



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**  
**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**  
**POSGRADO EN PROTECCIÓN VEGETAL**

**ETIOLOGÍA Y ANÁLISIS ESPACIO-TEMPORAL DE LA PECA  
DE LA GUAYABA (*Psidium guajava* L.) EN EL ORIENTE DE  
MICHOACÁN**

**TESIS**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO  
DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

**PRESENTA:**

**ERICK FLORES GONZÁLEZ**



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA  
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES  
SECRETARÍA DE EXÁMENES PROFESIONALES

**Bajo la supervisión de: DR. ÁNGEL REBOLLAR ALVITER**

Chapingo, Estado de México, mayo de 2017



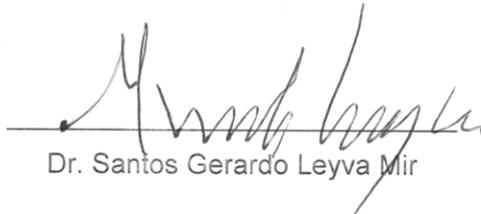
La presente Tesis titulada “Etiología y análisis espacio-temporal de la peca de la guayaba (*Psidium guajava* L.) en el Oriente de Michoacán” realizada por Erick Flores González bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

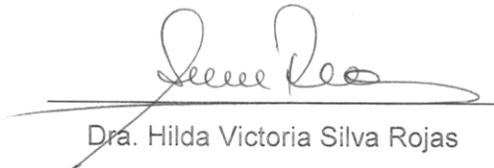
DIRECTOR:

  
Dr. Ángel Rebollar Alviter

ASESOR:

  
Dr. Santos Gerardo Leyva Mir

ASESOR:

  
Dra. Hilda Victoria Silva Rojas

ASESOR:

  
Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce

Chapingo, Estado de México, mayo de 2017.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por el apoyo económico recibido durante mi formación profesional.

A la **Universidad Autónoma Chapingo (UACH)**, por darme la oportunidad de realizar en sus instalaciones esta investigación y la transmisión de conocimientos por parte de su personal docente.

Al **Dr. Ángel Rebollar Alviter**, por su orientación, muestras de dedicación, paciencia y esfuerzo para lograr realizar un trabajo de calidad.

A la **Dr. Hilda Victoria Silva Rojas**, por su valioso apoyo, disponibilidad y asesoría durante el desarrollo de esta investigación.

A la **Dr. Guadalupe Valdovinos Ponce**, por sus enriquecedoras aportaciones, revisiones y consejos.

Al **Dr. Santos Gerardo Leyva Mir**, por las facilidades y atención prestada durante el desarrollo de esta investigación en el laboratorio de hongos a su cargo.

Al **Dr. Uwe Braun** de la Universidad Martin Luther en Halle (Salle), Alemania por su apoyo en la identificación de las especies de hongos.

Al **M.C. Dionicio Fuentes Aragón, M.C. Jorge Valdez Carrasco** y personal del laboratorio de Eco-Fisiología Animal del **INIRENA-UMSNH**, por el apoyo brindado en la toma de fotografías al microscopio.

Al personal del **Laboratorio de Biotecnología de Semillas** del **COLPOS** por su apoyo en los trabajos de biología molecular.

A los **productores** cooperantes de la región guayabera **del Oriente de Michoacán**, quienes con absoluta disposición me permitieron realizar esta investigación en sus huertos.

A la **M.C. Victoria Ayala Escobar** del Instituto de Fitosanidad del COLPOS por sus sugerencias para la identificación de las especies de hongos.

Y, por último, a mi **esposa, familiares y amigos**, quienes siempre me apoyaron y estuvieron conmigo en cada momento durante el curso de esta Maestría.

## **DATOS BIOGRÁFICOS**

El autor nació en la Ciudad de Zitácuaro, Michoacán un 25 de mayo de 1988. En el Municipio de Juárez, Michoacán realizó sus estudios básicos. Cursó el Bachillerato en el CBTis 162 de la Ciudad de Zitácuaro, titulándose como Técnico en Análisis y Tecnología de Alimentos. Inició su formación profesional en el Instituto Tecnológico de Valle de Morelia donde obtuvo el título de Ingeniero en Agronomía el 14 de noviembre del 2012. Desde enero 2012 hasta diciembre del 2014, laboró en el Centro Regional Universitario Centro Occidente de la Universidad Autónoma Chapingo (CRUCO-UACH), donde fue integrante de diversos proyectos de investigación enfocados al manejo agroecológico de plagas y enfermedades de cultivos de importancia económica en el Estado de Michoacán como guayaba, zarzamora, caña de azúcar, limón y hortalizas. Gracias a la calidad de la información generada pudo participar en diversos congresos científicos nacionales e internacionales, siendo acreedor a varios premios. En enero del 2015 inició sus estudios de Maestría en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, siendo miembro de la generación 56 como alumno del programa de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, finalizando en 2017 con la presentación de este trabajo de investigación.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT .....	xiii
<b>CAPÍTULO I. ETIOLOGÍA Y ANÁLISIS ESPACIO-TEMPORAL DE LA PECA DE LA GUAYABA (<i>Psidium guajava</i> L.) EN EL ORIENTE DE MICHOACÁN</b>	
1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
1.2. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
1.2.1. Producción mundial .....	3
1.2.2. Producción nacional .....	3
1.2.3. Peca de la guayaba .....	3
1.2.3.1. Síntomas .....	4
1.2.3.2. Origen de la enfermedad .....	5
1.2.3.3. Control .....	6
1.3. LITERATURA CITADA .....	7
<b>CAPÍTULO II. ETIOLOGÍA DE LA PECA DE LA GUAYABA (<i>Psidium guajava</i> L.)</b>	
RESUMEN .....	10
2.1. INTRODUCCIÓN .....	11
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	13
2.2.1. Aislamiento de hongos de frutos sintomáticos .....	13
2.2.2. Identificación morfológica .....	13
2.2.3. Pruebas de patogenicidad .....	14
2.2.3.1 Inoculaciones en campo. ....	15

2.2.3.2. Inoculaciones en invernadero.....	16
2.2.3.3. Reaislamiento.....	17
2.2.4. Identificación molecular.....	17
2.2.4.1. Extracción de DNA.....	17
2.2.4.2. Amplificación de genes.....	18
2.2.4.3. Secuenciación y comparación de secuencias de DNA.....	19
2.2.4.4. Análisis filogenético.....	19
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
2.3.1. Aislamiento de hongos.....	22
2.3.2. Caracterización morfológica de aislamientos.....	25
2.3.2.1. Aislamiento CRM 1.....	25
2.3.2.2. Aislamiento CRM 2.....	27
2.3.2.3. Aislamiento CRM 3.....	30
2.3.3. Pruebas de patogenicidad en campo.....	31
2.3.4. Pruebas de patogenicidad en invernadero.....	36
2.3.5. Identificación molecular de aislamientos inoculados y sus hongos reaislados.....	37
2.3.6. Inferencia filogenética.....	38
2.4. CONCLUSIONES.....	43
2.5. LITERATURA CITADA.....	44
<b>CAPÍTULO III. ANÁLISIS ESPACIO-TEMPORAL DE LA PECA (<i>Passalora psidiicola</i>) EN PARCELAS COMERCIALES DE GUAYABA EN EL ORIENTE DE MICHOACÁN</b>	
RESUMEN.....	48

3.1. INTRODUCCIÓN .....	49
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
3.2.1. Localización de los experimentos .....	51
3.2.2. Evaluación de la enfermedad.....	52
3.2.3. Caracterización de la dinámica temporal .....	52
3.2.4. Análisis espacial por índices de agregación .....	53
3.2.5. Análisis espacial por índices de distancia (SADIE) .....	54
3.2.6. Variables ambientales.....	55
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	56
3.3.1. Análisis temporal de la peca de la guayaba.....	56
3.3.2. Análisis espacial de la peca de la guayaba.....	62
3.3.2.1. Índices de dispersión y análisis de la distribución.....	62
3.3.2.2. Análisis espacial por índices de distancia (SADIE).....	65
3.4. CONCLUSIONES .....	70
3.5. LITERATURA CITADA.....	71

## ÍNDICE DE CUADROS

### CAPÍTULO II

<b>Cuadro 1.</b> Números de acceso en GenBank las secuencias ITS y TEF de los aislamientos inoculados en campo e invernadero y de especies relacionadas reportadas en Mirtáceas incluidas en el análisis filogenético.....	21
<b>Cuadro 2.</b> Resultados del BLAST en GenBank con base en las secuencias parciales de ITS y TEF, de los aislados obtenidos de frutos con síntomas de peca durante 2013 y 2014 en Michoacán, México.....	23
<b>Cuadro 3.</b> Resultados del BLAST de las especies inoculadas y aisladas de frutos inoculados con las secuencias parciales de ITS y TEF. ....	38

### CAPÍTULO III

<b>Cuadro 1.</b> Parámetros de ajuste de los modelos Monomolecular, Logístico y Gompertz, a epidemias de la peca de la guayaba en el Municipio de Juárez, Michoacán para incidencia y severidad en los dos huertos experimentales.....	58
<b>Cuadro 2.</b> Índice de agregación de la incidencia de peca de la guayaba en la temporada 2015-2016.....	64
<b>Cuadro 3.</b> Índice de dispersión de la incidencia de la peca de la guayaba en la temporada 2016-2017.....	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Fig. 1.** Síntomas de peca presentes en Michoacán, México durante 2015 en frutos de guayaba en diferente etapa fenológica. **A**, 7 d antes de la madurez fisiológica. **B**, Fruto en madurez comercial con pústulas individuales regulares con el centro amarillo y un halo rosado de 1 a 3 mm. **C**, Pústulas con el centro rojizo rodeado por un halo púrpura. **D**, Fruto maduro con manchas agrupadas en forma irregular coalescentes. **E**, Peca en estado inicial caracterizada por un halo rojizo con el centro amarillo. **F**, Peca (pústula) con el centro amarillo y borde rosado. **G**, Peca con el centro café y borde púrpura. **H**, Manchas coalescentes que originan una lesión irregular y ligeramente hundida con el centro corchoso, café y rodeado por un halo púrpura..... 4

### CAPÍTULO II

**Fig. 1.** Desarrollo de colonias durante 15 d en cajas de Petri de 60 mm en obscuridad a 25°C del aislamiento inoculado **A**, CRM 1 en agar extracto de malta y en **B**, jugo V8 con agar. **C**, Aislamiento reaislado CRM 4; en agar extracto de malta y **D**, jugo V8 con agar, en Michoacán, México durante el año 2016..... 26

**Fig. 2.** Aislamiento CRM 1 inoculado. **A**, Hifa superficial con conidióforo solitario que da lugar a un conidio. **B**, Conidióforo septado con 2 conidios y con cicatriz conidial oscura en el centro (Flecha). **C**, Conidióforo septado, con cicatriz en célula conidiógena, oscura, refractiva y engrosada con 3 conidios. **D**, Conidióforo sin septos con cicatrices engrosadas y oscuras al centro (Flecha) y dos conidios unidos. **E**, Conidios en medio SNA. Escala de barras = 10 µm en A, B, C, D y = 5 µm en E..... 26

**Fig. 3. A,** Estructuras fungosas del aislamiento CRM 4 aislado de frutos inoculados. **A,** Conidióforo septado solitario que da lugar a un conidio. **B,** Conidióforo que da lugar a 2 conidios. **C,** Conidióforo con 3 conidios. **D,** Conidios en medio SNA. Escala de barras = 10  $\mu\text{m}$  en A, B, C y = 5  $\mu\text{m}$  en D. 27

**Fig. 4.** Desarrollo de colonias durante 15 d en cajas de Petri de 60 mm en obscuridad a 25°C del aislamiento inoculado **A,** CRM 2 en agar extracto de malta y en **B,** en jugo V8 agar. **C,** Aislamiento reaislado CRM 5; en agar extracto de malta y **D,** en jugo V8 agar, en Michoacán, México durante el año 2016..... 28

**Fig. 5.** Aislamiento inoculado CRM 2 con **A,** Conidióforos sobre micelio superficial que dan lugar a varios conidios. **B,** Células conidiógenas con cicatrices refractivas, oscuras y engrosadas (Flechas). **C,** Conidios. Escala de barras = 10  $\mu\text{m}$  en A y B y = 5  $\mu\text{m}$  en C..... 29

**Fig. 6.** Aislamiento reaislado CRM 5 con **A,** Conidio sobre micelio superficial y conidióforos sobre micelio superficial que dan lugar a varios conidios. **B,** Conidióforo con células conidiógenas poliblasticas. **C,** Conidio pigmentado sobre micelio superficial. **D,** Conidios. Escala de barras = 10  $\mu\text{m}$  en A, y B y = 5  $\mu\text{m}$  en C y D..... 29

**Fig. 7.** Desarrollo de colonias durante 15 d en cajas de Petri de 60 mm en obscuridad a 25°C del aislamiento inoculado **A,** CRM 3 en agar extracto de malta y en **B,** jugo V8 agar. **C,** Aislamiento reaislado CRM 6; en agar extracto de malta y **D,** jugo V8 agar, en Michoacán, México durante el año 2016. .... 30

**Fig. 8.** Aislamiento inoculado CRM 3 con **A,** Conidióforos sobre micelio superficial con conidios de 0 a 1 septo. **B,** Conidióforo con células conidiógenas poliblasticas. **C,** Conidios. Escala de barras = 10  $\mu\text{m}$  en A y B y = 5  $\mu\text{m}$  en C. 31

**Fig. 9.** Aislamiento reaislados CRM 6 con **A,** Conidióforos sobre micelio superficial con conidios solitarios de 0 y 1 septo. **B,** Conidióforo con células

conidiógenas poliblasticas y cicatriz engrosada y oscura (Flecha). <b>C</b> , Conidios. Escala de barras = 10 $\mu$ m en A y B y = 5 $\mu$ m en C. ....	31
<b>Fig. 10.</b> Efecto de las inoculaciones con aislados de hongos obtenidos de síntomas de peca en la incidencia y severidad en frutos de guayaba inoculados en campo durante 2014 en Jungapeo, <b>A</b> y <b>B</b> y 2015 en Juárez, Michoacán, <b>C</b> y <b>D</b> . ....	33
<b>Fig. 11.</b> Síntomas de peca inducidos con las inoculaciones en campo en el huerto de Juárez durante 2015 con los aislamientos de hongos obtenidos de síntomas de peca; <b>A</b> , CRM 1. <b>B</b> , CRM 2. <b>C</b> , CRM 3. <b>D</b> , Control con agua destilada estéril. <b>E</b> , Control tratado con el fungicida pyraclostrobin. ....	34
<b>Fig. 12.</b> Temperatura media, horas con agua libre y humedad relativa diaria, presentada en el 2015 en el huerto de Juárez durante la etapa de inoculaciones y aparición de síntomas en campo. ....	36
<b>Fig. 13.</b> Árbol filogenético concatenado del alineamiento de las secuencias del Espacio Transcrito Interno (ITS) del DNA y el Factor de Elongación 1- $\alpha$ (TEF) de las especies inoculadas (en letras azules) y reaisladas (en negritas) (CRM 1 y CRM 4; CRM 2 y CRM 5; CRM 3 y CRM 6 respectivamente), comparadas con secuencias de especies de <i>Mycosphaerella</i> y anamorfos reportados en <i>Mirtáceas</i> . Valores de Probabilidad Posterior en base a 10,000,000 generaciones, se muestran en los nodos. Como especie fuera de grupo se incluyó a <i>Uwebraunia commune</i> CBS 112889. ....	40

### CAPÍTULO III

**Fig. 1.** Progreso temporal de la incidencia y severidad en días después de la poda (DDP) en el huerto de Zicata durante la temporada 1 (2015-2016) **A** y **B**, y en el huerto de Santa Ana en la temporada 2 (2016-2017) **C** y **D** del municipio

de Juárez, Michoacán. Fecha de poda en la temporada 1: 16/04/2015, y Fecha de poda en la temporada 2: 26/04/2016. .... 57

**Fig. 2.** Progreso de la temperatura media, horas con humedad relativa arriba del 80% y humedad relativa diaria en **A**, en la temporada 1, entre los 134 a 292 días después de la poda (22/08/2015 al 27/01/2016) y **B**, en la temporada 2, entre los 171 a 220 días después de la poda (14/10/2016 al 02/12/2016). ..... 61

**Fig. 3.** Mapas interpolativos de los índices locales de agregación con base en el Análisis Espacial por Índices de Distancia (SADIE) en seis tiempos de evaluación de la incidencia de la peca de la guayaba en la temporada de producción 2015-2016. Los índices de agregación ( $I_a$ ), el valor de la probabilidad ( $P$ ) y días después de la poda (16/04/2015) (DDP) se incluyen en el interior de la gráfica..... 67

**Fig. 4.** Mapas interpolativos de los índices locales de agregación con base en el Análisis Espacial por Índices de Distancia (SADIE) en cinco tiempos de evaluación (Eval.) de la incidencia de la peca de la guayaba en la temporada de producción 2016-2017. Los índices de agregación ( $I_a$ ), el valor de la probabilidad ( $P$ ) y días después de la poda (26/04/2016) (DDP) se incluyen en el interior de la gráfica..... 68

# ETIOLOGÍA Y ANÁLISIS ESPACIO-TEMPORAL DE LA PECA DE LA GUAYABA (*Psidium guajava* L.) EN EL ORIENTE DE MICHOACÁN MÉXICO

## ETIOLOGY AND SPATIO-TEMPORAL ANALYSIS OF GUAVA FRECKLE (*Psidium guajava* L.) IN EASTERN MICHOACAN MEXICO

### RESUMEN

La peca es una de las principales enfermedades de la guayaba en México. La etiología de esta enfermedad ha sido incierta y su epidemiología es desconocida. Los objetivos de esta investigación fueron conocer la etiología y realizar el análisis espacio-temporal de la enfermedad en el oriente de Michoacán México. Se obtuvieron 23 hongos aislados de frutos sintomáticos, de los cuales se seleccionaron tres para las inoculaciones de frutos verdes en campo e invernadero en dos temporadas de cultivo. Los hongos reaislados de los frutos inoculados se compararon morfológica y filogenéticamente con los hongos inoculados en base a la amplificación parcial por PCR del ADN de las regiones ITS y TEF. El análisis espacio-temporal de la enfermedad se realizó en dos parcelas comerciales de guayaba. Los datos de incidencia y severidad en el tiempo se ajustaron a los modelos Logístico, Monomolecular y Gompertz. Asimismo, se determinó el patrón de agregación a escala pequeña (unidad muestral) mediante índices de agregación, y el análisis espacial basada en índices de distancia con la metodología SADIE. Se completaron las pruebas de patogenicidad en campo con los tres hongos inoculados. Dichos hongos correspondieron a el género *Passalora*, una de ellas a la especie *Passalora psidiicola* y dos posibles nuevas especies. Las epidemias fueron descritas principalmente por el modelo Monomolecular. A nivel de unidad muestral, la enfermedad tuvo un comportamiento agregado (heterogeneidad), mejor descrita por la distribución  $\beta$ -binomial en los dos años de estudio. A nivel parcela en las primeras evaluaciones la enfermedad se presentó al azar y posteriormente evolucionó hacia un patrón espacial agregado en ambos años de estudio. Estos resultados permitirán el diseño de estrategias de manejo de la enfermedad más efectivas en el campo.

**Palabras clave:** *Mycosphaerellaceae*, epidemiología, SADIE.

### ABSTRACT

Guava freckle is one of the main diseases of guava in Mexico. The etiology of this disease has been uncertain and its epidemiology unknown. The objectives of this research were to know the etiology of the disease and to perform a spatio-temporal analysis in the eastern Michoacan Mexico. From symptomatic fruits, 23 fungal isolates were obtained, 3 of which were selected to inoculate green fruits in the field and under greenhouse conditions in two growing seasons. Fungi were re-isolated from inoculated fruits and were compared morphologically and phylogenetically with the inoculated fungi based on the partial amplification of the ITS and TEF DNA regions by PCR. The spatio-temporal analysis of the disease was performed in two commercial guava plots. The incidence and severity data in time were fitted to the Logistic, Monomolecular and Gompertz models. Also, the small-scale aggregation pattern (sample unit) was determined through aggregation indices, and spatial analysis by distance indices using the SADIE methodology. Field pathogenicity tests were completed with the three inoculated fungi. These fungi corresponded to the genus *Passalora*, one of them to *Passalora psidiicola* and the other two, to possible new *Passalora* species. Epidemics were mainly described by the Monomolecular model. At the sample unit level, the disease had an aggregate behavior (heterogeneity), best described by the  $\beta$ -binomial distribution in the two years of study. At the plot level in the first evaluations, the disease had a random pattern which evolved later towards an aggregate spatial pattern in both years of study. These results will contribute to the design of better disease management strategies in the field.

**Keywords:** *Mycosphaerellaceae*, epidemiology, SADIE.

---

Tesis de maestría en Ciencias en Protección Vegetal, Departamento de Parasitología, Posgrado de Protección Vegetal, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Erick Flores González.

Director: Dr. Ángel Rebollar Alviter.

## CAPÍTULO I

# ETIOLOGÍA Y ANÁLISIS ESPACIO-TEMPORAL DE LA PECA DE LA GUAYABA (*Psidium guajava* L.) EN EL ORIENTE DE MICHOACÁN

### 1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La guayaba (*Psidium guajava* L.) es un frutal originario de América del Norte y Sudamérica que se distribuye ampliamente en las regiones tropicales de América (Nakasone y Paull, 1998). La producción anual de guayaba es de alrededor de 1.2 millones de toneladas, la India y Pakistán aportan el 50%, México el 25% y el resto Colombia, Egipto y Brasil (Yam *et al.*, 2010). En el 2014, se cultivaron en México 20,899 ha con una producción de 302,718.45 t, de las cuales Michoacán aportó el 45.2% (SIAP, 2016).

La presentación del fruto (con o sin pecas en el epicarpio), es una de las variables que más influyen en los gustos o preferencias del consumidor al momento de comprar guayaba (Sangerman *et al.*, 2011), en especial cuando los frutos presentan más del 15% de severidad (Flores-González *et al.*, 2015). Este nivel de severidad se presenta principalmente en huertos que se programan para cosecha de octubre a diciembre, generando menores precios del producto o la pérdida total de la producción (Volke *et al.*, 2012).

Los síntomas de esta enfermedad se pueden presentar en frutos próximos a la madurez fisiológica y son más evidentes cuando alcanzan la madurez comercial. Inicialmente se presentan puntos de color rojizo de 1 mm con el centro amarillo, posteriormente el centro la lesión adquiere un color café con un halo de color rosado a púrpura de 1 a 3 mm. En ataques severos las pústulas coalescen llegando a cubrir una porción mayor del fruto, dando origen a una lesión irregular con el centro de aspecto corchoso, color café, rodeado por un

bordo púrpura (Flores-González, 2012), lo que repercute directamente en la calidad de los frutos impactando en su comercialización (Volke *et al.*, 2012).

La información publicada sobre la etiología de la peca de la guayaba es aún escasa y los resultados publicados sobre el agente causal han sido contradictorios, relacionándola como una enfermedad de origen abiótico (deficiencias o toxicidad de microelementos) (Domínguez, 1993; Nieto, 1996; Domínguez y Nieto, 1996; Cardoso *et al.*, 2008; Cardoso 2010) o biótico (hongos) (Crous, 1999; González y Rondón, 2005; Morera y Blanco, 2009; Jacobs *et al.*, 2014).

En esta investigación se aborda el tema desde el punto de vista de que los síntomas de peca son causados por factores bióticos, pues se han encontrado asociados hongos de la familia *Mycosphaerellaceae* (Crous, 1999; Jacobs *et al.*, 2014) y se ha demostrado que la incidencia y severidad se puede reducir por efecto de aplicaciones de fungicidas (Flores-González *et al.*, 2013; Rebollar-Alviter *et al.*, 2014). Adicionalmente, dada la importancia del estudio espacio-temporal de las enfermedades para describir, comprender, comparar y predecir epidemias, ya que puede conducir directamente al desarrollo, evaluación de estrategias y tácticas de control eficientes (Madden, 2006), se plantearon los siguientes objetivos: a) determinar la etiología de la peca de la guayaba y b) evaluar el progreso temporal y espacial de la peca de la guayaba en parcelas comerciales durante dos temporadas de producción.

## 1.2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 1.2.1. Producción mundial

La guayaba se cultiva comercialmente en muchos países tropicales y subtropicales del mundo, siendo India el mayor productor, seguido por Pakistán, México y Brasil, además son países productores Egipto, Tailandia, Colombia, Indonesia, Venezuela, Sudan, Bangladesh, Cuba, Vietnam, Malasia, Puerto Rico, Australia y Estados Unidos (Singh, 2011). Según Yam *et al.* (2010), la producción mundial de guayaba es aproximadamente de 1,2 millones de toneladas, la India y Pakistán aportan el 50%, México el 25% y el resto lo aportan Colombia, Egipto y Brasil.

### 1.2.2. Producción nacional

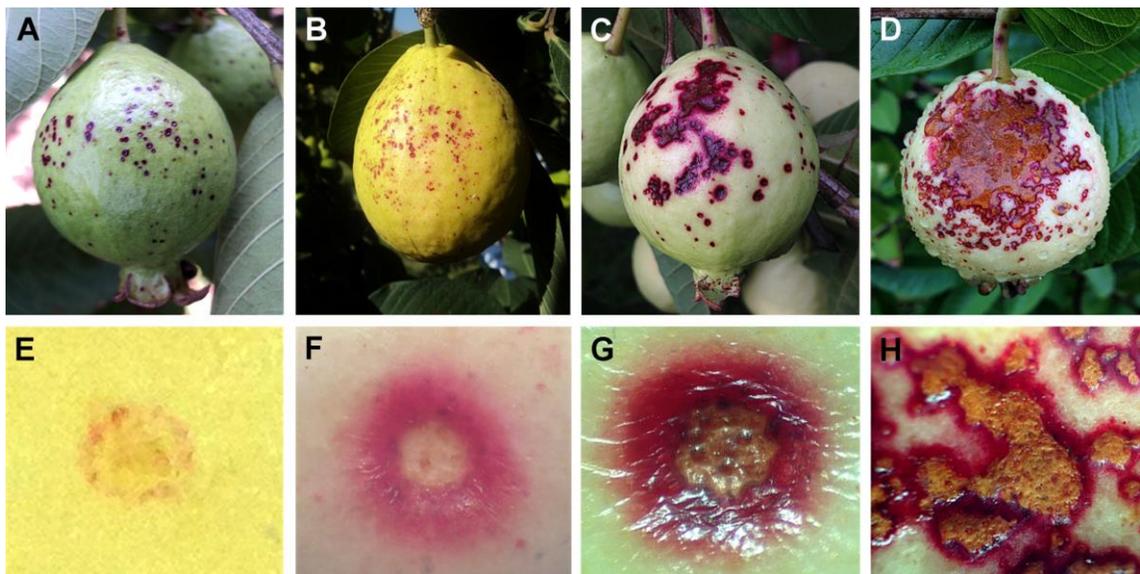
En el 2014, la guayaba se cultivó en México en 20,899.00 ha con una producción de 302,718.45 t, de las cuales el 45.2% lo aportó el estado de Michoacán (SIAP, 2016). En Michoacán gran parte de esta superficie se localiza en la región oriente del estado (Mendoza *et al.*, 2005).

### 1.2.3. Peca de la guayaba

La presencia de síntomas de peca es una de las variables que más influyen en el consumidor nacional al momento de comprar guayaba (Sangerman *et al.*, 2011). Esta enfermedad es de importancia cuarentenaria para la exportación a Estados Unidos (SAGARPA, 2013), en base a una publicación donde se encontró asociado a *Mycovellosiella psidii* en frutos sintomáticos (Crous, 1999). Los síntomas son más intensos en frutos de huertos que se programan para cosecha durante octubre a diciembre (Volke *et al.*, 2012). Los daños y pérdidas ocasionados por esta enfermedad son considerables. Mendoza *et al.* (2005), señalan que para el 77% de los productores, es el principal problema que afecta la comercialización en el Oriente de Michoacán. Flores-González *et al.* (2015)

reportaron que las pérdidas en la región Oriente de Michoacán pueden ascender hasta 7,350 t, equivalentes a 29.3 millones de pesos al año.

**1.2.3.1. Síntomas.** Los síntomas se pueden presentar en frutos próximos a la madurez fisiológica y son más evidentes cuando estos alcanzan la madurez comercial. Inicialmente se presentan puntos rojizos de 1 mm con el centro amarillo, posteriormente el centro, la lesión adquiere un color café con un halo de color rosado a púrpura de 1 a 3 mm. En ataques severos las pústulas coalescen, llegando a cubrir una porción mayor del fruto dando origen a una lesión irregular con el centro de aspecto corchoso, color café, rodeado por un bordo púrpura (Flores-González, 2012) (Fig. 1). Aunque estos daños no afectan directamente el mesocarpo, las lesiones tienen un efecto directo en la calidad física de los frutos cosechados y en consecuencia su comercialización (Domínguez y Nieto, 1996; Sangerman *et al.*, 2011).



**Fig. 1.** Síntomas de peca presentes en Michoacán, México durante 2015 en frutos de guayaba en diferente etapa fenológica. **A**, 7 d antes de la madurez fisiológica. **B**, Fruto en madurez comercial con pústulas individuales regulares con el centro amarillo y un halo rosado de 1 a 3 mm. **C**, Pústulas con el centro rojizo rodeado por un halo púrpura. **D**, Fruto maduro con manchas agrupadas en forma irregular coalescentes. **E**, Peca en estado inicial caracterizada por un halo rojizo con el centro amarillo. **F**, Peca (pústula) con el centro amarillo y borde rosado. **G**, Peca con el centro café y borde púrpura. **H**, Manchas coalescentes que originan una lesión irregular y ligeramente hundida con el centro corchoso, café y rodeado por un halo púrpura.

**1.2.3.2. Origen de la enfermedad.** Domínguez y Nieto (1996) indican que la peca de la guayaba es de origen abiótico, es decir, relacionada principalmente con deficiencias nutrimentales, pues observaron una relación inversa entre la concentración de Zinc y la severidad de la enfermedad, sin embargo, no establecieron una relación cuantitativa entre dichas variables, y el experimento no fue repetido en diferentes temporadas. Cardoso *et al.* (2008), en un estudio de microscopía electrónica de barrido, encontraron que en los frutos con peca existen cambios estructurales a nivel epidermis, pero no encontraron, signos de algún patógeno biótico; sin embargo, mencionan concentraciones diferenciales en Na, Mg y Ca, que se presentaron en mayor proporción en los frutos sin peca, mientras que los frutos con peca muestran mayor contenido de K, Mn, Fe y Cu. Posteriormente, Cardoso (2010), no logró reducir la incidencia y severidad de peca con respecto al testigo, con aplicaciones de fertilizantes foliares de tipo mineral, orgánico-mineral y fertilización en el sistema radicular. El autor menciona que la fertilización solo contribuyó a mantener los niveles nutrimentales dentro del óptimo o superior a la referencia en guayaba, pero no encontró una reducción significativa del daño con la aplicación de fertilizantes de origen químico y orgánico.

En relación a factores bióticos asociados a los síntomas de peca, Crous (1999), examinó distintos frutos de guayaba procedentes de México, colectados entre los años 1946 y 1969, y encontró asociado al hongo *Mycovellosiella psidii* en lesiones circulares de 2 a 3 mm de diámetro rodeadas de un borde oscuro. En Costa Rica, de síntomas similares, Morera y Blanco (2009) aislaron a *Cylindrocladium* spp., pero González y Rondón (2005), y Flores *et al.* (2009), en Venezuela, aislaron a *Phyllosticta psidiicola* (Petra) Van der Aa, (Tel: *Guignardia psidii*), asociada a una enfermedad similar a la peca, conocida como “la mancha roja”. Dicho hongo lo reportaron Ullasa y Rawal (1984) en la India, Lin *et al.* (2003) en Taiwan y Amaral *et al.* (2006) en Brasil, causando lesiones hundidas con desarrollo concéntrico en frutos, distintas a la sintomatología de la peca. En Sudáfrica Jacobs *et al.* (2014), aislaron e identificaron un complejo de especies de *Mycosphaerella* en lesiones circulares con el centro café rodeadas

de un halo rojizo de 1 a 4 mm, a la que le llamaron “mancha rosada” (Pink spot), pero no condujeron las pruebas de patogenicidad.

**1.2.3.3. Control.** Experiencias de los productores indican que las aplicaciones de fungicidas han reducido significativamente las pérdidas y han aumentado la calidad de la producción. Actualmente, en México se encuentran registrados en el cultivo de guayaba fungicidas para la peca, uno de ellos el azoxystrobin (Bankit®). La aplicación se realiza principalmente en combinación o de manera alternada con otros fungicidas como el clorotalonil, mancozeb, captan, productos derivados del cobre, benomil, carbendazim (Volke *et al.*, 2012). En este sentido, Flores-González *et al.* (2013) y Rebollar-Alviter *et al.* (2014) indicaron que la incidencia y severidad se redujo significativamente con aplicaciones en bloques de fungicidas de origen químico, como azoxistrobin o pyraclostrobin alternado con captan. Productos biorracionales como fosfito de potasio y glutatión-oligosacarinas funcionaron al nivel de los mejores tratamientos químicos, pero el costo del manejo basado en estos productos resultó ligeramente superior a los tratamientos con fungicidas como el pyraclostrobin alternado con productos de contacto. Estos tratamientos fueron aplicados de 2 a 3 meses antes de la cosecha en experimentos replicados en dos años de estudio.

Los estudios enfocados hacia la determinación del agente causal, y el conocimiento de la enfermedad en términos de su comportamiento espacio temporal son muy escasos, a pesar de la gran influencia que tiene la presencia de la enfermedad en la comercialización de la guayaba en el mercado nacional y de exportación (Sangerman *et al.*, 2011; SAGARPA, 2013). Generar información de la etiología y su epidemiología, permitirá diseñar estrategias de manejo de más efectivas de menor impacto ambiental.

### 1.3. LITERATURA CITADA

- Amaral, C. S., Salvaia, A., Angeli, S. S., Martins, M. C., Lourenço, A. S., y Amorim, L. 2006. Incidencia de patogenos pos-colheita em goiabas Kumagai. *Summa Phytopathologica*. 32:57-58.
- Cardoso, Del R. I. 2010. Deficiencias nutrimentales en guayabo y su relación con la incidencia de peca en fruto. Tesis Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados. México. 56 p.
- Cardoso, del R. I., Ruiz P. L del M., Rodríguez, M. M. de las N., Soto, G. A. B, y Rosas, S. G. 2008. Microscopia electrónica de barrido como herramienta en el estudio de la peca de la guayaba (*Psidium guajava* L.) IX Congreso Nacional de Microscopía, Guanajuato, México.
- Crous, W. P. 1999. Species of *Mycosphaerella* and related anamorphs occurring on *Myrtaceae* (excluding *Eucalyptus*). *Mycology Research*. 103:607-621.
- Domínguez, A. J. L. 1993. Búsqueda de firmeza y disminución de peca en frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) en Jalpa, Zacatecas. Tesis Licenciatura, Universidad Autónoma Chapingo. 64 p.
- Domínguez, A. J. L. y Nieto, A. D. 1996. Firmeza y disminución de peca en frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) en Jalpa, Zacatecas. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 2:223-226.
- Flores-González, G. E. 2012. Estrategias de manejo de la peca de la guayaba en el Oriente de Michoacán. Tesis licenciatura. Instituto Tecnológico del Valle de Morelia. Morelia, México.
- Flores-González, G. E., Rebollar-Alviter, A., Castro, S. R., y Castillo, P. M. R. 2015. Distribución geográfica y estimación de pérdidas por la peca de la guayaba en el Oriente de Michoacán. Suplemento de la *Revista Mexicana de Fitopatología*. 33:118.
- Flores-González, E., Rebollar-Alviter, A., Volke H. V. H., Silva-Rojas, H. V., Peña, O. C. S., y Espinoza, Q. G. 2013. Estrategias de manejo de la peca de la guayaba en el oriente de Michoacán. Suplemento *Revista Mexicana de Fitopatología*. 31:84.
- Flores, Y., Rondón, A., Arnal, E., Mujica, Y., García, M., y Romero, A. 2009. La mancha roja de la guayaba: síntomas y diseminación en el estado Cojedes, Venezuela. *Bioagro*. 21:75-77.
- González, M. S., y Rondón, A. 2005. First report of *Guignardia psidii*, an ascigerous state of *Phyllosticta psidiicola*, causing fruit rot on guava in Venezuela. *Plant Disease*. 89:773.

- Jacobs, A., Truter, M., and Schoeman, M. H. 2014. Characterisation of *Mycosphaerella* species associated with pink spot on guava in South Africa. *South African Journal of Science*. 110:26-31.
- Lin, C. C., Lai, C. S. y Tsai, S. F. 2003. Ecological survey of guava new fruit rot—*Phyllosticta* rot (black spot) and other fruit rots. *Plant Protection Bulletin*. 45:263-270.
- Madden, L. V. 2006. Botanical epidemiology: some key advances and its continuing role in disease management. *European Journal of Plant Pathology*. 115:3-23.
- Mendoza, L. M. R., Luis, A. A., Castillo, O. S. F. y Vidales, F. I., 2005. Diagnóstico del manejo actual del cultivo de guayaba en la Región Oriente de Michoacán. Publicación especial número 1. INIFAP. Uruapan, Michoacán, México. 38 p.
- Morera, M. R. y Blanco, M. H. 2009. Microorganismos asociados a frutos embolsados de guayaba Taiwanesa variedad Tai Kuo. *Agronomía Mesoamericana*. 20:339-349.
- Nakasone, H. Y., and Paull, R. E. 1998. *Tropical fruits*. CAB International, Wallingford, Eng.
- Nieto, A. D. 1996. Fisiología, bioquímica y patógenos en frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.). Tesis de Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados, México. 11 p.
- Rebollar-Alviter, A., Flores-González, E., Volke, H. V. H., and Silva-Rojas, H. V. 2014. Management strategies, associated fungi and intensity of guava speck in Michoacán, Mexico. In memories 50th Annual Meeting Caribbean Food Crops Society and APS Caribbean Division. Virgin Islands USA. 80 p.
- Sangerman, J. D. M., Larqué, S. B. S., Navarro, B. A., Schwentesius, de R. R., Nieto, M. C., y Cuevas, S. J. A. 2011. Estudio de mercado de aguacate, guayaba y durazno en el Distrito Federal, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2:925-938.
- SAGARPA, 2013. Addendum to the operational work plan for exports of guava (*Psidium guajava* L.) in fresh irradiated from Mexico to the United States. Revisado el 19/01/2016. <http://www.normich.com.mx/>.
- SIAP. 2016. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Revisado el 19/01/2016. <http://www.siap.gob.mx/>.

- Singh, S. P. 2011. Guava (*P. guajava* L.) Yahia, E. M. (ed.). Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK. 213-245 pp.
- Ullasa, B. A., y Rawal, R. D. 1984. *Guignardia* fruit rot of guava. A new disease from Bangalore. Current Science. 5:435-436.
- Volke, H. V. H., Camacho, B. P, Sánchez, G. A., Rebollar-Alviter, A., y Ruiz F. R. 2012. Manual de producción de guayaba en la region oriente de estado de Michoacán. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. Mexico. 105 p.
- Yam, T. J. A., Villaseñor, P. C. A., Romantchik, K. E., Soto, E. M., y Peña, P. M. A. 2010. Una revisión sobre la importancia del fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.) y sus principales características en la postcosecha. Revista de Ciencias Técnicas Agropecuarias. 19:74-82.

## CAPÍTULO II

### ETIOLOGÍA DE LA PECA DE LA GUAYABA (*Psidium guajava* L.)

#### RESUMEN

La peca de la guayaba es una sintomatología que afecta a frutos limitando su comercialización. Esta enfermedad se ha asociado con deficiencias nutrimentales y factores bióticos como la presencia de hongos. El objetivo de la presente investigación fue determinar la etiología de la enfermedad en el oriente de Michoacán. Se seleccionaron tres aislamientos para realizar las pruebas de patogenicidad en frutos del cv Media China, en estado inmaduro y de 2 a 3 cm de diámetro ecuatorial. Los ensayos se realizaron en condiciones de campo (estación lluviosa del 2014 y 2015) e invernadero (octubre a noviembre del 2016). Se asperjó una suspensión de micelio fragmentado sobre 45 frutos por aislamiento, inmediatamente de la inoculación cada fruto se cubrió por 12 h con una bolsa de polietileno. Se realizaron de 2 a 7 inoculaciones cada 7 o 15 días dependiendo de la rapidez de la maduración fisiológica de los frutos, Se evaluó la incidencia y severidad, se realizó un ANOVA y las pruebas de medias (Tukey  $\alpha=0.05$ ) en comparación con frutos no inoculados. Para identificar y confirmar si los hongos re-aislados correspondieron a los inoculados, se amplificó la región ITS con los primers ITS5F/ITS4R y el Factor de Elongación 1 $\alpha$  (TEF) con los primers EF1-688F/EF1-1521R. La reconstrucción filogenética se realizó con métodos bayesianos concatenando las secuencias ITS y TEF considerando 10 M de generaciones. Adicionalmente se realizó la caracterizaron morfológica. El análisis de varianza de la incidencia y severidad de los frutos inoculados indicó que hubo diferencias significativas respecto al control (frutos no inoculados) en los dos años de estudio, confirmando la patogenicidad de los aislamientos en campo. No se lograron reproducir los síntomas en invernadero. El análisis filogenético y morfológico, indicó que los hongos reaislados, fueron similares a los inoculados. Un aislamiento se identificó como *Passalora psidiicola* (= *Mycovellosiella psidii*) y dos probables nuevas especies de *Passalora* (= *Mycovellosiella*). Estos estudios completan las pruebas de patogenicidad y reproducen los síntomas de peca de la guayaba en condiciones de campo, lo que permitirá continuar con estudios básicos y aplicados para el manejo de la enfermedad.

**Palabras clave.** *Mycosphaerellaceae*, patogenicidad, hongos.

## 2.1. INTRODUCCIÓN

La guayaba (*Psidium guajava* L.) es un frutal originario de América del Norte y Sudamérica, ampliamente distribuido en las regiones tropicales de América. (Nakasone y Paull, 1998). La producción anual de guayaba es de alrededor de 1.2 millones de toneladas, siendo la India y Pakistán, los principales países productores con el 50%, mientras que México produce el 25%, y el resto Colombia, Egipto y Brasil (Yam *et al.*, 2010). En el 2014, la superficie de guayaba en México fue de 20,899 ha con una producción de 302,718.45 t, de las cuales el 45.2% fue aportado por el estado de Michoacán (SIAP, 2016).

El desconocimiento del agente causal de esta enfermedad es uno de los problemas que más afectan la comercialización internacional (Domínguez y Nieto, 1996) y nacional de guayaba (Sangerman *et al.*, 2011). Los síntomas de esta enfermedad se presentan en frutos próximos a la madurez fisiológica, pero son más evidentes cuando los frutos alcanzan la madurez comercial, inicialmente se presentan halos rojizos de 1 mm con el centro amarillo, posteriormente el centro la lesión adquiere un color café con un halo de color rosado a púrpura de 1 a 3 mm. En ataques severos las pústulas (manchas) coalescen llegando a cubrir una porción mayor del fruto, dando origen a una lesión irregular con el centro de aspecto corchoso, color café, rodeado por un bordo púrpura (Flores-González, 2012). Aunque estos daños no afectan directamente el mesocarpo de los frutos, las lesiones tienen un efecto directo en la calidad de la cosecha y en consecuencia su mercado (Domínguez y Nieto, 1996; Sangerman *et al.*, 2011).

A pesar de que esta enfermedad se ha registrado desde hace décadas, su etiología no está claramente definida. Domínguez y Nieto (1996) la asociaron con deficiencias de Cobre, Zinc, Manganeso y Magnesio. Sin embargo, correcciones de deficiencias de estos elementos, no redujeron significativamente la intensidad epidémica (Cardoso, 2010). Crous (1999) examinó muestras de frutos procedentes de México colectados entre 1946 y

1969, y encontró asociados a *Mycovellosiella psidii* en lesiones circulares de 2 a 3 mm de diámetro rodeadas de un borde oscuro. En Costa Rica, Morera y Blanco (2009) aislaron, de síntomas similares, a *Cylindrocladium* spp. González y Rondón, (2005) y Flores *et al.* (2009) en Venezuela, asociaron síntomas similares a *Phyllosticta psidiicola* (Petra) Van der Aa, (*Tel: Guignardia psidii*). Este mismo hongo ha sido reportado por Ullasa y Rawal (1984) en la India, Lin *et al.* (2003) en Taiwan, y Amaral *et al.* (2006) en Brasil causando síntomas distintos a los relacionados con la peca. En Sudáfrica, Jacobs *et al.* (2014), aislaron e identificaron de frutos con manchas de color café en el centro rodeadas por un halo rojizo de 1 a 4 mm, a un complejo de especies de *Mycosphaerella*, a la que le llamaron mancha rosada (Pink spot).

Dada la importancia económica del cultivo (SIAP, 2014), la reducción en la calidad de frutos con presencia de síntomas de peca (Sangerman *et al.*, 2012), y considerando las pérdidas potenciales que puede ocasionar esta enfermedad (Volke *et al.*, 2012; Flores-González *et al.*, 2015) es necesario realizar estudios para determinar el agente causal de este problema fitosanitario. Bajo la hipótesis de que los síntomas de peca de la guayaba son causados por una o más especies de hongos, ya que se han identificado hongos a esta sintomatología (Crous, 1999; Morera y Blanco, 2009; González y Rondón, 2005; Flores *et al.* 2009 y Jacobs *et al.*, 2014) y se ha demostrado que la aplicación de fungicidas es efectiva para reducir la incidencia y severidad de peca (Flores-González *et al.*, 2013; Rebollar-Alviter *et al.*, 2014). El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar las especies de hongos asociados a los síntomas de peca de la guayaba, y determinar si son los agentes causales de la enfermedad en condiciones de campo e invernadero en Michoacán, México cumpliendo con los Postulados de Koch.

## **2.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1. Aislamiento de hongos de frutos sintomáticos**

Se colectaron 10 muestras compuestas de 5 frutos sintomáticos cada una. Los frutos fueron seleccionados de distintos árboles de huertos de la región oriente de Michoacán durante los meses de septiembre a diciembre del 2013 y 2014. Las muestras se lavaron con agua corriente y se disectaron de 10 a 15 lesiones (pústulas) de 1 a 3 mm por muestra; posteriormente se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% por 1.5 min, se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se dejaron secar en la campana de flujo laminar por 40 min. El tejido sintomático se colocó en cajas de Petri estériles de 60 x 15 mm con medio papa dextrosa agar (PDA) (BD Bioxon® New Jersey, USA) y se mantuvieron a temperatura ambiente en oscuridad continua por 10 días. Las colonias que crecieron se transfirieron a PDA adicionado con ácido láctico al 1%, y se mantuvieron 15 días en las condiciones antes descritas, para posteriormente almacenarse a 4°C para su posterior utilización.

### **2.2.2. Identificación morfológica**

De los aislados obtenidos, se seleccionaron tres, con base en sus características morfológicas (color, forma de la colonia) y en su frecuencia de aparición. Estos aislados se usaron para realizar las pruebas de patogenicidad en campo e invernadero, la caracterización morfológica y la posterior identificación molecular.

Para la caracterización morfológica, se colocó un disco de 0.5 cm en el centro de 5 cajas de Petri (60 x 15 mm) por aislamiento, en medio de cultivo jugo V8 (200 mL de jugo V8 Herdez®, en 800 mL de agua destilada estéril con 0.2 g de CaCO<sub>3</sub> y 30 g de Agar) y agar extracto de malta (MEA) (20 g extracto de malta y 20 g de agar por litro de agua), se sellaron con Parafilm® y se mantuvieron durante 15 d en una incubadora (Thermo Scientific 1602D, USA) a 25°C bajo obscuridad continua. Después de este periodo se evaluó la coloración,

morfología y el diámetro de la colonia, midiendo la longitud del crecimiento en dos orientaciones, promediando el resultado de las dos lecturas y restando 0.5 cm, correspondientes al tamaño del disco colocado en el centro de caja.

Para promover la formación de esporas de los aislados, se utilizaron dos métodos. En el primero se agregó 1 mL de agua destilada estéril a cada caja de Petri con MEA y V8, con crecimiento micelial de las colonias bajo las condiciones previamente descritas. Se raspó el crecimiento micelial en ambos medios con una brocha estéril, se tomaron 20  $\mu$ L del fragmento de micelio y se esparcieron uniformemente en una caja de Petri 60 x 15 mm con agar sintético pobre en nutrientes (SNA) ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g;  $\text{KNO}_3$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, KCl 0.1 g, Sacarosa 0.1 g,  $\text{litro}^{-1}$  de agua) en 5 cajas por aislado (repeticiones) y se incubaron a 25°C por 5 d en oscuridad continua.

El segundo método consistió en cultivar los aislados en SNA y mantenerlos en incubadora bajo un foco de luz ultravioleta (8W) continua a 25°C durante 15 d. Después de este periodo, se cortaron secciones de la colonia de 22 x 22 mm y se colocaron sobre un portaobjetos; se les adicionó ácido láctico para la toma de fotografías con una cámara Infinity 1-2C montada en un microscopio Olympus BX41 con una magnificación de 40-100 X y se midieron 100 conidios. Con base en la distribución de las mediciones de largo y ancho se reportaron los valores extremos paréntesis y el rango de las medidas descriptivas del 95% de los conidios. Las mediciones y morfología de conidios se compararon con las claves de Hyde *et al.* (2013) para anamorfos de *Mycosphaerella* spp.

### **2.2.3. Pruebas de patogenicidad**

Después de varios ensayos sin lograr reproducir los síntomas característicos de la peca inoculando micelio y conidios en frutos inmaduros en condiciones de laboratorio (Resultados no mostrados), se hicieron las inoculaciones en condiciones de campo en dos parcelas comerciales de guayaba cv. Media China durante las temporadas 2014 y 2015 e invernadero durante octubre y noviembre del 2016.

**2.2.3.1 Inoculaciones en campo.** En 2014, se seleccionó una parcela comercial en el municipio de Jungapeo, Michoacán. Se seleccionaron tres arboles donde inocularon 15 frutos por árbol, inmaduros, asintomáticos y de un tamaño de 2.5 a 2.8 cm diámetro con dos aislamientos obtenidos de frutos sintomáticos durante 2013 (CRM 1 y CRM 2) y un control (agua estéril). Cada grupo de frutos se inoculó asperjando una suspensión de 200 mL de micelio en agua estéril, adicionado con 0.20 mL de Tween 20 por L<sup>-1</sup>. Previamente en el laboratorio se preparó una suspensión de micelio con los aislados seleccionados de 21 días de crecimiento en PDA, molidos y homogeneizados en una licuadora durante 1 min. Con el fin de favorecer la alta humedad relativa, los frutos se cubrieron con una bolsa de polietileno, la cual se removió 12 h después. En el interior del árbol, estos frutos estuvieron distribuidos al azar y en la parte media del mismo. Los frutos seleccionados, se reinocularon de 2 a 4 veces cada 7 días, dependiendo de la rapidez de maduración.

La inoculación de los frutos en campo se repitió en la temporada 2015, agregando al experimento un hongo aislado de frutos sintomáticos durante 2014 (CRM 3), pero ahora en una parcela comercial en el municipio de Juárez, Michoacán. En este caso, se incrementó el número de árboles (repeticiones) a cinco con un tamaño de muestra de 10 frutos asintomáticos (2.3 a 2.8 cm diámetro) por árbol. Los frutos se inocularon con base en la metodología del año anterior. Además del control (agua destilada) se incluyó otro control al que se le realizaron 3 aplicaciones del fungicida pyraclostrobin (0.5% producto comercial Headline®) el cual había sido eficaz en la reducción de la incidencia y severidad en experimentos previos (Flores-González *et al.*, 2013; Rebollar-Alviter *et al.* 2014). En este experimento, se realizaron de 3 a 7 inoculaciones dependiendo de la rapidez de maduración de los frutos. Las 3 primeras inoculaciones se realizaron cada 7 días, y las siguientes se realizaron cada 15 días, debido a que se observó que el desarrollo de los frutos fue más lento que el primer año de inoculaciones. La última inoculación se realizó un mes antes de que maduraran los frutos más tardíos. Durante el periodo de inoculaciones en el 2015 se monitoreo la temperatura media (°C), humedad relativa (%), y

periodos continuos con agua libre diaria (horas) con un Data Logger (Watch Dog Modelo 450 Spectrum Technologies, Inc.).

Las inoculaciones se realizaron durante los meses de agosto y septiembre el 2014 y de agosto a octubre el 2015, a partir de las 18:00 h, a fin de evitar daños a los frutos por altas temperaturas y favorecer la humedad relativa en el interior de las bolsas.

Los experimentos se establecieron en un diseño de bloques aleatorizados completos. Se evaluaron cinco tratamientos (hongos aislados CRM 1, CRM 2, CRM 3, un fungicida y control). La unidad experimental la constituyó el grupo de frutos inoculados por árbol (10 a 15 frutos).

Las variables evaluadas fueron incidencia (proporción de frutos enfermos en relación al total) y severidad (porcentaje de tejido enfermo en relación al total), la cual se determinó con base en una escala arbitraria de 7 categorías donde: 0 fruto sin síntomas, 1 = 0 al 5% de daño por peca, 2 = 5 a 10%, 3 = 10 al 25%, 4 = 25 a 50%, 5 = 50 a 75% y 6 = 75 a 100% de área del fruto cubierta por peca (Flores-González, 2012) por cada aislamiento inoculado en comparación con el control asperjado con fungicida y el no inoculado. Con fines de análisis se consideró el porcentaje medio del rango de severidad de cada categoría. Los datos de incidencia y severidad se sometieron a una prueba de homogeneidad de varianzas de Levene a fin de cumplir con los supuestos estadísticos. Posteriormente, se procedió a realizar un análisis de varianza (ANOVA) usando para ello el Proc Glimmix SAS (ver 9.4). Los tratamientos se consideraron como efectos fijos y los bloques (repeticiones) como aleatorios, además se realizó una prueba de separación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). El enfoque anterior, permitió diferenciar el efecto sobre la incidencia y severidad, debido a los tratamientos (aislados), de infecciones naturales y del fungicida.

**2.2.3.2. Inoculaciones en invernadero.** Se establecieron 22 plantas de guayabo cv. Media China el 31 de julio del 2015 en macetas de 80 L en Morelia, Michoacán. Dichas plantas se fertilizaron con 200 g Triple 17 por árbol al

momento del trasplante, la floración y en la etapa de amarre de frutos. Se realizaron de 1 a 3 inoculaciones semanales entre octubre y noviembre del 2016, con fragmentos de micelio y conidios de los 3 aislamientos (CRM 1, CRM 2 y CRM 3) y un control con agua destilada, en 40 a 45 frutos por aislamiento desde los 5 hasta 80 días antes de la madurez comercial.

**2.2.3.3. Reaislamiento.** Para confirmar si los síntomas presentados en los frutos provenían de las inoculaciones artificiales y no por infecciones naturales, se realizaron aislamientos de 5 frutos inoculados sintomáticos; de cada muestra se seleccionaron 15 puntos de peca que se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% por 1.5 min, se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril y se dejaron secar en la campana de flujo laminar por 40 min. El tejido sintomático se colocó en cajas de Petri estériles de 60 x 15 mm con medio papa dextrosa agar (PDA) (BD Bioxon® New Jersey, USA) y se mantuvieron a temperatura ambiente en oscuridad continua por 10 d. De los hongos reaislados se extrajo DNA, se realizaron las PCR de acuerdo al procedimiento que se indica en el capítulo 2.2.4. Las secuencias ITS y TEF de los hongos reaislados se incluyeron en el análisis filogenético concatenado con las cepas inoculadas, además de las comparaciones morfológicas.

#### **2.2.4. Identificación molecular**

**2.2.4.1. Extracción de DNA.** La extracción de DNA se realizó de acuerdo al protocolo de CTAB al 2% (Tris-HCl 100mM pH 8.0; Na<sub>2</sub> EDTA 2H<sub>2</sub>O 20 mM; pH 8.0; CTAB; NaCl 1.4 M) (Doyle y Doyle, 1990) con algunas modificaciones. Se colocó en un tubo Eppendorf de 2 mL, 1 mL del buffer previamente calentado a 60°C. Con una espátula se raspó el micelio de las cajas de Petri y se colocó a los tubos, se mezcló vigorosamente y se incubó a 96°C durante 60 min, mezclando en un agitador Vortex cada 10 min. Después se centrifugó por 5 min a 11,500 rpm, posteriormente se recuperó el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo de 2 mL, al que se le agregaron 500 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 vol/vol), y se mezcló por inversión durante 10 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 11,500 rpm durante 10 min para formar

la fase acuosa y la fase orgánica. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo de 2 mL, posteriormente se agregó 700 µL de cloroformo-alcohol isoamilico (24:1 vol/vol) y se agitó por inversión durante 10 min, se centrifugó durante 10 min a 11,500 rpm, se recuperó nuevamente el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo con 950 µL de etanol al 100% previamente enfriado a -20°C. Se mezcló suavemente 10 veces. Para precipitar el DNA, las muestras se mantuvieron a -20°C por lo menos 2 h. Posteriormente se realizó una centrifugación durante 30 min a 11,500 rpm, después se eliminó el sobrenadante y se re-suspendió la pastilla en 400 µL de agua libre de nucleasas (agua HPLC) y se incubó en el baño maría a 50°C durante 15 min para diluir por completo la pastilla de DNA. Para eliminar residuos de compuestos que puedan afectar el proceso de secuenciación, se realizó un lavado adicional con 34 µL de acetato de sodio y 1 mL de etanol al 95% y se mantuvo a -20°C durante 1 h, posteriormente se centrifugó durante 5 min a 11,500 rpm, se eliminó el sobrenadante, se le agregó 600 µL de isopropanol al 70% y se centrifugó a 11,500 rpm durante 5 min. Nuevamente se eliminó el sobrenadante y se agregó 600 µL de isopropanol al 70% y se centrifugó durante 5 min a 11,500 rpm, decantando el sobrenadante. Una vez obtenida la pastilla de DNA se secó hasta que quedó completamente deshidratada; posteriormente se hidrató con 50 µL de agua HPLC y se incubó a 80°C durante 10 min en baño maría para homogeneizar el DNA. La calidad y la concentración del DNA se verificaron por espectrofotometría en un NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, USA). El equipo se calibró con 1.5 µL de agua HPLC, posteriormente se colocó 1.5 µL de las muestras de extracción. Una vez obtenidas las concentraciones y las calidades se realizó una dilución a 20 ng/µL de DNA.

**2.2.4.2. Amplificación de genes.** Se amplificó la región correspondiente al Espacio Transcrito Interno (ITS) del DNA con los primers ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4, (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990) y la Región del Factor de Elongación 1α (TEF) con los primers EF1-688F (5'-CGGTCACCTTGATCTACAAGTGC-3') y EF1-1251R

(CCTCGAACTCACCAGTACCG-3') (Alves *et al.*, 2008). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador C1000 Touch (BIO-RAD, USA) en un volumen final de 15  $\mu$ L por muestra con 7.86  $\mu$ L de agua HPLC, Reaction Buffer 5X Colorless Go Taq® Promega Corp. (3  $\mu$ L), dNTP's (0.6  $\mu$ L), Primer F (0.18  $\mu$ L), Primer R (0.18  $\mu$ L), Taq DNA polimerasa (0.18  $\mu$ L) y DNA (3  $\mu$ L).

Las condiciones de la PCR para la amplificación del ITS fue una desnaturalización a 95°C por 4 min, alineamiento a 58°C por 1 min, elongación a 72°C durante 2 min, seguido de 35 ciclos a 72°C por 10 min cada uno y un ciclo final a 72°C por 10 min. Para la amplificación de TEF las condiciones fueron un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 1.25 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 35 s, alineamiento a 60°C por 55 s y un ciclo final a 72°C durante 1.3 min. El producto final de los fragmentos amplificados se verificó en geles de agarosa al 1.5% teñido con Gel Red® (Biotium, USA). Las amplificaciones se purificaron mediante una reacción enzimática con ExoSAP-IT® (Affymetrix, USA), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El tamaño de los fragmentos esperados para ITS y TEF fue de ~500 pb.

**2.2.4.3. Secuenciación y comparación de secuencias de DNA.** Las reacciones de secuenciación de los productos de PCR purificados se realizaron con el Kit BigDye Terminator v 3.0 (Applied Biosystems, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un secuenciador Genetic Analyzer modelo 3130 (Applied Biosystems, USA), utilizando los mismos primers de las reacciones de PCR.

Las secuencias obtenidas se editaron y se creó una secuencia consenso con el software BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999). Estas secuencias se compararon con las secuencias depositadas en GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

**2.2.4.4. Análisis filogenético.** Se construyó un árbol filogenético con las secuencias ITS y TEF concatenadas. Para ello se alinearon las secuencias con el profile MUSCLE (Robert, 2004), incluido en el programa MEGA7 (Tamura *et*

*al.*, 2013), incorporando las secuencias descargadas de GenBank de ITS y TEF de especies de *Mycosphaerella* y anamorfos que se han reportado en *Mirtáceas*, y como grupo externo monofilético cercana al resto de los taxones se incluyó a *Uwebraunia commune*. Los números de accesoión de GenBank de las secuencias descargadas y de los aislados que se inocularon se muestran en el Cuadro 1. El análisis Bayesiano se realizó con MrBayes v. 3.2.1 (Ronquist *et al.*, 2012) seleccionando los modelos de mejor ajuste de sustitución de nucleótidos seleccionado con jModelTest v. 0.1.1 (Posada, 2008) para cada loci (K80+G y HKY+G para ITS y TEF, respectivamente) con el Criterio de Información de Akaike (AIC). Las dos secuencias se concatenaron utilizando MESQUITE v. 3.10 (Maddison y Maddison, 2016). El árbol consenso se visualizó con el software FigTree v. 1.4.2 (Rambaut, 2016).

**Cuadro 1.** Números de accesión en GenBank las secuencias ITS y TEF de los aislamientos inoculados en campo e invernadero y de especies relacionadas reportadas en *Mirtáceas* incluidas en el análisis filogenético.

<b><i>Mycosphaerellaceae</i> y relacionados</b>	<b>Aislamiento</b>	<b>Numero de accesión ITS</b>	<b>Numero de accesión TEF</b>	<b>Referencia</b>
<i>Mycosphaerellaceae</i>	CRM 1	KX868091	KX868094	En este estudio
<i>Mycosphaerellaceae</i>	CRM 2	KX868092	KX868095	En este estudio
<i>Mycosphaerellaceae</i>	CRM 3	KX868093	KX868096	En este estudio
<i>Mycosphaerella africana</i>	CMW 3026	DQ267577	DQ235098	Hunter <i>et al.</i> , 2006
<i>Mycosphaerella aurantia</i>	CBS 110500	AY725531	DQ235097	Crous <i>et al.</i> , 2004
<i>Mycosphaerella ellipsoidea</i>	CBS 110843	AY725545	JX901653	Crous <i>et al.</i> , 2004
<i>Mycosphaerella heimii</i>	CBS 110682	KF901671	JX500107	Quaedvlieg <i>et al.</i> , 2014
<i>Dothistroma septosporum</i>	CBS 383.74	KF251303	KF253251	Verkley <i>et al.</i> , 2013
<i>Scolecostigmina mangiferae</i>	CBS 125467	GU269870	GU384578	Crous <i>et al.</i> , 2013
<i>Teratosphaeriaceae</i> sp.	CPC 12349	KF901800	KF903110	Quaedvlieg <i>et al.</i> , 2014
<i>Passalora dioscoreae</i>	CPC 11513	KF251311	KF253258	Verkley <i>et al.</i> , 2013
<i>Pallidocercospora acaciigena</i>	CBS 120740	KF901515	KF903106	Quaedvlieg <i>et al.</i> , 2014
<i>Pallidocercospora konae</i>	CBS 111028	KF901798	KF903140	Quaedvlieg <i>et al.</i> , 2014
<i>Mycosphaerella linicola</i>	CBS 316.37	KF251460	KF253408	Verkley <i>et al.</i> , 2013
<i>Uwebraunia commune</i>	CBS 112889	AY725539	JX500111	Crous <i>et al.</i> , 2004

## 2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.3.1. Aislamiento de hongos

Con la comparación preliminar en GenBank de las 23 secuencias obtenidas de frutos con síntomas de peca, usando el ITS (~500 pb) y una secuencia parcial de TEF (~500 pb) (incluyendo las secuencias de los aislamientos CRM 1, CRM 2 y CRM 3, que fueron seleccionados para las inoculaciones en campo e invernadero), no fue posible identificar las especies asociadas a la peca de la guayaba, debido a que las secuencias parciales obtenidas con el gen TEF, tuvieron una identidad máxima del 88%, y con los primers utilizados en este estudio se obtuvieron secuencias parciales de TEF de mayor tamaño que las depositadas en GenBank de referencia (~370 pb), por lo que el porcentaje de cobertura fue de un 85% máximo. Esto es indicativo que se trate de nuevas especies o que no existen secuencias depositadas similares a estas especies, aun y cuando se encontraron secuencias parciales del ITS, que tuvieron un 99 o 100% de identidad a *Mycosphaerella* spp., o algunos de sus géneros anamorfos, y 100% de cobertura (Cuadro 2). Lo anterior, evidencia que los aislamientos obtenidos de frutos con peca pertenecen a la familia *Mycosphaerellaceae* y la falta de estudios específicos en este patosistema.

Estos resultados coinciden con los reportados por Jacobs *et al.* (2014) en Sudáfrica, quienes identificaron tres especies de *Mycosphaerella*, y dos nuevas especies asociadas a síntomas similares a los de la peca de la guayaba en México, a la que llamaron la “mancha rosada” (pink spot), pero no completaron las pruebas de patogenicidad con ninguno de sus aislados.

**Cuadro 2.** Resultados del BLAST en GenBank con base en las secuencias parciales de ITS y TEF, de los aislados obtenidos de frutos con síntomas de peca durante 2013 y 2014 en Michoacán, México.

Aislamiento	Blast con las secuencias del Espacio Transcrito Interno (ITS)	Blast con las secuencias del Factor de Elongación (TEF)	Cobertura
CRM 1 <sup>a</sup>	375/375 (100%) de LT604873 <i>Mycosphaerella</i> sp.	294/347 (85%) de KF253259 <i>Passalora dissiliens</i>	71%
CRM 2 <sup>a</sup>	375/375 (100%) de LT604873 <i>Mycosphaerella</i> sp.	Similaridad no significativa	...
CRM 3 <sup>a</sup>	374/375 (99%) de EU514258 <i>Mycosphaerella mozambica</i>	334/403 (83%) de JX901630 <i>Mycosphaerella pini</i>	81%
CR 3	480/480 (100%) de GU269822 <i>Pseudocercospora tibouchinigena</i>	Similaridad no significativa	...
CR 4	496/497 (99%) de EU514258 <i>Mycosphaerella mozambica</i>	334/403 (83%) de JX901630 <i>Mycosphaerella pini</i>	67%
CRM 44	486/486 (100%) de DQ123604 <i>Mycosphaerella aurantia</i>	334/403 (83%) de JX901630 <i>Mycosphaerella pini</i>	67%
6A	484/484 (100%) de DQ123604 <i>Mycosphaerella aurantia</i>	319/379 (84%) de KF253259 <i>Passalora dissiliens</i>	72%
CRM 66	509/510 (99%) de KP861965 <i>Dothistroma septosporum</i>	274/314 (87%) de KF253251 <i>Dothistroma septosporum</i>	65%
RE 8	507/509 (99%) de KF421114 <i>Pseudocercospora bidentis</i>	294/347 (85%) de KM668878 <i>Passalora</i> sp.	65%
9A	487/487 (100%) de DQ123604 <i>Mycosphaerella aurantia</i>	Similaridad no significativa	...
CRM 11	559/560 (99%) de KR995129 <i>Dothistroma septosporum</i>	272/314 (87%) de KF253251 <i>Dothistroma septosporum</i>	59%

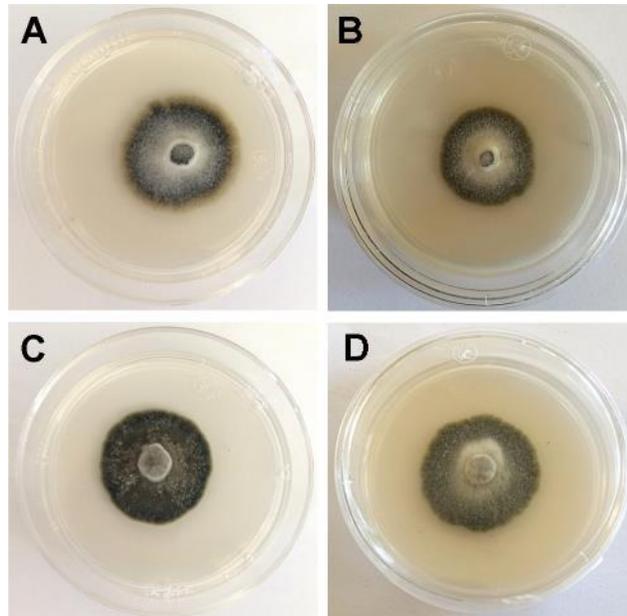
CRM 14	572/572 (100%) de KM409653 <i>Mycosphaerella</i> sp.	320/378 (85%) de KF253259 <i>Passalora dissiliens</i>	72%
CRM 15	510/511 (99%) de KP861965 <i>Dothistroma septosporum</i>	314/376 (84%) de KF253259 <i>Passalora dissiliens</i>	80%
16A	496/497 (99%) de EU514258 <i>Mycosphaerella mozambica</i>	294/347 (85%) de KF253259 <i>Passalora dissiliens</i>	85%
22A	573/577 (99%) de KR995129 <i>Dothistroma septosporum</i>	329/389 (85%) de KF253250 <i>Dothistroma pini</i>	80%
28A	479/482 (99%) de DQ676521 <i>Passalora</i> sp.	292/340 (86%) de KM668878 <i>Passalora</i> sp.	83%
32A	503/507 (99%) de KP861965 <i>Dothistroma septosporum</i>	323/386 (84%) de KF253250 <i>Dothistroma pini</i>	73%
36A	638/644 (99%) de EU707856 <i>Mycosphaerella buckinghamiae</i>	318/380 (84%) de KF253259 <i>Passalora dissiliens</i>	64%
60A	512/514 (99%) de KC149562 <i>Dothistroma pini</i>	334/408 (82%) de JX901630 <i>Mycosphaerella pini</i>	85%
63A	482/483 (99%) de GU269822 <i>Pseudocercospora tibouchinigena</i>	264/300 (88%) de JX901653 <i>Mycosphaerella ellipsoidea</i>	62%
64A	495/497 (99%) de JN19095 <i>Pantospora guazumae</i>	Similaridad no significativa	...
70A	478/482 (99%) de DQ676521 <i>Passalora</i> sp.	292/338 (86%) de KM668878 <i>Passalora</i> sp.	64%
73A	571/575 (99%) de EU707856 <i>Mycosphaerella buckinghamiae</i>	333/404 (82%) de JX901630 <i>Mycosphaerella pini</i>	69%

<sup>a</sup> Especies seleccionadas para realizar las pruebas de patogenicidad en campo e invernadero.

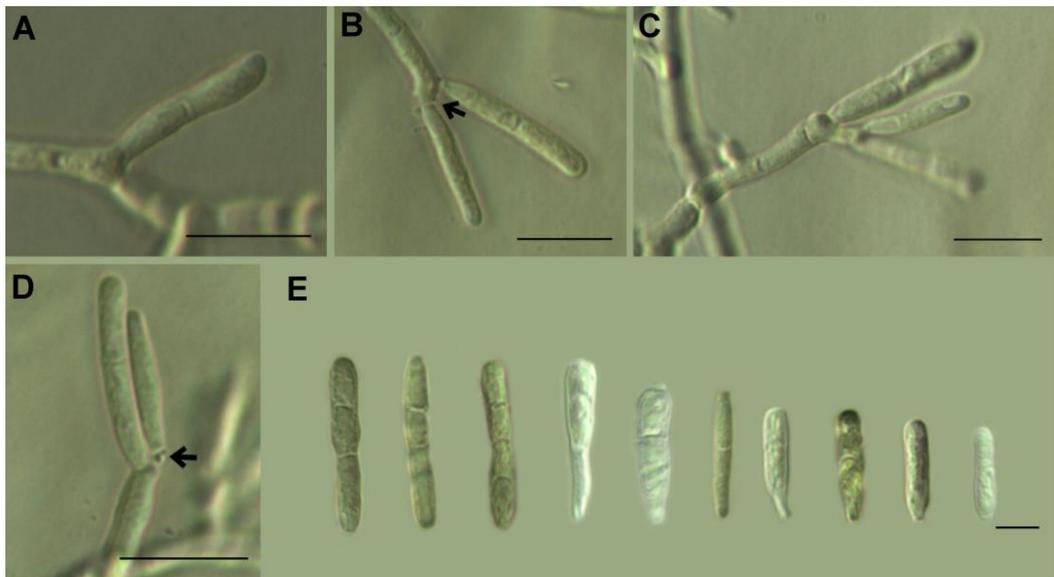
### 2.3.2. Caracterización morfológica de aislamientos

El micelio de las colonias de los 3 aislados seleccionados para las inoculaciones se desarrolló en los medios MEA y V8. Asimismo, la inducción de esporulación se logró mediante el método de esparcimiento de fragmentos de micelio en medio SNA bajo oscuridad continua a 25°C, después de 5 d de incubación, para el aislamiento CRM 1. Los aislados CRM 2 y CRM 3, solo produjeron conidios cuando se cultivaron en SNA y se mantuvieron bajo luz ultravioleta continua a 25°C durante 15 d. Las características de los aislados son las siguientes:

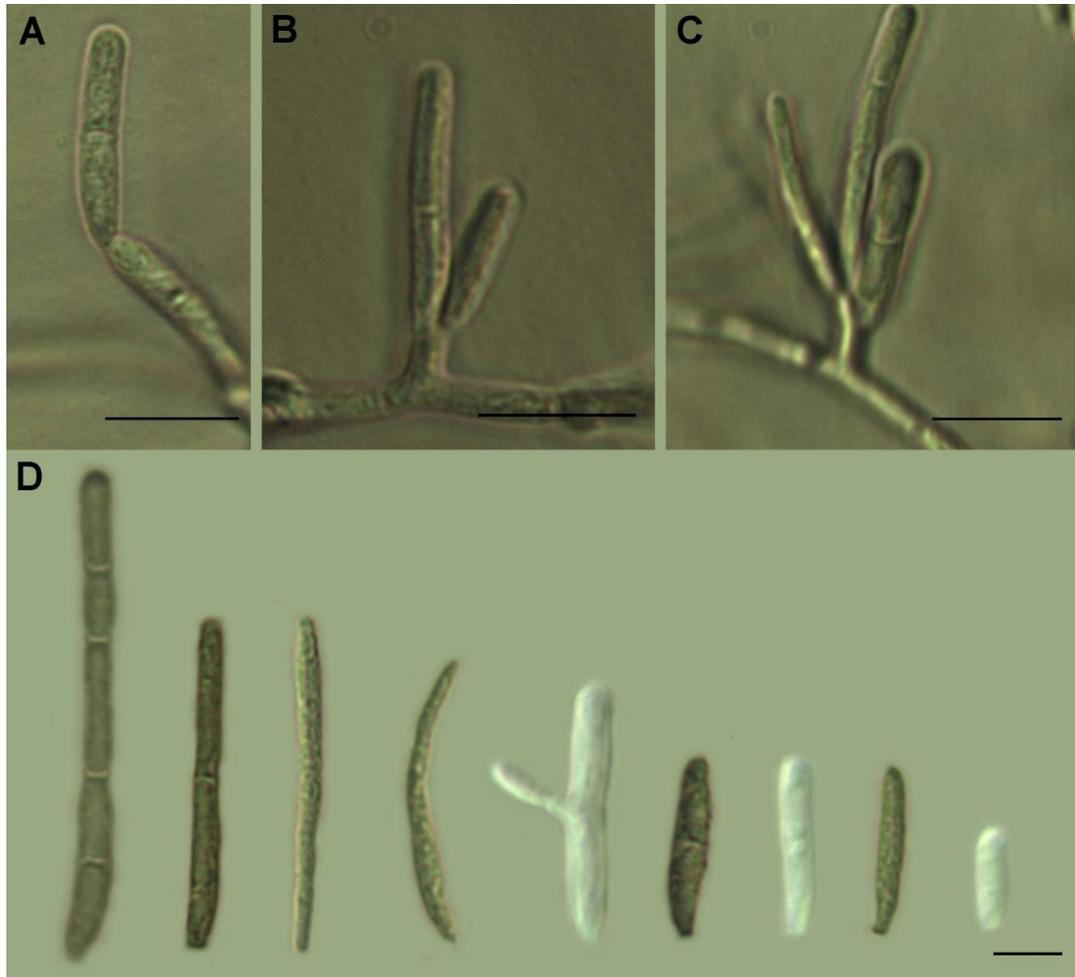
**2.3.2.1. Aislamiento CRM 1.** El aislado CRM 1, desarrolló colonias en medio MEA que crecieron de 21 a 25 mm y en V8 de 15 a 19 mm a 25°C (Figs. 1A y B) a los 15 días, al igual que el reaislado CRM 4 (Figs. 1C y D). En ambos medios produjeron micelio verde oliváceo aéreo suave, escaso o moderado, blanco grisáceo, margen verde oliváceo, delgado y desigual al igual que el hongo reaislado. Desarrolló conidióforos originados en micelio superficial. Células conidiógenas terminales, monoblásticas y poliblásticas con cicatriz conidial oscura, engrosada y refractiva (Figs. 2A, B, C y D). Conidios con proliferación simpodial, pigmentados, oliváceos, subcilíndricos, solitarios, con longitud y diámetro de (7-) 8 a 24.5 (-28) x 1.5 a 3 µm; rectos o ligeramente curvados; constreñidas en los septos, de 0 a 4 septos, en su mayoría de 1 septo, con cicatrices conidiales oscuras, refractivas, y engrosadas (Fig. 2E). El hongo re-aislado (CRM 4), no presentó diferencias significativas en sus mediciones, las cuales fueron de (7-) 9 a 28 (-35) x 1.5 a 3 µm, y conidios de hasta 4 septos, con las mismas características morfológicas que el aislado inoculado (Figs. 3A, B, C y D). Estas características correspondieron al género *Passalora psidiicola* (= *Mycovellosiella psidii*), con base en las características citadas por Crous y Braun (2003) y Braun *et al.* (2013) y confirmado tentativamente por el Dr. Uwe Braun de la Martin Luther University, Institute of Biology (Comunicación personal).



**Fig. 1.** Desarrollo de colonias durante 15 d en cajas de Petri de 60 mm en obscuridad a 25°C del aislamiento inoculado **A**, CRM 1 en agar extracto de malta y en **B**, jugo V8 con agar. **C**, Aislamiento reaislado CRM 4; en agar extracto de malta y **D**, jugo V8 con agar, en Michoacán, México durante el año 2016.



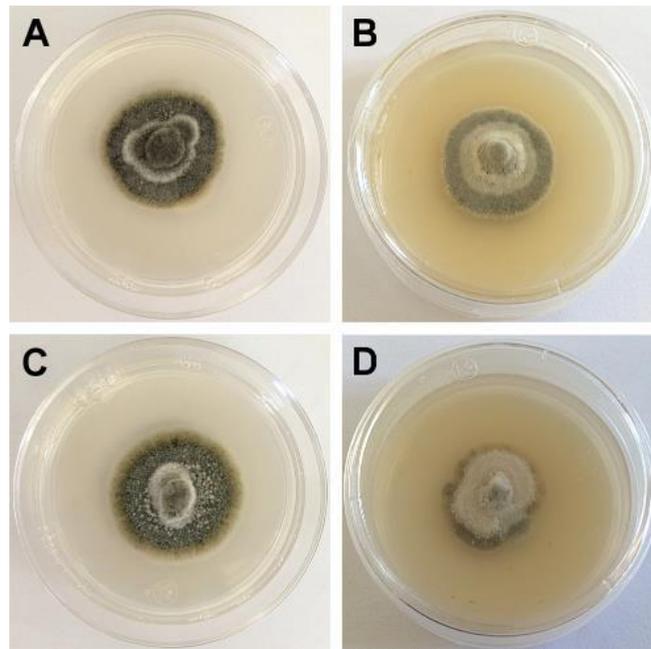
**Fig. 2.** Aislamiento CRM 1 inoculado. **A**, Hifa superficial con conidióforo solitario que da lugar a un conidio. **B**, Conidióforo septado con 2 conidios y con cicatriz conidial oscura en el centro (Flecha). **C**, Conidióforo septado, con cicatriz en célula conidiógena, oscura, refractiva y engrosada con 3 conidios. **D**, Conidióforo sin septos con cicatrices engrosadas y oscuras al centro (Flecha) y dos conidios unidos. **E**, Conidios en medio SNA. Escala de barras = 10  $\mu$ m en A, B, C, D y = 5  $\mu$ m en E.



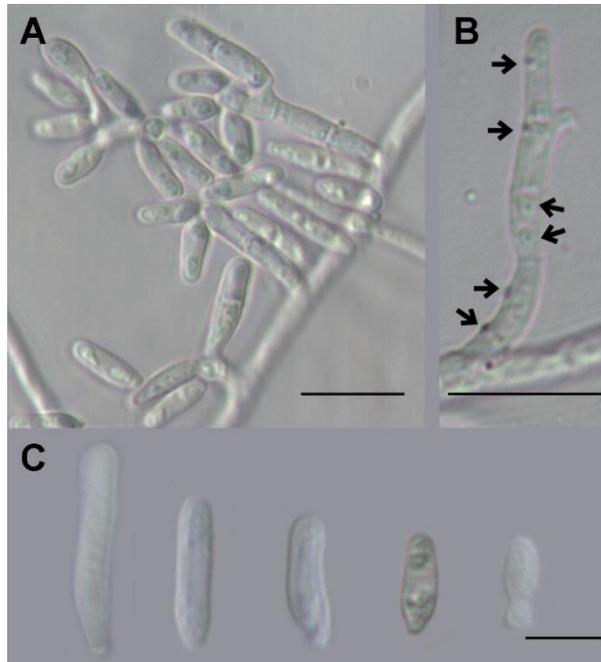
**Fig. 3.** **A,** Estructuras fungosas del aislamiento CRM 4 aislado de frutos inoculados. **A,** Conidióforo septado solitario que da lugar a un conidio. **B,** Conidióforo que da lugar a 2 conidios. **C,** Conidióforo con 3 conidios. **D,** Conidios en medio SNA. Escala de barras = 10  $\mu\text{m}$  en A, B, C y = 5  $\mu\text{m}$  en D.

**2.3.2.2. Aislamiento CRM 2.** Colonias del aislamiento CRM 2 crecieron 20 a 25 mm en MEA y 15 a 20 mm en V8 de manera similar creció cuando se reaisló de los frutos inoculados. En ambos medios produjeron micelio verde oliváceo; micelio aéreo suave muy abundante, blanco grisáceo, rodeado por un margen verde oliváceo, delgado y desigual (Figs. 4A, B, C y D). En ambos aislamientos los conidióforos se desarrollaron en micelio superficial y dieron lugar a células conidiógenas, monoblásticas y poliblásticas, con cicatrices integradas, terminales, engrosadas y oscuras (Figs. 5A, B y 6A, B y C). Conidios solitarios, proliferación simpodial, truncados en la base, sub-hialinos a pigmentados, subcilíndricos, de 0 a 1 septo, en su mayoría de 0, rectos y algunos deformes o

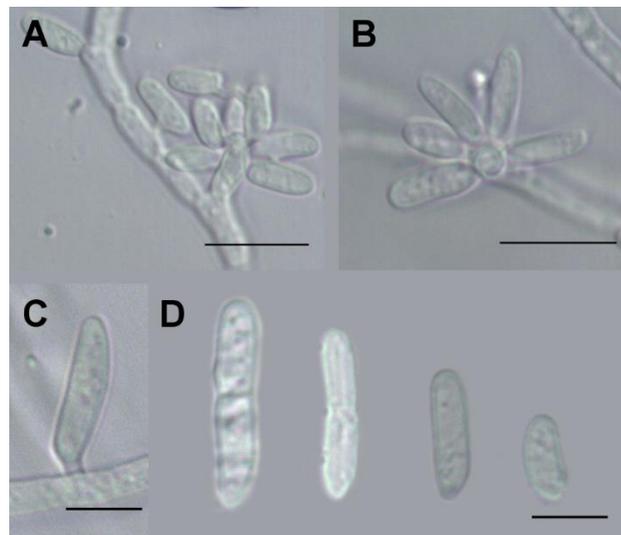
curvados con un largo y ancho de (5-) 5.5 a 13 (-14) x 1.5 a 3 en el aislamiento CRM 2 y de (4.5-) 5.5 a 13 (-15.5) x 1.5 a 3 cuando se reisoló de los frutos inoculados CRM 5 (Figs. 5C y 6D). Estas características correspondieron al género *Passalora* sp. (= *Mycovellosiella*), con base en las características citadas por Crous y Braun (2003) y Braun *et al.* (2013) y confirmado tentativamente por el Dr. Uwe Braun de la Martin Luther University, Institute of Biology (Comunicación personal).



**Fig. 4.** Desarrollo de colonias durante 15 d en cajas de Petri de 60 mm en obscuridad a 25°C del aislamiento inoculado **A**, CRM 2 en agar extracto de malta y en **B**, en jugo V8 agar. **C**, Aislamiento reaislado CRM 5; en agar extracto de malta y **D**, en jugo V8 agar, en Michoacán, México durante el año 2016.

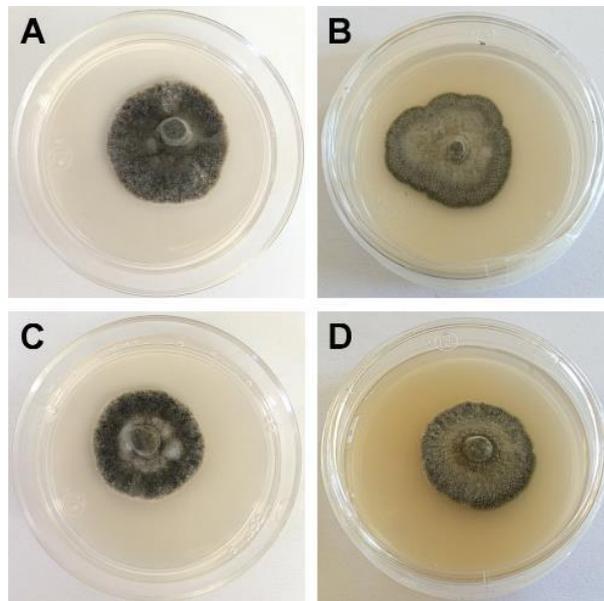


**Fig. 5.** Aislamiento inoculado CRM 2 con **A**, Conidióforos sobre micelio superficial que dan lugar a varios conidios. **B**, Células conidiógenas con cicatrices refractivas, oscuras y engrosadas (Flechas). **C**, Conidios. Escala de barras = 10  $\mu$ m en A y B y = 5  $\mu$ m en C.

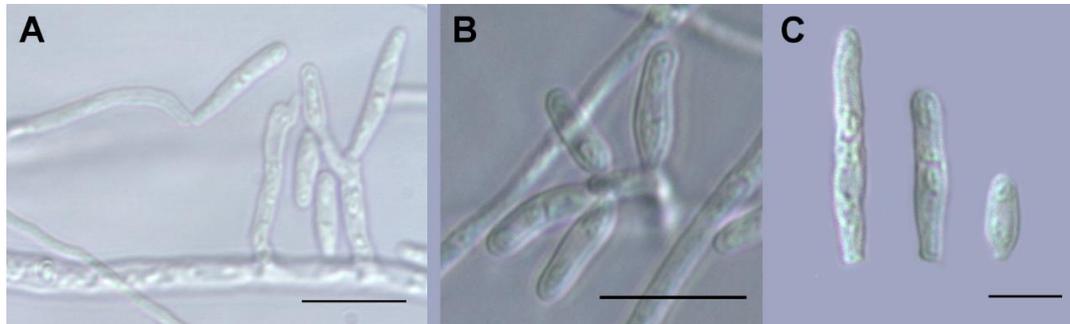


**Fig. 6.** Aislamiento reaislado CRM 5 con **A**, Conidio sobre micelio superficial y conidióforos sobre micelio superficial que dan lugar a varios conidios. **B**, Conidióforo con células conidiógenas poliblasticas. **C**, Conidio pigmentado sobre micelio superficial. **D**, Conidios. Escala de barras = 10  $\mu$ m en A, y B y = 5  $\mu$ m en C y D.

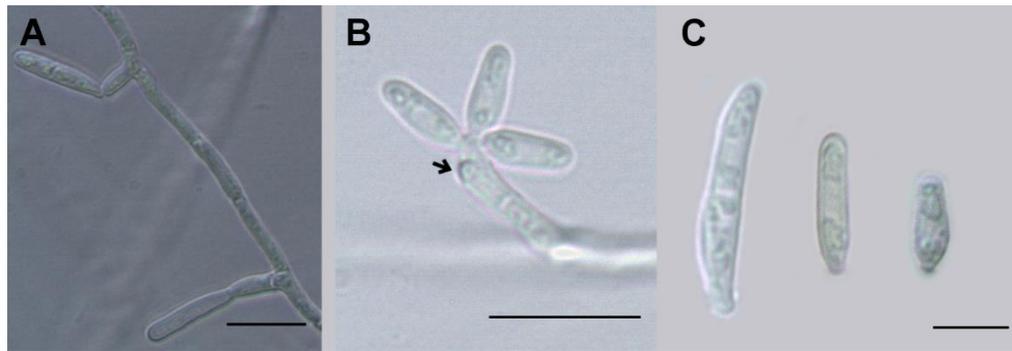
**2.3.2.3. Aislamiento CRM 3.** Colonias del aislamiento CRM 3 crecieron de 19 a 24 mm en MEA y 20 a 23 mm en V8, igual a las reaisladas después de la inoculación en un periodo de 15 d a 25°C. En ambos medios produjeron micelio verde oliváceo; micelio aéreo suave abundante, blanco grisáceo, rodeado por un margen verde oliváceo, delgado y desigual (Figs. 7A, B, C y D). En ambos aislamientos los conidióforos se desarrollaron en micelio superficial y dieron lugar a células conidiógenas monoblásticas y poliblásticas (Figs. 8A, B, 9A y B). Conidios rectos o curvados, solitarios, o raramente en cadenas cortas, truncados en la base, sub-hialinos a pigmentados, subcilíndricos, de 0 a 1 septo, en su mayoría de 0, con cicatrices engrosadas y oscuras (Figs. 8C y 9C) y con un largo y ancho de (5.5-) 7 a 14 (-16.5) x 1.5 a 2.5 para aislamiento inoculado CRM 3 y de (5-) 5.5 a 15 (-16) x 1.5 a 2.5 para su reisolado después de la inoculación en campo (Fig. 9C). Estas características correspondieron al género *Passalora* sp. (= *Mycovellosiella*), con base en las características citadas por Crous y Braun (2003) y Braun *et al.* (2013) y confirmado tentativamente por el Dr. Uwe Braun (Comunicación personal).



**Fig. 7.** Desarrollo de colonias durante 15 d en cajas de Petri de 60 mm en oscuridad a 25°C del aislamiento inoculado **A**, CRM 3 en agar extracto de malta y en **B**, jugo V8 agar. **C**, Aislamiento reaislado CRM 6; en agar extracto de malta y **D**, jugo V8 agar, en Michoacán, México durante el año 2016.



**Fig. 8.** Aislamiento inoculado CRM 3 con **A**, Conidióforos sobre micelio superficial con conidios de 0 a 1 septo. **B**, Conidióforo con células conidiógenas poliblasticas. **C**, Conidios. Escala de barras = 10 µm en A y B y = 5 µm en C.



**Fig. 9.** Aislamiento reaislados CRM 6 con **A**, Conidióforos sobre micelio superficial con conidios solitarios de 0 y 1 septo. **B**, Conidióforo con células conidiógenas poliblasticas y cicatriz engrosada y oscura (Flecha). **C**, Conidios. Escala de barras = 10 µm en A y B y = 5 µm en C.

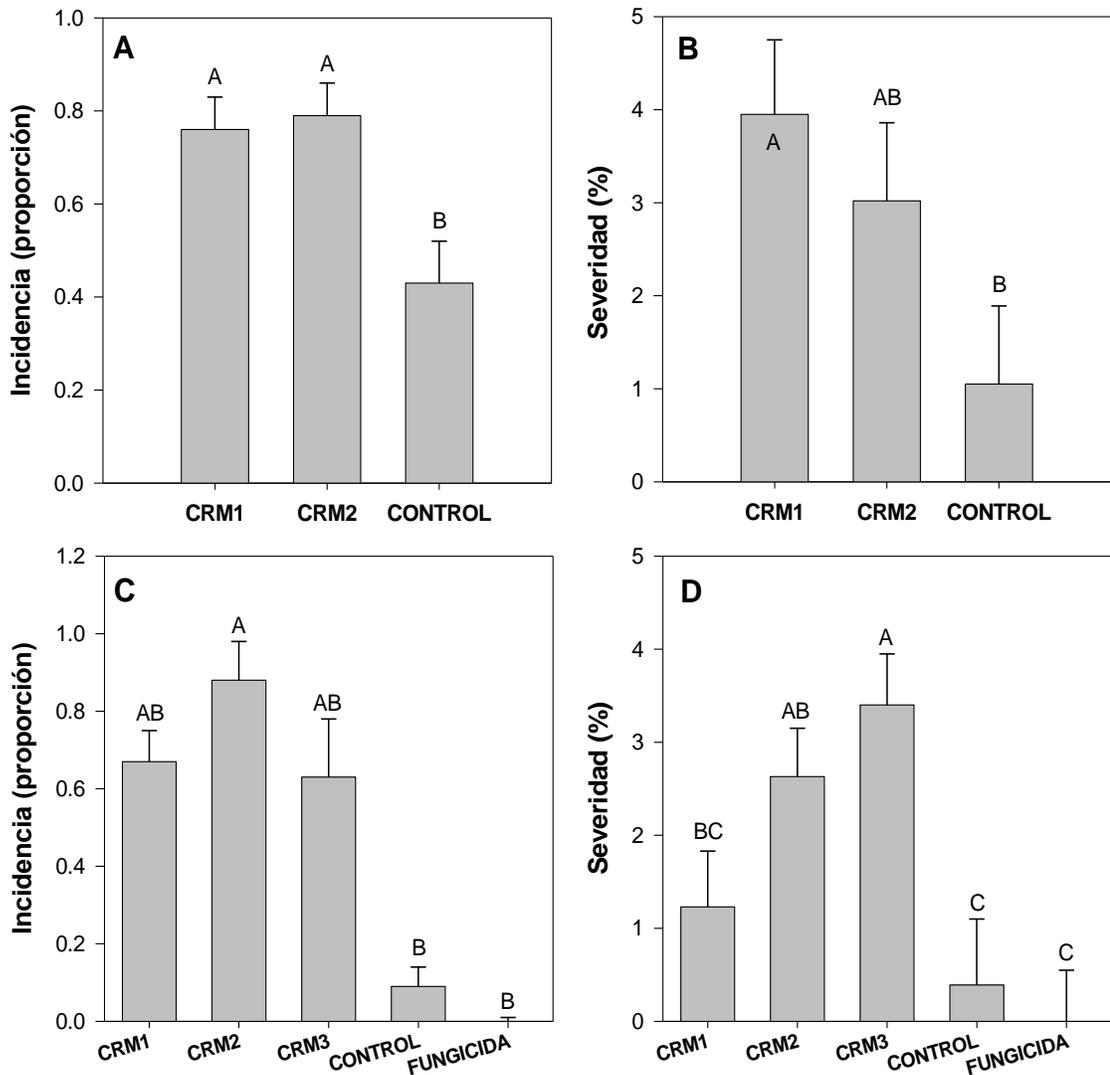
### 2.3.3. Pruebas de patogenicidad en campo

En la primera temporada de inoculaciones (2014), el análisis estadístico de la incidencia y severidad indicó que hubo diferencias significativas entre los aislados inoculados (CRM 1 y CRM 2) y el control (no inoculado). Los frutos inoculados con los aislamientos tuvieron significativamente mayor incidencia ( $F = 6.50$ ,  $P < 0.03$ ) y severidad ( $F = 5.64$ ,  $P < 0.004$ ) que los frutos no inoculados (Figs. 10A y B). En este primer año los síntomas se presentaron en los frutos más precoces a partir de los 21 días después de la primera inoculación, por efecto de tres inoculaciones semanales con los aislamientos CRM 1, CRM 2 y el control. Los síntomas continuaron presentándose en los frutos más tardíos que maduraron hasta 32 días después de la primera inoculación bajo el efecto de 4 inoculaciones semanales. Estos síntomas consistieron en pústulas o

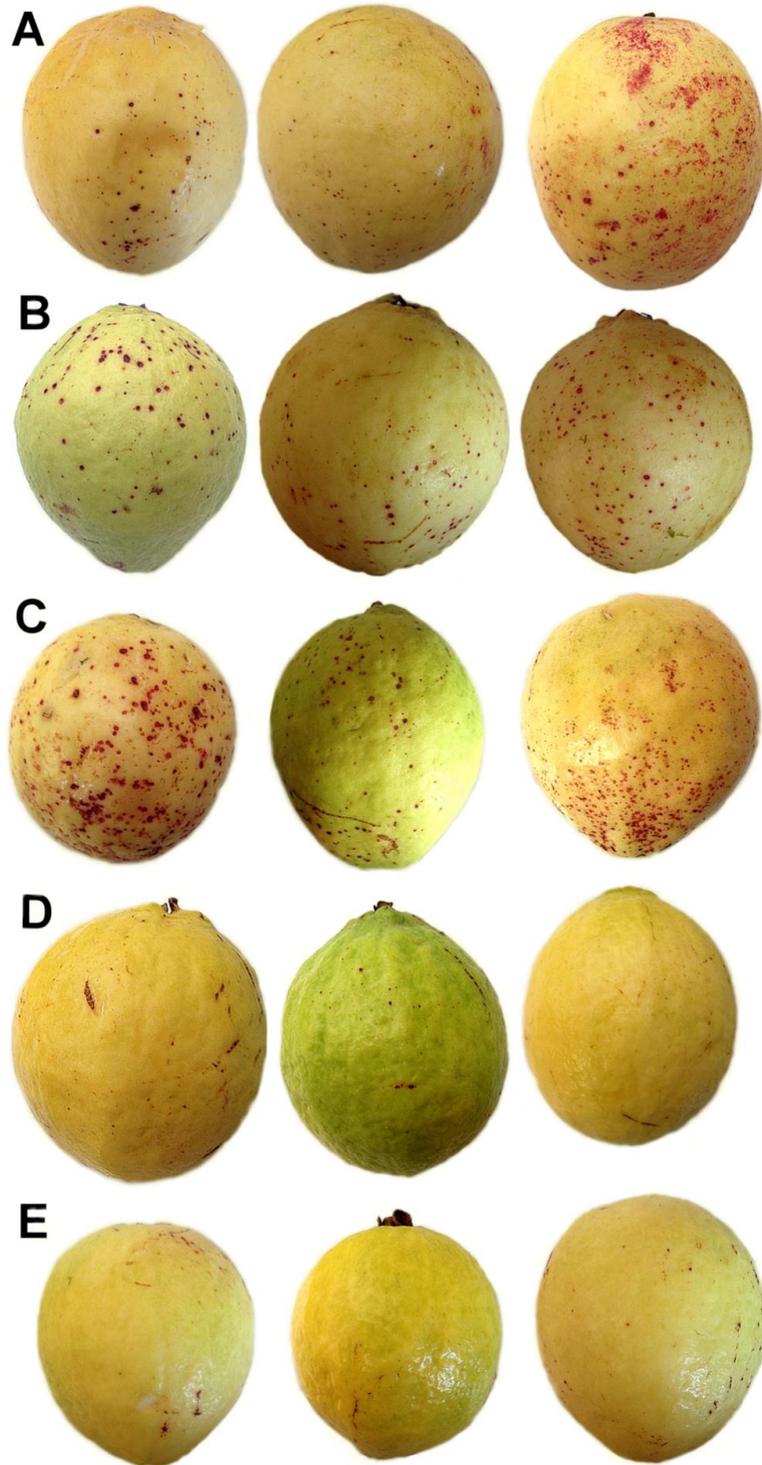
manchas de 1 a 3 mm, con el centro café o rojizo, rodeadas por un bordo púrpura o rosado, que frecuentemente se juntaron para formar una lesión irregular más grande.

De manera similar, en las inoculaciones de la temporada 2015, las tres especies inoculadas (CRM 1, CRM 2 y CRM 3) produjeron los síntomas característicos de la peca de la guayaba, con diferencias significativas en incidencia ( $F = 6.14$ ,  $P < 0.02$ ) y severidad ( $F = 10.52$ ,  $P < 0.001$ ) con el control no inoculado y el tratamiento con fungicida (Figs. 10B y C). En los frutos inoculados con los aislamientos, los síntomas se presentaron a los 27 días después de la primera inoculación, por efecto de tres inoculaciones semanales, mientras que en el control los primeros síntomas se presentaron hasta 85 días después de que iniciaron las inoculaciones en los frutos.

Estos síntomas consistieron en pústulas de 1 a 3 mm, con el centro café, rodeadas por un borde púrpura, que rara vez se juntaron para formar una lesión irregular más grande (Fig. 11). Presumiblemente los síntomas en los frutos no inoculados provienen de las infecciones naturales que se presentan principalmente durante los meses de octubre a diciembre, en ambas zonas de estudio (Volke *et al.*, 2012; Flores-González *et al.*, 2015).



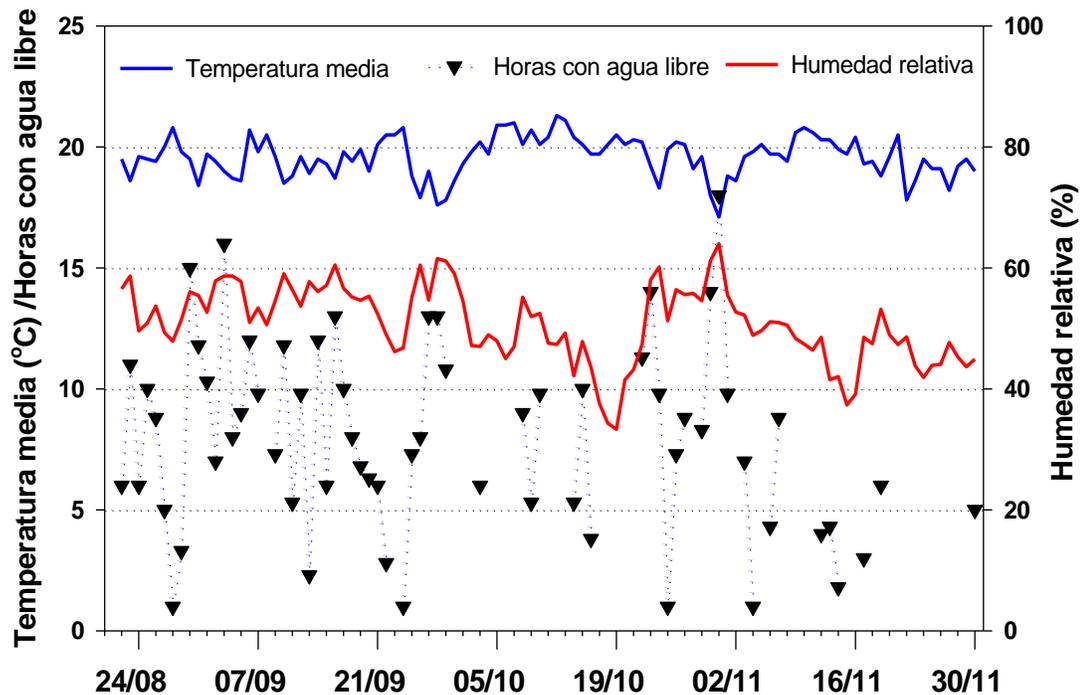
**Fig. 10.** Efecto de las inoculaciones con aislados de hongos obtenidos de síntomas de peca en la incidencia y severidad en frutos de guayaba inoculados en campo durante 2014 en Jungapeo, **A** y **B** y 2015 en Juárez, Michoacán, **C** y **D**.



**Fig. 11.** Síntomas de peca inducidos con las inoculaciones en campo en el huerto de Juárez durante 2015 con los aislamientos de hongos obtenidos de síntomas de peca; **A**, CRM 1. **B**, CRM 2. **C**, CRM 3. **D**, Control con agua destilada estéril. **E**, Control tratado con el fungicida pyraclostrobin.

El estudio de las pruebas de patogenicidad también permitió evidenciar que los primeros síntomas de la enfermedad se presentaron después de 21 a 27 días de la primera inoculación. En contraste, en el control no inoculado, los pocos frutos que mostraron síntomas (infecciones naturales), aparecieron 85 días después de iniciado el experimento de inoculación el segundo año (frutos de aproximadamente 2.5 a 2.8 cm de diámetro). Posterior a estas inoculaciones artificiales fue evidente una mayor incidencia y severidad y más temprana aparición de síntomas con las 3 especies inoculadas en comparación con el control no inoculado. El análisis estadístico, en los datos de incidencia y severidad en los dos años de estudios indicó que el efecto la intensidad (incidencia y severidad) en los frutos inoculados, es producto de la infección de los aislados inoculados y no por azar, o infección natural (control).

En relación a las condiciones ambientales que se presentaron durante la etapa de inoculaciones y aparición de síntomas en el huerto de Juárez durante 2015, la temperatura media diaria osciló entre 17 y 21°C y la humedad relativa diaria se mantuvo entre 33 y 64%. Estas condiciones fueron favorables para que se presentaran periodos de 1 hasta 18 h diarias con formación de agua libre en la superficie de los frutos, durante la mayoría de los días del periodo de inoculaciones (09/08/2015 al 25/10/2015) y aparición de síntomas (06/09/2015 al 22/11/2015) (Fig. 12).



**Fig. 12.** Temperatura media, horas con agua libre y humedad relativa diaria, presentada en el 2015 en el huerto de Juárez durante la etapa de inoculaciones y aparición de síntomas en campo.

#### 2.3.4. Pruebas de patogenicidad en invernadero

No se lograron reproducir los síntomas de peca de la guayaba en frutos mantenidos en macetas dentro de invernadero con la inoculación de los aislamientos CRM 1, CRM 2 y CRM 3, bajo las condiciones antes descritas.

Ante la escasa información relacionada con la epidemiología de la enfermedad, podría suponerse que en la reproducción de los síntomas por inoculación artificial en campo el medio ambiente desempeñó un papel sustancial, ya que la germinación de conidios de la mayoría de los hongos patógenos, sólo se produce por encima de un cierto nivel de humedad relativa (alto) o en presencia de humedad en la planta superficie (Albajes *et al.*, 1999). Park (1988), indica que en el caso de *Mycosphaerella* spp. aislada de eucalipto la presencia de agua libre sobre la superficie foliar durante 5 a 7 d y temperaturas de 15 a 20°C

son las más favorables para la infección. Mientras que Park *et al.* (2016), mantuvieron 48 h de humedad relativa al 100% y temperaturas de 26 a 32°C para lograr infectar con *Passalora ampelopsidis*, hojas de la planta de ornato *Parthenocissus quinquefolia* en condiciones de invernadero. En nuestro caso en los estudios conducidos en el invernadero el período de humedad relativa al 100% fue de 12 h, pero no se probó más allá de este tiempo por las dificultades de mantener los árboles en el interior de una cámara húmeda.

En condiciones de campo, la presencia de rocío y agua libre durante los períodos de inoculación son factores que favorecen la infección de la mayoría de hongos (Albajes *et al.*, 1999). Además, las condiciones prevalecientes posteriores a la remoción de las bolsas de polietileno, época que coincide con el período de lluvia en la zona de estudio. Al respecto, es necesario conocer con mayor profundidad las condiciones ambientales que favorecen esta enfermedad y conducir estudios específicos en condiciones controladas para encontrar los parámetros específicos que favorecen la infección de los frutos.

### **2.3.5. Identificación molecular de aislamientos inoculados y sus hongos reaislados**

Los resultados del BLAST de las secuencias ITS (~500 pb) y TEF (~500 pb) obtenidas en este estudio de los aislados inoculados y reaislados de frutos inoculados y comparadas con las depositadas en GenBank, indicaron que las 3 especies inoculadas fueron distintas entre ellas y que el hongo recuperado de los frutos inoculados correspondió al mismo que se inoculó. De acuerdo a estos estudios, se confirman los resultados obtenidos en los estudios de morfología indicando que los aislados inoculados pertenecen a la familia *Mycosphaerellaceae*, sin que se hayan encontrado secuencias en GenBank con el 100% de máxima identidad usando la región del ITS y secuencias parciales del gen TEF. Las secuencias parciales de la región del ITS tuvieron un 99 o 100% de identidad con *Mycosphaerella* o algunos de sus anamorfos y 100% de cobertura, mientras que con las secuencias parciales obtenidas con el gen TEF,

la identidad máxima fue del 85% y algunas secuencias no fueron significativamente similares a las depositadas en GenBank. Adicionalmente con los primers utilizados en este estudio se obtuvieron secuencias parciales de TEF con un mayor número de pares bases que las depositadas en GenBank de referencia (~370 pb), por lo que la cobertura máxima fue del 83% por el gen parcial TEF (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Resultados del BLAST de las especies inoculadas y aisladas de frutos inoculados con las secuencias parciales de ITS y TEF.

Aislamiento	Resultado del Blast con ITS	Resultado del Blast con TEF	Cobertura
CRM 1 <sup>a</sup>	375/375 (100%) de LT604873 <i>Mycosphaerella</i> sp.	294/347 (85%) de KF253259 <i>Passalora dissiliens</i>	71%
CRM 2 <sup>a</sup>	375/375 (100%) de LT604873 <i>Mycosphaerella</i> sp.	Similaridad no significativa	...
CRM 3 <sup>a</sup>	374/375 (99%) de EU514258 <i>Mycosphaerella mozambica</i>	334/403 (83%) de JX901630 <i>Mycosphaerella pini</i>	81%
CRM 4 <sup>b</sup>	375/375 (100%) de LT604873 <i>Mycosphaerella</i> sp.	294/347 (85%) de KF253259 <i>Passalora dissiliens</i>	66%
CRM 5 <sup>c</sup>	375/375 (100%) de LT604873 <i>Mycosphaerella</i> sp.	Similaridad no significativa	...
CRM 6 <sup>d</sup>	374/375 (99%) de EU514258 <i>Mycosphaerella mozambica</i>	333/402 (83%) de JX901630 <i>Mycosphaerella pini</i>	83%

<sup>a</sup> Especies inoculadas en frutos en campo e invernadero.

<sup>b</sup> Re-aislado de frutos inoculados con el aislado CRM 1.

<sup>c</sup> Re-aislado de frutos inoculados con el aislado CRM 2.

<sup>d</sup> Re-aislado de frutos inoculados con el aislado CRM 3.

### 2.3.6. Inferencia filogenética

Además de los estudios morfológicos de los aislados inoculados y reaislados de los frutos inoculados inoculaciones en campo, el análisis filogenético concatenado de las secuencias ITS y TEF indicó que las tres especies reaisladas correspondieron a las especies inoculadas, como se observa en la formación de los clados. De acuerdo a este análisis, CRM 1 se agrupó con CRM 4, CRM 2 con CRM 5, y CRM 3 con CRM 6, es decir, cada hongo

inoculado con su reaislado, lo que refuerza aún más los resultados obtenidos en el análisis estadístico de los datos de incidencia y severidad de los frutos inoculados en campo.

Los resultados anteriores, incluyendo la descripción morfológica previamente realizada, y las pruebas de patogenicidad de los 3 aislados indican que la peca de la guayaba es causada en Michoacán, México, por *Passalora psidiicola* (= *Mycovellosiella psidii*), y dos probables nuevas especies o especies no reportadas de *Passalora* de acuerdo al análisis filogenético (Fig. 13) ubicadas dentro de la familia *Mycosphaerellaceae*. Adicionalmente, como se observa en otro clado, las especies más cercanas a las de este estudio fueron *Mycosphaerella ellipsoidea* CBS 110843, *Mycosphaerella aurantia* CBS 110500 y *Mycosphaerella africana* CMW 3026 (PP = 1). En otro subgrupo independiente se encontraron especies cercanas a las reportadas en Sudáfrica por Jacobs *et al.* (2014), aisladas de síntomas similares a los de la peca de la guayaba, entre ellas a *Mycosphaerella heimii* CBS 110110682 y *Pallidocercospora acacigena*, CBS 120740 formando clados independientes con *Pallidocercospora konae* CBS 111028 (PP = 1), distantes a las de las especies obtenidas en este estudio.



esta especie. Lo anterior, debido a que el género *Passalora*, se encuentra actualmente en revisión y próximamente será publicado el documento que consigna las especies y la descripción correspondiente (Dr. Braun, comunicación personal).

*Passalora* es el nombre más antiguo de las formas asexuales de un complejo de cercosporoides asociados con el género *Mycosphaerella* caracterizado por tener conidióforos y conidios pigmentados con células conidiales engrosadas y oscuras Hyde *et al.*, 2013). Crous y Braun (2003) reevaluaron a este complejo y llegaron a la conclusión que el género *Mycovellosiella* y otros cercosporoides más, debían fusionarse bajo el nombre más antiguo de *Passalora*. Hernández-Gutiérrez y Dianese (2009) dividieron en secciones al género *Passalora s. lat.*, con base a diferencias morfológicas y propusieron que los hongos clasificados dentro de la sección *Mycovellosiella* deberían desarrollar micelio superficial, liso; conidióforos solitarios, derivados de hifas superficiales o solitarios, así como fasciculadas; conidios solitarios o en cadena, variables en forma, sin septos o pluriseptados, subhialinos o pigmentados. Esta nueva clasificación incluye a la especie *Mycovellosiella psidii*, reportada por Crous (1999), asociada a frutos con peca de la guayaba en México, la cual es actualmente sinónimo de *Passalora psidiicola* (Crous y Braun, 2003). La filogenia del género *Passalora* es compleja y no se ha resuelto por completo, este género ha tenido una serie de cambios taxonómicos (Braun *et al.*, 2013). Y, se ha visto que algunas especies de *Mycovellosiella* no tienen relación filogenética con especies dentro *Passalora*, pero hacer una revalorización o división adicional de *Passalora* no es posible con los datos disponibles actualmente, por lo tanto, al menos por el momento debe aceptarse que es un género que puede ser para — o incluso polifilético (Crous *et al.*, 2009; Hyde *et al.*, 2013; Braun *et al.*, 2013).

Ante la falta de secuencias que nos permitieran comparar las obtenidas en este estudio con *Passalora psidiicola*, la descripción morfológica de los 3 aislados que se usaron para completar las pruebas de patogenicidad reafirma que el aislado CRM 1, es similar a *P. psidiicola* en cuanto al número de septos (0-3) y

conidios de (8-)12 a 20(-30) x 2 a 3  $\mu\text{m}$  (Crous, 1999). Mientras que las características de los aislamientos CRM 2 y CRM 3 no estuvieron dentro de este rango, pero si dentro del género *Passalora*.

Estos resultados contribuirán al diseño planeado de estrategias de manejo de esta enfermedad en México y en otras regiones del mundo, en los cuales esta enfermedad es de importancia, y a la mejora de las exportaciones de la guayaba en este país. A partir de estos resultados, se podrán iniciar estudios tendientes a generar conocimiento de la epidemiología de enfermedad, y diseño de estrategias de manejo más efectivas, así como estudios básicos con diferentes propósitos para el beneficio de los productores de guayaba de México y otros países productores donde esta enfermedad es un problema.

## 2.4. CONCLUSIONES

Las especies de hongos obtenidos de frutos con peca pertenecen a la familia *Mycosphaerellaceae*. Algunos de ellos pudieran representar nuevas especies.

En este estudio se descubrió la etiología y se evidencia por primera vez que la peca de la guayaba es causada por *Passalora psidiicola* (Sinónimo de *Mycovellosiella psidii*) y dos probables nuevas especies de *Passalora*, enfermedad que por décadas se asoció a deficiencias nutrimentales en México.

*Passalora psidiicola*, únicamente desarrolló conidios después de 5 días, cuando se esparcieron 20  $\mu$ L, de fragmentos de micelio en medio SNA, obtenidos por raspado de colonias de 15 días de crecimiento en medio V8 o MEA, bajo un régimen de obscuridad continua a 25°C. Mientras que las dos probables nuevas especies solo produjeron conidios cuando se cultivaron en SNA bajo luz ultravioleta continua a 25°C después de 15 días.

## 2.5. LITERATURA CITADA

- Albajes, R., Lodovica, G. M., Van Lenteren, J. C., and Elad, Y. 1999. Integrated pest and disease management in greenhouse crops. *Developments in Plant Pathology Series*. Kluwer Academic Publishers. pp.1-507.
- Alves, A., Crous, P. W., Correia, A. and Phillips, A. J. L. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity*. 28:1-13.
- Amaral, C. S., Salvaia, A., Angeli, S. S., Martins, M. C., Lourenço, A. S., and Amorim, L. 2006. Incidencia de patogenos pos-colheita em goiabas Kumagai. *Summa Phytopathological*. 32:57-58.
- Braun, U., Nakashima, C., and Crous, P. W. 2013. Cercosporoid fungi (*Mycosphaerellaceae*) 1. Species on other fungi, *Pteridophyta* and *Gymnospermae*. *IMA Fungus*. 4:265-345.
- Cardoso del R. I., Ruiz P. L del M., Rodríguez, M. M. de las N., Soto, G. A. B, y Rosas, S. G. 2008. Microscopía electrónica de barrido como herramienta en el estudio de la peca de la guayaba (*Psidium guajava* L.) IX Congreso Nacional de Microscopia, Guanajuato, Gto., Méx.
- Cardoso Del R. I. 2010. Deficiencias nutrimentales en guayabo y su relación con la incidencia de peca en fruto. Tesis Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Méx. 56 p.
- Crous, W. P. 1999. Species of *Mycosphaerella* and related anamorphs occurring on Myrtaceae (excluding *Eucalyptus*). *Mycologia Research*. 103:607-621.
- Crous, P. W., and Braun, U. 2003. *Mycosphaerella* and its anamorphs. 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora*. *CBS Biodiversity Series*. 1:1-571.
- Crous, P. W., Braun, U., Hunter, G. C., Wingfield, M. J., Verkley, G. J., Shin, H. D., Nakashima, C., and Groenewald, J. Z. 2013. Phylogenetic lineages in *Pseudocercospora*. *Studies in Mycology*. 75:37-114.
- Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Mansilla, J. P., Hunter, G. C., and Wingfield, M. J. 2004. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus*. *Studies in Mycology*. 50:195-214.
- Crous, P. W., Wingfield, M. J., and Groenewald, J. Z. 2009. Niche sharing reflects a poorly understood biodiversity phenomenon. *Persoonia*. 22:83-94.

- Domínguez, A. J. L. 1993. Búsqueda de firmeza y disminución de peca en frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) en Jalpa, Zacatecas. Tesis Licenciatura, Universidad Autónoma Chapingo. 64 p.
- Domínguez, A. J. L. y Nieto, A. D. 1996. Firmeza y disminución de peca en frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) en Jalpa, Zacatecas. Revista Chapingo Serie Horticultura. 2:223-226.
- Doyle, J. J., and Doyle, J. L. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. Focus. 12:13-15.
- Flores-González, G. E. 2012. Estrategias de manejo de la peca de la guayaba en el Oriente de Michoacán. Tesis licenciatura. Instituto Tecnológico del Valle de Morelia. Morelia, México.
- Flores-González, G. E., Rebollar-Alviter, A., Castro, S. R., y Castillo, P. M. R. 2015. Distribución geográfica y estimación de pérdidas por la peca de la guayaba en el Oriente de Michoacán. Suplemento de la Revista Mexicana de Fitopatología. 33:118.
- Flores-González, E., Rebollar-Alviter, A., Volke H. V. H., Silva-Rojas, H. V., Peña, O. C. S., y Espinoza, Q. G. 2013. Estrategias de manejo de la peca de la guayaba en el oriente de Michoacán. Suplemento Revista Mexicana de Fitopatología. 31:84.
- Flores, Y., Rondón, A., Arnal, E., Mujica, Y., García, M., y Romero, A. 2009. La mancha roja de la guayaba: síntomas y diseminación en el estado Cojedes, Venezuela. Bioagro. 21:75-77.
- González, M. S, and Rondón, A. 2005. First report of *Guignardia psidii*, an ascigerous state of *Phyllosticta psidiicola*, causing fruit rot on guava in Venezuela. Plant Disease. 89:773.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series. 41:95-98.
- Hernández-Gutiérrez, A., and Dianese, J. C. 2009. New cercosporoid fungi from the Brazilian Cerrado 2. Species on hosts of the subfamilies *Caesalpinioideae*, *Faboideae* and *Mimosoideae* (*Leguminosae* s. lat.). Mycotaxon 107:1-24.
- Hunter, G. C., Wingfield, B. D., Crous, P. W., and Wingfield, M. J. 2006. A multi-gene phylogeny for species of *Mycosphaerella* occurring on *Eucalyptus* leaves. Studies in Mycology. 55:147-161.

- Hyde, K. D, Jones, E. B. G., Liu, J. K., Ariyawansa, H., Boehm, E., Boonmee, S., Braun, U., Chomnunti, P., Crous, P. W., Dai, D. Q., Diederich, P., Dissanayake, A., Doilom, M., Doveri, F., Hongsanan, S., Jayawardena, R., Lawrey, J. D., Li, Y. M., Liu, Y. X., Lücking, R. , Monkai, J. , Muggia, L., Nelsen, M. P., Pang, K. L., Phookamsak, R., Senanayake, I., Shearer, C. A., Suetrong, S., Tanaka, K., Thambugala, K. M., Wijayawardene, N. N., Wikee, S., Wu, H. X., Zhang, Y., Aguirre, H. B, Alias, S. A., Aptroot, A., Bahkali, A. H., Bezerra, J. L., Bhat, D. J., Camporesi, E., Chukeatirote, E., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hirayama, K., Hoog, S. D., Kang, J. C., Knudsen, K., Li, W. J., Li, X. H., Liu, Z. Y., Mapook, A., McKenzie, E. H. C., Miller, A. N., Mortimer, P. E., Phillips, A. J. L., Raja, H. A., Scheuer, C., Schumm, F., Taylor, J. E., Tian, Q., Tibpromma, S., Wanasinghe, D. N., Wang, Y., Xu, J. C., Yacharoen, S., Yan, J. Y., and Zhang, M. 2013. Families of Dothideomycetes. *Fungal Diversity*. 63:1-313.
- Jacobs, A., Truter, M., and Schoeman, M. H. 2014. Characterisation of *Mycosphaerella* species associated with pink spot on guava in South Africa. *South African Journal of Science*. 110:26-31.
- Lin, C. C., Lai, C. S. and Tsai, S. F. 2003. Ecological survey of guava new fruit rot—*Phyllosticta* rot (black spot) and other fruit rots. *Plant Protection Bulletin*. 45:263-270.
- Maddison, W. P., and Maddison, D. R. 2016. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.10 <http://mequiteproject.org>.
- Morera, M. R. y Blanco, M. H. 2009. Microorganismos asociados a frutos embolsados de guayaba taiwanesa variedad Tai Kuo. *Agronomía Mesoamericana*. 201:339-349.
- Nakasone, H. Y., and Paull, R. E. 1998. *Tropical fruits*. CAB International, Wallingford, Eng.
- Nieto A. D. 1996. Fisiología, bioquímica y patógenos en frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.). Tesis de Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados, México. 111p.
- Park, R. F. 1988. Effect of certain host, inoculum, and environmental factors on infection of *Eucalyptus* species by two *Mycosphaerella* species. *Transactions of the British Mycological Society*. 90:221-228.
- Park, J. H., Park, M. J., Han, K. S., Cho, S. E., and Shin, H. D. 2016. Occurrence of passalora leaf spot caused by *Passalora ampelopsidis* on virginia creeper in Korea. *Journal of Phytopathology*. 164:198-201.
- Posada, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology Evolution*. 25:1253-1256.

- Quaedvlieg, W., Binder, M., Groenewald, J. Z., Summerell, B. A., Carnegie, A. J., Burgess, T. I., and Crous, P. W. 2014. Introducing the consolidated species concept to resolve species in the *Teratosphaeriaceae*. *Persoonia*. 33:1-40.
- Rambaut, A. 2016. FigTree, a graphical viewer of phylogenetic trees. Version 1.4.2 <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>.
- Rebollar-Alviter, A., Flores-González, E., Volke, H. V. H., and Silva-Rojas, H. V. 2014. Management strategies, associated fungi and intensity of guava speck in Michoacan, Mexico. 50th Annual Meeting Caribbean Food Crops Society and APS Caribbean Division. Virgin Islands USA. 80 p.
- Robert, C. E. 2004 MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32:1792-1797.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., and Huelsenbeck, J. P. 2012. MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*. 61:539-542.
- Sangerman, J. D. M., Larqué, S. B. S., Navarro, B. A., Schwentesius, de R. R., Nieto, M. C., y Cuevas, S. J. A. 2011. Estudio de mercado de aguacate, guayaba y durazno en el Distrito Federal, México. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas*. 2:925-938.
- SIAP. 2016. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Revisado el 19/01/2016. <http://www.siap.gob.mx/>.
- Tamura, K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30:2725-2729.
- Ullasa, B. A., and Rawal, R. D. 1984. *Guignardia* fruit rot of guava. A new disease from Bangalore. *Current Science*. 5:435-436.
- Verkley, G. J., Quaedvlieg, W., Shin, H. D., and Crous, P. W. 2013. A new approach to species delimitation in *Septoria*. *Studies in Mycology*. 75:213-305.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. in: *PCR Protocols*. Academic Press, San Diego, CA. pp 315-322.

# CAPÍTULO III. ANÁLISIS ESPACIO-TEMPORAL DE LA PECA (*Passalora psidiicola*) EN PARCELAS COMERCIALES DE GUAYABA EN EL ORIENTE DE MICHOACÁN

## RESUMEN

La peca de la guayaba es una enfermedad que por mucho tiempo se desconoció su etiología. Debido a que recientemente se reportó un complejo de especies de *Passalora* como agentes causales, no se han realizado análisis que describan el progreso de esta enfermedad. Por tal motivo se realizó la presente investigación con los objetivos de analizar el progreso espacio-temporal de la peca de la guayaba en huertos del municipio de Juárez, Michoacán durante las temporadas 2015-2016 y 2016-2017. Se evaluó la incidencia y severidad en 25 árboles cada 7 a 20 días, tomando una muestra de 25 a 40 frutos en cada evaluación. Para determinar el mejor modelo los datos obtenidos se ajustaron a los modelos Logístico, Monomolecular y Gompertz en su forma linealizada. Se determinó el patrón de agregación a nivel muestral (árbol) mediante índices de agregación ( $I_a$ ), y el análisis espacial en base a índices de distancia mediante la herramienta SADIE. Los datos de clima se registraron en Data Logger instalado en cada uno de los huertos. La enfermedad se ajustó a principalmente al modelo Monomolecular ( $R^2 = 0.94$  y  $0.92$ ). Este modelo se ha utilizado para describir enfermedades monocíclicas. A nivel de árbol la enfermedad se presentó en agregados y a nivel parcela se comportó al azar en las primeras evaluaciones y posteriormente se formaron agregados. Lo que sugiere que no existe transmisión de árbol a árbol. Previo a la aparición de síntomas se registraron periodos continuos y frecuentes de horas con humedad relativa mayor a 80%, estos periodos disminuyeron considerablemente cuando aparecieron los síntomas. La presencia de síntomas de peca se asoció con temperaturas medias diarias menores a 20°C.

**Palabras clave:** *Passalora*, epidemiología, SADIE.

### 3.1. INTRODUCCIÓN

En México la guayaba (*Psidium guajava* L.) es de gran importancia debido a que el país se ubica dentro de los principales productores a nivel mundial con una superficie cultivada de 20,899.00 ha y una producción de 302,718.45 t anuales, de las cuales el 45.2% es aportado por el estado de Michoacán de acuerdo con datos del 2014 reportados por el SIAP (2016). Además de su consumo en fresco, este fruto tiene diversos usos industriales como para la elaboración de pectinas, aceites con sus semillas, pulpas, puré, polvo para reconstituir como néctar, mermeladas, jaleas, dulces y también existe demanda en la industria de alimentos para bebés (Yam *et al.*, 2010).

La peca de la guayaba es una de las características que más influyen en los gustos o preferencias del consumidor (Sangerman *et al.*, 2011), ya que esta enfermedad puede reducir considerablemente el precio de venta cuando los síntomas coalescen llegando a cubrir una porción mayor al 10% del fruto, dando origen a una lesión irregular con el centro de aspecto corchoso (Flores-González, 2012). Aunque estos daños no afectan directamente el interior de los frutos, las lesiones tienen un efecto directo en la calidad de la cosecha, ya que cuando la intensidad es mayor da lugar a menores precios del producto o la pérdida total de la producción (Volke *et al.*, 2012). Los daños y pérdidas por la peca son considerables. Mendoza *et al.* (2005) señala que para el 77% de los productores de guayaba en el oriente de Michoacán la peca es el principal problema que interfiere con la comercialización de la producción, y por lo tanto en el precio. Flores-González *et al.* (2015) reportaron que las pérdidas en la Región Oriente de Michoacán pueden ascender hasta 7,350 toneladas, equivalentes a 29.3 millones de pesos al año.

La peca de la guayaba es causada por *Passalora psidiicola* y otras especies del género *Passalora* (*Sin. Mycovellosiella*), pertenecientes a la familia *Mycosphaerellaceae* (Capítulo II). Diversas especies de hongos de esta familia se han reportado asociadas a diversas enfermedades en *Mirtáceas* (Crous,

1998, 1999; Burgess *et al.*, 2007; Crous *et. al.*, 2007a, b, c, 2008a, b, 2009; Flores *et al.*, por publicar), y el desarrollo epidemiológico de algunas de estas especies en *Eucalyptus* spp., ha sido bien estudiado (Park 1988 a, b; Park y Keane, 1982 a, b). En el género *Psidium*, no se han realizado estudios en el componente del progreso espacio-temporal de estas enfermedades con la finalidad de conocer los aspectos epidemiológicos de la enfermedad. Actualmente, el manejo se basa en aplicaciones de fungicidas e inductores de resistencia como pyraclostrobin, azoxistrobin, captan, mancozeb, clorotalonil, fosfito de potasio, glutatión-oligosacarinas, *Bacillus subtilis* cada 10 a 15 d a partir de 3 meses antes de que los frutos alcancen la madurez comercial en huertos que se programan para cosecha durante noviembre y diciembre, sin que se cuenten con conocimientos previos de la epidemiología de esta enfermedad, lo cual tiene un impacto negativo sobre el medio ambiente y la economía del productor (Flores-González *et al.*, 2013; Rebollar-Alviter *et al.*, 2014). El estudio de la dinámica espacio-temporal de las enfermedades, es importante para describir, comprender, comparar y predecir epidemias y también puede conducir directamente al desarrollo, evaluación de estrategias y tácticas de control eficientes (Madden, 2006). La asociación de la peca de la guayaba con hongos como agentes causales es reciente, por lo que no se conocen los aspectos epidemiológicos que contribuyan a un diseño de estrategias de manejo más sustentado. El objetivo de este estudio fue determinar el progreso temporal y espacial de la peca de la guayaba en huertos comerciales de la región Oriente de Michoacán en las temporadas 2015-2016 y 2016-2017.

## **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1. Localización de los experimentos**

El estudio se realizó durante la temporada de producción de 2015-2016, (temporada 1) (agosto-enero), en una plantación comercial de guayaba (cv. Media China) de 22 años, localizada en la localidad de Zicata de Morelos, Municipio de Juárez, Michoacán, México ( $19^{\circ}19'42.45''\text{N}$  y  $100^{\circ}23'48.50''\text{O}$ ) a una altitud de 1560 msnm. La fecha de poda fue el 16 de abril del 2015 y la última aplicación de fungicidas se realizó 141 d antes del inicio de la epidemia. Una segunda parcela se estableció en la temporada 2016-2017 (temporada 2) (octubre-diciembre), en un huerto del mismo cultivar de 18 años, localizada en la localidad de Santa Ana de Guerrero, del mismo municipio, en las coordenadas  $19^{\circ}17'16.92''\text{N}$  y  $100^{\circ}26'25.41''\text{O}$  y una altitud de 1300 msnm. La fecha de poda fue el 26 de abril del 2016 y la última aplicación de fungicidas fue realizada 28 d antes del inicio de la epidemia.

Al inicio del experimento de la temporada 1, el huerto se encontraba en etapa final de floración, y, en la temporada 2, los frutos se encontraban en etapa de desarrollo (2.5 a 5.0 cm de diámetro ecuatorial). En ambos huertos se seleccionaron 25 árboles en un arreglo de 5 surcos por 5 árboles (6 x 6m) (la unidad de muestreo fue un árbol). Los surcos (filas) estuvieron orientados de noroeste a suroeste en la temporada 1 y norte a sur en la temporada 2. En estos huertos no se realizó ninguna aplicación de fungicidas desde el momento del establecimiento de los experimentos, hasta la última toma de datos.

El manejo agronómico en ambos huertos dado por parte del productor en cada huerto fue bueno, incluyendo 2 aplicaciones de Sulfato de amonio, Superfosfato de calcio triple, Urea, Sulfato de calcio, Cloruro de potasio y Fosfato diamónico como fuentes, control de plagas con productos químicos y control mecánico de malezas.

### **3.2.2. Evaluación de la enfermedad**

Se realizaron evaluaciones cada 7 a 20 días de la incidencia (proporción de frutos con síntomas en relación al total muestreado por árbol) y severidad (porcentaje de tejido enfermo en relación al total), con base en una escala arbitraria de 7 categorías donde: 0 fruto sin síntomas de peca, 1 = 0 al 5% ,2 = 5 a 10%, 3 = 10 al 25%, 4 = 25 a 50%, 5 = 50 a 75% y 6 = 75 a 100% de área del fruto cubierta por peca (Flores-González, 2012). El punto medio de cada categoría fue considerado en todos los análisis. En virtud de que la peca se evidencia principalmente en frutos maduros, las evaluaciones se realizaron solo en frutos en estado de madurez comercial del estrato medio y superior del árbol tomando una muestra al azar de 25 a 30 frutos en la temporada 1 y de 25 a 40 frutos en la temporada 2 por árbol entre los cuatro puntos cardinales en cada evaluación, dependiendo del número de frutos maduros en cada evaluación. Los frutos se removieron del árbol después de cada evaluación y se realizaron 6 evaluaciones en la temporada 1 y 5 en la temporada 2.

### **3.2.3. Caracterización de la dinámica temporal**

Para cada tiempo de evaluación, los datos de la incidencia ( $p$ ) y severidad media por árbol, se usaron para ajustar los modelos Logístico, Monomolecular, y Gompertz en su forma linearizada (Campbell y Madden, 1990). La selección del modelo de mejor ajuste se basó en el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), el cuadrado medio del error (CME) y la distribución al azar de los residuales (Campbell y Madden, 1990). Con base en el modelo de mejor ajuste, se estimó el error estándar de los parámetros de la enfermedad inicial ( $y_0$ ) y la tasa de incremento de la enfermedad ( $r$ ), y se registró la intensidad final, tiempo a la aparición de los síntomas ( $X_0$ ) y el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE).

### 3.2.4. Análisis espacial por índices de agregación

Con la finalidad de determinar el patrón espacial y generar hipótesis acerca de los procesos biológicos asociados al origen de la enfermedad, se determinó el índice de dispersión a escala pequeña (árbol), con base en el muestreo de 25 o 40 frutos por árbol basado en la incidencia. El índice de dispersión  $D$  proviene del cociente de la varianza observada (proporción) y la varianza estimada bajo el supuesto de que los datos tienen una distribución binomial, con la siguiente ecuación (Madden *et al.*, 2007):

$$D = \frac{S_y^2}{\bar{y}(1 - \bar{y})/n}$$

Dónde:  $D$  es el índice de dispersión;  $S_y^2$ , es la varianza observada de los datos en proporción;  $\bar{y}(1 - \bar{y})/n$ , es la varianza estimada bajo el supuesto de que los datos tiene una distribución normal. Cuando  $D = 1$ , los datos de los individuos enfermos (guayabas) en la unidad de muestreo tienen un patrón al azar;  $D > 1$ , describe un patrón agregado y cuando  $D < 1$ , un patrón regular (Madden *et al.*, 2007). Debido a que en la temporada 2016-2017, el tamaño de muestra de frutos por cada árbol fue diferente variando entre 25 y 40, la varianza observada se calculó con base en la siguiente ecuación:

$$S_y^2 = \sum \frac{n^2(y_i - \bar{y})}{\bar{n}(N - 1)}$$

Donde:  $S^2$ , es la varianza observada de la proporción de frutos enfermos;  $(y_i = Y/n_i)$ ;  $n_i$ , es el número de frutos muestreados por árbol,  $\bar{n} = \frac{\sum_i n_i}{N}$  el número medio de frutos muestreados por árbol.

La varianza estimada para la distribución binomial de los valores  $y_i$ , proporción de frutos enfermos por árbol:

$$S_{bin}^2 = \frac{y(1 - \bar{y})}{\bar{n}}$$

El índice de dispersión se obtuvo como  $D = \frac{s_y^2}{\frac{y(1-y)}{\bar{n}}}$

Adicionalmente, con el fin de confirmar el estatus de la enfermedad a nivel de unidad muestral (Quadrat), los datos se ajustaron a la distribución Binomial y  $\beta$ -Binomial (BBD) por cada fecha de muestreo. Esta última distribución es factible de describir la distribución de frecuencias cuando las unidades de muestreo tienden a tener el mismo estatus de enfermedad (Madden *et al.*, 2007). La BBD tiene dos parámetros,  $p$  (probabilidad de un fruto de estar enfermo) y  $\theta$  (parámetro de heterogeneidad). A medida que  $\theta$  es mayor, la heterogeneidad de los datos se incrementa y la distribución de frecuencias se ajusta más a una BBD y su patrón es agregado. Cuando este parámetro se acerca a cero, la distribución de frecuencia de los datos es mejor descrita por la distribución binomial indicando un patrón al azar (Madden *et al.*, 2007). La comparación de los dos modelos se realizó mediante el cociente de probabilidad o razón de verosimilitud (*Likelihood ratio test*) usando para ello, el Proc nlmixed de SAS ver 9.4 y el código en SAS desarrollado por el Dr. Larry Madden (The Ohio State University).

### **3.2.5. Análisis espacial por índices de distancia (SADIE)**

Para tomar en cuenta la localización espacial de las observaciones de incidencia en cada tiempo de evaluación, los datos (conteos de frutos con peca) por cada unidad de muestreo (árbol de guayaba) los datos se analizaron usando la metodología de SADIE (Perry, 1998). SADIE cuantifica el patrón espacial de una muestra de una población midiendo el esfuerzo (la distancia) que un individuo debe hacer para moverse a un arreglo extremo en el cual los individuos están espaciados de manera uniforme o regular en la unidad muestral (Xu y Madden, 2004), donde las unidades de muestreo tienen el mismo valor. Este esfuerzo en la práctica equivale a la distancia mínima,  $D$ , requerida para alcanzar la regularidad, es decir que los distintos valores en la unidad de muestreo alcancen el mismo valor en todas las posiciones del espacio, de tal manera que cuanto mayor es este valor, mayor es la tendencia a

la agregación (Quero, 2006). Estas distancias se suman para obtener un valor general de la distancia a la regularidad (Distancia observada), la cual posteriormente se compara con la distribución de las distancias obtenida de permutaciones (aleatorización de distancias a la regularidad por múltiples permutaciones). Los promedios de estas distancias resultan en una media esperada proveniente de la distribución de frecuencias (Carisse *et al.*, 2008). La proporción de valores de las distancias calculadas mayores que las observadas se usa como el valor de la probabilidad de la prueba de agregación (Quero, 2006; Carisse *et al.*, 2008). La razón de las distancias a la regularidad observadas entre las esperadas ( $D/E_e$ ) donde  $E_e$  es la media aritmética de las distancias a la regularidad obtenida de las muestras aleatorizadas es el índice de agregación ( $I_a$ ), de tal manera que cuando  $I_a < 1$  el patrón de agregación se considera regular;  $I_a = 1$  al azar y  $I_a > 1$  agregado (Xu y Madden, 2004). Para conocer si este valor es significativamente diferente de 1, se realiza una prueba de  $\chi^2$  ( $P < 0.05$ ) (Quero, 2006; Carisse *et al.*, 2008). Adicionalmente, SADIE calcula índices locales de agregación ( $v$ ) que cuantifican el grado en que cada valor de la variable en su posición contribuye al patrón general de los datos como un índice de agregación adimensional ( $v_i$  y  $v_j$ ). Valores de  $v > 1.5$  indican la presencia de una mancha o agregado (zona con valores altos de la variable),  $v$  menores que -1.5 indican la presencia de un claro (zona con valores bajos de la variable), y valores de 1, indican una distribución aleatoria de esa unidad de muestreo (Perry, 1998). En este caso, los valores de  $v_i$  y  $v_j$  se usaron para construir mapas interpolativos con base en *Kriging* ordinario basado en el modelo lineal usando para ello el software Surfer (Ver 10).

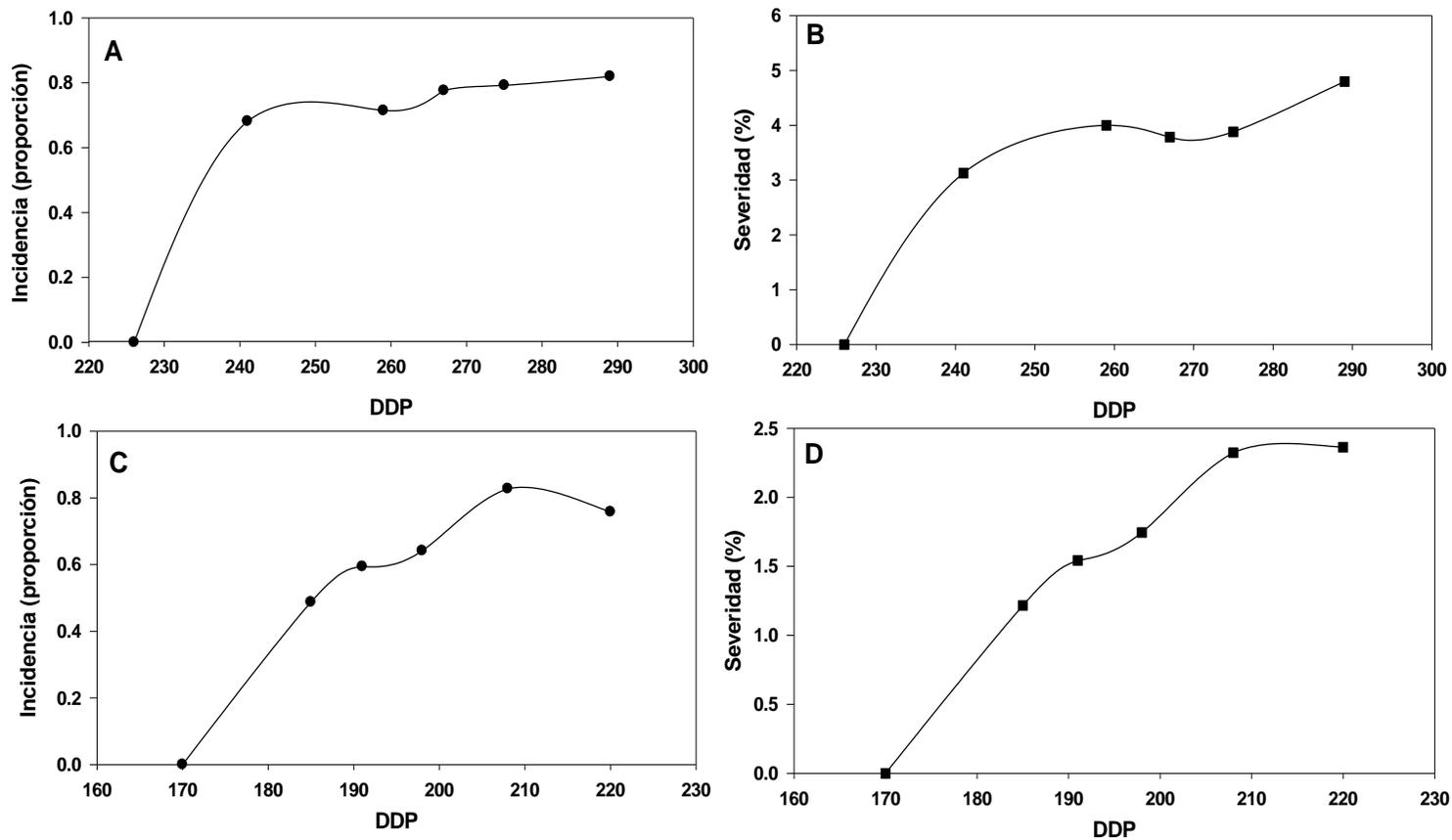
### **3.2.6. Variables ambientales**

La temperatura media (°C), humedad relativa (%), y periodos continuos con humedad arriba del 80% diaria (horas), se registró desde el establecimiento del experimento con un Data Logger (Watch Dog Modelo 450 Spectrum Technologies, Inc.) instalado cada uno de los huertos.

### 3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.3.1. Análisis temporal de la peca de la guayaba

Las Figs. 1A, B, C y D, muestran el progreso temporal de la epidemia de peca de la guayaba en dos temporadas de cultivo. En la temporada 1, la incidencia y severidad inicial ( $y_0$ ) fue de 0.68 ( $p$ ) y 3.1%, y se presentó a partir de los 241 DDP ( $X_0$ ) (13/12/2015). La incidencia y severidad máxima y final fue de 0.82 ( $p$ ) y 4.8% respectivamente, y se presentó hasta 289 DDP (30/01/2016), la epidemia tuvo una duración de 48 d, y fue descrita por el modelo Monomolecular, para la variable incidencia ( $R^2 = 0.94$ ) y para la severidad por el modelo Gompertz ( $R^2 = 0.99$ ). Mientras que en la temporada 2 la incidencia y severidad inicial ( $y_0$ ) fue de 0.48 ( $p$ ) y 1.2% respectivamente, y se presentó a los 185 DDP (28/10/2016), mientras que la incidencia máxima fue de 0.83 ( $p$ ) a los 208 DDP (20/11/2016), y la final fue de 0.76 ( $p$ ) y la severidad máxima y final fue de 2.3% a los 220 DDP (02/12/2016). Esta epidemia tuvo una duración de 35 d y fue mejor descrita por el modelo Logístico en incidencia ( $R^2 = 0.72$ ) y Monomolecular para severidad ( $R^2 = 0.92$ ) (Cuadro 1). El ABCPE en la temporada 1 fue mayor, con 41.19 en incidencia y 210.21 en severidad, respecto a la temporada 2 con 28.07 para incidencia y 68.24 en severidad.



**Fig. 1.** Progreso temporal de la incidencia y severidad en días después de la poda (DDP) en el huerto de Zicata durante la temporada 1 (2015-2016) **A** y **B**, y en el huerto de Santa Ana en la temporada 2 (2016-2017) **C** y **D** del municipio de Juárez, Michoacán. Fecha de poda en la temporada 1: 16/04/2015, y Fecha de poda en la temporada 2: 26/04/2016.

**Cuadro 1.** Parámetros de ajuste de los modelos Monomolecular, Logístico y Gompertz, a epidemias de la peca de la guayaba en el Municipio de Juárez, Michoacán para incidencia y severidad en los dos huertos experimentales.

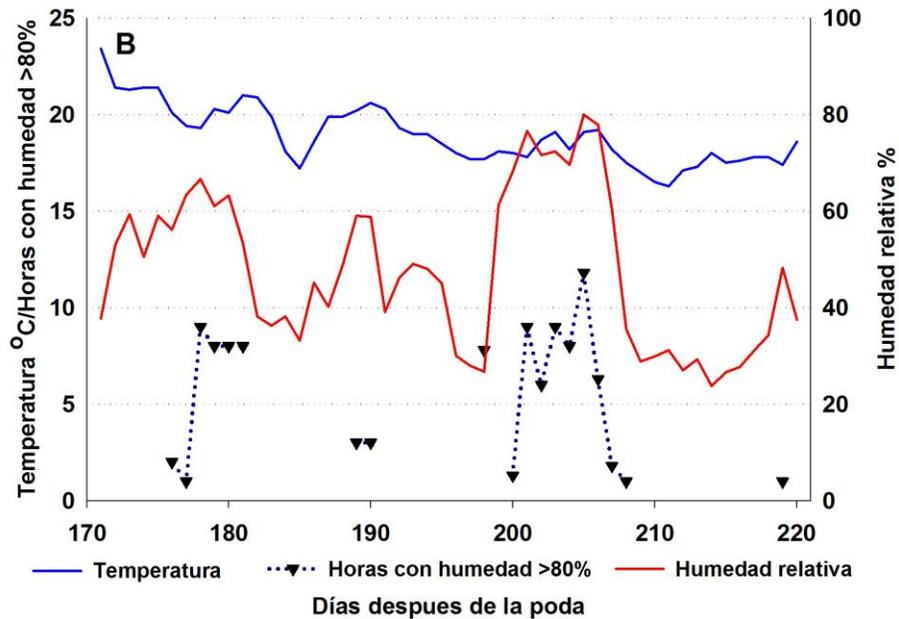
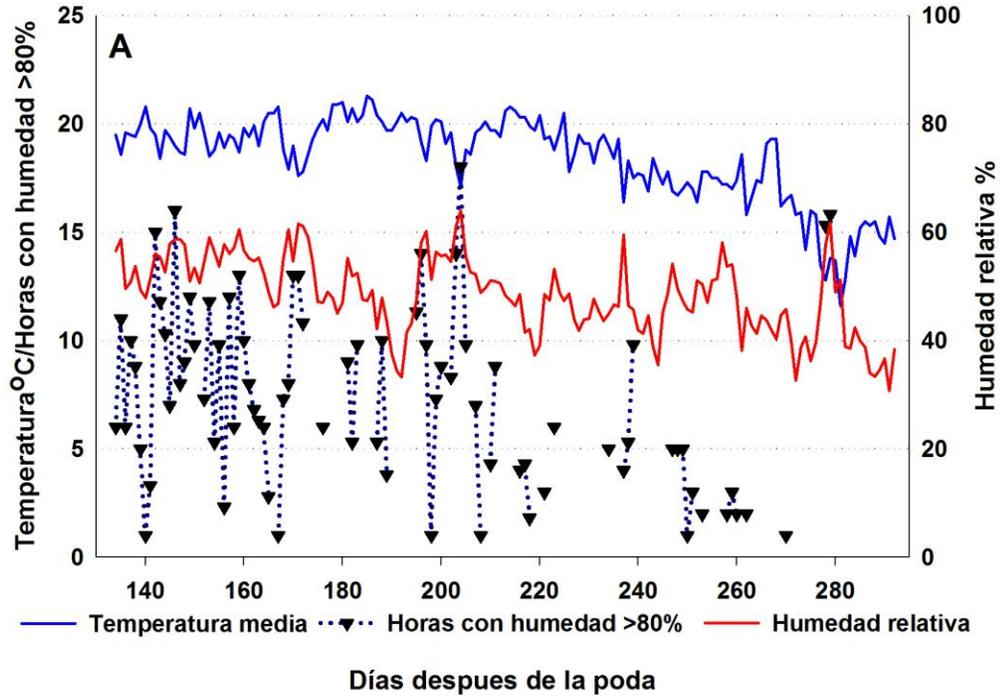
Ciclo	Variable	Modelo	R <sup>2</sup>	CME	Significancia	y <sub>0</sub> (SE)	r (SE)	Ecuación linearizada
2015- 2016	Incidencia	Monomolecular	0.94	0.004	0.005	-1.92±0.47	0.01±0.001	$\ln[1/(1-y)] = \ln[1/(1-y_0)] + r_M t$
		Logistico	0.94	0.007	0.005	-3.30±0.62	0.01±0.002	$\ln[y/(1-y)] = \ln[y_0/(1-y_0)] + r_L t$
		Gompertz	0.94	0.005	0.005	-1.75±0.55	0.01±0.002	$-\ln[-\ln(y)] = -\ln[-\ln(y_0)] + r_G t$
	Severidad	Monomolecular	0.82	0.002	0.03	-0.84±0.36	0.005±0.001	$\ln[1/(1-y)] = \ln[1/(1-y_0)] + r_M t$
		Logistico	0.84	0.01	0.02	-3.85±0.87	0.01±0.003	$\ln[y/(1-y)] = \ln[y_0/(1-y_0)] + r_L t$
		Gompertz	0.99	0.00002	0.01	-0.04±0.01	0.60±0.01	$-\ln[-\ln(y)] = -\ln[-\ln(y_0)] + r_G t$
2016- 2017	Incidencia	Monomolecular	0.69	0.07	0.08	-4.01±2.02	0.02±0.01	$\ln[1/(1-y)] = \ln[1/(1-y_0)] + r_M t$
		Logistico	0.72	0.15	0.06	-7.07±2.80	0.04±0.01	$\ln[y/(1-y)] = \ln[y_0/(1-y_0)] + r_L t$
		Gompertz	0.71	0.10	0.07	-4.60±2.38	0.03±0.01	$-\ln[-\ln(y)] = -\ln[-\ln(y_0)] + r_G t$
	Severidad	Monomolecular	0.92	0.0004	0.01	-0.64±0.14	0.004±0.0007	$\ln[1/(1-y)] = \ln[1/(1-y_0)] + r_M t$
		Logistico	0.90	0.01	0.01	-6.21±0.88	0.02±0.004	$\ln[y/(1-y)] = \ln[y_0/(1-y_0)] + r_L t$
Gompertz	0.91	0.003	0.01	-1.94±0.40	0.01±0.002	$-\ln[-\ln(y)] = -\ln[-\ln(y_0)] + r_G t$		

R<sup>2</sup> = coeficiente de determinación; CME = cuadrado medio del error; y<sub>0</sub> (SE) = enfermedad inicial r (SE) = tasa de incremento de la enfermedad.

Los resultados obtenidos indican una asociación entre la aparición de síntomas y un descenso en la temperatura media de 11 a 20°C en el ciclo 2015-2016 y de entre 16 a 19°C en el ciclo 2016-2017. El número de horas diarias con periodos de humedad arriba del 80% se presentaron principalmente antes de la aparición de los primeros síntomas a los 241 DDP (13/12/2015) en la temporada 1, y fueron más prolongados y frecuentes en comparación de la temporada 2, donde solo fueron significativos entre los 176 a 181 y 200 a 208 DDP, correspondiente a las fechas 19 al 21 de octubre y del 12 al 20 de noviembre del 2016, pero no se observó una relación clara entre la humedad relativa y el progreso de la enfermedad en ambos huertos (Figs. 2A y B). Estas condiciones fueron óptimas para que hubiera formación de rocío durante el desarrollo y madurez de los frutos y la presencia de síntomas. En otros patosistemas Nass *et al.* (2006), encontraron una relación entre la incidencia de la peca amarilla de la caña de azúcar (*Passalora koepkei*) y la presencia de rocío.

Con base en los resultados de los modelos que describen el progreso de la peca de la guayaba a través del tiempo, el modelo Monomolecular describe epidemias monocíclicas, este modelo aplica a epidemias para las cuales no existe dispersión de planta a planta (y en este caso de fruto a fruto), y no hay propagación secundaria en un ciclo de producción (Nutter, 2007). Lo anterior sugiere que la peca de la guayaba en el ciclo 2015-2016 provino de una fuente de inóculo primaria origen de la mayor proporción de las infecciones, evidenciada por la alta incidencia en el segundo tiempo de evaluación. Para el manejo de una enfermedad monocíclica puede reducirse o eliminar el inóculo inicial ( $y_0$ ). Para un hongo cuyos conidios estén en el medio ambiente de manera abundantes y tienen múltiples ciclos de infección (policíclicas) las reducciones del inóculo inicial sólo significan un pequeño retraso en el progreso de la enfermedad (Nutter, 2007; Albajes *et al.*, 1999). Los modelos Logístico y Gompertz son útiles para describir enfermedades policíclicas. Ambos modelos describen epidemias en las cuales la curva de la tasa de incremento de la

enfermedad alcanza un punto máximo y tiende a descender, con la diferencia de que el modelo Gompertz describe puntos de inflexión que descienden más lentamente en comparación con el modelo Logístico (Campbell y Madden, 1990). En términos biológicos, la mayor ABCPE en cuanto a incidencia y severidad, que se presentó en el patosistema de la primera temporada, pudo estar relacionado, entre otros factores, con el periodo sin aplicación de fungicidas, desde el establecimiento del experimento, hasta el inicio de la epidemia (141 d en la temporada 1 y 28 d en la temporada 2 sin aplicación) y durante el desarrollo de la epidemia (48 y 35 d en la temporada 1 y 2 respectivamente), las condiciones climáticas prevalecientes, donde se registraron las temperaturas medias diarias más bajas y el mayor número de horas con humedad arriba del 80%. Así mismo, en ambas temporadas de producción, se presentaron periodos donde la incidencia o severidad disminuyó respecto a evaluaciones anteriores, por lo que la dinámica temporal de este patosistema no siempre mostró continuidad a través del tiempo. Esto se debe a que cada evaluación fue independiente una de otra, ya que los frutos sintomáticos y asintomáticos evaluados (en estado de madurez comercial) fueron removidos del árbol después de cada evaluación por los productores, y, en las siguientes evaluaciones se seleccionaron frutos que anteriormente no presentaban síntomas. Al respecto es necesario realizar estudios enfocados al conocimiento de las fuentes de inóculo primario, patogénesis, y condiciones que favorecen el desarrollo de la enfermedad y su interacción con los componentes de la epidemia.



**Fig. 2.** Progreso de la temperatura media, horas con humedad relativa arriba del 80% y humedad relativa diaria en **A**, en la temporada 1, entre los 134 a 292 días después de la poda (22/08/2015 al 27/01/2016) y **B**, en la temporada 2, entre los 171 a 220 días después de la poda (14/10/2016 al 02/12/2016).

### 3.3.2. Análisis espacial de la peca de la guayaba

**3.3.2.1. Índices de dispersión y análisis de la distribución.** Con base en el índice de dispersión  $D$ , los datos indicaron que a nivel de unidad de muestreo (árbol), la enfermedad presentó un patrón espacial agregado. El ajuste de la distribución de frecuencias del número de frutos enfermos indicó que para el ciclo 2015-2016, fue descrita por la distribución  $\beta$ -Binomial, en todos los tiempos de evaluación. Lo anterior confirma que la incidencia de la enfermedad tiene un comportamiento agregado a nivel de árbol (unidad de muestreo), reflejado por el valor de parámetro  $\theta$ , el cual es una medida de la heterogeneidad de los datos (Cuadro 2). Lo anterior no necesariamente implica que dicha agregación también se dé a gran escala (parcela) (Madden *et al.*, 2007).

El índice de dispersión para la temporada 2016-2017, también indicó que la enfermedad tuvo un patrón espacial agregado a escala de unidad de muestreo (árbol). Sin embargo, debido a que, en este caso, el número de frutos muestreados fue diferente por cada unidad de muestreo, la estimación del índice  $D$ , se basó tomando en cuenta el tamaño de muestra diferente por unidades muestrales, y no se realizó el análisis de la distribución de frecuencias. La estimación del parámetro  $\theta$ , basado en la estimación de momentos se presenta en el Cuadro 3. Como se puede observar, en todos los tiempos, el valor del parámetro fue mayor que 0, indicando agregación a nivel de escala de unidad de muestreo, similar a la temporada anterior.

La distribución  $\beta$ -Binomial, ha sido ampliamente reportada como la más idónea para describir la distribución de la incidencia de diversas enfermedades, porque proporciona la mejor descripción de los datos observados y el mejor ajuste de los resultados obtenidos (Hughes y Madden 1993; Turechek y Madden, 1999; Nita *et al.*, 2012). En enfermedades de otros cultivos con dispersión de inóculo por medio de salpicaduras de otros patógenos, como el tizón de la fresa (*Phomopsis obscurans*) (Turechek y Madden, 1999), la mancha foliar de la fresa

(*Sphaerotheca macularis*) (Turechek y Madden, 2000) y en la enfermedad monicíclica, Phomopsis de la caña y mancha de la hoja de la uva (*Phomopsis viticola*) (Nita *et al.*, 2012) también encontraron el mismo patrón espacial, es decir, a escala pequeña (Planta), agregación, independientemente de que el inóculo de las dos primeras enfermedades tienen un comportamiento policíclico. La descripción estadística para determinar los patrones espaciales de la dispersión de una enfermedad, por si sola, no explica los mecanismos responsables de la dispersión de una enfermedad (Campbell y Madden 1990). Sin embargo, tiene usos muy importantes para diseñar los procedimientos de muestreo de una enfermedad y para un diseño experimental (Hughes y Madden 1993).

**Cuadro 2.** Índice de agregación de la incidencia de peca de la guayaba en la temporada 2015-2016.

DDP	Media	V/M	Patrón Espacial	Media Bin	<i>D</i>	Patrón Espacial	$\rho$ (beta-Bin)	$\theta$ ( $\beta$ -Bin)	Intra-cluster Rho	Likelihood Ratio test	Probabilidad (P) $\chi^2$
226	0.76	2.22	Agregado	0.22	26.31	Agregado	0.26 (0.01)	13.76(10.2)	0.07(0.04)	10.8	P=0.002
241	20.44	3.28	Agregado	0.68	2.41	Agregado	0.70(0.05)	0.40 (0.11)	0.28 (0.06)	189	P<0.000
259	21.44	1.29	Agregado	0.71	4.43	Agregado	0.71 (0.04)	0.17(0.06)	0.14(0.04)	53.0	P<0.000
267	23.28	0.94	Agregado	0.78	4.18	Agregado	0.76(0.03)	0.14 (0.05)	0.12(0.04)	44.0	P<0.000
275	22.44	1.62	Agregado	0.77	4.34	Agregado	0.72(0.05)	0.18 (0.08)	0.20(0.06)	77.4	P<0.000
289	24.44	7.36	Agregado	0.77	14.85	Agregado	0.55 (0.06)	0.70 (0.18)	0.41(0.06)	420.0	P<0.000

DDP = días después de la poda (16/04/2015); V/M = Varianza media observada; *D* = Índice de dispersión;  $\rho$  ( $\beta$ -Binomial) = probabilidad de un fruto de estar enfermo;  $\theta$  ( $\beta$ -Bin) = parámetro de heterogeneidad; Likelihood Ratio test = cociente de probabilidad o razón de verosimilitud.

**Cuadro 3.** Índice de dispersión de la incidencia de la peca de la guayaba en la temporada 2016-2017.

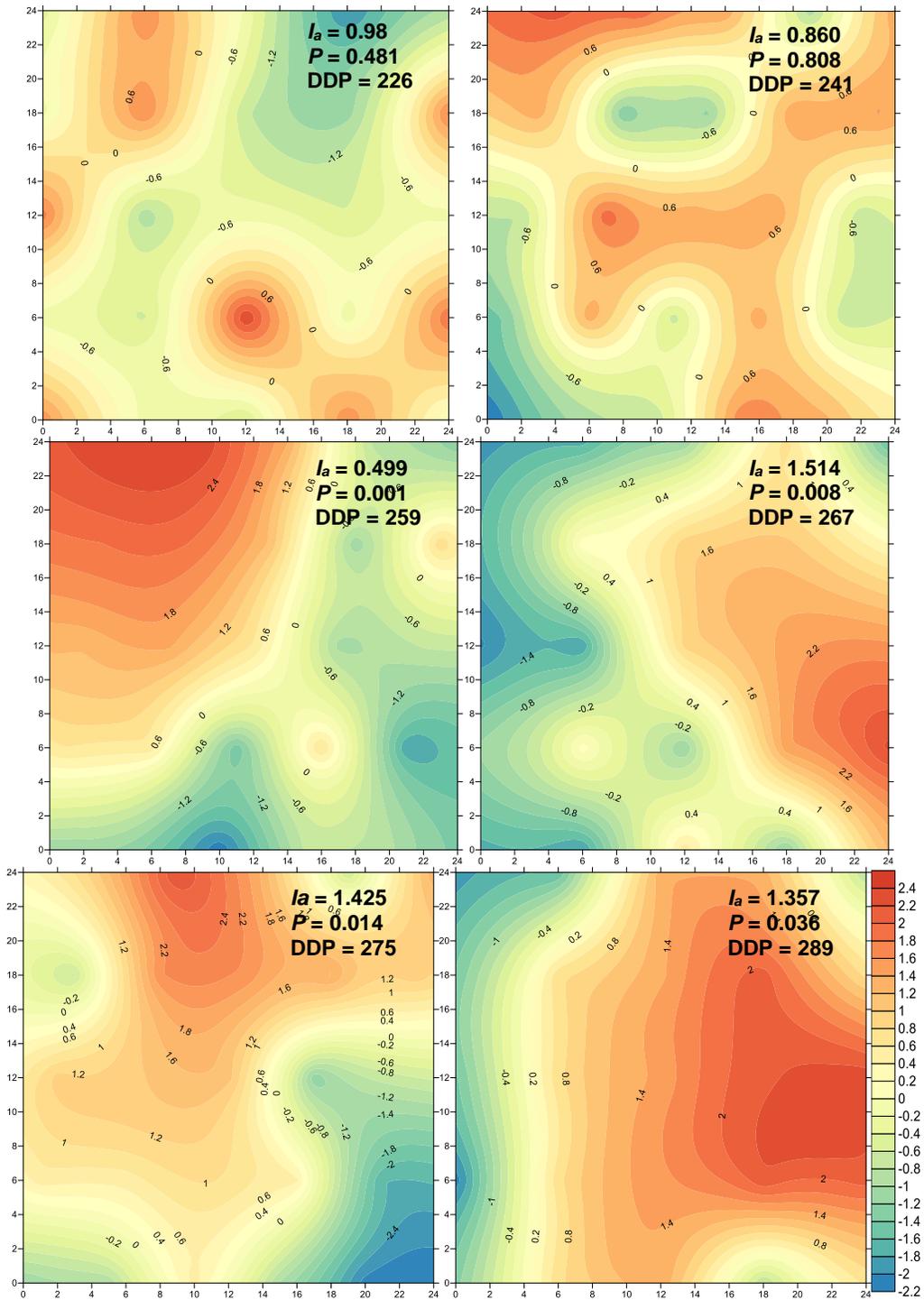
DDP	Varianza (Observ; Prop.)	Media	Varianza Binomial	<i>D</i>	Patrón espacial	$\theta$ ( $\beta$ -Bin)
185	0.028	0.429	0.008	3.5	Agregado	0.09
191	0.028	0.564	0.006	4.6	Agregado	0.10
198	0.030	0.622	0.006	5.0	Agregado	0.11
208	0.061	0.766	0.007	8.7	Agregado	0.46
220	0.035	0.730	0.005	7.0	Agregado	0.48

DDP: días después de la poda (26/04/2016); *D* = Índice de dispersión;  $\theta$  ( $\beta$ -Bin) = parámetro de heterogeneidad.

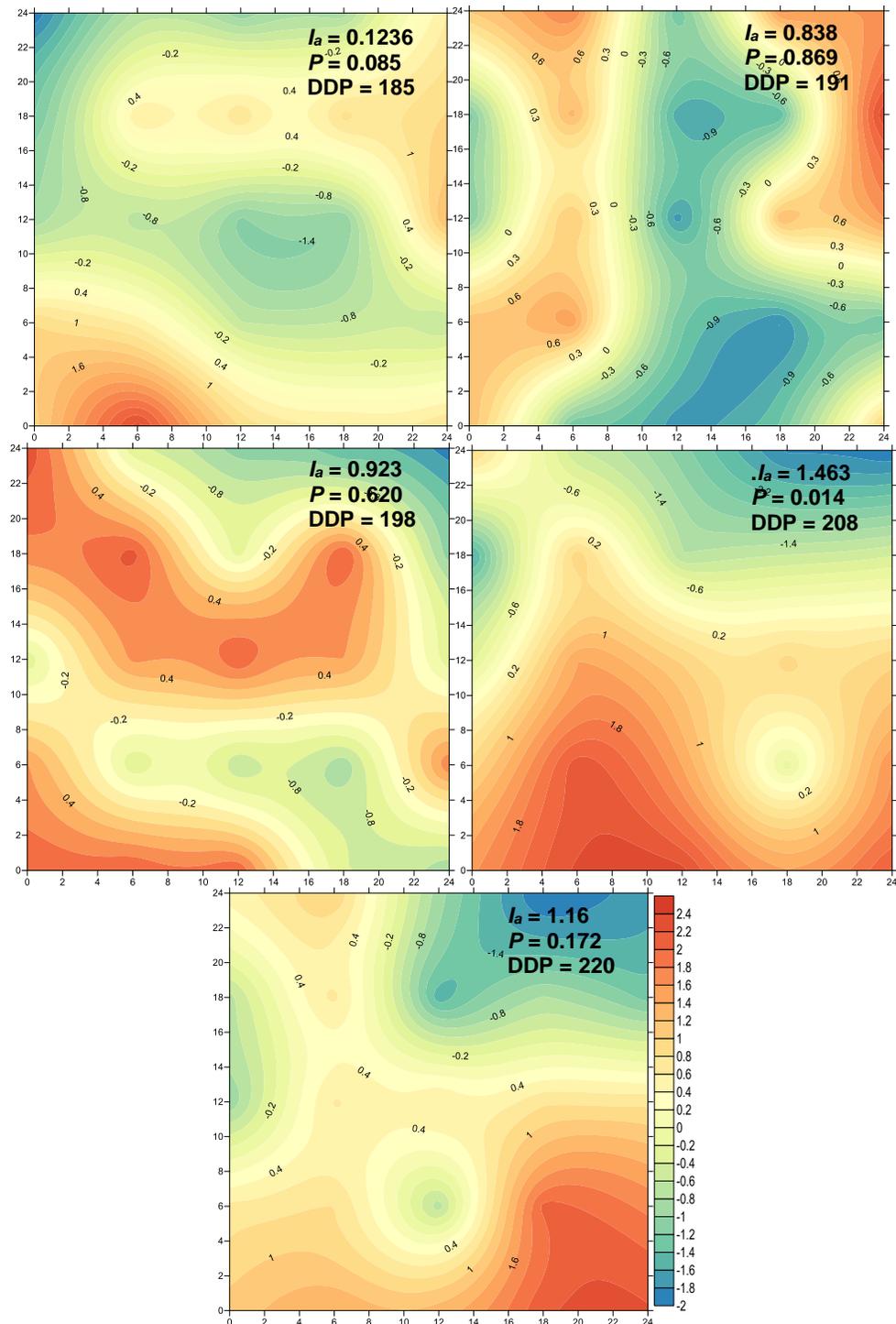
**3.3.2.2. Análisis espacial por índices de distancia (SADIE).** En la temporada 2015-2016, el índice de agregación de la enfermedad determinado por SADIE fue menor que 1 indicando que, al inicio de la enfermedad, hasta la tercera evaluación (259 DDP), correspondiente al 31/12/2015, tuvo un comportamiento cercano a un patrón al azar, seguido por un patrón agregado en las últimas tres evaluaciones (Fig. 3). En la temporada 2016-2017, la enfermedad también tuvo un patrón al azar hasta la tercera evaluación (198 DDP) correspondiente al 10/11/2016. En la cuarta evaluación el patrón espacial cambió hacia agregado, y así se mantiene en la quinta evaluación (Fig. 4). Este comportamiento espacial de la incidencia de la peca, en las dos temporadas de producción indican que la enfermedad inició con un patrón al azar, lo que sugiere que las primeras infecciones surgen del interior de la plantación en cada unidad de muestreo, pues como se observa en el progreso temporal (Fig. 1), las epidemias inician con un alto nivel de incidencia, es decir no hay una acumulación de inóculo que resulte en nuevas infecciones típico en los procesos policíclicos. De hecho, como se observa en la Fig. 1, en la última evaluación el nivel de incidencia se redujo, y en general el incremento de la enfermedad fue significativamente menor a partir de la segunda evaluación. Es probable que esa poca variación del cambio en la tasa absoluta de la enfermedad sea producto de la disponibilidad de inóculo de la misma fuente, y la reducción al final del período a evaluar, sea producto de una reducción en la disponibilidad de inóculo para la infección en los últimos frutos que han madurado. Sin embargo, estas hipótesis deben ser probadas a partir de experimentos específicos.

De acuerdo con estudios espaciales en otros patosistemas, también se ha encontrado que la dependencia espacial no siempre muestra continuidad a través del tiempo, inicialmente, la enfermedad se presenta en agregados y conforme pasa el tiempo y aumenta la enfermedad, el patrón se aleatoriza (Gottwald *et al.*, 1992; Ávila *et al.*, 2012, 2013), contrario a lo que se observó en este estudio, sin embargo, los métodos utilizados para el cálculo de los índices

de agregación no fueron los mismos. En este caso, la metodología SADIE, ha demostrado ser más poderoso que otras pruebas para detectar la no aleatoriedad y se ha utilizado ampliamente y con éxito para describir y cuantificar datos espaciales en la patología vegetal (Turechek y Madden 1999; Xu y Madden, 2005). La mayor parte de análisis desarrollados con la metodología de SADIE en otras enfermedades, ha revelado que la mayoría de los conjuntos de datos exhiben patrones al azar (Turechek y Madden, 1999; Dallot *et al.*, 2003; Xu y Madden, 2004; Nita *et al.*, 2012). Nuestros datos exhiben un patrón inicial al azar y en las últimas evaluaciones en agregados. Con base en lo anterior, se podría argumentar que no existe infección de árbol a árbol, ya que no se observó que la enfermedad se dispersara desde los primeros focos de infección a árboles vecinos en ambos ciclos de producción. La aparición de la enfermedad en nuevos sitios se podría relacionar con los frutos caídos en estado de descomposición, ya que estos pudieran tener mayor influencia en la dispersión del inóculo, en comparación con los frutos enfermos que se encuentran en el árbol, y que estos sean la fuente de inóculo primario para la siguiente temporada. Esto debido a que en los frutos tirados pueden permanecer por un tiempo prolongado en suelo con condiciones favorables, mientras que los frutos sintomáticos o asintomáticos en el árbol son cosechados en un lapso entre 3 a 7 días después de que alcanzan la madurez fisiológica, cuando aún no alcanzan a desarrollarse estructuras fungosas en ellos.



**Fig. 3.** Mapas interpolativos de los índices locales de agregación con base en el Análisis Espacial por Índices de Distancia (SADIE) en seis tiempos de evaluación de la incidencia de la peca de la guayaba en la temporada de producción 2015-2016. Los índices de agregación ( $I_a$ ), el valor de la probabilidad ( $P$ ) y días después de la poda (16/04/2015) (DDP) se incluyen en el interior de la gráfica.



**Fig. 4.** Mapas interpolativos de los índices locales de agregación con base en el Análisis Espacial por Índices de Distancia (SADIE) en cinco tiempos de evaluación (Eval.) de la incidencia de la peca de la guayaba en la temporada de producción 2016-2017. Los índices de agregación ( $I_a$ ), el valor de la probabilidad ( $P$ ) y días después de la poda (26/04/2016) (DDP) se incluyen en el interior de la gráfica.

En resumen, este estudio evidencia que las epidemias de la peca de la guayaba en el oriente de Michoacán, se presenta a escala pequeña (árbol), en forma agregada, es decir, se presenta gran variación del nivel de incidencia en los árboles muestreados. Al considerar la distribución espacial a nivel de parcela, los datos indicaron que la enfermedad se origina al azar (el mismo nivel de probabilidad que la enfermedad se presente en un sitio u otro), con niveles de incidencia entre 40 a 60% en la primera evaluación de frutos maduros, lo que sugiere la existencia de una fuente de inóculo primario en el interior de la parcela (probablemente frutos caídos o residuos de poda y cosecha). Después de la ocurrencia de este alto nivel de incidencia, la misma se mantiene en niveles que varían entre 60 y 80%, e incluso en la temporada 2016-2017, tendió a bajar en la última evaluación. Estos resultados sugieren la ocurrencia de un proceso monocíclico producto de la existencia de estructuras fungosas de supervivencia en residuos, que bajo condiciones ambientales favorables dan origen a estructuras infectivas que resultan en un alto nivel de incidencia que se manifiesta en los frutos maduros de guayaba. Aunque las hipótesis anteriores deberán ser probadas en futuros trabajos, estos estudios indican que las prácticas culturales dirigidas a la reducción del inóculo inicial y su eficiencia en etapas tempranas en el desarrollo de fruto, combinada con aplicaciones de fungicidas químicos y biológicos permitidos, es una práctica altamente recomendada para el manejo de la enfermedad. Con base en los resultados obtenidos en el comportamiento epidémico de la enfermedad, las estrategias de manejo deben dirigirse a la reducción del inóculo inicial, y su eficiencia antes de la aparición de síntomas, es decir desde frutos inmaduros (2.5 a 3 cm de diámetro ecuatorial) a fin de prevenir pérdidas económicas. Al respecto, Flores-González *et al.* (2013) y Rebollar-Alviter *et al.* (2014) demostraron que es factible manejar la enfermedad, si las aplicaciones de fungicidas químicos, biológicos y activadores de resistencia se aplican en frutos en desarrollo (2.5 a 3 cm de diámetro).

### **3.4. CONCLUSIONES**

La epidemia de la peca de la guayaba se ajustó principalmente al modelo Monomolecular. Este modelo es útil para describir epidemias monocíclicas.

Antes de la aparición de los síntomas de peca fueron más frecuentes y prolongados los periodos diarios con humedad arriba del 80%. Los síntomas de peca se presentaron cuando la temperatura media diaria fue menor a 20°C y hubo presencia de rocío.

La enfermedad de la peca de la guayaba se desarrolló de manera agregada dentro de cada árbol, lo que indica que los síntomas de incidencia se concentraron en frutos ubicados en ciertas zonas específicas del árbol más que en otras.

A nivel parcela el progreso espacial de la enfermedad tuvo un comportamiento al azar en las primeras evaluaciones y posteriormente se formaron agregados.

### 3.5. LITERATURA CITADA

- Albajes, R., Lodovica, G. M., Van Lenteren, J. C., and Elad, Y. 1999. Integrated pest and disease management in greenhouse crops. Developments in Plant Pathology Series. Kluwer Academic Publishers. pp.1-507.
- Ávila, Q. G. D., Téliz, O. D. González, H. H., Tijerina, C. L., Johansen, N. R., Mojica, G. A., y Vaquera, H. H. 2002. Dinámica espacio-temporal de la roña (*Elsinoe perseae*), el daño asociado a trips y antracnosis (*Glomerella cingulata*) del aguacate en Michoacán, México. Revista Mexicana de Fitopatología. 20:77-87.
- Ávila, Q. G. D.; Tijerina, C. L. Mora, A. G., Vaquera H. H., and Téliz, O. D. 2003. Spatial and temporal dynamic of scab (*Sphaceloma perseae* Jenk.) on avocado (*Persea americana* Mill). Revista Mexicana de Fitopatología. 21:152-160.
- Burgess, T. I., Barber, P. A., Sufaati, S., Xu, D., Hardy, G. E. St. J., and Dell, B. 2007. *Mycosphaerella* spp. on *Eucalyptus* in Asia; new species, new hosts and new records. Fungal Diversity. 24:135-157.
- Carisse, O., Savary, S., and Willocquet, L. 2008. Spatiotemporal relationships between disease development and airborne inoculum in unmanaged and managed Botrytis leaf blight epidemics. Phytopathology. 98:38-44.
- Crous, P. W. 1998. *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs associated with leaf spot diseases of *Eucalyptus*. Mycological Memoir. 21:1-170.
- Campbell, C. L., and Madden, L. V. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley & Sons, New York, NY, USA.
- Crous, W. P. 1999. Species of *Mycosphaerella* and related anamorphs occurring on *Myrtaceae* (excluding *Eucalyptus*). Mycological Research. 103:607-621.
- Crous, P. W., Braun, U., and Groenewald, J. Z. 2007a. *Mycosphaerella* is polyphyletic. Studies in Mycology. 58:1-32.
- Crous, P. W., Mohammed, C., Glen, M., Verkley, G. J. M., and Groenewald, J. Z. 2007b. *Eucalyptus* microfungi known from culture. 3. *Eucasphaeria* and *Symptoventuria* genera nova, and new species of *Furcaspora*, *Harknessia*, *Heteroconium* and *Phacidiella*. Fungal Diversity. 25:19-36
- Crous, P. W., Summerell, B. A., Carnegie, A. J., Mohammed, C., Himaman, W., and Groenewald, J. Z. 2007c. Foliicolous *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs on *Corymbia* and *Eucalyptus*. Fungal Diversity. 26:143-185.

- Crous, P. W., Summerell, B. A., Mostert, L., and Groenewald, J. Z. 2008a. Host specificity and speciation of *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* species associated with leaf spots of *Proteaceae*. *Persoonia*. 20:59-86.
- Crous, P. W., Wingfield, M. J., and Groenewald, J. Z. 2009a. Niche sharing reflects a poorly understood biodiversity phenomenon. *Persoonia*. 22:83-94.
- Crous, P. W., Wood, A. R., Okada, G., and Groenewald, J. Z. 2008b. Foliicolous microfungi occurring on *Encephalartos*. *Persoonia*. 21:135-146.
- Dallot, S., Gottwald, T., Labonne, G., and Quiot, J. B. 2003. Spatial pattern analysis of Sharka disease (Plum pox virus strain M) in peach orchards of southern France. *Phytopathology* 93:1543-1552.
- Flores-González, E. 2012. Estrategias de manejo de la peca de la guayaba en el Oriente de Michoacán. Tesis Licenciatura. Instituto Tecnológico del Valle de Morelia. Morelia, México.
- Flores-González, E., Rebollar-Alviter, A., Castro, S. R., y Castillo, P. M. R. 2015. Distribución geográfica y estimación de pérdidas por la peca de la guayaba en el Oriente de Michoacán. Suplemento de la Revista Mexicana de Fitopatología. 33:118.
- Flores-González, E., Rebollar-Alviter, A., Volke H. V. H., Silva-Rojas, H. V., Peña, O. C. S., y Espinoza, Q. G. 2013. Estrategias de manejo de la peca de la guayaba en el oriente de Michoacán. Suplemento Revista Mexicana de Fitopatología. 31:84.
- Gottwald, T. R., Reynolds, K. M., Campbell, C. L., and Timmer, L. W. 1992. Spatial and spatio temporal autocorrelation analysis of citrus canker epidemics in citrus nurseries and groves in Argentina. *Phytopathology*. 82:843-851.
- Hughes, G., and Madden, L. V. 1993. Using the Beta-Binomial distribution to describe aggregated patterns of disease incidence. *Phytopathology*. 83:759-763.
- Madden, L. V. 2006. Botanical epidemiology: some key advances and its continuing role in disease management. *European Journal of Plant Pathology*. 115:3-23.
- Madden, L. V., Hughes, G., and Van den Bosch F. 2007. The study of plant disease epidemics, APS Press, St. Paul.

- Mendoza, L. M. R., Luis, A. A., Castillo, O. S. F. y Vidales, F. I., 2005. Diagnóstico del manejo actual del cultivo de guayaba en la Región Oriente de Michoacán. Publicación especial número 1. INIFAP. Uruapan, Michoacán, México. pp 6-38.
- Nass, H. A, Ramón, M, Rodríguez, H. A, Niño, M, y George, J. R. 2006. Aspectos epidemiológicos de la peca amarilla de la Caña de Azúcar (*Passalora koepkei*) en Yaritagua, Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía. 23:181-187.
- Nita, M., Ellis, M. A., and Madden, L. V. 2012. Spatial pattern of Phomopsis Cane and Leaf Spot symptoms in commercial vineyards in Ohio. Journal of Phytopathology. 160: 26-36.
- Nutter, F. W. 2007. The role of plant disease epidemiology in developing successful integrated disease. En Ciancio, A., y Mukerji K. G. Management Programs General Concepts in Integrated Pest and Disease Management. Springer. pp.45-79
- Park, R. F. 1988a. Epidemiology of *Mycosphaerella nubilosa* and *M. cryptica* on *Eucalyptus* spp. in South-eastern Australia. Transactions of the British Mycological Society. 91:261-266.
- Park, R. F. 1988b. Effect of certain host, inoculum, and environmental factors on infection of *Eucalyptus* species by two *Mycosphaerella* species. Transactions of the British Mycological Society. 90:221-228.
- Park, R. F., and Keane, P. J. 1982a. Three *Mycosphaerella* species from leaf diseases of *Eucalyptus*. Transactions of the British Mycological Society. 79:95-100.
- Park, R. F., and Keane, P. J. 1982b. Leaf diseases of *Eucalyptus* associated with *Mycosphaerella* species. Transactions of the British Mycological Society. 79:101–115.
- Perry, J. N. 1998. Measures of spatial pattern for counts. Ecology 79:1008-1017.
- Quero, J. L. 2006. SADIE como herramienta de cuantificación de la heterogeneidad espacial: casos prácticos en el Parque Nacional de Sierra Nevada (Granada, España). Ecosistemas. 15:40-47.
- Rebollar-Alviter, A., Flores-González, E., Volke, H. V. H., and Silva-Rojas, H. V. 2014. Management strategies, associated fungi and intensity of guava speck in Michoacán, Mexico. 50th Annual Meeting Caribbean Food Crops Society and APS Caribbean Division. Virgin Islands USA. 90 p.

- Sangerman, J. D. M., Larqué, S. B. S., Navarro, B. A., Schwentesius, de R. R., Nieto, M. C., y Cuevas, S. J. A. 2011. Estudio de mercado de aguacate, guayaba y durazno en el Distrito Federal, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2:925-938.
- SIAP. 2016. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Revisado el 19/01/2016. <http://www.siap.gob.mx/>.
- Turechek, W. W., and Madden, L. V. 1999. Spatial pattern analysis of strawberry leaf blight in perennial production systems. *Phytopathology*. 89:421-433.
- Turechek, W. W., and Madden, L. V. 2000. Analysis of the association between the incidence of two spatially aggregated foliar diseases of strawberry. *Phytopathology*. 90:157-170.
- Volke, H. V. H., Camacho, B. P, Sánchez, G. A., Rebollar-Alviter, A., y Ruiz F. R. 2012. Manual de producción de guayaba en la region oriente de estado de Michoacán. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. Mexico. 105 p.
- Xu, X. M. and Madden, L. V. 2004. Use of SADIE statistics to study spatial dynamics of plant disease epidemics. *Plant Pathology*. 53:38-49.
- Xu, X. M., and Madden, L. V. 2005. Interrelationships among SADIE indices for characterizing spatial patterns of organisms. *Phytopathology*. 95:874-883.
- Yam, T. J. A., Villaseñor, P. C. A., Romantchik, K. E., Soto, E. M., y Peña, P. M. A. 2010. Una revisión sobre la importancia del fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.) y sus principales características en la postcosecha. *Revista de Ciencias Técnicas Agropecuarias*. 19:74-82.