septos al madurar (Úrbez-Torres *et al.* 2006, Zea-Bonilla *et al.* 2007).

La confusión en la taxonomía de *Botryosphaeria* se debe a que los anamorfos de este género aparecen frecuentemente en tejidos afectados y son primeramente utilizados para identificación (Slippers *et al.* 2004); sin embargo, el uso de las características morfológicas del anamorfo no son confiables, por la similitud entre especies y el efecto de la edad en la morfología del conidio (Jacobs y Rehner 1998). Anamorfos de los géneros *Diplodia*, *Botryosphaeria*, *Fusicoccum*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia* y *Sphaeropsis* han sido vinculados a *Botryosphaeria*, pero basados en características morfológicas y en análisis filogenéticos de secuencias ITS del rDNA, sólo dos grupos de anamorfos son reconocidos: anamorfos con conidios pigmentados son clasificados como *Diplodia* y anamorfos de conidios hialinos como *Fusicoccum* (Denman *et al.* 2000).

El uso de herramientas moleculares como la secuenciación de DNA permite distinguir nuevas especies, que sin las cuales podrían permanecer desconocidas (Pavlic *et al.* 2009) y están revelando de manera significativa una mayor diversidad en algunos hospederos que anteriormente se habían analizado (Crous *et al.* 2006); sin embargo, las características morfológicas y algunas fenotípicas como patogenicidad no pueden ser ignoradas por que las diferencias en estas características pueden indicar la presencia de especies crípticas y son de importancia para su identificación (Pavlic *et al.* 2009) .

Otros géneros de hongos se reportan asociados al cáncer del arándano entre ellos *Phoma* sp. (Wright 2006) *Gloeosporium minus* (Milholland 1973, 1995) *Alternaria* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* (Wright 2006, EPPO 2009), *Godronia cassandrae* (EPPO

2009, Ramsdell 1995, Stromeng y Stensvand 2001, Weingartner y Klos 1974), *Pestalotiopsis* spp. (Espinoza *et al.* 2009, Wright 2006) *Phomopsis vaccinii* (Baker *et al.* 1995, EPPO 2009, Espinoza *et al.* 2009, Farr *et al.* 2002, Polashock y Kramer 2006, Ramsdell 1995, Weingartner y Klos 1974, Wilcox 1939, Wright 2006). Los síntomas causados por infecciones de *Botryosphaeria* en la punta de las ramillas, pueden ser confundidas con los ocasionados por *Phomopsis* sp., *Botrytis* sp., *Pestalotiopsis* sp., daños por frío y otras enfermedades (Espinoza y Briseño 2009, Ramsdell 1995, Witcher y Clayton 1963), por lo que el agente causal del cáncer del tallo en plantas no puede ser diagnosticado sin su aislamiento a partir de tallos infectados (Witcher y Clayton 1963).

Las especies de *Botryosphaeria* son descritas como patógenos que entran a través de las yemas florales, lenticelas, estomas y heridas; una vez dentro del tejido el patógeno coloniza el sistema vascular de la planta (Brown y Britton 1986, Demaree y Wilcox 1942, Michailides 1991, Milholland 1972, Witcher y Clayton 1963); sin embargo, cuando penetra a través de estomas abiertos, el hongo no causa necrosis ni muerte descendente, sólo pequeñas lesiones elevadas que no logran crecer; no existen evidencias de la penetración directa del hongo al hospedante (Milholland 1969). Los sitios primarios de infección son las heridas causadas por poda, daños por herbicidas, por frío y por cosechadoras mecánicas (Cline y Schilder 2006, Creswell y Milholland 1987, Milholland 1995, 1972, Polashock y Kramer 2006). La infección por *Botryosphaeria* spp. en tallos a través de heridas provoca una rápida ruptura de todos los tejidos; luego el hongo progresa a la parte baja del tallo, y las tilosas que se forman causan oclusión parcial o total de los vasos del xilema (Milholland 1972). La agresividad de *Botryosphaeria* spp. queda manifiesta por su habilidad para infectar cualquier parte de la planta (si las condiciones son favorables) resultando en un ciclo dinámico de la enfermedad que involucra cada parte de la planta y provee inóculo para nuevas infecciones (Michailides 1991).

La incidencia de la enfermedad en zonas productoras de arándano en Estados Unidos se ha incrementado de un 9 % a un 25 % en 1985 (Creswell y Milholland 1987, Milholland 1985), mientras que en zonas productoras de Nueva Zelanda el 18 % de las plantas son afectadas por esta enfermedad, reportándose costos de 500,000 dólares anuales debido a pérdidas en el campo y costos de replante (Sammonds *et al.* 2009); por otro lado en Taiwan

para 1997 se reporta una incidencia entre 65 % y 93 % en plantaciones de arándano (Ko *et al.* 1999).

Los daños causados por esta enfermedad se presentan como anillamiento y muerte de cañas, lo que reduce la productividad del cultivo e implican un gran costo debido al replante de huertos (Demaree y Morrow 1951, Milholland 1972, Sammonds *et al.* 2009). Las pérdidas son más severas en cultivos jóvenes, ya que las plantas que llegan a ser infectadas generalmente mueren en los dos primeros años (Cline y Schilder 2006, Milholland 1972). En plantaciones viejas, la enfermedad se presenta como muerte descendente de una o más cañas (Smith 1997).

El síntoma típico del cáncer del tallo en campo es la presencia de una o más ramas muertas cercanas a ramas vivas con hojas verdes normales (Cline y Schilder 2006, Witcher y Clayton 1963). Al inicio de la infección, sólo se aprecia desarrollo de coloración amarilla o roja en las hojas de una o más ramas (Cline y Schilder 2006, Milholland 1995). En algunos tallos dañados en la base, las hojas se tornan café claro y permanecen adheridas después de morir. Otras ramas pueden ser defoliadas cuando todas las hojas están muertas. El tejido leñoso del tallo de ramas afectadas tiene una coloración marrón (Milholland 1995). La decoloración del tejido del tallo frecuentemente aparece solo en un lado de los tallos afectados, extendiéndose de pocos centímetros a la completa longitud del tallo (Milholland 1985, Milholland y Creswell 1987, Witcher y Clayton 1963); el hongo produce cuerpos fructíferos bajo la superficie de la corteza, a lo largo del tallo (Cline y Schilder 2006).

El hongo inverna en tallos infectados, el amplio rango de hospederos contribuye a la supervivencia del patógeno y la dispersión de la enfermedad (Cline y Schilder 2006). La dispersión y maduración de las esporas son afectadas por la temperatura y la lluvia, las plantas infectadas muestran síntomas de cuatro a seis semanas después que ocurrió la infección (Milholland 1995). Se ha observado que el estrés por sequía induce la predisposición de las plantas al cáncer del tallo (Milholland 1972).

En los últimos cinco años se ha incrementado la superficie cultivada con arándano en Michoacán, las áreas donde este cultivo se desarrolla presentan condiciones ambientales favorables para el desarrollo de enfermedades infecciosas. Uno de los principales problemas

observados ha sido la presencia de cáncer del tallo y tizón de ramas; asociado a esta enfermedad, de manera consistente se ha aislado al hongo *Botryosphaeria*, sin embargo no ha sido establecida aún la especie por lo que el objetivo de este trabajo fue identificar, con base en características morfológicas y análisis de DNA, la especie causante del cáncer del tallo en arándano presente en la principal zona productora de arándano del estado de Michoacán.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Incidencia del cáncer del tallo

Se determinó la incidencia del cáncer del tallo durante las estaciones de primavera, otoño e invierno del 2009-2010 en las variedades Biloxi y Sharpblue, en los huertos de La Loma, El Barreno y La Alameda, en Los Reyes, Michoacán, mediante un muestreo simple aleatorio. Se realizaron cuatro evaluaciones por estación y se considero el tamaño de la muestra del 5 % de la población.

Colecta de muestras y aislamientos

Se colectaron plantas de arándano con síntomas evidentes de tizón de tallo y de brotes tiernos (Fig. 1). Todas las muestras fueron obtenidas de los huertos La Loma, El Barreno y La Alameda, de Los Reyes, Michoacán, durante el año 2009.

Las muestras se lavaron con agua corriente y jabón, se hicieron cortes de tejido enfermo de 3 a 4 mm de diámetro y se desinfestaron con NaOCl al 2 %, durante 90 segundos, después se lavaron doblemente con agua destilada estéril, se secaron con papel estéril y se sembraron en cajas Petri con medios de cultivo PDA (Bioxon®) y V8-agar y se incubaron a temperatura ambiente. Al obtener el desarrollo del patógeno, se tomó un disco de micelio de los márgenes de la colonia para su purificación. La frecuencia de aislamiento de los hongos obtenidos del síntoma también fue determinada.

Pruebas de patogenicidad

Plantas sanas de dos años de edad de la variedad Biloxi fueron inoculadas artificialmente con micelio de los hongos aislados del síntoma y previamente identificados (Capítulo 1) con base en características morfológicas. Las ramas se desinfestaron con una solución de NaOCl al 2 % y se lavaron con agua destilada estéril; se secaron con papel absorbente estéril, y se les practicó una herida con una aguja hipodérmica. Sobre las heridas se colocaron discos de micelio de 7 mm de diámetro procedentes de un aislados puros de siete días de edad, desarrollados en PDA (Bioxon®); los discos se fijaron a la rama con cinta adhesiva transparente. Se usaron cuatro repeticiones por hongo y se incluyó una planta control, tratada de igual forma pero colocando sobre la herida discos de PDA (Bioxon®) sin crecimiento

micelial. Todas las plantas se mantuvieron en cámara húmeda bajo condiciones de invernadero hasta la aparición de síntomas.



Figura 1. Síntomas de cáncer en arándano. A. Necrosis de la corona B. Defoliación C. Abandamiento, síntoma típico del cáncer del tallo D. Tizón de punta E. Cáncer en ramas.

Identificación morfológica

Para la identificación morfológica de *Botryosphaeria* se utilizaron colonias procedentes de un cultivo monospórico puro, desarrolladas en medio de cultivo PDA (Bioxon®). Las características evaluadas de la colonia fueron: forma, color (anverso y reverso) y apariencia del micelio. Para la medición y caracterización de estructuras reproductivas se hicieron cortes

de picnidios inmersos en el tejido de tallos inoculados, los cortes fueron montados en lactofenol azul. Se midieron 100 conidios y 20 picnidios, utilizando un microscopio compuesto Leica DM1000, con el programa Leica Mycsrosystems CMS GmbH versión 2.4.0 R1. Para las mediciones de las estructuras reproductivas se tomo en consideración longitud x amplitud, indicando la medida menor y mayor así como el promedio de mediciones de las estructuras (Crous *et al.* 2009).

Para determinar la temperatura óptima de crecimiento de *Botryosphaeria* sp. se colocaron discos de 9 mm de diámetro con crecimiento micelial en cajas Petri con 20 mL de medio de cultivo PDA y se incubaron en oscuridad a 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C y 35 °C (Espinoza *et al.* 2009, Wringht y Harmon 2010) en una incubadora (marca mrc). Para cada temperatura se utilizaron cinco cajas Petri. El crecimiento radial del hongo fue medido con una regla milimétrica a intervalos de 24 h durante cuatro días. Con los datos obtenidos se llevo a cabo un análisis de varianza bajo un diseño completamente al azar, así mismo se realizo una comparación múltiple de medias (Tukey $\alpha=0.05$). Los análisis estadísticos fueron ejecutados con el paquete estadístico SAS (SAS Institute, Raleigh, NC.).

Producción de picnidios

Se utilizaron dos métodos para inducir la formación de picnidios de *Botryosphaeria*: 1) en el fondo de frascos de cristal esterilizados a vapor, se colocaron discos de PDA de 2 cm de diámetro con crecimiento micelial de siete días; sobre cada disco se colocaron en posición vertical dos tallos de arándano frescos y sanos de la variedad Biloxi, lavados y desinfestados con una solución de cloro al 2 %. Los frascos se mantuvieron bajo condiciones naturales de luz temperatura y humedad. 2) se prepararon ocho medios de cultivo: PDA, Agar – agua, V8, infusión de frutos de arándano, pulpa de frutos, infusión tallo de arándano con dextrosa, infusión de tallos con CaCO_3 y extracto de malta. Para la preparación de los medios elaborados a base de órganos de arándano se utilizó un procedimiento similar al utilizado para V8-agar (Uddin *et al.* 1997). El pH de cada uno de los medios fue medido con papel indicador (Art.Nr. 92110 pH- Fix 0-14). Cada medio de cultivo fue vaciado a cajas Petri en proporción de 20 mL por caja. En el medio solidificado se colocó en el centro de la caja, un disco de 9 mm de PDA con micelio del hongo de siete días de desarrollo. Se utilizaron cuatro cajas Petri

por cada uno de los medios empleados. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente (18.74 ± 2 °C) y se expusieron a luz fluorescente constante con una lámpara (13W LA08190G Skv. 32697), ubicada 38 cm por encima de las cajas. El crecimiento micelial se midió diariamente con una regla milimétrica.

A las tres semanas de crecimiento de la colonia, se marcaron cuatro puntos perpendiculares a partir del centro de la caja, a intervalos de 90 °. De cada punto se obtuvo un disco de 10 mm de diámetro. En cada disco se contó el número de picnidios presente y se determinó el promedio de picnidios por caja. Los datos de crecimiento micelial y número de picnidios desarrollados fueron sometidos a un análisis de varianza para un diseño completamente al azar, con ocho tratamientos y cuatro repeticiones; así mismo se hizo comparación múltiple de medias (Tukey $\alpha=0.05$). Los análisis estadísticos fueron realizados con el paquete estadístico SAS (SAS Institute, Raleigh, NC.).

Extracción de DNA

La identificación molecular de especie se hizo mediante la amplificación por PCR del rDNA (ITS1-5.8S-ITS2) a partir de colonias monospóricas de los aislados B1097 y B1098 desarrolladas en PDA (Bioxon®), bajo condiciones de oscuridad a temperatura y humedad ambientales.

La extracción del DNA se llevo a cabo de acuerdo al protocolo descrito por Ceniz (1992). Con una espátula se tomó micelio del cultivo y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL que contenía 300 μ L de buffer de extracción (200 mM tris HCl, pH 8.5; 250 mM de NaCl; 25 mM EDTA; 0.5 % SDS). El micelio se maceró con una varilla de cristal y se agregaron 150 μ L de acetato de sodio 3M, pH 5.2; la muestra se incubó a -20 °C durante 10 minutos y posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm (Centrifuga Legend Micro 21R) por 5 minutos a 4 °C; el sobrenadante fue transferido a un tubo limpio, se adicionó un volumen igual de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos; posteriormente se centrifugó nuevamente y el sobrenadante fue decantado; se dio un lavado con etanol al 70 %, se eliminó el sobrenadante y el tubo se colocó en posición vertical invertida sobre una toalla de papel para eliminar los residuos de etanol y secar el precipitado. El DNA se resuspendió en

50 µL de TE. La integridad del DNA se verificó bajo irradiación ultravioleta en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio; se obtuvo una fotografía del gel utilizando un fotodocumentador Bio ImagingSystemsMiniBis Pro. El DNA obtenido se almacenó a -20 °C para su posterior procesamiento.

PCR

Se preparó la reacción en un volumen total de 12.5 µL con aproximadamente 50 ng de DNA total, dNTPs 0.02 mM, MgCl₂ 2.5 mM, oligonucleótidos ITS1 e ITS4 (White *et al.* 1990) 0.2 pmol de c/u, *Taq* polimerasa (Invitrogen) 0.02 U y amortiguador de reacción de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las reacciones se colocaron en un termociclador Labnet, empleando el protocolo descrito por Crous *et al.* (2009). La desnaturalización inicial fue a 96 °C por 5 min, seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineación a 52 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 80 s y un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 min.

Se evaluó el resultado de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio, usando 5 µL de producto de PCR.

Secuenciación del amplicón

El producto de PCR obtenido se purificó y se envió para su secuenciación a la empresa Macrogen Corp. en Maryland, EE.UU.

Análisis filogenético

La secuencias obtenidas se editaron con el programa Sequencher 4.6 (Gene Codes, Ann Arbor, MI) y fueron comparadas con secuencias homólogas publicadas en la base de datos de genes (NCBI GenBank), utilizando el software BLAST (Altschul *et al.*, 1997) disponible en el sitio de Internet del National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA). Las secuencias completas de mayor identidad se seleccionaron para hacer el alineamiento múltiple con el programa ClustalX 2.0; se construyó un fenograma a partir del alineamiento múltiple con el programa MEGA version 5 (Tamura *et al.* 2011), usando el algoritmo máxima parsimonia.

2.3. RESULTADOS

Aislamiento

De las muestras con síntomas de cáncer de tallo se obtuvieron con una frecuencia 8:10 colonias fungosas con las características descritas para *Botryosphaeria*. Las colonias inicialmente es blanca y se torna gris olivo en el centro y gris a negro después de 10 días, de micelio copioso, algodonoso, elevado, con márgenes ligeramente lobulados. Estas características en su mayoría concuerdan con lo reportado por (Espinoza *et al.* 2009, Shen *et al.* 2010, Úrbez-Torres *et al.* 2010). Hongos de otros géneros también fueron aislados de las muestras con cáncer del tallo incluyendo a *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Phomopsis* y *Phoma*.

Pruebas de patogenicidad

La prueba de patogenicidad resultó positiva para todos los hongos aislados; sin embargo, con manifestaciones sintomáticas distintas siendo *Botryosphaeria*, el que reprodujo el síntoma del cual fueron aislados. Los primeros síntomas en las plantas inoculadas que ocasionó *Botryosphaeria* se presentaron tres días después de la inoculación, en forma de pequeñas lesiones irregulares café claro, tornándose más oscuras; a los siete días la necrosis cubrió el diámetro del tallo y causó amarillamiento de hojas y muerte regresiva de la rama.

Incidencia

Durante primavera la incidencia del cáncer del tallo fue de 36.72 %; en otoño se incrementó a 41.26 %, debido a que durante este período la humedad relativa aumentó por las constantes lluvias, condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad (Weingartner y Klos 1974, Ramsdell 1995); en el invierno la incidencia fue de 37.06 %. Durante el verano la toma de datos se suspendió debido a que los arbustos fueron podados.

Identificación morfológica

Las colonias inicialmente fueron blancas tornándose gris olivo del centro de la colonia, y gris oscuro a negro después de 10 días con micelio copioso aéreo, algodónoso, elevado, con márgenes ligeramente lobulados (Fig. 1). Estas características, en su mayoría, concuerdan con lo reportado por Espinoza *et al.* 2009, Shen *et al.* 2010 y Úrbez-Torres *et al.* 2006.

Por lo que se refiere a la prueba de temperaturas hubo significancia ($P > F = 0.0001$), al hacer la separación de medias (Tukey $\alpha = 0.05$), se formaron cuatro grupos: a 30 °C la colonia presentó el mayor crecimiento radial (35.00 mm), mientras que a 10 °C no se observó crecimiento; las temperaturas de 35, 25, 20 y 15 °C presentaron un crecimiento entre 23.39 y 0.60 mm (Fig. 3).

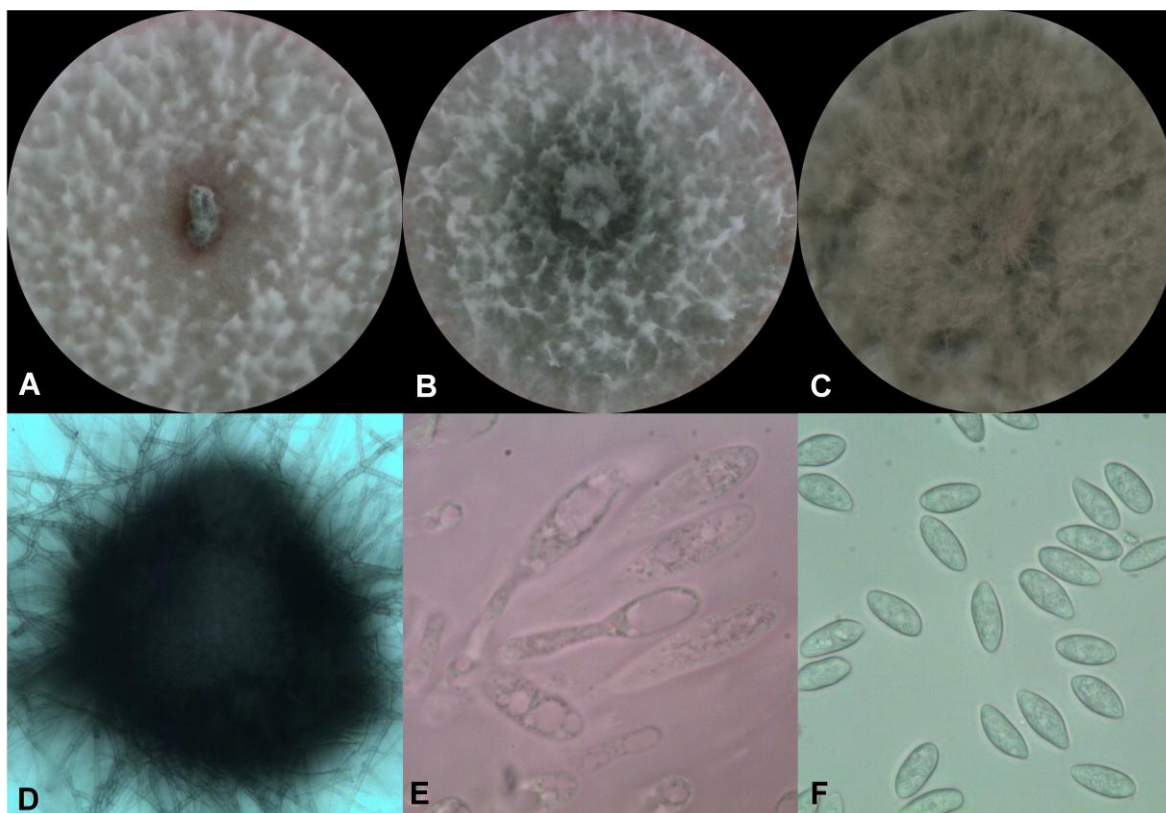


Figura 2. Morfología de la colonia y estructuras reproductivas asexuales de *Botryosphaeria parva* desarrolladas en PDA. A. Colonia a los cinco B. Nueve y C. 14 días de edad D. Picnidio E. Células conidiógenas F. Conidios.

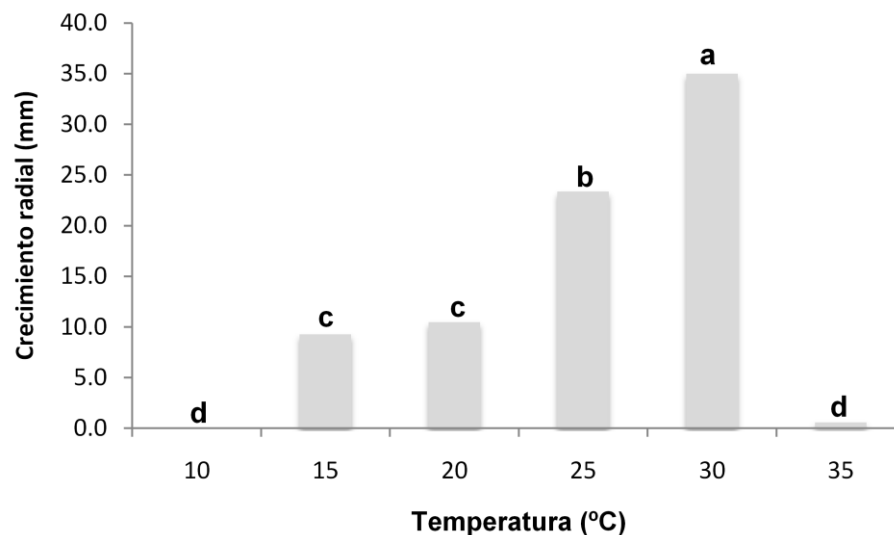


Figura 3. Crecimiento radial de la colonia de *Botryosphaeria parva* incubada a seis temperaturas. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha = 0.05$)

Producción de picnidios

Los picnidios de *Botryosphaeria* se produjeron tanto en tallos de arándano inoculados como en los medios nutritivos evaluados, observándose en este caso mayor número de picnidios.

En el caso de tallos inoculados para inducir la formación de picnidios, se desarrolló necrosis de tejido en la zona de contacto con el micelio, 24 h después de la inoculación; la necrosis avanzó de forma ascendente hasta cubrir todo el tallo en un promedio de 10 días. La formación de picnidios ocurrió a los siete días después de la inoculación. Los picnidios se formaron parcialmente inmersos en el tejido, de forma globosa, uniostiolados, de café oscuro a negro, con dimensiones de 187.12-318.41 (259.33) x 160.52- 397.02 (252.18) μm y para el largo de la cavidad 127.88-319.68 (185.54) μm ; presentó conidios unicelulares hialinos, granulares y fusiformes a elipsoides, con un tamaño de 16.2- 21.33 (18.25) x 6.7-8.5 (7.58) μm , (Fig. 4) características que coinciden con las reportadas por (Espinoza *et al.* 2009, Shen *et al.* 2010, Úrbez-Torres *et al.* 2006).

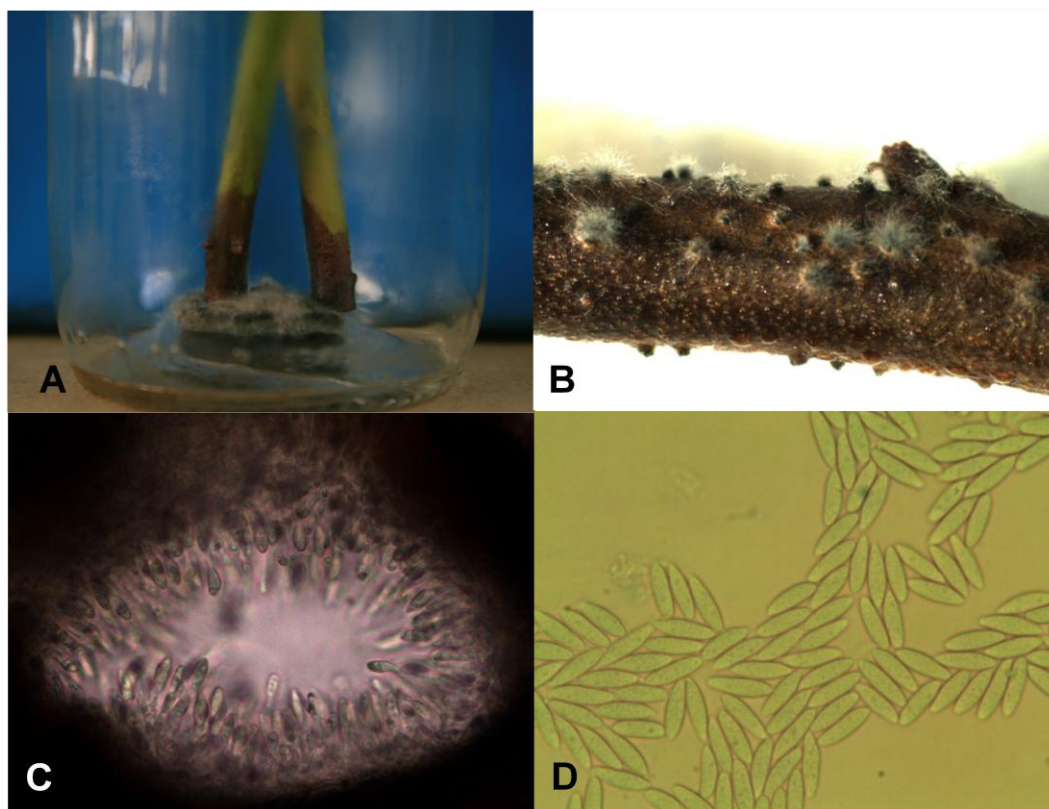


Figura 4. Desarrollo de picnidios de *Botryosphaeria parva* en tallos de arándano. A. Tallos inoculados con *B. parva*, B. Picnidios parcialmente inmersos en el tejido C. Corte transversal de un picnidio D. Conidios.

Con relación a los medios de cultivo, existió variación entre ellos ($P > F = 0.0001$), como puede observarse en el Cuadro 1. Los medios infusión de fruto, pulpa de fruto de arándano y V8, fueron en los que hubo mayor crecimiento, resultaron iguales estadísticamente; los demás medios mostraron un crecimiento intermedio (20.125 a 48 mm), compartiendo grupos estadísticos; el medio extracto de malta presentó el menor crecimiento.

Respecto a la producción de picnidios, el análisis de varianza resultó significativo ($P > F = 0.0001$) donde la mayor producción se obtuvo en el medio de infusión de fruto de arándano, seguido del V8, aunque este último, estadísticamente no fue diferente del de infusión de tallo con dextrosa; mientras que los medios que presentaron el menor número de picnidios fueron extracto de malta y PDA. En el medio Agar agua no se observó producción de picnidios durante el tiempo que se evaluó (Cuadro 1).

Las características que presentan los conidios y los picnidios producidos en los medios de cultivo son similares a los observadas en los tallos (Fig. 4).

Cuadro 1. Diámetro de crecimiento y número de picnidios de *Botryosphaeria parva* desarrollados en 0.8 cm² en cada uno de los medios evaluados.

Medio de cultivo	Diámetro (mm)		Medio de cultivo	No. picnidios	
Infusión de fruto	73.000	a ¹	Infusión de fruto	47.500	a
Pulpa de fruto	73.000	a	Jugo V8	30.063	b
Jugo V8	69.625	a	Infusión tallo dextrosa	18.188	bc
PDA	48.875	b	Pulpa de fruto	9.375	cd
Infusión de tallo	36.375	bc	Infusión tallo	6.063	cd
Infusión tallo dextrosa	24.000	cd	Extracto de malta	2.000	d
Extracto de malta	23.500	cd	PDA	0.938	d
AA	20.125	d	AA	0.000	d

¹Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05)

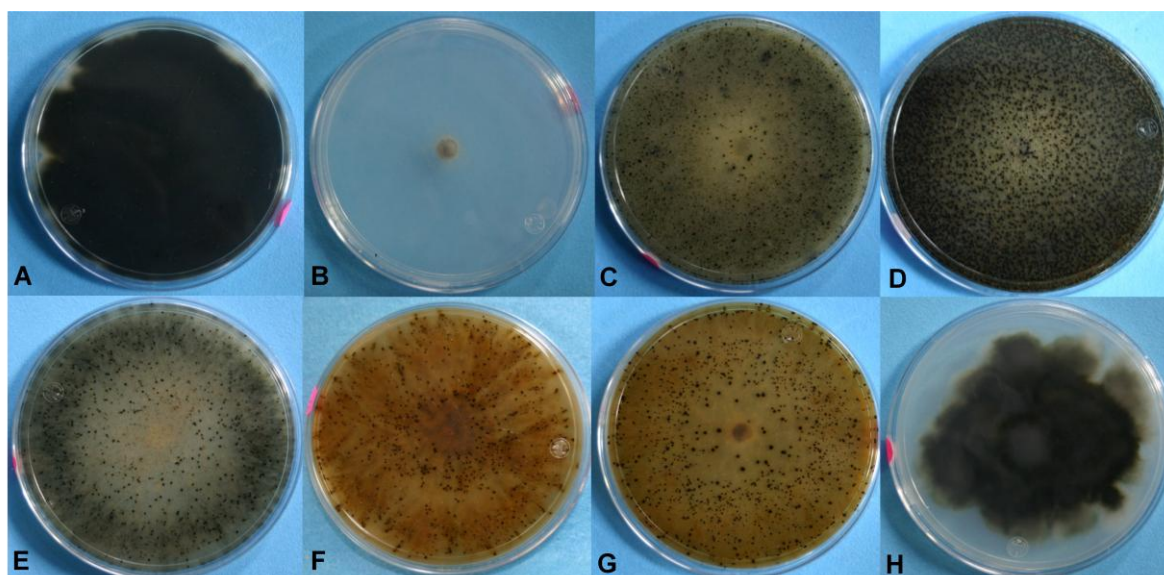


Figura 5. Producción de picnidios de *Botryosphaeria parva* en medios de cultivo. A. PDA B. Agar-agua C. V8 D. Infusión de fruto de arándano E. Pulpa de fruto F. Infusión de tallo G. Infusión de tallo dextrosa y H. Extracto de malta.

Extracción de DNA

El protocolo utilizado para la extracción de DNA permitió la obtención de DNA de buena calidad de todos los aislados; de un tamaño aproximado de 20 kb y libre de degradación. El DNA obtenido fue suficiente para los ensayos de PCR.

Análisis filogenético

Los ensayos de PCR con el par de *primers* ITS1/ITS4 generaron un producto de amplificación de 558 pb para el aislado B1097 y 516 pb para el B1098, observándose el mismo patrón de bandeo en todos los ensayos realizados.

El alineamiento múltiple se llevó a cabo con el empleo de siete secuencias que de acuerdo a los resultados de la comparación BLAST fueron las que mostraron mayor homología con las secuencias obtenidas (Cuadro 2).

La comparación de las secuencias de los ITSs obtenidas con las secuencias depositadas en el GenBank reveló que el aislado B1098 mostró una alta homología con distintas secuencias de *B. parva*. El árbol filogenético generado a partir de la comparación de secuencias reveló que el aislado B1098 presenta una estrecha relación con *B. parva*. Ambas secuencias fueron 98 % idénticas a *Neofusicoccum parvum* aislamiento 290 IV (Número de acceso GU797370) (Fig. 7). *N. parvum* ha sido reportado como el anamorfo de *B. parva* (Crous *et al.* 2006).

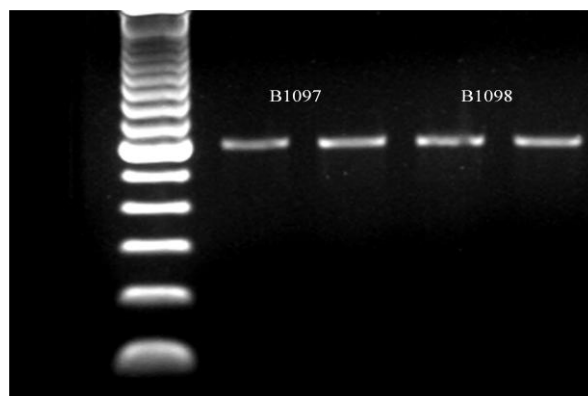


Figura 6. Producto de amplificación del gen 5.8S del rDNA y de los espaciadores internos transcritos ITS1 e ITS2, del aislado 1098 de *Botryosphaeria* obtenidos con los *primers* ITS1/ITS4.

Cuadro 2. Accesiones de secuencias de especies de *Botryosphaeria* utilizadas para el alineamiento múltiple y su identidad con la secuencia de los aislados B1097 y B1098 .

Número de Accesión	Especie	Identidad (%)
AY228105	<i>Botryosphaeria</i> sp. CMW7231	98 %
GU595024	<i>Neofusicoccum parvum</i> isolate H4461	97 %
FJ755238	<i>Neofusicoccum mediterraneum</i> strain CZ109	98 %
GU944801	<i>Neofusicoccum parvum</i>	98 %
EU812205	<i>Botryosphaeria parva</i> isolate B4.2-06	98 %
GU797370	<i>Neofusicoccum parvum</i> isolate 290.IV	98 %
FN640477	<i>Botryosphaeria parva</i>	98 %

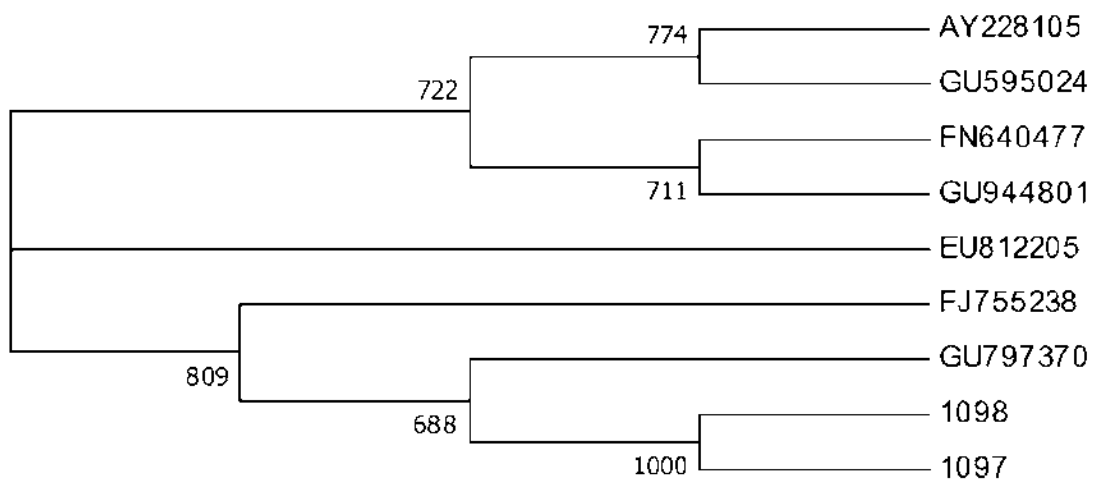


Figura 7. Relaciones taxonómicas evolutivas de *Botryosphaeria*. La historia evolutiva fue inferida con el método “neighbor joining”. La suma de longitudes de ramificación fue de 1.89664340 en el árbol. Los análisis involucran nueve secuencias de nucleótidos, con un total de 461 posiciones en el grupo de datos.

2.4. DISCUSIÓN

Este es el primer trabajo de investigación, que se llevo a cabo con la finalidad de determinar el agente causal del cáncer del tallo en la principal zona productora de arándanos en el estado de Michoacán. Se identificó a *Botryosphaeria parva* asociada con el cáncer del tallo, muerte descendente y tizón de puntas en arándano, además se encontró sola o asociada con otros hongos incluyendo a *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Phoma*, *Pestalotiopsis* y *Phomopsis*, datos que concuerdan con lo reportado por Espinoza *et al.* 2009, Michailides 1991, Wright y Harmon 2010.

B. parva fue la especie aislada del cáncer con mayor frecuencia en las estaciones de primavera, otoño e invierno de las variedades Biloxi y Sharpblue, siendo Sharpblue la que mayor daño presentó, aún cuando esta variedad se señala como resistente al cáncer del tallo (Lyrene y Ballington 2006), esto puede deberse a un aumento en la susceptibilidad del cultivo a enfermedades por ser introducido en un nuevo hábitat, de acuerdo con Lyrene y Ballington 2006.

El reaislamiento del agente causal de lesiones necróticas desarrolladas en las pruebas de patogenicidad confirma que *B. parva* es patógena en arándano. En un estudio en Chile, para confirmar la variabilidad patogénica de especies de *Neofusicoccum*, Espinoza *et al.* (2009) indican que *N. parvum* es la especie más virulenta. El porcentaje de incidencia de la enfermedad obtenido en este estudio y la patogenicidad demostrada de *B. parva* señalan que esta especie puede ser económicamente importante para la industria del arándano, ya que tiene el potencial para reducir la producción del cultivo, por lo que se necesita desarrollar estrategia de control contra esta especie.

B. parva presentó el crecimiento micelial más rápido a los 30 °C, lo que coincide con Espinoza *et al.* 2009, quienes además señalan que esta especie fue aislada de localidades cálidas y secas de Chile.

B. parva, presentó conidios fusiformes, hialinos, granulados, pero en ningún momento se observaron septos, a diferencia con lo reportado por Úrbez-Torres *et al.* 2006, Zea-Bonilla *et al.* 2007; sin embargo, en otros estudios no se encontraron septos en *N. parvum* por lo que

se indica que la presencia de septos en las especies de *Neofusicoccum*, anamorfo de *Botryosphaeria*, no es una característica constante (Pavlic *et al.* 2009).

Estudios previos para inducir la esporulación de especies de *Botryosphaeria* indican que *B. parva*, produce pocos picnidios en medios de cultivo tradicionales y en puntas de hospedero no produce picnidios, ni libera las esporas (Amponsah *et al.* 2008), sin embargo en este estudio, los medios elaborados a base de órganos del hospedero así como el uso de tallos y puntas, indujeron la producción de picnidios de *B. parva*, lo que indica que es factible utilizar medios de cultivo a base de órganos del hospedero para promover la esporulación de esta especie.

Los síntomas obtenidos del cáncer del tallo en esta investigación fueron similares a los descritos en zonas productoras de arándano de EE.UU. causados por *B. dothidea*, (Cline y Schilder 2006, Milholland 1995, Polashock y Kramer 2006) *B. corticis* (Cline y Schilder 2006, Demaree and Morrow 1951) de Chile por *Neofusicoccum* spp. (Espinoza *et al.* 2009), de Nueva Zelanda por *Botryosphaeria* spp. (Sammonds 2009) y en Taiwan por *B. dothidea* (Ko *et al.* 1999).

Aunque la primeras especies descritas como agentes causales del cáncer del tallo en EE.UU. fueron *B. corticis* (Demaree y Wilcox 1942) y *B. dothidea* (Witcher y Clayton 1963) y algunos de los síntomas coinciden con los descritos en este estudio, la presencia de estas especies no se confirmó en esta investigación. Además para la identificación de *B. dothidea* y *B. corticis* en EE.UU. en la década de los 60s se usaron principalmente características morfológicas como color, textura, número de septos, tamaño y forma de conidios; sin embargo, estas características no son del todo confiables debido a la plasticidad de algunas de estas características (Jacobs y Rehner 1998). Recientes avances en técnicas moleculares proveen herramientas confiables para la correcta identificación de las especies de *Botryosphaeria* usando procedimientos como secuenciación de rDNA (ITS1, gen 5.8S, ITS2) (Jacobs y Rehner 1998, Zhonghua y Michailides 2002, Wright y Harmon, 2010), análisis del gen beta-tubulina, factor de elongación 1-alfa (Gezahgne *et al.* 2003, Wright y Harmon 2010) y polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) (Gezahgne *et al.* 2003), sin ignorar las características fenotípicas que ayuden a diferenciar algunas especies anteriormente descritas como *B. dothidea* (Slippers *et al.* 2004). Debido a la similitud en

características morfológicas de conidios del anamorfo y sintomatología entre *B. dothidea*, reportada en EE.UU y *B. parva* identificada en esta investigación, se debe hacer una comparación, que permita determinar si son especies relativas.

Investigaciones hechas por Deenman *et al.* (2003) y Slippers *et al.* (2004) señalan que alrededor de 250 especies de *Botryosphaeria* incluyendo especies de *Neofusicoccum*, están presentes en todo el mundo y son descritas como patógenos de plantas, saprofitos o endófitos. Las especies de *Botryosphaeria* conocidas como endófitas crecen dentro de tejidos de plantas sin exhibir síntomas de enfermedad por que pueden ser introducidas fácilmente en nuevas regiones y representan una amenaza igualmente grave para plantas nativas así como cultivadas (Slippers y Wingfield 2007), por lo que se requieren mas investigaciones para mejorar el entendimiento del ciclo de la enfermedad y establecer protocolos apropiados para el manejo de la misma. El uso de variedades resistentes a la enfermedad debe ser considerado como una estrategia sustentable de control.

2.5. CONCLUSIONES

De los cinco hongos aislados del síntoma del cáncer, *Botryosphaeria* es el que presenta la mayor frecuencia de aislamiento.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la secuenciación de DNA y las características morfológicas, *B. parva* es el agente causal del cáncer del tallo del arándano en el Los Reyes, Michoacán.

Los aislados de *B. parva* obtenidos en la región de Los Reyes, Michoacán, son patogénicos en arándano, lo que sugiere que este hongo puede ser una amenaza para este cultivo.

Es factible utilizar medios de cultivo a base de órganos de arándano para promover la esporulación de *B. parva* aislada de este mismo hospedero.

2.6. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. **Plant pathology**. Fifth edition. Elsevier Academic Press. 921 p.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller y D.J. Lipman. 1997. **Gapped BLAST and PSI-Blast: A new generation of protein database search programs**. *Nucl. Acids Res.* (25) 3389 – 3402. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.
- Amponsah, N. T., E. E. Jones, H. J. Ridgway y M. V. Jaspers. 2008. **Production of *Botryosphaeria* species conidia using grapevine green shoots**. *New Zealand Plant Protection* 61: 303-305.
- Barnett, H. L. y B. B. Hunter, 1999. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Fourth Edition. Second printing. Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minn. 218 p.
- Brown, E. A. y K. O. Britton. 1986. ***Botryosphaeria* diseases of apple and peach in the southeastern**. *Plant Dis.* 70: 480-484.
- Caruso, F y D. C. Ramsdell. 1995. **Compendium of blueberry and cranberry diseases**. The American Phytopathological Society. 87 p.
- Cline, W. O. y A. Schilder. 2006. **Identification and control of blueberry diseases**. En: N. F Childers y P. M. Lyrene (Eds.) **Blueberries for growers, gardeners, and promoters**. Dr. Norman F. Childers Publications, Melrose Florida. pp.115-138.
- Cenis, J. L. 1992. **Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification nucleic acids** *Research*. 20. 2380.
- Crous, P. W., B. Slippers, M. J. Wingfield, J. Rheeder, W. F. O. Marasas, A. J. L. Philips, A. Alves, T. Burgess, P. Barber y J. Z. Groenewald. 2006. **Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae***. *Studies in Mycology*. 55: 235-253.
- Crous, P. W., G. J. M. Verkley, J. Z. Groenewald y R. A. Samson. 2009. **Fungal biodiversity**. CBS Laboratory Manual series. The Netherlands. 269 pp.

- Demaree, J. B. y E. B. Marrow. 1951. **Relative resistance of some blueberry varieties and selections to stem canker in North Carolina.** *Plant Dis. Reporter* 35: 136-141.
- Demaree, J. B. y M. Wilcox. 1942. **Blueberry cane canker.** *Phytopathology* 32:136-141.
- Denman, S., P. W. Crous, J. E. Taylor, J. Ch. Kang, I. Pascoe y M. J. Wingfield. 2000. **An overview of taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny.** *Studies in Mycology*. 45: 129-140.
- Denman, S., P. W. Crous, B. Slippers, B. D. Wingfield y M. J. Wingfield. 2003. **Circumscription of *Botryosphaeria* species associated with Proteaceae base on morphology and DNA sequence data.** *Mycologia*. 95: 294-307.
- De Wet, J., B. Slippers, O. Preisig, B. D. Wingfield y M. J. Wingfield. 2008. **Phylogeny of the *Botryosphaeria* reveals patterns oh host association.** *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 116-126.
- Espinoza, J. G., E. X. Briseño, E. R. Chávez, J. R. Úrbez-Torres y B. A. Latorre. 2009. ***Neofusicoccum* spp. Associated with stem canker and dieback of blueberry in Chile.** *Plant Dis.* 93: 1187-1194.
- Galletta, G. J. y J. R. Ballington. 1996. **Blueberries, cranberries, and lingonberries.** En: J. Janick y J. N. Moore (eds.). **Fruit breeding**, Vol. II: Vine and small fruits. Wiley, New York. pp 1-107.
- Ko, Y., S. K. Sun y C.C. Land. 1999. **First report of stem blight of blueberry caused by *Botryosphaeria dothidea* in Taiwan.** *Plant Prot. Bull.* 41: 133-137.
- Kong, C. S., X. L. Qiu, K. S. Yi y X. F. Yu. 2010. **First report of *Neofusicoccum vitifusiforme* causing blueberry blight of blueberry in China.** Disease notes. *Plant Dis.* 94: 1373.
- Lyrene, P. M. y J. R. Ballington. 2006. **Varieties and their characteristics.** En: N.F Childers y P.M. Lyrene (Eds.) **Blueberries for growers, gardeners, and promoters.** Dr. Norman F. Childers Publications, Melrose Florida. pp. 26-37.

- OEPP/EPPO. 2009. ***Diaporthe vaccini***. OEPP/EPPO Bulletin 39:18-24.
- Michailides, T. J. 1991. **Pathogenicity, distribution, sources of inoculum, and infection courts of *Botryosphaeria dothidea* on pistacho**. *Phytopathology*. 81: 566-573.
- Milholland, R. D. 1973. **Blueberry stem canker and dieback caused by *Gloeosporium minus***. *Phytopathology* 64: 727-730.
- Milholland, R. D. 1995. ***Botryosphaeria* stem blight**. En: Caruso F. y D. C. Ramsdell. 1995. **Compendium of blueberry and cranberry diseases**. The American Phytopathological Society. pp 9-10.
- Milholland, R. D. 1995. ***Gloeosporium* leaf spot and stem canker**. En: Caruso F. y D. C. Ramsdell (Eds.). **Compendium of blueberry and cranberry diseases**. APS Press, The American Phytopathological Society. p. 16.
- Milholland, R. D. 1972. **Histopathology and pathogenicity of *Botryosphaeria dothidea* on blueberry stem**. *Phytopathology* 62: 654-660.
- Milholland, R. D. 1987. **Identification of a new race of *Botryosphaeria corticis* on highbush and rabbiteye blueberry in North Carolina**. *Plant Dis*. 72: 268.
- Pavlic, D., B. Slippers, T. A. Coutinho y M. J. Wingfield. 2009. **Molecular and phenotypic characterization of three phylogenetic species discovered within the *Neofusicoccum parvum*/ *Neofusicoccum ribis* complex**. *Mycologia* 101: 636-647.
- Polashock, J. J. y M. Kramer. 2006. **Screening for resistance to *Botryosphaeria* stem blight and *Phomopsis* twig blight in blueberry**. *Acta Hort*. 715: 493-496.
- Prodorutti, D., H. Pertot, L. Giongo y C. Gessler. 2007. **Highbush blueberry: cultivation, protection, breeding and biotechnology**. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology* 1: 44-56.
- Ramsdell, D. C. 1995. ***Phomopsis* canker**. En: Caruso, F y Ramsdell, D. C. 1995. **Compendium of blueberry and cranberry diseases**. The American Phytopathological Society. 14 p

- Ramsdell, D. C. 1995. ***Fusicoccum* canker (*Godronia* canker)**. En: Caruso, F y Ramsdell, D. C. 1995. **Compendium of blueberry and cranberry diseases**. The American Phytopathological Society. 15 p.
- Sammonds, J., R. Billones, M. Rocchetti, H. J. Ridgway, M. Walter y M. V. Jaspers. 2009. **Survey of blueberry farms for *Botryosphaeria* dieback and crown rot pathogens**. *New Zealand Plant Protection* 62: 238- 242.
- Shen, Y. M., C. H. Chao y H. L. Lú. 2010. **First report of *Neofusicoccum parvum* associated with stem canker and dieback of asian pear trees in Taiwan**. *Plant Dis.* 94: 1062.
- Slippers, B. y M. J. Wingfield. 2007. **Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact**. *Fungal Biology Reviews*. 21: 90-106.
- Slippers, B., P. W. Crous, T. A. Coutinho, B. D. Wingfield y M. J. Wingfield. 2004. **Multiple gene sequences delimit *Botryosphaeria australis* sp. nov. from *B. lutea***. *Mycologia* 96: 1028-1039.
- Smith, H., G. H. J. Kemp, y M. J. Wingfield. **Canker and dieback of eucalyptus in South Africa caused by *Botryosphaeria dothidea***. *Plant Pathology* 43: 1031-1034.
- Tamura, F., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei y S. Kumar. 2011. **MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods**. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
- Taylor, J. 1958. **Stem canker and related blueberry diseases North Carolina**. Agr. Expt. Sta. Tech. Bull. 132. 24 p.
- Uddin, W., Stevenson, K. L., y Pardo-Schultheiss, R. A. 1977. **Pathogenicity of species of *Phomopsis* causing a shoot blight on peach in Georgia and evaluation of possible infection courts**. *Plant Dis.* 81: 983-989.

- Úrbez-Torres, J.R., W. D. Gubler, H. Peláez, Y. Santiago, C. Martín y C. Moreno. 2006. **Ocurrence of *Botryosphaeria obtusa*, *B. dothidea*, and *B. parva* associated with grapevine trunk diseases in Castilla y Leon region, Spain.** Disease notes. *Plant Dis.* 90: 835.
- Weingartner, D. P. y Klos, E. J. 1974. **Etiology and symptomatology of canker and dieback diseases on highbush blueberry caused by *Godronia (Fusicoccum) cassandre* and *Diaporthe (Phomopsis) vaccinii*.** *Phytopathology* 65:105-110.
- White T. J., T. Bruns, S. Lee y J. Taylor. 1990. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.** En: Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J., Sninsky y T. J. White. 1990. **PCR protocols. A guide to methods and applications.** Academic Press, Inc. San Diego, California. 315-322.
- Witcher, W. y C. N. Clayton. 1963. **Blueberry stem blight caused by *Botryosphaeria dothidea (B. ribis)*.** *Phytopathology* 53: 705-712.
- Wright, A. F. y P. F. Harmon. 2010. **Identification of species in Botryosphaeriaceae family causing stem blight on southern highbush blueberry in Florida.** *Plant Dis.* 94: 966-971.
- Wright, E. R., B. A. Pérez, R. L. Fernández, K. Asciutto, M. C. Rivera, F. Murillo, P. Vásquez, M. Divo de Sesar, A. Pérez, H. L. Aguilar, M. F. Rosato, A. Crelier, y J. Baldoma, 2006. **Conocimiento actual sobre enfermedades del arándano. En: Primer Congreso Latinoamericano de Arándano y otros Berries.** Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. 1-4.
- Zea-Bonilla, T., M. A. González-Sánchez, P. M. Martín-Sánchez y R. M. Pérez-Sánchez. 2007. **Avocado dieback caused by *Neofusicoccum parvum* in the Andalucía region Spain.** Disease notes. *Plant Dis.* 91: 1052.

CAPÍTULO III

RESPUESTA DE 24 FAMILIAS SEGREGANTES DE ARÁNDANO (*Vaccinium* spp.) A INOCULACIONES ARTIFICIALES DE *Botryosphaeria parva*.

RESUMEN

El cáncer del tallo es una de las principales enfermedades limitantes del arándano; los daños causados se presentan como anillamiento y muerte de cañas. El uso de variedades resistentes es una medida eficaz y segura para evitar este problema. El objetivo de esta investigación fue evaluar la respuesta de 24 familias de segregantes de arándano a inoculaciones artificiales del agente causal del cáncer del tallo. Plantas sanas de arándano arbustivo del norte (NHB; *Vaccinium corymbosum*), arbustivo del sur (SHB; *Vaccinium* sp.) y ojo de conejo (RE; *V. ahei*)) procedentes de semillas se inocularon con discos de micelio de *B. parva* y se incubaron en cámara húmeda por 24 horas. La resistencia relativa de las familias se determinó cinco semanas postinoculación tomando la longitud de lesión (LL), transformada ésta a una escala logarítmica para poder realizar los análisis estadísticos (ANOVA y prueba de medias); se establecieron intervalos de confianza de 95 % para las medias; para categorizar las familias se hizo una prueba de *t*. Se estimaron componentes de varianza para calcular la heredabilidad del tamaño de lesión. La LL varió de 0 a 257 mm, observándose gran variación entre y dentro de familias. Las familias T-451, Climax, F-105 y Austin se agruparon como muy susceptibles (LL >50 mm); Alapha, Onslow, MS-635, Tifblue, Ira, T-431, T- 584, Montgomery, MS- 250, Premier y Summit como susceptibles (LL de 30.25 a 49.72 mm); las familias A-494, A-272, Ozarkblue, Duke, Early Dawn, A4, A-265, G-615 y Puru se comportaron como resistentes, (LL de 17.80 a 29.67 mm). En general, los arándano NHB y RE fueron los más resistentes y susceptibles, respectivamente. La identificación de estos materiales y la determinación de alta heredabilidad (76 %) para la resistencia relativa permitirán implementar un programa de mejoramiento genético tendiente a obtener, en tiempo relativamente corto, genotipos resistentes a *B. parva* en Michoacán.

RESPONSE OF 24 BLUEBERRY (*Vaccinium* spp.) SEEDLING FAMILIES TO ARTIFICIAL INOCULATIONS WITH *Botryosphaeria parva*.

ABSTRACT

Stem canker is a major disease that limits blueberry production; main damages occur as girdling and eventual death of canes. The use of resistant varieties is an effective tool to avoid this problem. The main objective of this research was to evaluate the response of 24 seedling families of different blueberry types to artificial inoculations with *Botryosphaeria parva*. Healthy plants of northern highbush (NHB; *Vaccinium corymbosum*), southern highbush (SHB; *Vaccinium* sp.) and rabbit eye blueberry (RE; *V. ahei*) originated from seeds were inoculated with *B. parva* mycelium discs followed by incubation in moist chamber for 24 h. Relative resistance of seedling families was determined by measuring lesion length (LL) five weeks after inoculation; LL was transformed to a logarithmic scale in order to perform variance analysis and mean separations; 95 % confidence intervals were established for means. A *t* test was performed to categorize families. Variance components were calculated in order to estimate heritability of lesion response. LL varied from 0 to 257 mm, with much variation among and within families. T-451, Climax, F-105 and Austin were grouped as very susceptible families (LL >50 mm); Alapha, Onslow, MS-635, Tifblue, Ira, T-431, T- 584, Montgomery, MS- 250, Premier and Summit were grouped as susceptible (LL = 30.25 to 49.72 mm); A-494, A-272, Ozarkblue, Duke, Early Dawn, A4, A-265, G-615 and Puru were classed as resistant (LL = 17.80 to 29.67 mm). In general, NHB and RE were classed as the highest resistant and susceptible types, respectively. Identification of resistant genotypes along with the finding of high heritability estimates (76 %) for relative resistance will enhance the implementing of a breeding program aimed at obtaining resistant blueberry varieties to *B. parva* in a relative short period of time.

3.1. INTRODUCCIÓN

El clásico arándano, también conocido como “*blueberry*” por su color azul, es un frutal arbustivo de clima templado que se estableció firmemente en el Este de Norteamérica después de haberse originado de formas tropicales en la era Pleistocénica (Camp 1945). En su hábitat natural, el arándano crece de manera silvestre asociado a bosques de coníferas; su domesticación como cultivo apetecido por el ser humano se inició apenas a principios del siglo XX (Coville 1937).

Los principales países productores de arándano son Estados Unidos y Canadá; contribuyen de manera importante a la producción mundial Chile, Argentina, Australia y Nueva Zelanda (FAO 2010). En 2008 la superficie mundial cultivada con arándano fue de 74,015 ha y se cosecharon 329,147 t de fruta (FAO 2010), lo que representó un aumento del 12.4 % en superficie establecida y 47.2 % en volumen de producción respecto a lo reportado para 2007 (Lehnert 2008). De acuerdo con Strik y Yarborough (2005), se estima que la superficie mundial establecida con arándano se duplicará para el ciclo 2012-2013.

México figura como uno de los países productores de arándano más jóvenes, con plantaciones en los estados de Jalisco (330 ha), Puebla (60 ha) y Michoacán (90 ha); con la excepción de Puebla, las plantaciones se han establecido a partir del año 2003. Sin embargo, las condiciones agroclimáticas propicias para su desarrollo y la cercanía del país con su mercado más importante, los Estados Unidos, hacen que el interés por este frutal vaya en constante aumento (J. López Medina, comunicación personal).

Según Galletta (1975), el arándano cultivado pertenece a la Familia Ericaceae, Subfamilia Vacciniaceae, Tribu Vacciniae, Género *Vaccinium* y Subgénero *Cyanococcus*. Todas las variedades comerciales de arándano fueron seleccionadas de especies o híbridos interespecíficos del género *Vaccinium* sección *Cyanococcus*, al cual pertenecen 13 especies nativas del este de Norte América (Lyrene y Ballington 2006).

Las especies de arándano de mayor importancia económica son del tipo arbustivo, entre las que se encuentran los “arbustos del norte” (NHB) o arándanos altos (*Vaccinium corymbosum* L.), que destacan por su alta productividad con mínimos insumos (Prodorutti et

al. 2007); los “ojos de conejo” (RE; *V. ashei* Reade) y los “arbustos del sur” (SHB; *V. sp.*); estos últimos son híbridos resultantes de cruces entre *V. corymbosum* y *V. ashei* y se caracterizan por presentar bajos requerimientos de frío y producción temprana (Galletta y Ballington 1996). Las variedades que mejor adaptación han mostrado en las regiones subtropicales de Michoacán y Jalisco son del tipo “arbustos del sur” (J. López Medina, comunicación personal). Aún y cuando el área plantada con arándano aumenta constantemente en México, poco se sabe acerca de su susceptibilidad a enfermedades (Smith 2009).

En el estado de Michoacán las principales variedades establecidas son Sharpblue, Misty y Biloxi, las cuales se caracterizan por ser arbustos con buena productividad, de floración y maduración tempranas, con frutos medianos de buen sabor, color y firmeza. Sharpblue fue introducida en 1975 por la Universidad de Florida, con requerimientos de frío de 200 a 300 h (Sharp y Sherman 1976). Sharpblue fue una de las primeras variedades ampliamente plantadas, pero actualmente está siendo remplazada por otras (Lyrene y Ballington 2006). En 1992 la Universidad de Florida introdujo a Misty, variedad que se distingue por presentar requerimientos de frío entre 100 y 300 h, pero con mejor firmeza y color que Sharpblue (Lyrene *et al.* 1997). La variedad Biloxi fue introducida en 1998 por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA); sus necesidades de frío son de 400-500 h y requiere polinización cruzada para fructificar (Lyrene y Ballington 2006, Spiers *et al.* 2002).

Además de sufrir daños por temperaturas, estrés hídrico, desórdenes nutricionales, toxicidad por sales y otros factores físicos y químicos del medio, el arándano se ve afectado por diversos agentes infecciosos, los cuales ocasionan enfermedades en todos los órganos de la planta (Caruso y Ramsdell 1995). La presencia de temperaturas cálidas durante primavera, veranos lluviosos y condiciones de crecimiento continuo presentes en las zonas de Michoacán en donde se produce el arándano, son factores favorables para el desarrollo de enfermedades de origen fungoso, particularmente los de tipo fungoso (Agrios 2005).

El cáncer del tallo es una de las principales enfermedades limitantes del arándano (Cline y Schilder 2006). Los daños causados por el cáncer se presentan como anillamiento y muerte de cañas, lo que reduce la productividad del cultivo e implica un gran costo de replante (Demaree y Morrow 1951, Milholland 1972). Las pérdidas son más severas en cultivos jóvenes, ya que las plantas que llegan a ser infectadas generalmente mueren en los dos

primeros años (Cline y Schilder 2006, Milholland 1972). En plantaciones adultas, la enfermedad se presenta como muerte descendente de una o más cañas (Smith 1997).

Asociados al cáncer del tallo del arándano se han reportado diversos hongos entre ellos *Alternaria* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides* (EPPO 2009, Wright 2006), *Gloeosporium minus* (Milholland 1973, 1995), *Godronia cassandrae* (EPPO 2009, Ramsdell 1995, Stromeng y Stensvand 2001, Weingartner y Klos 1974), *Phoma* sp. (Wright 2006), *Pestalotiopsis* spp. (Espinoza *et al.* 2009, Wright 2006), *Phomopsis vaccinii* (Baker *et al.* 1995, Caruso y Ramsdell 1995, EPPO 2009, Espinoza *et al.* 2009, Farr *et al.* 2002, Polashock y Kramer 2006, Weingartner y Klos 1974, Wilcox 1939, Wright 2006) y *Botryosphaeria* spp. (Demaree y Wilcox 1942, EPPO 2009, Espinoza y Briseño 2009, Espinoza *et al.* 2009, Milholland 1995, Polashock y Kramer 2006, Witcher y Clayton 1963, Wright y Harmon 2010). El diagnóstico del agente causal en campo es difícil, ya que los síntomas causados por *Pestalotiopsis*, *Phomopsis* y *Botryosphaeria* son similares (Espinoza y Briseño 2009, Witcher y Clayton 1963), además de que se les ha encontrado coexistiendo en una misma planta enferma (Espinoza *et al.* 2009, Michailides 1991, Wright y Harmon 2010).

Las especies de *Botryosphaeria* reportadas causando cáncer del tallo en arándano son *B. dothidea* (Cline y Schilder 2006, Creswell y Milholland 1987, 1995, Polashock y Kremer 2006, Smith 2009, Witcher y Clayton 1962, Wright y Harmon 2010), *B. corticis* (Caruso y Ramsdell 1995, Cline y Schilder 2006, Demaree y Morrow 1951, Milholland 1969), *B. parva* (Espinoza *et al.* 2009, Sammonds *et al.* 2009), *B. lutea/australis* y *B. obtusa* (Sammonds *et al.* 2009).

Se ha demostrado que *Botryosphaeria* spp. entra a través de las yemas florales, lenticelas, estomas y heridas; una vez dentro del tejido el patógeno coloniza el sistema vascular de la planta (Demaree y Wilcox 1942, Milholland 1972, Michailides 1991, Witcher y Clayton 1963). Los sitios primarios de infección son las heridas de poda y daños causados por herbicidas, frío o cosechadoras mecánicas (Cline y Schilder 2006, Creswell y Milholland 1987, Milholland 1995, 1972, Polashock y Kramer 2006); sin embargo, cuando penetra a través de estomas abiertos, el hongo no causa necrosis ni muerte descendente, sólo pequeñas lesiones elevadas que no logran crecer (Milholland 1969). No se ha observado penetración directa del hongo al hospedero (Milholland 1969).

Los síntomas del cáncer varían en los diferentes cultivares, dependiendo del grado de susceptibilidad de éstos (Creswell y Milholland 1987, Demaree y Wilcox 1942), el grado de virulencia del patógeno y la forma de penetración de éste en el hospedero (Milholland 1972). En inoculaciones artificiales la respuesta en la planta depende del tipo de inóculo que se use y la parte infectada de la misma (Creswell y Milholland 1987, Wilcox 1940, Witcher y Clayton 1961); también influye la localización geográfica del hospedero (Úrbez-Torrez *et al.* 2006). La agresividad de *Botryosphaeria* spp. queda manifiesta por su habilidad para infectar cualquier parte de la planta (si las condiciones son favorables), resultando en un ciclo dinámico de la enfermedad que involucra cada parte de la planta y provee inóculo para nuevas infecciones (Michailides 1991). Witcher y Clayton (1962) demostraron que los aislamientos de *B. dothidea* obtenidos de varios hospederos leñosos fueron patogénicos en tallos de arándano, existiendo considerable variación de patogenicidad entre ellos y que las infecciones ocurrieron solamente con inoculaciones a través de heridas.

El uso de fungicidas para el control del cáncer del tallo en condiciones de campo son ineficientes (Cline y Schilder 2006, Creswell 1987, Milholland 1995), ya que las enfermedades del tallo son más difíciles de controlar de esta manera que las enfermedades foliares y las de fruto (Polashock y Kramer 2006), por lo que la protección de heridas de poda con fungicidas es una medida preventiva y eficiente (Bester *et al.* 2007). A fin de prevenir la muerte eventual de tallos o de la planta completa y reducir el número de esporas liberadas en el campo, se recomiendan algunas prácticas culturales, tales como la poda de los tallos infectados (Cline y Schilder 2006); sin embargo, el uso tanto de variedades resistentes como de plantas libres de la enfermedad son las medidas más efectivas y seguras para evitar el cáncer del tallo (Cline y Schilder 2006, Demaree y Wilcox 1942, Polashock y Kramer 2006). Las variedades del tipo “arbustos altos” exhiben considerables diferencias en su habilidad para resistir el ataque de hongos causantes del cáncer (Demaree y Wilcox 1942).

La herencia de la reacción del hospedante (susceptibilidad o resistencia) a varios patógenos se ha utilizado en la producción y distribución de variedades resistentes a patógenos que producen una enfermedad en particular (Agrios 2005). Para determinar la resistencia o susceptibilidad a patógenos en plantas de arándano, es crítico considerar el desarrollo del hongo después de la infección y no al establecimiento de ésta; también se debe tomar en

cuenta el tipo de lesión que se desarrolla y no el número de lesiones (Milholland 1969, 1972); otros factores a considerar son el material vegetal, el clima y las prácticas culturales (Stromeng y Stensvand 2001). Las variedades identificadas con un intervalo medio de susceptibilidad pueden funcionar bien bajo condiciones de campo, donde la presión del inóculo es presumiblemente más baja (Ehlenfeldt y Polashock 2009).

La selección de genotipos resistentes se basa generalmente en pruebas de campo con plantas infectadas naturalmente (Creswell y Milholland 1987). Distintos protocolos se han empleado para determinar resistencia al cáncer del tallo (Creswell y Milholland 1987, Demaree y Wilcox 1942, Demaree y Marrow 1951, Espinoza *et al.* 2009, Milholland 1969, Michailides 1991, Polashock y Kramer 2006, Smith 2009). Para determinar susceptibilidad o resistencia de una planta al cáncer del tallo, se ha tomado como criterio la longitud de la lesión en los tallos, medida en un determinado tiempo después de la inoculación con el patógeno (Espinoza *et al.* 2009, Polashock y Kramer 2006, Smit 2009). En algunos casos se ha observado una alta variación entre cultivares, determinando que esa variación se debe a las diferencias de patogenicidad entre los aislamientos de *Botryosphaeria* sp. (Polashock y Kramer 2006). El método de inoculación y la edad de los tallos influyen también en la respuesta de las diferentes variedades; cuando se utiliza micelio como inóculo, la infección es mayor que cuando se utilizan conidios; los tallos endurecidos parcialmente reflejan más apropiadamente la susceptibilidad que los tallos muy jóvenes o muy viejos (Creswell y Milholland 1987).

Algunas variedades de arándano presentaron resistencia a diversos patógenos. Smith (2006), en estudios de susceptibilidad de 20 variedades al “tizón del tallo” (*B. dothidea*), encontró que aquellas variedades del tipo “arbustivo del sur” fueron más resistentes que las “ojo de conejo”. En otro estudio, Polashock y Kramer (2006) evaluaron la respuesta de 50 variedades a *Phomopsis* sp.; las variedades con mayor tolerancia (arándano de matorral) mostraron lesiones menores de 17 mm, mientras que en variedades susceptibles (arbustos del sur y ojos de conejo) las lesiones fueron mayores de 58 mm, considerándose como resistentes aquellas plantas con lesiones menores de 10 mm.

En Michigan, al evaluar la susceptibilidad de nueve variedades del tipo arbustos del norte al cáncer del tallo causado por *Phomopsis vaccinii*, se encontró que ‘Elliott’ y ‘Bluetta’

sobrevivieron por más tiempo a la infección y tuvieron la más baja frecuencia de mortalidad (Baker *et al.* 1995).

En otro estudio, Milholland (1969) evaluó la susceptibilidad de cinco variedades de arándano a *B. corticis*. ‘Angola’ y ‘Murphy’ presentaron lesiones ligeramente levantadas y no se observaron estructuras fructíferas como peritecios o picnidios, por lo que estas variedades se consideraron resistentes; en cambio ‘Weymouth’ y ‘Wolcott’, por presentar lesiones grandes y elevadas, se consideraron como susceptibles (Milholland 1969). Para el caso de *B. corticis*, se observó que el proceso de infección, germinación de esporas, penetración y establecimiento en tallos de arándano fue un proceso lento (Milholland 1969), por lo que la observación del hongo durante una sola temporada no es suficiente para el desarrollo de signos definitivos de patogenicidad (Demaree y Wilcox 1942).

Basándose en la longitud de lesión después de inoculaciones artificiales con *B. corticis*, Polashock y Kramer (2006) reportan que los arbustos medio altos y los arbustos bajos se destacaron por ser más resistentes que otros tipos de arándanos. Entre los arbustos altos, Weymouth fue la variedad más resistente, mientras que Ozarkblue, Bluecrop, Duke y Bluejay fueron las variedades más susceptibles. Además, en ese mismo trabajo se señaló que la fuente de resistencia en esas variedades no era obvia debido a que muchas de las plantas evaluadas eran híbridos interespecíficos. Entre los materiales que comúnmente presentaron resistencia destacan aquellos descendientes de germoplasma derivado de *Vaccinium angustifolium* (Polashock y Kramer 2006).

Según Milholland (1995), la mayoría de las variedades de “arbustos altos” (HB) son susceptibles a *Botryosphaeria* spp.; sin embargo, las variedades Murphy, Cape Fear y O’Neal han mostrado resistencia en campo. En un estudio hecho en Chile, Espinoza *et al.* (2009) evaluaron la susceptibilidad de nueve variedades de arándano a la inoculación artificial con tres especies de *Neufusicoccum*, con los resultados siguientes: Elliott fue la variedad más susceptible; ‘Brighwell’, ‘O’Neal’ y ‘Brigitta’ fueron moderadamente susceptibles; ‘Misty’, ‘Bluecrop’ y ‘Duke’ resultaron ser las menos susceptibles; la especie más virulenta de los aislamientos evaluados fue *N. parvum* (Espinoza *et al.* 2009).

Smith (2009) utilizó la variedad susceptible Tifblue, del tipo “ojo de conejo”, como control para determinar la severidad de la enfermedad según la longitud de lesión. Aquellas variedades con una longitud de lesión menor que la de Tifblue fueron clasificadas como resistentes, entre las que se incluían a tres del tipo “arbusto del sur” (Pearl River, Emerald, y Star); variedades con una longitud de lesión igual a Tifblue se clasificaron como susceptibles, entre ellas Biloxi, Bluecrisp, Brighwell, Magnolia, Ozarkblue; aquellas con longitud de lesión mayor que Tifblue se consideraron como muy susceptibles, tales como Legacy, Gulf Coast, Cooper, Jubilee, O’Neal, Magnolia y Reveille.

De acuerdo con Cline y Schilder (2006), las variedades más resistentes a la infección por *Botryosphaeria* spp. fueron Murphy, O’Neal y Cape Fear, todas del tipo SHB, las cuales raramente mueren debido a esta enfermedad, aunque pueden llegar a infectarse.

En la región productora de arándano del estado de Michoacán se cultivan variedades tipo SHB (Biloxi, Sharpblue, Misty), las cuales han mostrado susceptibilidad al cáncer del tallo causado por *B. parva*; esta enfermedad llega a presentarse en niveles de incidencia de hasta 41 %. Ante la posibilidad de crecimiento de la superficie cultivada, dadas las excelentes oportunidades de mercado actuales y futuras para el arándano, se hace necesario generar una base de conocimiento sobre el comportamiento de diferentes genotipos ante el cáncer de tallo; esto con el fin de detectar posibles fuentes de resistencia genética y determinar su uso potencial en programas de mejoramiento y en el establecimiento de nuevas plantaciones comerciales. Por tal motivo, el presente trabajo se llevó a cabo con el objetivo de determinar la respuesta de 24 familias de segregantes de arándano a inoculaciones artificiales de *B. parva*.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron semillas de polinización libre de 24 familias de arándanos, entre ellas del tipo arbustivos del norte (NHB), arbustivos del sur (SHB) y ojos de conejo (RE), las que fueron colectadas durante el verano del 2007 en zonas productoras de Arkansas y Oregon, EEUU. La semilla se trasladó a la Facultad de Agrobiología de la Universidad Michoacana, en donde se mantuvo en refrigeración (5 ± 1 °C) hasta el momento anterior a la siembra.

La germinación de semillas se inició el 17 de marzo de 2009 bajo condiciones de invernadero. El sustrato utilizado consistió en una mezcla en proporción 1:1 (v/v) de turba canadiense o “peat moss” (Premier Tech Horticulture; Quebec, Canadá) y corteza de pino molida. La semilla se colocó en charolas de plástico sin divisiones (53 cm largo x 27 cm ancho x 6 cm alto) llenadas con el sustrato descrito; durante el proceso de germinación el invernadero se mantuvo con riego por nebulización intermitente activado durante las horas de mayor calor durante el día. A finales de agosto de 2009, las plántulas obtenidas se pasaron a charolas de poliestireno (Beaver Plastics, Uruapan, México) de 80 cavidades, cada cavidad de 55 cm³; esta vez el sustrato consistió en una mezcla en proporción 1:1 (v/v) de turba canadiense y perlita (Horti-Pearl, North Hollywood, Calif.); a esta mezcla se agregaron 2 g de Basacote® plus (Compo Agro, Chile) por cada litro de sustrato. En marzo de 2010, cuarenta plantas de cada familia de segregantes se transfirieron a charolas de poliestireno (Beaver Plastics) de 60 cavidades, cada cavidad con 220 ml de capacidad, utilizando el mismo sustrato, pero esta vez adicionado con 4 g de Basacote® plus por litro de la mezcla. Estas plantas, que fueron inoculadas, posteriormente se mantuvieron en invernadero con un nivel de humedad adecuado.

Inóculo

Como inóculo se utilizaron discos de micelio de 9 mm de diámetro. Los discos de micelio fueron tomados de colonias monospóricas de cinco días de edad de un aislado de *Botryosphaeria parva* (B1097). Las colonias fueron desarrolladas en PDA (Bioxon®) en

condiciones de oscuridad a una temperatura de 22 °C. La patogenicidad de la especie fue previamente confirmada en plantas de arándano de la variedad Biloxi.

Inoculación

Los tallos y ramas de las plantas se sanitizaron con una solución de NaOCl al 2%, luego se lavaron con agua destilada estéril y se secaron con papel absorbente esterilizado. De cada planta se seleccionó la rama más vigorosa, la cual se despuntó a una altura promedio de 10 cm, empleando para ello tijeras sanitizadas con la solución señalada anteriormente. El inóculo se colocó en la herida generada y se fijó con cinta parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, Ill.). Como controles positivos se incluyeron ocho plantas de la variedad Biloxi, las cuales fueron inoculadas de la misma forma; también se incluyeron 48 controles negativos que se trataron con círculos de PDA (Bioxon®) estériles (Polashock y Kramer 2006). Después de la inoculación, las plantas se mantuvieron por 24 h a una temperatura promedio de 26 °C y 90 % de humedad relativa, en una cámara humedad 1.5 m de ancho x 4 m de largo x 1 m de alto) construida en un área aislada dentro del invernadero. Las plantas inoculadas fueron distribuidas en un diseño en bloques al azar con 24 tratamientos (familias) y 4 repeticiones; cada repetición estuvo formada por 10 plantas.

Evaluación

La longitud de lesión en cada una de las plantas inoculadas se midió a partir del punto de inoculación y hasta el margen de la zona necrótica. La medición se hizo con un calibrador marca Foy (Foy Tools) de 0.05 mm de precisión. Se efectuaron cinco mediciones a intervalos de siete días, a partir del 24 de septiembre. Durante todo el periodo de evaluación, las plantas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero y fueron regadas según se requería. Al finalizar las evaluaciones, de cada familia se seleccionó una planta sintomática y ésta fue trasladada al laboratorio para realizar re-aislamientos en PDA del patógeno inoculado. Al finalizar el experimento las ramas infectadas se podaron y las heridas causadas por la poda fueron cubiertas con una pasta de Thiabendazol.

Análisis estadístico

Con el propósito de remover la dependencia de la desviación estándar respecto a su media y poder cumplir el supuesto de homogeneidad de varianzas requerido por la prueba de F , los valores de longitud de lesión fueron transformados a valores logarítmicos mediante la ecuación $z = \log(y+1)$, donde y representó la longitud de lesión. Con los datos transformados se hizo el análisis de varianza mediante el procedimiento Proc GLM del programa SAS (SAS Institute, Raleigh, NC), versión 8. Los datos transformados solo se usaron en el análisis de varianza. La comparación de medias se hizo con la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) y se determinaron intervalos de confianza al 95 % para la media. Adicionalmente, las familias se agruparon de acuerdo al tipo de arándano.

La respuesta de cada una de las familias a la inoculación con *B. parva* se determinó mediante una prueba de t (0,05) basada en la longitud de lesión. Se calculó la media general de longitud de lesión y se seleccionó la familia cuya media de longitud de lesión fuera más próxima a la media general. Esta familia se utilizó como referencia en la prueba de t . A fin de formar grupos de familias de fácil identificación, se utilizó un sistema de tres categorías: 1) muy susceptibles, familias con promedio de longitud de lesión significativamente mayores que la familia referencia; 2) susceptibles, familias con promedio de longitud de lesión estadísticamente iguales a la familia referencia, y 3) resistentes, familias con promedio de longitud de lesión significativamente menores que la familia referencia.

Los gráficos presentados fueron realizados con el software estadístico R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), versión 2.12.1.

Con los datos de longitud de lesión transformados a una escala logarítmica se hizo un análisis de componentes de varianza. Para ello, se utilizó el procedimiento “Variance Components Estimation” del programa SAS; los cálculos se basaron en la fórmula propuesta por Márquez-Sánchez y Sahagún-Castellanos (1994) para familias de medios hermanos, ya que todas las familias de segregantes utilizadas en el presente trabajo resultaron de polinización libre. Con los componentes de varianza se calculó la heredabilidad.

3.3. RESULTADOS

Se observó gran variación entre y dentro de las familias (Fig. 1). Obteniéndose lesiones de 0 hasta 257 mm.

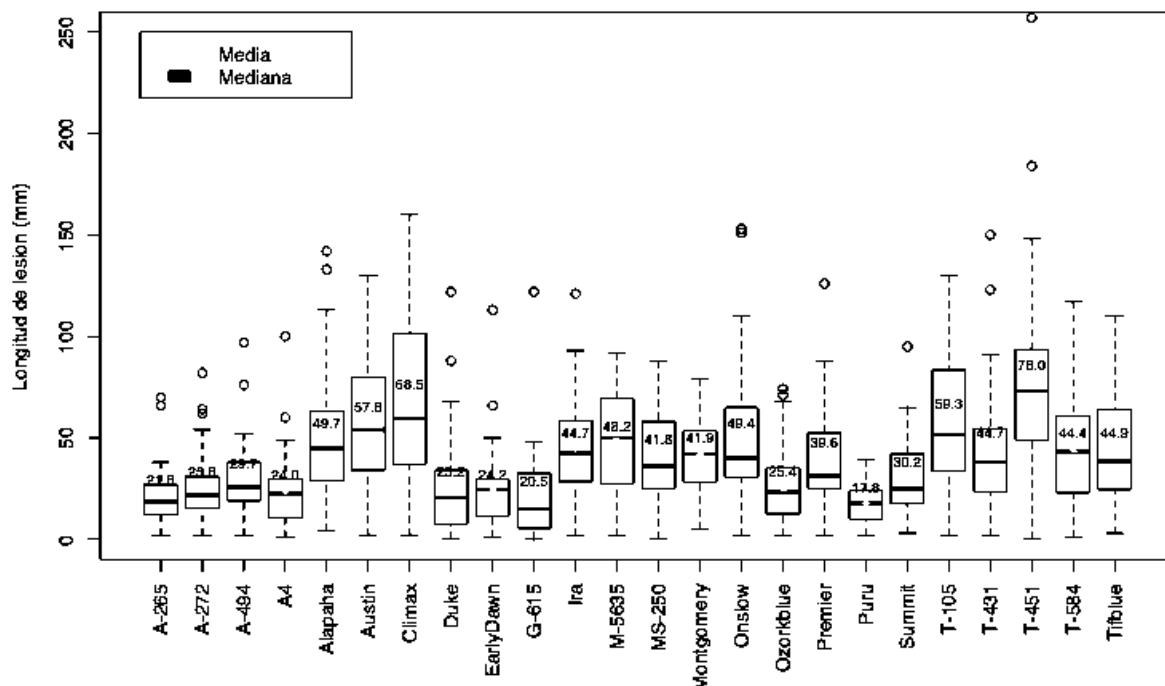


Figura 1. Respuesta de 24 familias de arándano a infecciones de *Botryosphaeria parva* cinco semanas después de la inoculación.

El 98.53 % de plantas inoculadas presentó lesión necrótica a los siete días después de haber sido inoculadas. Durante las cinco semanas de evaluación, fue posible observar respuestas diferenciadas de las plantas. El desarrollo de lesiones fue marcadamente rápido durante las semanas dos y tres; la mayoría de lesiones detuvieron su desarrollo a partir de la tercera semana; sin embargo, en un grupo de plantas de diferentes familias la lesión mantuvo su crecimiento hasta alcanzar la base del tallo.

El análisis de varianza de la respuesta de las familias de segregantes a las inoculaciones artificiales con *B. parva* indicó variación entre ellas ($P > 0.0001$) (Tabla 1). Al realizar la comparación de medias (Tukey $\alpha = 0.05$), se formaron siete grupos; la longitud media de lesión varió de 17.8 a 78 mm. La familia T-451 presentó mayor longitud de lesión (78 mm), seguida de las familias Climax (68.5 mm), F-105 (59.3 mm) y Austín (57.6 mm). Por otro lado, la familia Puru presentó la menor longitud de lesión (17.8 mm). La longitud de lesión de las demás familias varió de 21 a 49.72 mm (Fig. 2, Cuadro 1).

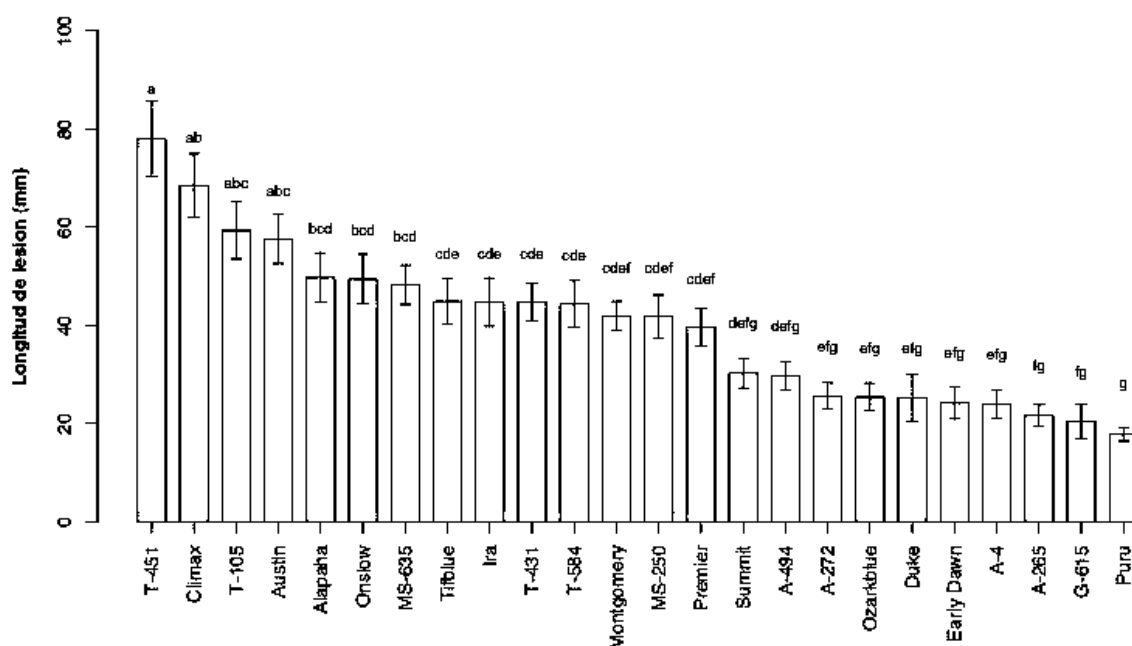


Figura 2. Respuesta de 24 familias segregantes de arándano a infecciones artificiales de *Botryosphaeria parva* cinco semanas después de la inoculación. Media de longitud de lesión. Familias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey=0.05). Las barras representan el error estándar de la media.

Cuadro 1. Familias de segregantes de arándano utilizadas en la prueba de resistencia y su respuesta a la infección de *Botryosphaeria parva*

Familia	Tipo ¹	Origen	Longitud de lesión (mm) ²		Intervalo de Confianza 95%	Reacción ³
T-451	SHB	Arkansas	78.000	a	62.495, 93.505	ms
Climax	RE	Arkansas	68.475	ab	55.319, 81.631	ms
F-105	RE	Arkansas	59.300	abc	47.536, 71.064	ms
Austin	RE	Arkansas	57.575	abc	47.493, 67.650	ms
Alapaha	RE	Arkansas	49.725	bcd	39.188, 59.612	s
Onslow	RE	Arkansas	49.400	bcd	39.603, 59.847	s
MS-635	SHB	Arkansas	48.200	bcd	40.125, 56.275	s
Tifblue	RE	Arkansas	48.850	cde	34.738, 53.962	s
Ira	NHB	Oregon	44.725	cde	36.993, 52.457	s
T-431	SHB	Arkansas	44.700	cde	35.397, 54.303	s
T-584	SHB	Arkansas	44.350	cdef	34.817, 54.583	s
Montgomery	RE	Arkansas	41.875	cdef	33.038, 50.505	s
MS-250	SHB	Arkansas	41.794	cdef	35.864, 47.886	s
Premier	RE	Arkansas	39.650	defg	31.893, 47.407	s
Summit	SHB	Arkansas	30.250	defg	23.946, 35.404	s
A-494	SHB	Arkansas	29.675	defg	24.142, 36.358	r
A-272	SHB	Arkansas	25.625	efg	17.346, 33.154	r
Ozarkblue	SHB	Arkansas	25.400	efg	20.186, 31.064	r
Duke	NHB	Oregon	25.250	efg	19.733, 31.067	r
Early Dawn	NHB	Oregon	24.175	efg	17.722, 30.628	r
A4	NHB	Arkansas	24.000	efg	18.207, 29.793	r
A-265	SHB	Arkansas	21.650	fg	17.145, 26.155	r
G-615	NHB	Arkansas	20.460	fg	13.317, 27.606	r
Puru	NHB	Oregon	17.800	g	14.982, 20.618	r

¹Tipo de arándano: **RE** ojos de conejo; **SHB** arbustos altos del sur; **NHB** arbustos altos del norte

²Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

³Reacción: **ms** muy susceptible; **s** susceptible; **r** resistente

La media general de longitud de lesión fue de 39.87 mm. La familia Premier, con una longitud de lesión media de 39.65 mm, fue la más próxima a la media general, por lo que fue tomada como referencia para determinar la respuesta de las familias a la infección. De acuerdo a la prueba de *t*, cuatro familias fueron identificadas como muy susceptibles, once familias como susceptibles y nueve familias como resistentes (Fig. 3).

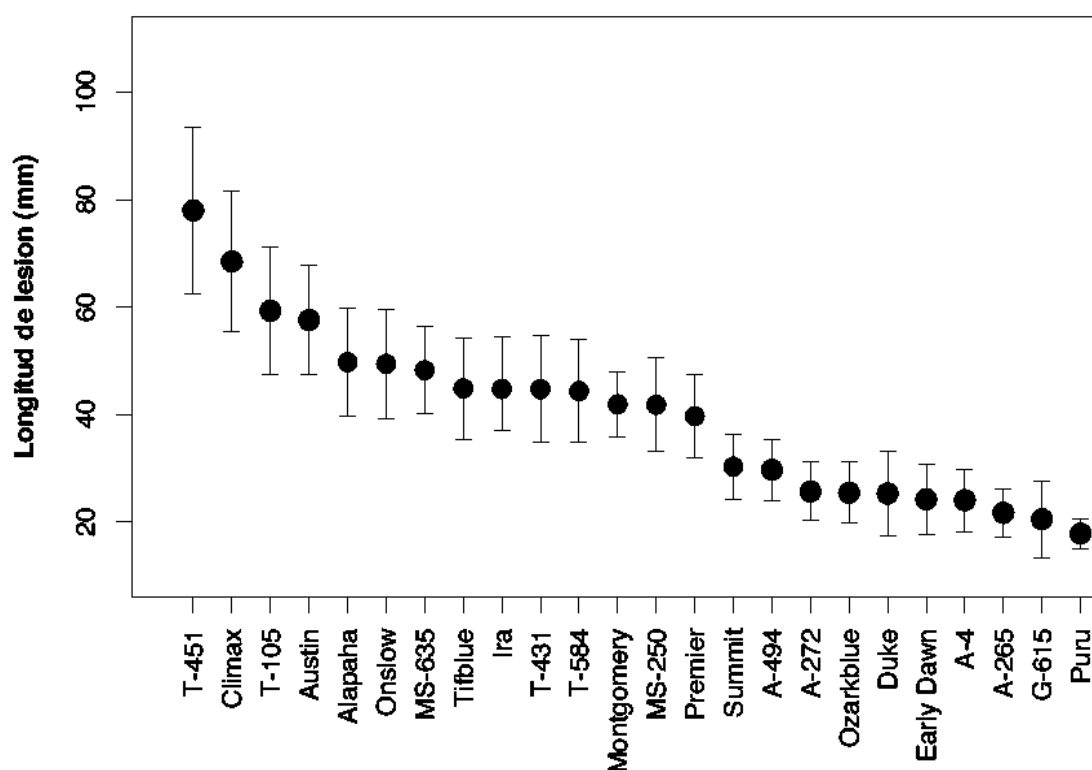


Figura 3. Respuesta de 24 familias de arándano a infecciones de *Botryosphaeria parva* cinco semanas después de la inoculación. Los círculos representan la media de longitud de lesión; las líneas representan los intervalos de confianza al 95 %. Familias con círculos negros son diferentes del promedio ($P=0.05$).

Las familias Climax, F-105 y Austín, del tipo RE se agruparon como muy susceptibles; Alapha, Onslow, Tifblue, Montgomery y Premier se agruparon como susceptibles, con una longitud de lesión media que varió de 68.47 a 39.65 mm. Dentro de arándanos del SHB, las familias susceptibles fueron MS-635, T-431, T-584, MS-250 y Summit; como resistentes estuvieron las familias A-494, A-272, Ozarkblue y G-615; solo la familia T-451 fue muy susceptible, con longitud de lesión que varió de 78.0 a 25.4 mm. Las familias Duke, Early Dawn, A4, G-615, del NHB, se comportaron como resistentes; de éstas, únicamente la familia Ira se mostró susceptible. El intervalo de longitud de lesión para este tipo de arándanos fue de 44.7 a 17.8 mm.

Al inicio de la infección, los tallos presentaron una coloración café claro y conforme la lesión avanzó, se tornó café oscuro y adquirió una consistencia rugosa; las hojas se tornaron rojas o café claro y finalmente se secaron. La lesión avanzó de forma irregular; el color del margen de la lesión varió entre amarillo, rojo y café. En algunas plantas se observó que cuando las lesiones desarrollaron borde rojo, el crecimiento de la lesión se detuvo; en otras plantas el cáncer avanzó hasta causar defoliación total. *Botryosphaeria parva* fue re-aislado de todas las familias infectadas, no así de los controles negativos.

En algunas plantas se observaron lesiones grandes, las cuales avanzaron hasta la corona y presentaron un área intermedia de tejido sano. De éste tejido asintomático no fue posible aislar al patógeno.

Después de cinco semanas, 50 plantas de diferentes familias presentaron lesiones menores de 5 mm, por lo que fueron nuevamente inoculadas con el propósito de reevaluar su respuesta al patógeno; de estas 50 plantas, 20 de ellas (4 - Early Dawn, 3 - Ozarkblue, 3 - A4, 3 - A- 272, 2 - G-615, 1 - MS-250, 1 - Puru, 1 - T-584, 1 - A-494 y 1 - Duke) desarrollaron lesiones menores de 10 mm. Este material se seleccionó para ser utilizado posteriormente en programas de mejoramiento genético.

Con relación a los tipos de arándanos evaluados, la respuesta a la inoculación de *B. parva* fue altamente significativa ($P > 0.0001$); la prueba de separación de medias permitió la formación de tres grupos en donde los arándanos RE mostraron mayor susceptibilidad a la

infección; los SHB mostraron una respuesta moderada y los NHB exhibieron resistencia a la infección. (Cuadro 2).

Cuadro 2. Respuesta de los tipos de arándano a inoculaciones artificiales de *B. parva*..

Tipo de arándano	Longitud de lesión (mm)	Reacción
Ojos de conejo	51.356 a ^z	Muy susceptible
Arbustos altos del sur	38.921 b	Susceptible
Arbustos altos del norte	26.292 c	Resistente

^z Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey=0.05).

Debido a que los genotipos de arándano utilizados fueron originados por polinización libre, cada una de las familias, al tener un progenitor femenino en común, estuvo formada por medios hermanos. La determinación de componentes de variación permite conocer qué tan importante es el aspecto genético en la manifestación de un carácter y si ese mismo es heredable en cierto grado. Al respecto, los componentes de varianza obtenidos fueron:

$$\text{Var (Bloques)} = 0.01833, \text{Var (Familias)} = 0.03689$$

$$\text{Var (Familias*Bloques)} = 0.003460, \text{Var (Error)} = 0.15305$$

Con los valores de anteriores se calcularon las varianzas aditivas y de dominancia (Márquez-Sánchez y Sahagún-Castellanos 1994):

$$\sigma^2 A = \text{Varianza aditiva} = 4 \text{ Var (Familias)} = 4(0.03689) = 0.14756$$

$$\begin{aligned} \sigma^2 D &= \text{Varianza de dominancia} = \text{Var (Error)} - 3*\text{Var (Familias)} \\ &= 0.15305 - 3(0.03689) = 0.04238 \end{aligned}$$

Los datos anteriores permitieron estimar el valor de heredabilidad en sentido estricto de la manera siguiente:

$$\begin{aligned} h^2 &= \sigma^2 A / (\text{Var (Familias)} + \text{Var (Familias*Bloques)} + \text{Var (Error)}) \\ &= 0.14756 / (0.03689 + 0.00346 + 0.15305) = 0.76 = 76 \% \end{aligned}$$

3.4. DISCUSIÓN

Las familias segregantes de arándano evaluadas en este estudio mostraron respuesta diferencial a las inoculaciones de *Botryosphaeria parva*. Dentro de cada familia se observó gran variación, derivada de la heterocigosis presente dentro de los segregantes procedentes de polinización libre. La respuesta diferencial se puede atribuir a la composición genética de los materiales.

En un estudio de evaluación de la susceptibilidad al cáncer del tallo, Smith (2009) determinó la respuesta de 21 arándanos del tipo “arbustos del sur” (SHB) y 7 del tipo “ojos de conejo” (RE), utilizando como referencia el cultivar Tifblue (RE) considerado como susceptible. Esto le permitió establecer que los arándanos tipo RE muestran mayor susceptibilidad al cancer del tallo que los arándanos SHB. En el presente trabajo se tomó como referencia a la familia Premier (RE), que permitió la clara separación de tres grupos de respuesta, en donde los RE manifestaron mayor susceptibilidad, lo que coincide con los resultados obtenidos por Smith (2006). La familia Tifblue fue clasificada como susceptible, lo que también concuerda con el reporte de Smith (2006).

En lo general, los SHB se comportaron como susceptibles y los SHN como resistentes. La familia Ozarkblue (SHB) se mostró como resistente en este estudio; sin embargo, Polashock y Kremer (2006) y Smith (2009), la consideran susceptible. Por otra parte, consideran a Duke (NHB) como susceptible; sin embargo, esta variedad fue resistente, lo que coincide con los resultados previamente señalados por Espinoza *et al.* (2009). Al igual que en lo reportado por Polashock y Kremer (2006) de las 24 familias de segregantes evaluadas ninguna mostró ser inmune al cáncer del tallo.

Estos resultados, al igual que en trabajos previos (Espinoza *et al.* 2009, Milholland 1995, Polashock y Kremer 2006, Smith 2009) confirman que la resistencia al cáncer del tallo puede estar presente entre cultivares comerciales, pero también en familias segregantes (Polashock y Kremer 2006).

La gran variación de síntomas observados permite confirmar que la respuesta a la inoculación dependió del hospedante. Es posible que las diversas expresiones observadas correspondan a mecanismos de defensa de las plantas activados por la presencia del patógeno. Las heridas provocadas en los tallos contribuyeron al establecimiento de la infección, aún en aquellos materiales resistentes; sin embargo, algunas plantas mostraron una clara restricción a la infección, produciendo únicamente una delgada zona necrótica en el área de inoculación. Está establecido que en el caso de hospederos resistentes, las heridas provocan la liberación de enzimas hidrolíticas que digieren los polímeros de la pared celular del hospedero, formando como producto de descomposición elicitores endógenos que disparan la reacción de defensa (Prell y Day 2001).

Dado que sólo se utilizó un aislado, no se puede precisar el tipo de resistencia observada; sin embargo, de acuerdo al análisis de componentes de varianza, el mayor efecto fue para la varianza aditiva, lo cual sugiere que la resistencia está contralada por varios genes; por lo tanto, se esperaría que la misma fuera del tipo horizontal. Se sugiere, para trabajos futuros, evaluar los materiales que mostraron resistencia utilizando un mayor número de aislados de *B. parva*, obtenidos de la zona productora de Michoacán, para considerar posibles variaciones patogénicas que modifiquen los resultados encontrados. Otros factores como edad de la planta, tipo de tallo inoculado y número de tallos inoculados, deben también ser considerados para determinar con mayor precisión el tipo y nivel de resistencia de las familias seleccionadas.

Los resultados obtenidos permiten de manera preliminar, identificar genotipos que pueden ser propagados masivamente y ser utilizados en las zonas en donde el cáncer del tallo se presenta con mayor incidencia. Así mismo, se han detectado materiales valiosos que pueden ser utilizados en trabajos de mejoramiento genético.

3.5. CONCLUSIONES

Los arándanos “arbustos altos del norte” (NHB) muestran resistencia a la infección de *Botryosphaeria parva*.

Los arándanos “ojos de conejo” (RE) son susceptibles a la infección de *B. parva*.

Las familias Puru (NHB) es la más resistente y la familia T-451 (SHB) la más susceptible a infecciones de *B. parva*.

La resistencia al cáncer del tallo parece estar controlada por genes menores y es altamente heredable (76 %).

La diversidad de síntomas del cáncer del tallo permite aseverar que existe variabilidad genética entre los materiales evaluados.

3.6. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. **Plant pathology**. Fifth edition. Elsevier Academic Press. 921 p.
- Baker, J. B., J. F. Hancock y D. C. Ramsdell. 1995. **Screening highbush blueberry cultivars for resistance to *Phomopsis* canker**. *HortScience* 30: 586-588.
- Bester, W., P. W. Crous, y P. H. Fourie. 2007. **Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants to *Botryosphaeria* species**. *Australasian Plant Pathology* 36: 73-77.
- Camp, W. H. 1945. **The North American blueberries with notes on the other groups of *Vacciniaceae***. *Brittonia* 5: 203-275.
- Caruso, F y D. C. Ramsdell. 1995. **Compendium of blueberry and cranberry diseases**. The American Phytopathological Society. 87 p.
- Cline, W. O. y A. Schilder. 2006. **Identification and control of blueberry diseases**. En: N.F Childers y P.M. Lyrene (Eds.) **Blueberries for growers, gardeners, and promoters**. Dr. Norman F. Childers Publications, Melrose Florida. pp.115-138.
- Cline, W. O., P. M. Brannen, y H. Sherm, 2006. **Blueberry disease management in the southeastern United States**. *Acta Hort.* 715: 489-492.
- Coville, F. V. 1937. **Improving the wild blueberry**. En: **USDA Yearbook of Agriculture**. 1937: 559-574.
- Creswell, T. C. y R. D. Milholland. 1987. **Responses of blueberry genotypes to infection by *Botryosphaeria dothidea***. *Plant Dis.* 71: 710-713.
- Demaree, J. B. y E. B. Marrow. 1951. **Relative resistance of some blueberry varieties and selections to stem canker in North Carolina**. *Plant Dis.* 35: 136-141.
- Demaree, J.B. and M.S. Wilcox. 1942. **Blueberry cane canker**. *Phytopathology* 32: 136-141.
- Eck, P., R. E. Gough, I. V. Hall, y J. M. Spiers. 1990. **Blueberry management**. En: G.J. Galletta y D. G. Himelrick (Eds.). **Small fruit crop management**. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey. pp. 273-333.

- Ehlenfeldt, M. K. y J. J. Polashock. 2009. **Disease resistance in blueberry - steps toward an integrated utilization approach.** *Acta Hort.* 810: 325-328.
- Espinoza, J. G., E. X. Briseño, E. R. Chávez, J. R. Úrbez-Torres, y B. A. Latorre. 2009. ***Neofusicoccum* spp. associated with stem canker and dieback of blueberry in Chile.** *Plant Dis.* 93: 1187-1194.
- Galletta, G. J. y J. R. Ballington. 1996. **Blueberries, cranberries, and lingonberries.** En: J. Janick y J. N. Moore (Eds.). **Fruit breeding.** Vol. II: Vine and small fruits. Wiley, New York. pp. 1-107.
- Galletta, G. J. 1975. **Blueberries and cranberries.** En: J. Janick y J.N. Moore (eds.). **Advances in fruit breeding.** Purdue University Press, West Lafayette, Ind. pp. 154-196.
- Gough, R. E. 1994. **The highbush blueberry and its management.** Food Product Press, New York, USA. 272 p.
- Luby, J. J., J. R. Ballington, A. D. Draper, K. Pliszka, y M. E. Austin. 1990. **Blueberries and cranberries (*Vaccinium*).** En: J. N. Moore y J. R. Ballington (Eds.). **Genetic resources of temperate fruit and nut crops.** ISHS, Wageningen, The Netherlands. pp. 393-456.
- Lyrene, P. M. 1990. **Low-chill highbush blueberries.** *Fruit Var. J.* 44: 82-86.
- Lyrene, P. M., W. B. Sherman y R. H. Sharp. 1997. **‘Misty’ southern highbush blueberry.** *HortScience* 32: 1297-1298.
- Lyrene, P. M. y J. R. Ballington. 2006. **Varieties and their characteristics.** En: N. F. Childers y P. M. Lyrene (Eds.) **Blueberries for growers, gardeners, and promoters.** Dr. Norman F. Childers Publications, Melrose Florida. pp. 26-37.
- Márquez-Sánchez, F. y J. Sahagún-Castellanos. 1994. **Estimation of genetic variances with maternal half-sib families.** *Maydica* 39: 197-201.
- Michailides, T. J. 1991. **Pathogenicity, distribution, sources of inoculum, and infection courts of *Botryosphaeria dothidea* on pistacho.** *Phytopathology* 81: 566-573.
- Milholland, R. D. 1969. **Histology of *Botryosphaeria* canker of susceptible and resistant highbush blueberries.** *Plant Pathology* 60: 70- 74.

- Milholland, R. D. 1972. **Histopathology and pathogenicity of *Botryosphaeria dothidea* on blueberry stem.** *Phytopathology* 62: 654-660.
- Milholland, R. D. 1995. *Botryosphaeria* stem blight. En: Caruso, F. y D. C. Ramsdell (Eds.). **Compendium of blueberry and cranberry diseases.** The American Phytopathological Society. 87 p.
- Polashock, J. J. y M. Kramer. 2006. **Screening for resistance to *Botryosphaeria* stem blight and *Phomopsis* twig blight in blueberry.** *Acta Hort.* 715: 493-496.
- Prell H. H. y P. R. Day. 2001. **Plant-fungal pathogen interaction.** Springer-Verlang, New York. 214 p.
- Prodorutti, D., H. Pertot, L. Giongo, y C. Gessler. 2007. **Highbush blueberry: cultivation, protection, breeding and biotechnology.** *European J. Plant Sci. Biotechnol.* 1: 44-56.
- Sammonds, J., R. Billones, M. Rocchetti, H. J. Ridgway, M. Walter y M.V. Jaspers. 2009. **Survey of blueberry farms for *Botryosphaeria* dieback and crown rot pathogens.** *New Zealand Plant Protection* 62: 238- 242.
- Sharp, R. H y W. B. Sherman.1976. '**Sharpblue**' blueberry. *HortScience* 11: 65.
- Smith, B. J. 1997. **Detached stem assay to evaluate the severity of stem blight of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*).** *Acta Hort.* 446: 457-464.
- Smith, B. J. 2009. ***Botryosphaeria* stem blight of southern blueberries: cultivar susceptibility and effect of chemical treatments.** *Acta Hort.* 810: 385-394.
- Spiers, J. M., S. J. Stringer, A. D. Draper y C. L. Gupton. 2002. '**Biloxi**' southern highbush blueberry. *Acta Hort.* 574:153-155.
- Stromeng, G. M. y A. Stensvand. 2001. **Susceptibility of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars to *Godronia* canker (*Godronia cassandrae* f. sp. *vaccinii*) in Norway.** *Gartenbauwissenschaft* 66: 78-84.
- Strik, B. C. 2006. **Blueberry production trends in North America, past and future.** En: N. F. Childers y P. M. Lyrene (Eds.). **Blueberries for growers, gardeners, and promoters.** Dr. Norman F. Childers Publications, Melrose, Florida. pp.1-13.

- Strik, B. C. y D. Yarborough. 2005. **Blueberry production trends in North America, 1992 to 2003, and predictions for growth.** *HortTechnology* 15: 391- 398.
- Úrbez-Torrez, J. R., G. M. Leavitt, T. M. Voegel y W. D. Gubler. 2006. **Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California.** *Plant Dis.* 90: 1490-1503.
- Wilcox, M. S. 1939. ***Phomopsis* twig blight of blueberry.** *Phytopathology* 29: 136-142.
- Witcher, W. y C. N. Clayton. 1963. **Blueberry stem blight caused by *Botryosphaeria dothidea* (*B. ribis*).** *Phytopathology* 53: 705-712.

VII. DISCUSION GENERAL

En Michoacán, México el cultivo del arándano es de reciente introducción, por lo tanto no existen información de los problemas fitosanitarios presentes en el cultivo. Este estudio representa el primer intento para determinar la presencia y diversidad de hongos asociados a la filósfera del arándano. Las observaciones de campo indican que la filósfera del arándano está afectada por varias especies de hongos. La incidencia de las enfermedades presentes en la la filósfera del arándano fue muy variable, destacándose la roya por presentar la mayor incidencia y el cáncer del tallo, por su afectación al cultivo. A pesar de que la roya es considerada una enfermedad de menor importancia, en ocasiones puede ocasionar una defoliación extensiva, (Bristow y Strech 1995), en este estudio, esta enfermedad causa una defoliación parcial de los arbustos, presentándose mayor daño en la variedad Sharpblue.

Colletotrichum sp., fue el hongo aislado con mayor frecuencia de 12 síntomas observados se detectó su presencia en nueve, seguido de *Alternaria*, que fue aislado de cuatro síntomas, la infección causada por estos hongo, es un factor importante que decrece la producción y calidad del cultivo y son responsables de pérdidas significativas durante el almacenamiento del fruto (Polashock *et al.*, 2005), aun cuando las especies de *Colletotrichum* son reportadas como endófitas, epifitas, saprófitas y patógenas (Hyde *et al.*, 2009), la frecuencia de aislamiento de *Colletotrichum* de la filósfera del arándano en los huertos estudiados, sugiere que juega un papel importante en las infecciones de la planta. Por otro lado, aunque *Alternaria* se reporta asociado a lesiones en tallos, hojas y fruto (Cline y Shilder 2006, Milholland 1995), es considerado como un invasor secundario por algunos autores (Milholland 1995) ya que en algunas investigaciones su patogenicidad no ha sido bien determinada (Oudemans *et al.* 1998).

Otros hongos aislados fueron *Phyllosticta* que ha sido aislado de otras especies de *Vaccinium* (Szmagara 2009) y se reporta como causante de pudrición de fruto (Oudemans *et al.* 1998); sin embargo, en este estudio se encontró causando manchas foliares; *Stemphyllium*, *Curvularia* y *Bipolaris*, son reportados en otros trabajos causando síntomas similares a los aquí

descritos, (Caruso y Ramsdell 1995, Cline y Schilder 2006, Wright *et al.* 2007), sin embargo, en esta investigación presentaron una incidencia y frecuencia baja. A pesar de eso, la presencia de estos organismos en el cultivo, sugiere su significativa participación en la presencia de enfermedades y la susceptibilidad del cultivo a ser atacado por diversos patógenos.

Chaetomium se ha reportado causando pudriciones de madera en cultivos ornamentales (Alexopoulos *et al.* 1996); en arándano no hay reportes que lo señalen asociado con enfermedades, por lo que se sugiere su participación como saprófito (Crous *et al.*, 2009), ya que en este trabajo se aisló de tejido de yemas secas.

Causando cáncer o tizón se identificó a *Alternaria* (Milholland 1995, OEPP/EPPO 2009), *Colletotrichum* (OEPP/EPPO 2009, Wright *et al.* 2006), *Pestalotiopsis* (Espinoza *et al.* 2009, Wright *et al.* 2006), *Phoma* (Szmagara 2009, Wright *et al.* 2006), *Phomopsis* (Farr *et al.* 2001, Ramsdell 1995, Weingartner y Klos 1974, Wilcox 1939, Wright *et al.* 2006), y se reveló la presencia de *Neofusicoccum* sp., causando mortandad en las plantas y con una incidencia de hasta el 41 %, la patogenicidad de *Neofusicoccum* está bien documentada causando cáncer en el tallo (Demaree y Wilcox 1942, Espinoza *et al.* 2009, Milholland 1995, Witcher y Clayton 1963, Wright y Harmon 2010) y es reconocido como uno de los más perjudiciales en las zonas productoras de arándano (Cline y Schilder 1996, Demaree y Wilcox 1942, Witcher y Clayton 1963, Wright y Harmon 2010). Sin embargo, la presencia de *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Phoma* y *Phomopsis* no debe ser ignorada, a fin de determinar el papel que juegan en el desarrollo del cáncer del tallo.

Trabajos previos reportan varias especies de *Botryosphaeria* asociadas al cáncer del tallo (Espinoza *et al.* 2009, Kong *et al.* 2010, Milholland 1995, Sammonds *et al.* 2009, Witcher y Clayton 1963, Wright y Harmon 2010), sin embargo, en este trabajo se identificó a *B. parva* asociada con el cáncer del tallo y tizón de puntas. Se reporta en estudios de variabilidad patógena a *Neofusicoccum parvum* (anamorfo de *B. parva*) como la especie mas virulenta de las especies evaluadas (Espinoza *et al.* 2009).

B. parva, presentó conidios fusiformes, hialinos, granulados, sin septo; sin embargo, en otros estudios no se encontraron septos en *N. parvum* por lo que se indica que la presencia de

septos en las especies de *Neofusicoccum*, no es una característica constante (Pavlic *et al.* 2009).

El uso de medios elaborados a base de órganos del hospedero así como de tallos y puntas inoculados con *B. parva*, indujeron la producción de picnidios de la especie, lo que indica que es factible utilizar medios de cultivo a base de órganos del hospedero para promover la esporulación de esta especie a pesar de que estudios previos indican que *B. parva*, produce pocos picnidios en medios de cultivo tradicionales y en puntas de hospedero no produce picnidios, ni libera las esporas (Amponsah *et al.* 2008).

Las primeras especies descritas como agentes causales del cáncer del tallo en EE.UU. fueron *Botryosphaeria corticis* (Demaree y Wilcox 1942) y *B. dothidea* (Witcher y Clayton 1963) y aunque algunos de los síntomas coinciden con los descritos en este estudio, la presencia de estas especies no se confirmó. Sin embargo, en esas investigaciones se usaron principalmente características morfológicas como color, textura, número de septas, tamaño y forma de conidios; que no son del todo confiables debido a la plasticidad de algunas de estas características (Jacobs y Rehner 1998). Recientes avances en técnicas moleculares proveen herramientas confiables para la correcta identificación de las especies de *Botryosphaeria*. Debido a la similitud en características morfológicas de conidios del anamorfo y sintomatología entre *B. dothidea*, reportada en EE.UU y *B. parva* identificada en esta investigación, se debería de hacer una comparación, que permitiera determinar si son especies relativas.

Las especies de *Botryosphaeria* están presentes en todo el mundo y son descritas como patógenos de plantas, saprófitos o endófitos (Deenman *et al.* 2003, Slippers *et al.* 2004), debido a esto se requieren más investigaciones para mejorar el entendimiento del ciclo de la enfermedad y así establecer protocolos apropiados para el manejo de la misma. El uso de variedades resistentes a la enfermedad debe ser considerado como una estrategia potencial de control.

Estudios previos indican que la mayoría de los cultivares de arándano presentan susceptibilidad a especies de *Botryosphaeria* (Polashock y Kremer 2006, Smith 2006, 2009).

Se evaluaron 24 familias segregantes de arándano, seis de ellas del tipo (NHB), diez del tipo (SHB) y ocho del tipo (RE), las cuales fueron inoculadas con *B. parva*. Las familias mostraron respuesta diferencial a las inoculaciones, lo que se puede atribuir a la composición genética de los materiales evaluados.

Smith (2009), determinó la respuesta de variedades de arándanos tanto los SHB como RE, utilizando como referencia el cultivar Tifblue (RE) considerado como susceptible; los arándanos RE mostraron mayor susceptibilidad a la enfermedad que los SHB. Asimismo se tomó como referencia a la familia Premier (RE), lo que permitió obtener una clara separación de tres grupos de respuesta, con los RE agrupados como los de mayor susceptibilidad, lo que coincide con los resultados previamente obtenidos por Smith (2006).

En lo general, los materiales del tipo SHB se comportaron como susceptibles y los arbustos del norte resistentes. La familia Ozarkblue (SHB) se mostró como resistente en este estudio; sin embargo, tanto Polashock y Kremer (2006) como Smith (2009) la consideran susceptible. Por otra parte, Polashock y Kremer (2006) consideran a Duke (NHB) como susceptible, en tanto que Espinoza *et al.* (2009) la consideran como resistente; los segregantes obtenidos en este trabajo de esa variedad mostraron ser resistentes, lo que coincide con los resultados de estos últimos autores.

Al igual que lo observado en trabajos previos (Espinoza *et al.* 2009, Milholland 1995, Polashock y Kremer 2006, Smith 2009), se confirmó que la resistencia al cáncer del tallo puede estar presente tanto en variedades comerciales como en familias segregantes de las mismas (Polashock y Kremer 2006).

La gran variación de síntomas observados permite confirmar que la respuesta a la inoculación depende del hospedante. Es posible que diversas expresiones observadas correspondan a mecanismos de defensa de las plantas activados por la presencia del patógeno. Las heridas provocadas en los tallos en gran medida pudieron contribuir con el establecimiento de la infección, aún en aquellos materiales resistentes; sin embargo, algunas plantas mostraron una clara respuesta de resistencia, produciendo únicamente una delgada zona necrótica en el área de inoculación. Está establecido que, en el caso de hospederos resistentes, las heridas provocan la liberación de enzimas hidrolíticas que digieren los polímeros de la

pared celular del hospedero, formando como producto de descomposición elicitores endógenos que disparan la reacción de defensa (Prell y Day 2001).

Los datos que arrojó el análisis de componentes de varianza, responde al tipo de herencia cuantitativa, con una mayor contribución para los efectos aditivos; es decir, se esperaba que la misma fuera horizontal. Los resultados obtenidos permitieron, de manera preliminar, identificar genotipos de arándano resistentes que pueden ser utilizados como progenitores para iniciar un programa de mejoramiento genético, lo que puede permitir la generación de variedades de arándano adaptadas y resistentes al cáncer del tallo causado por *B. parva* en Los Reyes Michoacán.

VIII. PERSPECTIVAS

Debido a la importancia que está cobrando el arándano en el estado de Michoacán y la carencia de información acerca de los patógenos que lo atacan, se hace demandante la generación de conocimientos destinados a identificar las especies de patógenos que afectan el cultivo del arándano para implementar las estrategias de prevención y/o control adecuadas.

La incidencia del cáncer del tallo obtenido en este estudio y la patogenicidad demostrada de *B. parva* señalan que esta especie puede ser económicamente importante para la industria del arándano, por lo que se sugiere hacer pruebas de susceptibilidad a fungicidas, tanto *in situ* como *in vitro*, para poder establecer medidas de control.

Se sugiere, evaluar en trabajos futuros un mayor número de aislados de *B. parva* en arándano, colectados de las diversas zonas productoras, a fin de considerar posibles variaciones patogénicas.

Asimismo, en trabajos subsecuentes de búsqueda de resistencia se sugiere tomar en cuenta otros factores como: edad de la planta, consistencia de tallo inoculado y número de tallos inoculados, para determinar con mayor precisión el tipo y nivel de resistencia de los genotipos a evaluar.

IX. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

- Baker, J. B., J. F. Hancock y D. C. Ramsdell. 1995. **Screening highbush blueberry cultivars for resistance to *Phomopsis* canker**. *HortScience* 30: 586-588.
- Bristow, P. R. y A. W. Stretch. 1995. **Leaf rust**. En: Caruso, F. y D. C. Ramsdell (Eds.). **Compendium of blueberry and cranberry diseases**. The American Phytopathological Society. pp 20-22.
- Caruso, F y D. C. Ramsdell. 1995. **Compendium of blueberry and cranberry diseases**. The American Phytopathological Society. 87 p.
- Cline, W. O y A. Schilder. 2006. **Identification and control of blueberry diseases**. En: Childers N. F y P. M. Lyrene (Eds.) **Blueberries for growers, gardeners, and promoters**. Dr. Norman F. Childers Publications, Melrose Florida. pp115-138.
- Creswell, T. C. y R. D. Milholland. 1987. **Responses of blueberry genotypes to infection by *Botryosphaeria dothidea***. *Plant Dis.* 71: 710-713.
- Dal Bello, G. y A. Perellò. 1998. **First report of leaf rust of blueberry caused by *Pucciniastrum vaccinii* in Argentina**. *Plant Dis.* 82: 1062.
- Demaree, J. B. y M. S. Wilcox. 1942. **Blueberry cane canker**. *Phytopathology* 32: 136-141.
- Demaree, J. B. y E. B. Marrow. 1951. **Relative resistance of some blueberry varieties and selections to stem canker in North Carolina**. *Plant Dis.* 35: 136-141.
- Denman, S., P. W. Crous, B. Slippers, B. D. Wingfield y M. J. Wingfield. 2003. **Circumscription of *Botryosphaeria* species associated with Proteaceae based on morphology and DNA sequence data**. *Mycologia* 95: 294-307.
- Eck, P., R. E. Gough, I. V. Hall y J. M. Spiers. 1990. **Blueberry management**. En: G. J. Galletta y D. G. Himelrick (Eds.). **Small fruit crop management**. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey. pp 273-333.
- Ehlenfeldt, M. K. y J. J. Polashock. 2009. **Disease resistance in blueberry-steps toward an integrated utilization approach**. *Act Hort.* 810: 325-328.

- Espinoza, J. G., E. X. Briseño y B.A. LaTorre. 2009. **Identification of species of *Botryosphaeria*, *Pestalotiopsis* and *Phomopsis* in blueberry in Chile.** *Phytopathology* 98: S53.
- Espinoza, J. G., E. X. Briseño, E. R. Chávez, J. R. Úrbez-Torres y B. A. Latorre. 2009. ***Neofusicoccum* spp. associated with stem canker and dieback of blueberry in Chile.** *Plant Dis.* 93: 1187-1194.
- FAO. 2010. FAO Statistics Division 2010 (<http://faostat.fao.org>; Accesada: 8 Feb. 2010).
- Galletta, G. J. y J. R. Ballington. 1996. **Blueberries, cranberries, and lingonberries.** En: Janick J. y J. N. Moore (Eds.). **Fruit breeding, Vol. II: Vine and small fruits.** Wiley, New York. pp 1-107.
- Gough, R. E. 1994. **The highbush blueberry and its management.** Food Product Press, New York. 272 p.
- Gezahgne, A., J. Roux, B. Slippers y M. J. Wingfield. 2004. **Identification of the agent of *Botryosphaeria* stem canker in Ethiopian *Eucalyptus* plantations.** *South African J. Botany* 70: 241-248.
- Hanson, E. J. 1995. **Nutritional and other abiotic disorders.** En: Caruso, F y Ramsdell, D. C. 1995. **Compendium of blueberry and cranberry diseases.** The American Phytopathological Society. pp 65.
- Inderbitzin, P. 2009. ***Botryosphaeria* species from California tree nut crops: exploration of species limits using multiple genes and isolates from 29 hosts on five continents.** *Phytopathology* 99: S56.
- Jacobs, K. A. y S. A. Rehner. 1998. **Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa.** *Mycologia* 90: 601-610.
- Lehnert, D. 2008. **Blueberry production is skyrocketing worldwide.** The Fruit Growers News (www.fruitgrowersnews.com/pages/arts.php?ns=908; Accesada: 2 dic. 2010).

- Luby, J. J., J. R. Ballington, A. D. Draper, K. Pliszka y M. E. Austin. 1990. **Blueberries and cranberries (*Vaccinium*)**. En: Moore J. N. y J. R. Ballington (eds.). **Genetic resources of temperate fruit and nut crops**. ISHS, Wageningen, The Netherlands. pp 393-456.
- Lyrene, P. M. 1990. **Low-chill highbush blueberries**. *Fruit Var. J.* 44: 82-86.
- Ma, Z. y T. J. Michailides. 2002. **Characterization of *Botryosphaeria dothidea* isolates collected from pistachio and other plant hosts in California**. *Phytopathology* 92: 519-526.
- McDonald, V. T., S. C. Lynch y A. Eskalen. 2009. **Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with avocado branch dieback and trunk canker in California**. *Phytopathology* 99: S81.
- Michailides, T. J. 1991. **Pathogenicity, distribution, sources of inoculum, and infection courts of *Botryosphaeria dothidea* on pistacho**. *Phytopathology* 81: 566-573.
- Milholland, R. D. 1969. **Histology of *Botryosphaeria* canker of susceptible and resistant highbush blueberries**. *Plant Pathology* 60: 70-74.
- Milholland, R. D. 1972. **Histopathology and pathogenicity of *Botryosphaeria dothidea* on blueberry stem**. *Phytopathology* 62: 654-660.
- Milholland, R. D. 1973. **Blueberry stem canker and dieback caused by *Gloeosporium minus***. *Phytopathology* 64: 727-730.
- Milholland, R. D. 1995. ***Gloeosporium* leaf spot and stem canker**. En: Caruso, F. y Ramsdell, D. C. 1995. **Compendium of blueberry and cranberry diseases**. The American Phytopathological Society. pp 16.
- Nickerson, N. L. 1995. **Red leaf**. En: Caruso, F. y D. C. Ramsdell, 1995. **Compendium of blueberry and cranberry diseases**. The American Phytopathological Society. pp 20.
- OEPP/EPPO. 2009. ***Diaporthe vaccini***. OEPP/EPPO Bulletin 39:18-24.
- Polashock, J. J. y M. Kramer. 2006. **Screening for resistance to *Botryosphaeria* stem blight and *Phomopsis* twig blight in blueberry**. *Acta Hort.* 715: 493-496.
- SAGARPA. 2009. **Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera**. www.siap.gob.mx.
Accesada: 30 de junio de 2009.

- Stromeng, G. M y A. Stensvand. 2001. **Susceptibility of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L. cultivars to Godronia canker (*Godronia cassandrae* f. sp. *vaccinii*) in Norway.** *Gartenbauwissenschaft* 66: 78-84.
- Strik, B. C. y D. Yarborough. 2005. **Blueberry production trends in North America, 1992 to 2003, and predictions for growth.** *HortTechnology* 15: 391- 398.
- Úrbez-Torres, J. R. y W. D. Gubler. 2006. **Occurrence of *Botryosphaeria obtusa*, *B. dothidea* and *B. parva* associated with grapevine trunk disease in Castilla y León región, Spain.** *Plant Dis.* 90: 835- 840.
- Wilcox, M. S. 1939. ***Phomopsis* twig blight of blueberry.** *Phytopathology* 29: 136-142.
- Witcher, W. y C. N. Clayton. 1963. **Blueberry stem blight caused by *Botryosphaeria dothidea* (*B. ribis*).** *Phytopathology* 53: 705-712.
- Weingartner, D. P. y E. J. Klos. 1974. **Etiology and symptomatology of canker and dieback diseases on highbush blueberry caused by *Godronia* (*Fusicoccum*) *cassandre* and *Diaporthe* (*Phomopsis*) *vaccinii*.** *Phytopathology* 65:105-110.
- Wright, A. F. y P. F. Harmon. 2010. **Identification of species in the Botryosphaeriaceae family causing stem blight on southern highbush blueberry in Florida.** *Plant Dis.* 94: 966-971.
- Wright, E. R., B. A. Pérez, R. L. Fernández, K. Asciutto, M. C. Rivera, F. Murillo, P. Vásquez, M. Divo de Sesar, A. Pérez, H. L. Aguilar, M. F. Rosato, A. Crelier y J. Baldoma, 2006. **Conocimiento actual sobre enfermedades del arándano.** En: Primer Congreso Latinoamericano de Arándano y otros Berries. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. pp 1-4.
- Zea-Bonilla, T., M. A. González-Sánchez, P. M. Martín-Sánchez y R. M. Pérez-Jiménez. 2007. **Avocado dieback caused by *Neofusicoccum parvum* in the Andalucía region, Spain.** *Plant Dis.* 91: 1052-1060.

X. ANEXOS

Anexo 1. MEDIOS NUTRITIVOS EMPLEADOS

PDA (Papa Dextrosa Agar)

Ingredientes:

PDA Bioxon®..... 39 g

Agua destilada..... Aforar a 1000 ml

pH de 6

Procedimiento:

Se agregó el polvo de PDA Bioxon® al agua destilada, calentando ligeramente hasta disolver; la mezcla se esterilizó en autoclave a una presión de 120 libras durante 15 minutos.

Agar agua

Ingredientes:

Agar bacteriológico Bioxon®..... 15 g

Agua destilada Aforar a 1000 ml

pH de 7

Procedimiento:

Se siguió el mismo procedimiento mencionado en el párrafo anterior para la preparación de PDA.

Jugo V8

Ingredientes:

Jugo V8..... 200 mL

Agar bacteriológico Bioxon®..... 15 g

CaCO₃..... 2 g

Agua destilada..... Aforar a 1000 mL

pH de 6

Procedimiento:

El CaCO₃ se mezcla con el jugo V8 hasta homogeneizar, se le agrega el agua destilada y el agar y se disuelven calentando un poco, se esteriliza a 120 libras durante 15 minutos.

Infusión de arándano

Ingredientes:

Frutos completos de arándano..... 200 g

Agar bacteriológico Bioxon®..... 15 g

CaCO₃..... 2 g

Agua destilada..... Aforar a 1000 mL

pH de 5

Procedimiento:

Se lavan y cortan los frutos de arándano, se les agrega agua destilada estéril hasta cubrirlos, se hierven durante 10 minutos, dejando consumir un poco, posteriormente el concentrado se filtra con una gasa se agrega el CaCO₃ y el agar, se disuelve calentando un poco, posteriormente se afora a un litro y se esteriliza a 120 libras durante 15 minutos.

Pulpa de arándano

Ingredientes:

Frutos de arándano sin epidermis.....	200 g
Agar bacteriológico Bioxon®.....	15 g
CaCO ₃	2 g
Agua destilada.....	Aforar a 1000 mL

pH de 7

Procedimiento:

Los frutos sin epidermis se trituran en un mortero, la pulpa se filtra con una gasa para separar la semilla, se agrega agua destilada, el agar y el CaCO₃ y se disuelve calentando un poco, se afora a un litro y se esteriliza a 120 libras durante 15 minutos.

Infusión de tallo

Ingredientes:

Tallos frescos de arándano	200 g
Agar bacteriológico Bioxon.....	15 g
CaCO ₃	2 g
Agua destilada.....	Aforar a 1000 mL

pH de 7

Procedimiento:

Los tallos se lavan con jabón y agua corriente, se cortan en trozos pequeños, se les agrega agua destilada estéril hasta cubrirlos y se exponen al fuego durante 10 minutos o hasta que el agua se reduzca a la mitad, la infusión se filtra con una gasa, se agrega el agar, el CaCO₃ y se

disuelven calentando un poco, se afora a un litro y se esteriliza a 120 libras durante 15 minutos.

Infusión de tallo

Ingredientes:

Tallos frescos de arándano..... 200 g
Agar bacteriológico Bioxon®..... 15 g
Dextrosa Anhidra J.T. Baker®..... 2 g
Agua destilada Aforar a 1000 mL

pH de 6

Procedimiento:

Es similar al de infusión de tallo anterior, pero se agrega dextrosa en lugar de CaCO_3 .

Extracto de Malta

Ingredientes:

Extracto de malta DifcoTM 33.6 g
Agua destilada Aforar a 1000 mL

pH de 5

Procedimiento:

Se agrega el polvo de Extracto de malta DifcoTM al agua destilada, calentando ligeramente hasta disolver, se esteriliza en autoclave a una presión de 120 libras durante 15 minutos.

Anexo 2. SECUENCIAS DE DNA DE *Botryosphaeria parva*

>1097

cctgatccgaggtcaccttgagaaataattcaaaggttcgtccggcgggcgacgccgtgcgctccaaagcgaggtgttttctactacgct
tgaggcaagacgccaccgccgaggtctttaaggggcggtccgtggaggacggacccattaccaagcgcagcatgcgggcgaaggtt
aaggtgcgctcccgtaggtgtaggagctcctcaaagcctgcttgagtagaaggacgccctcattcggcagcttggtgagatgacaa
cgagcttgagctacgcagcgggtctctctgcaatctccggaccccatcaatccaaactaagccccgtctccgcacatcttctcaactccat
cgaacactatctgtangctagcttcgtgtagaacctcaaggantatgtggngcatctgcttcgcctgggtggaggacacgttgctgcgtg
ctgcnncgctaccgcaaactcnacagaacgatttagttaangacccgcttgactacnnaatgcctacatccccgttccgctgagaga
agngat

>1098

gaggtcaccttgagaaataattcaaaggttcgtccggcgggcgacgccgtgcgctccaaagcgaggtgttttctactacgcttgaggca
agacgccaccgccgaggtctttaaggcggtccgtggaggacgaggcccaataccaagcagagcttgagggttgaaatgacgctcg
aacaggcatgcccctcgaataccaagggcgcaatgtgcgttcaaagattcgatgattcactgaattctgcaattcacattacttttgga
tttggctgcgttctacctaagaaaccaaccactataagagggactaaaagtatcggcttaatgatcagattttcacaatgaaaaactata
tcnnncttattcatctgaacattcagggtgagaacaccgatgacggggtccaatcatccaaggagattctcgctgaaccagatcccgat
cctgaggacaatgactaagctagcttaactttcncacgaggaga